

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

INFORME FINAL DE TESIS:



**RESPUESTA DEL IZOTE PONY (*Beaucarnea recurvata* R.) A LA
PROPAGACION *in vitro* UTILIZANDO TEJIDO DE SEMILLA
BOTÁNICA COMO EXPLANTE**

POR

**BYRON ENRIQUE ALVARADO LÓPEZ
9240006**

GUATEMALA, FEBRERO DE 2,004.

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**RESPUESTA DEL IZOTE PONY (*Beaucarnea recurvata* R.) A LA
PROPAGACIÓN *in vitro* UTILIZANDO TEJIDO DE SEMILLA
BOTÁNICA COMO EXPLANTE.**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

BYRON ENRIQUE ALVARADO LOPEZ

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

En el grado académico de

LICENCIADO

Guatemala, Febrero de 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE
AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

RESPUESTA DEL IZONTE PNY *Beaucarnea recurvata* A LA REPRODUCCIÓN *IN VITRO*, CON EXPLANTES PROVENIENTES DE SEMILLA BOTÁNICA.

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DELA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUTEMALA

POR

BYRON ENRIQUE ALVARADO LOPEZ

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMA DE PRODUCCIÓN AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, FEBRERO 2004

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS	Con oraciones y agradecimiento infinito.
MIS PDRES	AURA LUZ LOPEZ HERRARTE DE ALVARADO LUIS ENRIQUE ALVARADO ALARCÓN Por los esfuerzos, sacrificios y paciencia que me dieron para salir adelante. Mi más grande admiración.
MI HERMANO	LUIS HAROLDO ALVARADO LOPEZ Por todo el apoyo incondicional que siempre a mostrado hacia mi persona.
A MI HIJO	KEVYN DANIEL ALVARADO U. Para dejarle un ejemplo a seguir en el camino largo de la vida.
A MI ESPOSA	AMARILLYS URIZAR QUEZADA Por el apoyo y paciencia que me brinda incondicionalmente
A MIS SUEGROS	MARTA ALICIA QUEZADA AUGUSTO URIZAR
A MIS AMIGOS	Por la amistad incondicional que me brindan

TESIS QUE DEDICO

A:

MI HIJO

KEVYN DANIEL ALVARADO URIZAR
Por ser la razón de mi vida.

MIS PADRES

AURA LUZ LOPEZ DE ALVARADO
LUIS ENRIQUE ALVARADO ALRCON

A MI PAIS

GUATEMALA

A MI FACULTAD

AGRONOMIA

A LA UNIVERSIDAD

SAN CARLOS DE GUATEMALA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente

A:

Sra. Marta Alicia Quezada de Urizar
Por su insistencia y apoyo incondicional.

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez
Ing. Agr. Héctor Sagastume
Por su orientación, asesoría y paciencia para la realización de el
presente trabajo.

Ing. Agr. Edil Rodríguez
Por el apoyo incondicional.

Ing. Agr. Edin Orozco
Por su amistad, apoyo y Buenos consejos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la
realización de esta investigación.

*RESPUESTA DEL IZOTE PONY (Beaucarnea recurvata R.) A LA
PROPAGACIÓN in vitro UTILIZANDO TEJIDO DE SEMILLA
BOTÁNICA COMO EXPLANTE.*

**BYRON ENRIQUE ALVARADO LOPEZ
9240006**

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE CUADROS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	3
III. MARCO TEORICO	5
3.1 MARCO CONCEPTUAL	5
3.1.1 Izote Pony	5
3.1.1.1 Clasificación Taxonómica	5
3.1.1.2 Descripción Morfológica	5
3.1.1.3 Distribución geográfica	6
3.1.1.4 Importancia económica	6
3.1.2 Micropropagación	7
3.1.2.1 Definición de Cultivo de Tejidos	8
3.1.2.2 Explante	8
3.1.2.3 Tamaño del Explante	9
3.1.2.4 Asepsia del Explante	10
3.1.2.5 Medio de Cultivo	10
3.1.2.6 Componentes del medio de cultivo	11
3.1.3 Reguladores de crecimiento	11
3.1.3.1 Auxinas	12
3.1.3.1.1 Ácido Indolbutirico (AIB)	13
3.1.3.1.2 Efecto de las auxinas	13
3.1.3.1.3 Biosíntesis de las auxinas	14
3.1.3.1.4 Mecanismo de acción de las Auxinas	15
3.1.3.2 Ácido Giberélico	15
3.1.3.2.1 Efecto de las Giberelinas	17
3.1.3.3 Efecto de las citocininas	18
3.1.3.4 Interacción Auxina-Citocinina	19
IV. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GENERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
V. HIPÓTESIS	22
VI. METODOLOGÍA	23
6.1 Localización del experimento	23
6.2 Manejo del experimento	23
6.2.1. Preparación del medio de germinación	23
6.2.1.1 Elaboración de medios de cultivo	23
6.2.1.2 Procedimiento de desinfección	24
6.2.1.3 Siembra de la semilla	24
6.2.1.4 Incubación de los cultivos	24
6.2.2 Fases de la investigación	25

6.2.2.1	Fase de inducción de brotes	25
6.2.2.2	Fase de enraizamiento de brotes	25
6.3	Variables respuestas	25
6.3.1	Fase de Inducción de brotes	25
6.3.1.1	Longitud de brotes	25
6.3.1.2	Número de brotes	25
6.3.2	Fase de enraizamiento de brotes	26
6.3.2.1	Número de raíces	26
6.3.2.2	Longitud de raíces	26
6.3.2.3	Peso seco de raíz	26
6.4	Diseño experimental	26
6.4.1	Unidad experimental	28
6.5	Análisis de la información	28
6.6	Presentación de los resultados	28
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1	Germinación de semillas de pony <i>in vitro</i>	29
7.1.2	Análisis de la producción de brotes <i>in vitro</i>	31
7.1.3	Análisis de Enraizamiento	33
7.1.4	Análisis peso seco de raíz	34
7.1.5	Análisis longitud de raíz	35
VIII.	CONCLUSIONES	41
IX.	RECOMENDACIONES	42
X.	BIBLIOGRAFÍA	43
XI	ANEXOS	45

INDICE CUADROS

CONTENIDO	PAGINA
1 Ventajas y desventajas de la reproducción <i>in vitro</i> para la Reproducción de Pony.	7
2 Distribución de niveles de reguladores de crecimiento utilizados en la fase de inducción de brotes de Izote Pony.	26
3 Distribución de tratamientos de la fase de enraizamiento.	27
4 Resultados obtenidos en el laboratorio del ICTA, Amatitlan 2002	29
5 Resultados del análisis de varianza para la variable germinación de semillas <i>in vitro</i> , ICTA 2000	29
6 Comparación de medidas Tukey ($p \leq 0.05$), para la variable semillas de izote pony germinadas <i>in vitro</i> .	31
7 Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la regeneración de plántulas y formación de hojas de <i>Beaucarnea recurvata</i> a las 7 semanas del cultivo	32
8 Análisis de varianza para la variable número de plantas <i>in vitro</i> , ICTA 2002.	33
9 Caracteres de raíces de plántulas de izote pony con diferentes concentraciones de ANA <i>in vitro</i> , ICTA 2002	34
10 Análisis de varianza para la variable pesos seco de raíces en la producción <i>in vitro</i> , del izote pony.	35
11 Comparación de medidas Tukey ($p \leq 0.05$) para la variable peso seco de raíz de izote pony <i>in vitro</i> , con la adición de diferentes combinaciones de ANA, con un alfa 0.05%.	35
12 Análisis de varianza para la variable longitud de raíces, en la Producción <i>in vitro</i> , del izote pony.	36
13 Comparación de medidas Tukey ($p \leq 0.05$) para la variable longitud de raíz de izote pony <i>in vitro</i> , con la adición de diferentes combinaciones de ANA, con un alfa 0.05%.	36
14 Precios unitarios de los insumos, cantidades y costos de producción de Pony <i>in vitro</i> , ICTA, 2002.	39
15 Diferencias de los costos parciales, entre lo convencional y lo obtenido en el laboratorio.	37

16	Requerimiento del medio de cultivo basal de MS	46
17	Procedimiento para la preparación de soluciones concentradas para el MS.	47

INDICE FIGURAS

CONTENIDO	PAGINA
1. estructura molecular ácido 3 indolacético (IAA)	12
2. Estructura molecular ácido Giberelico (GA ₃)	17
3. Estructura molecular de las Citocinas	19
4. Respuesta al enraizamiento de plántulas de izote pony.	38

I. INTRODUCCIÓN

En Guatemala el cultivo del izote pony (*Beaucarnea recurvata* R.) contribuye al ingreso de divisas, pues ha cobrado gran importancia por la gran demanda y alto precio que tiene a nivel internacional. Su producción se exporta a diferentes países, especialmente del mercado europeo, en donde se somete a un proceso de extracción; de sus aceites y resinas, o simplemente se utiliza como planta ornamental.

El izote pony, es un recurso fitogenético de gran valor económico en nuestro país, y hoy se cataloga como un importante producto no tradicional de exportación, dentro del rubro de las plantas ornamentales y específicamente en el área de los follajes, tanto por los volúmenes que se exportan como por los precios que alcanza en el mercado internacional (15).

A inicios de la década de los 80's, en Guatemala se principia a manejar la exportación de izote pony como planta ornamental, y es en esa misma época que se generan las primeras técnicas para darle al producto las características que lo hacen atractivo a los ojos de los consumidores, al igual que se consiguen plantas de buena calidad y sanidad.

El comercio de esta especie cobra importancia en un principio en la parte norte del país, luego se establecen centros de acopio en la región nor-oriental, por los precios favorables que se estaban obteniendo por pulgada cuadrada del bulbo, y porque los pobladores locales la obtenían de forma silvestre y sin darle ningún tipo de manejo. Sin embargo, es de suponer que las poblaciones silvestres sin manejo no son sostenibles a largo plazo por lo que luego surgieron plantaciones. Han existido fluctuaciones en el mercado pero a partir de 1998 la demanda se ha incrementado, siendo Holanda el principal mercado.

Actualmente salen del puerto Santo Tomás de Castilla 4 contenedores diarios; cada pulgada lineal se paga a 2.05 dólares, y tallos los ramificados 4 dólares la planta, con lo que generan divisas para el país(17).

El presente estudio evaluó el efecto de tres concentraciones diferentes de BAP (*bencilaminopurina*) y GA₃ (*ácido giberélico*) a partir de plántulas originadas por semilla botánica. Basados en la investigación realizada por Samyn en 1993, donde logró brotes aplicando 0.5 mg/l de BAP (*bencilaminopurina*) (10). Para el enraizamiento se evaluaron tres concentraciones de ANA (*ácido naftalenacético*) basado en la investigación de Lepoivre en 1977 (2). Encontrándose que los diferentes tratamientos evaluados producen brotes y enraizamiento.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El izote pony (*Beaucarnea recurvata*) es una especie endémica en peligro de extinción, debido a extracción y exportación en altos volúmenes. Además de esto en su reproducción se tienen problemas de baja germinación y contaminación por patógenos de las nuevas plántulas.

En las plantas de pony se presenta la dificultad de obtener semilla con buen porcentaje de germinación, según productores de semilla el porcentaje de germinación esta entre 40% y 50%. Por otro lado, los productores de semilleros tienen el problema, de desconocer el origen y pureza de la semilla.

Las plantas utilizadas para la producción de pony para exportación provienen generalmente de plantas encontradas en forma silvestre o en su defecto de una reproducción asexual del material, ya sea por hijuelos o por estacas. Si la nueva planta proviene de una planta con una enfermedad no visible en ese momento, los síntomas se pueden presentar posteriormente, provocando el rechazo de estas, y con esto se esta afectando el rendimiento normal.

Otro problema que aqueja a este cultivo es la dificultad de adquirir semilla pues la recolección se realiza una vez al año, y su demanda es alta, además, su costo es elevado, llegando a un precio de Q.150.00 por libra, muchas veces sólo se vende a los asociados de las diferentes cooperativas. Además como ya se señalo, el porcentaje de germinación esta por debajo de el 50% lo que hace más difícil su reproducción masiva, ya que necesita de una gran cantidad de semilla (20,000 semillas aproximadamente por manzana.), para producir una cantidad considerable de plantas sanas para el trasplante.

Por esta razón se debe hacer uso de técnicas, de reproducción masiva que aseguren una cantidad adecuada de plantas y con la calidad requerida.

El cultivo *in vitro* podría ayudar en la solución de estos problemas, ya que se propagaría las plantas en forma masiva y de mejor calidad y sanidad, ya que por esta técnica se propaga el tejido de las plantas en un ambiente aséptico, con un medio elaborado con nutrientes y en las condiciones favorables para que el mismo se desarrolle y forme una planta con todas las características de su progenitora y libre de enfermedades que afecten su desarrollo.

Por lo anterior en el presente trabajo se pretende producir plantas sanas y de buena calidad a través de la micropropagación, ya que de esta manera se producirán masivamente plántulas a partir de semillas que han sido seleccionadas de plantas madres sanas.

III. MARCO TEÒRICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1. IZOTE PONY

3.1.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino	Plantae
Subreino	Embryobionta
División	Magnoliphyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Lillidae
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<u><i>Beaucarnea</i></u>
Especie	<i>B. recurvata</i> Rose.

3.1.1.2. Descripción Morfológica

Se considera que las plantas pertenecientes a esta especie son árboles pequeños con tallos altos, limpios, con la base gruesamente bulbosa, poco ramificados y estas pocas ramas son densamente frondosas en los extremos; con alturas que van de los 3 a 12 m, y con diámetros comprendidos entre los 0.20-0.45 m. Pero las plantas pequeñas son ideales como especies de interiores, ya que debido a su lento crecimiento, mantienen un tamaño conveniente por muchos años (11). Poseen hojas relativamente delgadas con longitudes que alcanzan algunas veces un metro o menos; teniendo de 2 –3 cm de ancho, con los bordes lisos o rugosos, siendo la superficie de las hojas ásperas al tacto (11).

Las flores se encuentran agrupadas en panículas ovoides alargadas, abundantemente ramificadas, siendo las ramificaciones de las panículas de 30 cm de longitud, teniendo las flores un perianto segmentado aproximadamente de 3 mm de largo; fruto elíptico y ovado de 15-18 mm de longitud y 13 – 15 mm de ancho, marginado en la base y el ápice, semillas de 5 mm de diámetro, irregularmente trilobados y lisos.

3.1.1.3. Especies y su distribución geográfica

Standley (11), señala que son conocidas cerca de 9 especies de plantas pertenecientes al género *Beaucarnea*, distribuidas tanto en Guatemala como en México. Este autor reporta tres especies para Guatemala: *Ameliae* Lundel, *guatemalensis* Rose, y *Petenensis* Lundell, aunque existen dudas en cuando a que *ameliae* sea distinta a *petenensis*.

Todos los miembros de este género son endémicos y se encuentran distribuidos en forma natural en los departamentos de El Petén, Alta y Baja Verapaz, Huehuetenango, Jalapa y Chiquimula (11). Pero a partir del inicio del proceso de exportación de esta planta, ya se cultiva en la mayor parte de la República.

3.1.1.4. Importancia económica

El izote pony ha tenido un gran impacto entre lo que se ha denominado follajes para interiores esto ha incidido en forma directa en los volúmenes de este producto que han sido exportados.

3.1.2 MICROPROPAGACIÓN

Originalmente, la micropropagación se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal, que es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* (7).

3.1.2.1 DEFINICIÓN DE CULTIVO DE TEJIDOS

Para Aguilar (1) y Villalobos (14) el cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con métodos biotecnológicos y ofrece la oportunidad de reducir el tiempo requerido para la producción de variedades mejoradas. En la mayoría de los cultivos de importancia económica se necesita de siete a diez años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras en cultivo de tejidos las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de reducción del tiempo y volúmenes de siembra en campo requeridos por los métodos convencionales.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerá del objetivo perseguido. La respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad

para el logro de un objetivo propuesto. Es necesario recalcar que, para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras (1)(14).

3.1.2.2. EXPLANTE

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (8). Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos (8).

Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de los frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados. El establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos pueden limitar aún más la elección del tipo de explante (8).

3.1.2.3 TAMAÑO DEL EXPLANTE

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables.

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores están la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernaderos o campo. Otro factor sería los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos (12).

Según Villalobos (1982) (14), el tamaño del explante no tiene mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemos (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas.

3.1.2.4 ASEPSIA DEL EXPLANTE

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación (8).

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra. Para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) realizar cultivos respetando ciertas normas de asepsia (8).

3.1.2.5 MEDIO DE CULTIVO

Hurtado y Merino (5) y Villalobos (14) indican que el éxito del cultivo de tejidos de plantas, está influenciado por la composición de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias y las condiciones apropiadas de nutrientes así como su forma química adecuada se ha establecido cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Villalobos (14) indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macro nutrientes lo son: las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, cobre, molibdeno y cobalto. Un medio de cultivo contiene estos elementos y carbohidratos, normalmente sacarosa, este último compuesto sirve para reemplazar el carbono que la planta normalmente fija por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades tales como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento.

3.1.2.6 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene 15 y 35 compuestos químicos que suministran (8):

- a) Agua (agua de intercambio iónico destilada)
- b) Sales inorgánicas (macro nutrientes y micro nutrientes)
- c) Fuentes de Carbono
- d) Vitaminas
- e) Agente Gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- f) Sustancias reguladoras del crecimiento
- g) pH (exponente del ión hidrógeno)
- h) Otros compuestos

3.1.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO

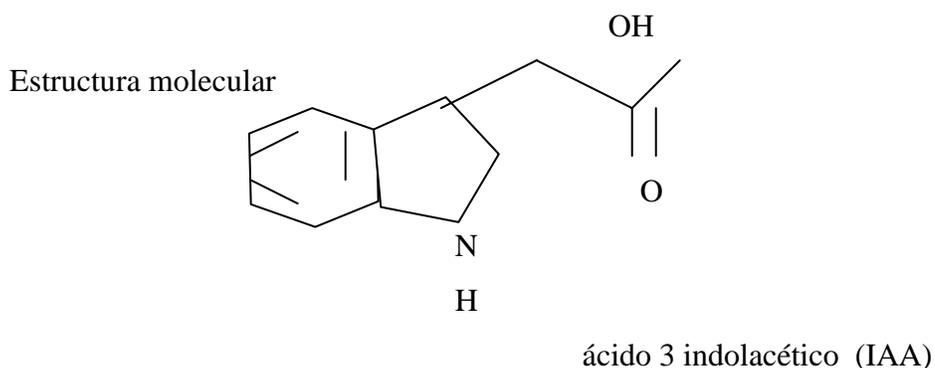
Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos que en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico vegetal. Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones, regula los procesos fisiológicos de aquellas y por lo general se desplazan de un lugar de producción a un sitio de acción (16).

Es muy difícil definir el término hormona vegetal con toda precisión. Muchas sustancias del tipo hormonal pueden actuar en su lugar de síntesis, actuar al parecer de modo no específico o actuar a nivel genético como inductores o represores. A menudo se prefiere el término fitorregulador, refiriéndose a compuestos naturales o sintéticos que inducen respuestas en el crecimiento, desarrollo o metabolismo (1).

3.1.3.1.AUXINAS

Timan, citado por Mendoza (6), define a las auxinas como sustancias orgánicas que promueven el crecimiento a lo largo del eje longitudinal, en concentraciones aproximadas de 0.003 molar. Todos los compuestos que tienen actividad auxínica poseen hidrógeno y oxígeno en proporciones y disposiciones diferentes, y algunos de ellos contienen, además, nitrógeno y cloro; tienen estructuras simples, pero la mayoría son complejos (16).

Ha sido confirmado en gran cantidad de investigaciones que las auxinas naturales, aplicadas artificialmente, son un requerimiento para la iniciación de raíces adventicias en tallos, además, se ha demostrado que la división de las primeras células iniciales depende de la presencia de auxinas, ya sea aplicadas o endógenas (4).



3.1.3.1.1. ACIDO INDOLBUTIRICO (AIB)

Entre los reguladores de crecimiento que comúnmente se utilizan, uno de los mejores estimulantes del enraizamiento es la auxina AIB. Este tiene una actividad auxínica débil y los sistemas de enzimas destructores de auxinas lo destruyen en forma relativamente lenta, por lo que resulta muy eficaz como estimulante de raíces. Debido a que el AIB se desplaza muy poco, se retiene muy cerca del sitio de aplicación. Los reguladores de crecimiento que se desplazan con gran facilidad pueden causar efectos indeseables de crecimiento en la planta propagada (16).

El AIB presenta ventajas sobre otras auxinas sintéticas formadoras de raíces como el ANA (ácido naftalenacético), ya que este compuesto es mucho más tóxico que el AIB y deben evitarse las concentraciones excesivas de ANA por el peligro de provocar daño a la planta, y las dos auxinas anteriores resultan más activas en la inducción de enraizamiento que el AIA (ácido indolacético), ya que este es más inestable en las plantas y se descompone rápidamente en presencia de la luz solar (16).

El AIB produce sistemas radiculares fuertes, fibrosos, mientras que otros reguladores de crecimiento, como los ácidos fenoxiacéticos, a menudo producen sistemas de raíces atrofiados y matosos, compuestos de raíces dobladas y gruesas (7).

3.1.3.1.2 EFECTO DE LAS AUXINAS

Las auxinas intervienen en numerosos fenómenos fisiológicos, su acción depende de su concentración y sus interacciones con los otros reguladores. Al estudiar por separado los diversos efectos es posible observar lo siguiente (15):

- Una clara acción sobre el crecimiento celular: este efecto se debe al aumento consecutivo de la plasticidad en la pared esquelética y a la penetración de agua en la célula; la resistencia de la pared disminuye y la célula se alarga.
- Modificación de la permeabilidad de la membrana (membrana plástica) que se entiende por un rechazo de iones H^+ , lo que provoca una acidificación responsable de la disminución de la resistencia de la pared y absorción de iones K^+
- Estimulación de la división celular en las células de origen cambial (esta acción ha posibilitado los primeros éxitos de los cultivos *in vitro*). Este efecto se ha calificado como “histogeno”, ya que conduce a numerosas células, todas ellas semejantes, que forman un callo.

Las auxinas, ácido indolbutírico (AIB) y el ácido indolacético (AIA) son usadas en rango que varía de 0.1 a 10 mg/l, el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) se usan en un rango de 0.001 a 10 mg/l.

3.1.3.1.3 BIOSÍNTESIS DE LAS AUXINAS

Para que un compuesto cumpla el papel que una hormona desempeña, debe hacer que su propia concentración tiene que estar regidamente controlada. El control de la concentración auxínica en las varias partes de la planta es complejo, envolviendo múltiples procesos. Un medio de regulación de los niveles de auxina es el control de la biosíntesis *in situ*.

El aminoácido triptofano es comúnmente considerado como el precursor para la biosíntesis auxínica (AIA) en plantas y las rutas biosintéticas que ha sido estudiadas son ilustradas en la figura 1. Por una ruta, el triptofano es convertido a ácido indolpirúvico vía una reacción a una enzima. El ácido indolpirúvico luego es decarboxilado a indolacetaldehído en una reacción que requiere de carboxilasa y pirofosfato tiamina. Un dehidrogenasa aldehído, para la cual la nicotinamida, adenina, dinucleotida es la coenzima más efectiva, oxida el indolacetaldehído a AIA.

La segunda ruta principal involucra una decarboxilación inicial de triptófano para formar triptamina. La catálisis por una auxina oxidasa luego convierte triptamina a indolacetaldehído, el cual es oxidado a AIA. En unos sistemas de plantas, una u otra de éstas rutas aparentemente ocurre con la exclusión de la otra, en otros sistemas ambas rutas son operativas (16).

3.1.3.1.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS AUXINAS

Las auxinas parecen tener dos efectos principales en el proceso de alargamiento celular; aumentan la plasticidad de la pared y participan directa o indirectamente en las reacciones mediante las cuales se depositan nuevas moléculas de celulosa dentro de las paredes; sin embargo, el efecto de las auxinas en el desarrollo de la pared celular se considera en la actualidad no como un efecto directo sino como una posible expresión final de un proceso metabólico condicionado o regulado por la hormona.

Hay pruebas abundantes de que las auxinas actúan primariamente como agentes catalíticos o reguladores en alguna fase del metabolismo de los carbohidratos.

3.1.3.2 ACIDO GIBERELICO

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, el ácido giberélico (AG) se ha convertido en un tema de intensa investigación, aunque la adición de este compuesto a los medios de cultivo de tejidos ha sido ocasional a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias giberelinas, relacionadas con el AG, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular (7).

El ácido giberélico (Ga_3) puede provocar cambios a nivel genético que estimula a su vez la síntesis enzimática en las células, también provoca la estimulación de la síntesis de ARN en las capas de aleurona (16).

Una de las teorías sostiene que el ácido Giberélico tiene relación con la síntesis del ARN mensajero dirigido por el ADN en el núcleo. En la actualidad se cree que el ácido Giberélico modifica el ARN producido en los núcleos y así puede éste ejercer su control sobre la expansión celular, así como sobre otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal (16).

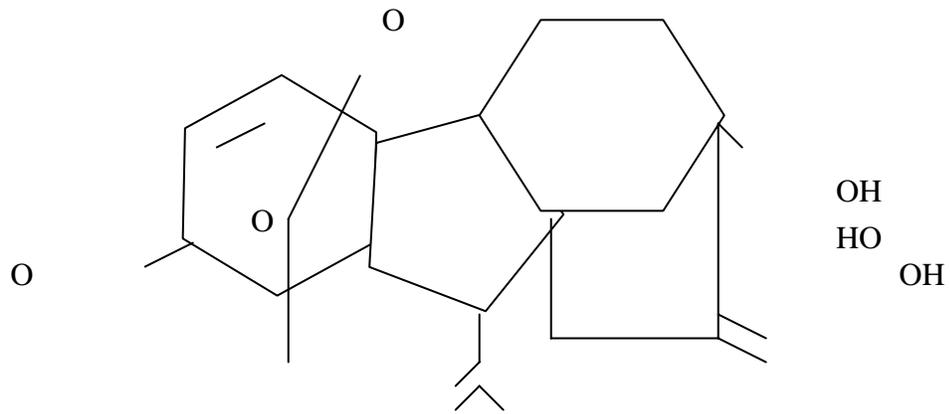
El ácido giberélico puede provocar la expansión celular, mediante la inducción de enzimas que debilitan las paredes celulares. Con frecuencia el ácido giberélico incrementa el contenido de auxinas, transportándolas a su lugar de acción (16).

Los efectos biológicos del ácido giberélico, según Stow y Yamaki en 1,959, citados por Mendoza (6), el efecto más sorprendente de asperjar plantas con ácido Giberélico es como estimulante del crecimiento, los tallos de las plantas asperjadas se vuelven generalmente mucho más largas que lo normal, se estimula el crecimiento de los entrenudos individuales, mientras el número de entrenudos permanece sin cambios.

La aplicación de ácido Giberélico a los tallos produce un incremento pronunciado de la división celular en el meristemo subapical y provoca el crecimiento rápido de muchas plantas arrojadas (16).

Las giberelinas tienen un efecto directamente inductor en la floración y su aplicación puede suplir efecto de horas frío haciendo florear a plantas con termo período frío aunque el invierno sea templado, igualmente puede inducir la floración de varias plantas de días largos en foto períodos cortos, con lo que suple a las horas luz (9).

Estructura molecular



Ácido geberelico (GA₃)

3.1.3.2.1 EFECTO DE LAS GIBERELINAS

Se utilizan para inducir el desarrollo de embriones adventicios. En la mayoría de los casos se usa AG₃, entre varias giberelinas existentes (12). La actividad fisiológica, aplicado a plantas en general, AG₃, pueden influir en el crecimiento y desarrollo de una variedad. Varios de los efectos del AG₃ en todas las plantas son causados por el selectivo crecimiento o disminución en la biosíntesis y en la actividad de las enzimas. Otro posible resultado es un cambio en la disponibilidad de auxinas endógenas. El ácido giberélico es descubierto para suprimir la síntesis de la fosfatasa y enzimas que tienen que ver con la producción de algunos productos secundarios; y las síntesis de α -amilasa y maltasa son estimuladas, por ejemplo durante la germinación de semillas de cereal (3).

El cultivo de tejidos de plantas puede ser generalmente inducido a crecer y diferenciarse sin giberelinas, aunque el ácido giberélico puede llevar a ser un ingrediente esencial del medio para el cultivo de células en una baja densidad.

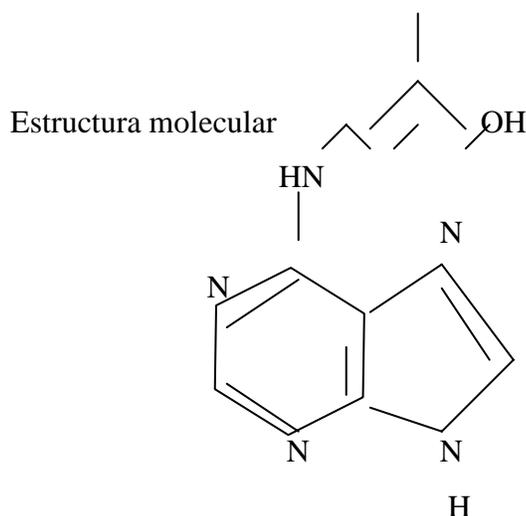
Cuando el AG₃ es adicionado al medio de cultivo, a menudo produce un efecto que es de similar naturaleza que las auxinas. Altas concentraciones de AG₃ (1-8 mg/l.) induce el crecimiento de células indiferenciadas de callos, y puede promover el crecimiento de callos en combinación con auxinas y bajos rangos de citocininas (3).

Un factor de crecimiento, que es probablemente una giberelina, es producido por la germinación de embriones de algunas especies de plantas y debe ser transmitido al endospermo antes que el tejido proliferare para formar callos en el cultivo. Donde la presencia tanto de auxinas y citocininas en un medio de crecimiento aventaja para el acallamiento rápido en la superficie del corte de un explante. La nueva adición de una cantidad de AG₃ (0.1 mg/l.) o la reposición de la auxina por AG₃ realmente inhibe el desarrollo de callos (4).

3.1.3.3 EFECTO DE LAS CITOCININAS

Las citocininas se descubrieron en forma accidental en un cultivo *in vitro*. Se sabía que en los medios de cultivo, la adición de leche de coco provocaba un efecto favorable en la multiplicación celular y en la formación de yemas. Las investigaciones que intentaron descubrir el factor responsable de este efecto condujeron al aislamiento de un complejo activo de naturaleza púrica, el cual no pudo identificarse. Esto permitió hacer investigaciones con las purinas y en 1956 Skoog aisló, a partir de ADN desnaturalizado, una sustancia muy activa. Las citocininas son muy activas y al igual que las auxinas, presentan numerosas acciones siendo las principales (16):

- Un efecto en la división celular; en este proceso son indispensables, pero ineficaces en ausencia de auxinas; las dos se complementan, la auxina favorece la duplicación de los ácidos desoxiribonucleicos (ADN) y la citosina hace posible la separación de los cromosomas.
- Un papel muy claro en la organogénesis, en la que brindan estimulación considerable a la formación de yemas.
- Las citocininas (5), promueven la división celular y la organización de callos. Es decir promueven la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos.



3.1.3.4 INTERACCION AUXINA-CITOCININA

Según Skoog y Miller (1957) (3), encontraron la formación de brotes puede ser inducido previsiblemente de callos de tabaco usando relativamente bajos niveles de auxinas y altos niveles de citosina en el medio de crecimiento. Desde este descubrimiento muchos aspectos de diferenciación celular y organogénesis en el cultivo de tejidos y órganos han sido encontrados por una interacción entre concentraciones de citocininas y auxinas. El balance entre estas dos clases de reguladores que usualmente son requeridos para el crecimiento de iniciación o diferenciación en tejidos de cultivos.

Un balance entre estos reguladores del crecimiento es más con frecuencia requerido para la formación de brotes adventicios y meristemos de raíz. La concentración necesaria de cada tipo de regulador difiere mucho de acuerdo a la especie de planta, la condición del cultivo y los componentes usados en la interacción entre dos clases de reguladores; es a menudo complejo, y más que una simple combinación de sustancias es probablemente para producir resultados óptimos (8).

A pesar de la frecuencia necesaria tanto de auxinas y citocininas en el cultivo de tejidos, la naturaleza de las interacciones entre dos tipos de reguladores es rara vez comentado sobre como se da dicha interacción. Todavía hay mucho que aprender, aunque sobre las auxinas y citocininas son normalmente requeridos para el crecimiento y morfogénesis, las auxinas pueden inhibirse durante la acumulación de citocininas, así como las citocininas pueden inhibir a más de algún proceso de las auxinas (8).

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la respuesta del izote pony (*Beaucarnea recurvata* R.) a la micro propagación.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar el efecto de tres niveles de Bencilaminopurina, en combinación con tres niveles de ácido giberélico, sobre la inducción de brotes.
- ❖ Evaluar el efecto de tres niveles de ácido naftalenacético sobre el enraizamiento de brotes.

V. HIPÓTESIS

- ✓ Con cualquiera de las diferentes combinaciones de Bencilaminopurina y Ácido giberélico se obtendrá brotación *in vitro* a partir de semilla botánica de pony.
- ✓ El efecto de la utilización de ANA en tres diferentes concentración, provocará un enraizamiento ideal para el izote pony.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Localización del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el kilómetro 21.5 carretera hacia Amatitlán, Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala.

6.1 Manejo del Experimento

6.1.1. Preparación del Medio de Germinación

Previo a la preparación de los medios de cultivo se precedió a la elaboración de soluciones madres o concentradas, esto para reducir los pasos en la preparación de los mismos.

Las soluciones orgánicas como las citocininas, se conservan a temperatura ambiente y las auxinas se en el refrigerador y se utilizaron antes de dos semanas.

La preparación del medio para la germinación se realizó de acuerdo a las facilidades brindadas por el laboratorio de biotecnología. Para esta investigación se requirió de 10 litros de medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

6.1.1.1. Elaboración de Medios de Cultivo

Las soluciones concentradas fueron elaboradas con base en las concentraciones descritas para el medio basal MS (Cuadro 2 del Anexo). De estas soluciones se extrajeron los volúmenes deseados para la elaboración del medio de acuerdo la concentración del regulador AG₃. Se filtró por medio de una bomba de vacío y luego se agregó al medio cuando la temperatura fue menor a los 60 °C, todo esto,

dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol al 70%. De igual manera se manejó para el regulador ANA. Posteriormente se transfirió a los tubos de cultivo (esterilizados en un autoclave a 121°C durante 20 min, a una presión de 103.4 kp (15 lb/pul²) (6)), en una cantidad aproximada de 10 mililitros del medio y se taparon con papel aluminio, para ser llevados al cuarto de crecimiento, para que el medio se gelifique.

6.1.1.2 Procedimiento de Desinfección

A las semillas del izote pony previamente recolectadas en el campo, se le hicieron aplicaciones productos químicos para desinfestarlas, y evitar contaminantes, aplicando una solución de Agrimicin® (10 g/l) y Bavistín® (8 g/l), en donde se sumergieron las semillas.

6.1.1.3 Siembra de la Semilla

La siembra de la semilla en el medio de cultivo se realizó en la cámara de flujo laminar, tomando para el caso, las medidas de desinfección de todo el instrumental y cristalería.

6.1.1.4 Incubación de los Cultivos

Las siembras en los medios de cultivo se mantuvieron en el área de incubación. El cuarto de crecimiento está equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1,000 a 3,000 lux de intensidad aproximadamente. La temperatura media durante el experimento fue de 25°C, con un fotoperíodo programado de 16 horas de luz.

6.1.2 Fases de la Investigación

El estudio se dividió en dos fases; a) la inducción de brotes y b) enraizamiento.

6.1.2.1 Fase de Inducción de Brotes

Esta fase consistió en la evaluación de la formación de brotes a partir de las semillas, en los diferentes tratamientos evaluados.

6.1.2.2 Fase de Enraizamiento de Brote

La distribución del material propagado se realizó de manera al azar, colocando una planta por tubo en el medio MS de enraizamiento. Para evaluar el enraizamiento en el izote Pony, se procedió a plantar brotes en medio de cultivo preparado con tres niveles de ANA, en donde se tomaron datos a los 30 días de las variables respuestas.

6.2 Variables respuesta

6.2.1 Fase de Inducción de Brotes

6.2.1.1. Longitud de Brotes

Para la toma de datos de esta variable se procedió de la siguiente manera: 25 días después de la germinación, se trasladaron a los diferentes medios para brotación y se procedió a medir la distancia en centímetros que existe entre la base del tallo y la parte más alta de la planta.

6.2.1.2. Número de brotes

Se procedió a realizar un conteo del número de brotes por planta, cuando las plántulas se encontraban dentro del tubo de cultivo.

6.2.2. Fase de Enraizamiento de Brotes

6.2.2.1. Número de raíces

Para la toma de datos de esta variable se procedió a realizar un conteo del número de raíces primarias de la planta.

6.2.2.2. Longitud de raíces

La evaluación de esta variable se realizó por un promedio de las longitudes de las raíces primarias de cada planta.

6.2.2.3. Peso seco de raíz

Para la toma de datos de esta variable se procedió al secado de las raíces extraídas de las plantas muestreadas, en un horno a 55°C por una hora.

6.3. Diseño experimental

Para la fase de brotación se utilizó el diseño Completamente al Azar con arreglo Factorial 3x2, con diez repeticiones, además, se realizó análisis de regresión.

Cuadro 1. Distribución de niveles de reguladores de crecimiento utilizados en la fase de inducción de brotes del izote pony.

NIVEL		B A P (mg/l)		
		0.25	0.5	0.75
GA ₃ (mg/l)	0.05	1	2	3
	0.10	4	5	6
	0.15	7	8	9

El modelo utilizado en el experimento de propagación:

$$Y = M + BAP + GA_3 + BAP \times GA_3 + E$$

Donde

Y = Variable respuesta

M = Efecto de la media general

BAP = Efecto del tratamiento con bencilaminopurina

GA₃ = Efecto del tratamiento con ácido giberélico

BAP × GA₃ = Efecto de interacción entre la bencilaminopurina y el ácido giberélico.

E = Error experimental

Para la fase de enraizamiento se utilizó un diseño completamente al azar. Se utilizaron 3 niveles de ácido naftalenacético (ANA), en medio de MS, los niveles fueron: 0.062 mg/l, 0.125 mg/l, y 0.186 mg/l, esto basado en lo expuesto por Lepoivre, citado por Edwin F.(2) realizado en izote pony.

Cuadro 2. de distribución de tratamientos en la fase de enraizamiento.

TRATAMIENTO	ANA (mg/l)
1	0.062
2	0.125
3	0.186

Modelo estadístico utilizado para medir el efecto del enraizamiento:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta

M = Efecto de la media general

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

E_{ij} = Error experimental.

6.3.2 Unidad experimental

Como unidad experimental se utilizó un tubo de ensayo de 25x150 mm, el cual contenía, en el caso de propagación, una semilla cada uno y en el caso de enraizamiento una planta.

6.4 Análisis de la Información

Los resultados obtenidos de cada uno de los tratamientos se describe de forma descriptiva detallando de manera precisa cada uno de los pasos realizados para poder cumplir dicho objetivo.

6.5 Presentación de los Resultados

Con los resultados a obtenidos se elaboraron tablas y figuras para una mejor ilustración de los resultados, y se generaron diagramas para un mejor entendimiento. Finalmente se elaboraron resúmenes con los eventos más sobresalientes.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Germinación de semillas de pony *in vitro*

En el análisis de varianza realizado para la variable semillas de pony germinadas *in vitro* hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$). El coeficiente de variación fue de 13.1%, Cuadro 2. De acuerdo a estos resultados, existe influencia del medio de cultivo con la adición de los reguladores de crecimiento GA3 y BAP.

Cuadro 2 Resultados del análisis de varianza para la variable germinación de semillas *in vitro*, ICTA 2000.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Fc.	Probabilidad	Valor crítico para F
Tratamientos	216.1666667	9	24.01851852	19.35820896	1.64912E-07	2.456282289
Bloques	15	2	7.5	6.044776119	0.009810949	3.55456109
Error	22.33333333	18	1.240740741			
Total	253.5	29				

Existe significancia ($p \leq 0.05$).

C.V. = 13.10 % , con un nivel de significancia del 0.05%.

En la comparación de medias para la misma variable, con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), hubo conformación de 5 grupos Cuadro 3. En el primer grupo, aparecen los tratamientos donde se obtuvo el mayor número de semillas germinadas y corresponde a los aquellos donde fue aplicado 0.1 de ácido giberélico más 0.5 de bencilaminopurina, al igual que los tratamientos con 0.15/0.25, 0.1/25, 0.1/0.75 y 0.05/0.25 de GA3/BAP, respectivamente. Con el uso de estas concentraciones de reguladores de crecimiento, se obtuvo un promedio de 11.667 semillas de izote pony germinadas de un total de 25 que fueron utilizadas, esto equivale a 47% de germinación. Los otros tratamientos con medias iguales dentro del mismo grupo oscilaron entre 45.33% a 40%. El grupo con menor número de semillas germinadas osciló entre, 26.68%, cuando fue utilizado 0.15 de GA3 y 0.75 de BAP a 14.66 % de germinación con la utilización de 0.15 y 0.5 de GA3 y BAP respectivamente. Al analizar estos resultados, parece que el incremento de la concentraciones de BAP disminuye el porcentaje de germinación de esta especie *in vitro*. De acuerdo a estos resultados, uso de 0.1 e 0.5 de BAP fueron las combinaciones ideales para lograr los mejores porcentajes de germinación de izote pony *in vitro*.

En lo que se refiere a las semillas que no germinaron y por ende no existió una respuesta favorable a la brotación, se puede explicar a la baja capacidad de germinación que por naturaleza tiene esta especie. El porcentaje de germinación reportado por los cultivadores en forma convencional, esta entre 60 y 75 %. Por lo que se puede indicar que el cultivo *in vitro* aparentemente no mejora este porcentaje de germinación, por lo que es necesario llevar a cabo otras investigaciones tendientes a mejorar el porcentaje de germinación.

Cuadro 3 Comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$) para la variable semillas de izote pony germinadas *in vitro*, con la adición de diferentes combinaciones de ácido giberélico y bencilaminopurina, ICTA, 2000.

Tratamiento (mg/l)		Promedio semillas germinadas	Grupo Tukey
Ácido giberélico	Bencilaminopurina		
0.15	0.25	11.667	A6
0.1	0.5	11.333	A4
0.05	0.75	10.667	A B5
0.01	0.25	10.667	A B2
0.05	0.25	10.000	A B1
0	0	8.000	B C3
0.05	0.5	7.667	B C D10
0.15	0.75	6.667	C D E7
0.1	0.75	4.667	D E
0.15	0.5	3.667	E

Valores seguidos por la misma letra en la vertical no difieren entre si ($p \leq 0.05$).

7.1.2 Análisis de la producción de brotes *in vitro*

En el análisis de varianza realizado para la variable de producción de brotes *in vitro*, no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados. En todas las combinaciones de AG3 y ABA y en el tratamiento testigo (sin reguladores de crecimiento) se observó formación de brotes. El mayor número de brotes fue obtenido con la utilización de 0.10 de GA3 y 0.5 a 0.75 mg/l de BAP. En el Cuadro 4, se presentan los resultados de la generación de brotes producidos de acuerdo al tratamiento utilizado. En el tratamiento testigo, en donde no se adicionó reguladores de crecimiento, se obtuvo ocho brotes y fue el menor. El hecho de que no hubo diferencia significativa en el estudio, la adición de reguladores *in vitro* si aumenta la brotación del izote.

En lo que se refiere al número de hojas producidas por los diferentes tratamientos, se observó la formación de dos 2 hojas por brote (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la formación de brotes y hojas en *Beaucarnea recurvata*, a las 7 semanas de cultivo, ICTA, 2002.

Tratamiento		Variable analizada	
GA3 (mg/l)	BAP (mg/l)	Brotes	Hojas por planta
0.0	0.0	8	2
0.05	0.25	15	2
0.05	0.5	12	2
0.05	0.75	15	2
0.10	0.25	14	2
0.10	0.5	16	2
0.10	0.75	16	2
0.15	0.25	14	2
0.15	0.5	12	2
0.15	0.75	11	2

Referencia GA₃ = Ácido giberélico; BAP = Bencilaminopurina.

Pérdidas de brotes y que no llegaron a generar una respuesta en dichos tratamientos no fueron contemplados en el análisis. Las pérdidas fueron debido a contaminación del medio. Las giberelinas y el regulador bencilaminopurina en este cultivo, tuvieron interacciones que coadyuvaron a generación de plántulas sanas vigorosas, formando todos sus órganos, lo que permite indicar que más de una combinación de sustancias fue necesaria para producir resultados en las plantas de pony *Beaucarnea recurvata*.

Durante el desarrollo del experimento, se pudo observar adecuado crecimiento de los brotes. Se muestran características morfológicas convenientes para el fin de la investigación. La progenie obtenida en la reproducción *in vitro*, presentó características

fenotípicas idénticas a la planta madre. Algunas ventajas y desventajas de la técnica de reproducción *in vitro* para esta especie se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Ventajas y desventajas observadas en la reproducción *in vitro* de izote pony, ICTA, 2000.

Ventajas	Desventajas
Perpetuación de caracteres agronómicos	Trasmisión de características no deseadas
Eliminación de la fase juvenil	Riesgo de alguna mutación
Obtención de plantas uniformes	Mayor susceptibilidad a fitopatógenos por provenir de plantas generadas por reproducción <i>in vitro</i> .

7.1.3 En relación al análisis de la variable número de plántulas producidas *in vitro*, como se puede ver en el cuadro 6, no existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados.

Cuadro 6. Análisis de varianza para la variable número de plantas *in vitro*, ICTA, 2000

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	9	128.533203	14.281467	1.0313	0.454
BLOQUES	2	28.066895	14.033447	1.0134	0.385
ERROR	18	249.266602	13.848145		
TOTAL	29	405.856699			

C.V : 28.48 %

No existe diferencia significativa entre tratamientos.

7.1.4. Análisis de enraizamiento de brotes de izote con ácido naftalenacético.

El número de raíces producidos por tratamiento osciló entre 1 a 6, siendo el menor para el tratamiento testigo o sea, aquellos brotes cultivados en medio donde no fue adicionado ANA. Al analizar estos resultados se observa que si existe algún efecto la producción de raíces. Para futuras evaluaciones es conveniente ampliar las concentraciones de producto o combinaciones con otros reguladores de crecimiento. En el cuadro 6 se presenta los datos obtenidos según tratamiento evaluado.

Cuadro 7. Caracteres de raíces de plántulas de izote pony con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético in vitro, ICTA, 2000.

TRATAMIENTO	Dosis de ANA (mg/l)	Promedio de raíces en cm	Raíces (promedio)	Peso seco de Raíces (mg)
0	0	0.8	1	0.885
		0.0	0	0.0
		1.0	2	0.832
1	0.062	2.2	6	1.256
		2.3	6	1.347
		2.6	7	1.568
2	0.125	2.0	6	1.245
		2.0	6	1.279
		2.2	6	1.356
3	0.186	1.9	6	1.298
		1.8	5	1.284
		2.0	6	1.314

REFERENCIA: GA₃ = Ácido giberélico; BAP = Bencilaminopurina.

7.1.5. En la variable peso seco de raíz, en la reproducción *in vitro*, de izote pony, se puede ver en el cuadro 7, que mostro diferencia significativa entre tratamientos, En la comparación de medias para la misma variable, con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), hubo conformación de 2 grupos Cuadro 8 . En el primer grupo, aparecen los tratamientos donde se obtuvo el mayor peso seco en mlg/repetición y corresponde a los aquellos donde fue aplicado 0.186 y 0.125 de ácido naftalenacético

Cuadro 7. análisis de varianza para la variable peso seco de raices, en la producción *invitro*, del izote Pny, *Beaucarnea recurvata*, ICTA, 2000.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	1.399862	0.466621	8.2298	0.016
BLOQUES	2	0.179894	0.089947	1.5864	0.280
ERROR	6	0.3410194	0.056699		
TOTAL	11	1.911995			

C.V. =20.93%

Cuadro 8. Comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$) para la variable peso seco de raíz de izote pony *in vitro*, con la adición de diferentes combinaciones de ácido naftalenacético, con un alfa 0.05 %, comparador de 0.6736.

Tratamiento	Media de raices	Grupo Tukey
2	1.3857	A
4	1.3330	A
3	1.2833	A
1	0.5497	B

Si existe diferencia significativa ($P \leq 0.05\%$) en las dosis de ANA utilizadas. Por lo tanto el tratamiento con mayor concentración de ANA mostró una respuesta esperada, puesto que por tener una mayor concentración se esperaba una mayor longitud de las raíces, sin embargo, esto se presentó en las concentraciones menores 0.062 y 0.125.

7.1.7. En el cuadro 9 de la variable longitud de raíces se puede observar, En el análisis de varianza realizado para la variable longitud de raíces de pony *in vitro* hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$). El coeficiente de variación fue de 20.87 %, Cuadro 9.

De acuerdo a estos resultados, existe influencia del medio de cultivo con la adición ácido naftalenacético, en observó que los ápices de las raíces sólo crecen en longitud como lo haría normalmente como parte de la raíz de la planta en el campo.

Vale la pena mencionar que en la fase de trasplante algunas plantas sufrieron oxidación severa, por lo que no fue posible lograr resultados.

En la comparación de medias para la misma variable, con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), hubo conformación de 2 grupos Cuadro 10. En el primer grupo, aparecen los tratamientos donde se obtuvo el mayor longitud y corresponde a los aquellos donde fue aplicado 0.125 de ácido naftalenacético, al igual que el de la concertación de 0.186 Con el uso de estas concentraciones de reguladores de crecimiento, se obtuvo un promedio de 1.38 cm , para lo cual fueron utilizadas, el total de raíces de cada plántula. Los otros tratamientos con medias iguales dentro del mismo grupo se encuentra a 1.33 cm a . El grupo con menor longitud 1.28 cm, fue al que se le agrego la concentración de 0.62 de ANA. Al analizar estos resultados, parece que el incremento de la concentraciones de ANA aumentan la longitud de raíz de esta especie *in vitro*.

Cuadro 9. análisis de varianza para la variable longiud de raices, en la producción *invitro*, del izote Pny, *Beaucarnea recurvata*, ICTA, 2000.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	3	1.411869	0.470623	8.3344	0.015
BLOQUES	2	0.180611	0.090305	1.5992	0.277
ERROR	6	0.338804	0.056467		
TOTAL	11	1.931284			

C.V. =20.87%

Cuadro 10. Comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$) para la variable longitud seco de raíz de izote pony *in vitro*, con la adición de diferentes combinaciones de ácido naftalenacético, con un alfa 0.05 %, comparador de 0.6736.

Tratamiento	Media de raíces	Grupo Tukey
2	1.3860	A
4	1.3370	A
3	1.2830	A
1	0.5477	B

En lo que se refiere a los resultados mostrados por el testigo, estas repeticiones produjeron raicillas que no fueron funcionales ya que fueron demasiado delgadas y por lo tanto frágiles. Entonces es necesario transferirlas a un medio con hormonas promotoras de raíces y al transplantarlas se observó que se evitó que las plántulas continuaran proliferando el fortalecimiento de tallos y hojas, por ende las raíces se engrosaron y alargaron.

En lo referente al número de raíces, se puede ver en el Cuadro 6 que no existe una diferencia significativa entre tratamientos.

Según lo observado en el transcurso del experimento, el ANA, que es una auxina sintética que es formadora de raíces, es conveniente para usarla en ese proceso, ya que produce plántulas sanas y con vigorosidad.

En el testigo en algunas repeticiones se observaron raicillas, pero muy escasas y delgadas, por lo que el efecto de las auxinas hicieron de forma general en las diferentes concentraciones una estimulación de la división celular en las células de origen cambial. Por lo que se puede indicar que es un efecto histogeno, ya que conduce a numerosas células semejantes a que formen un callo.

Como comentarios adicionales, se puede anotar que en este proceso, en el peso seco influyeron las auxinas, puesto que esta hormona tiene una clara acción sobre el crecimiento celular. Existe entonces una mayor cantidad de raíces diferenciadas en su mayoría raíces secundarias lo que aumenta el peso del sistema radical.

Así también se pudo observar durante el experimento que el ANA produjo, sistema radical fuerte y fibrosos, ya que en el Cuadro 6 se puede comparar el testigo con el resto de tratamientos.

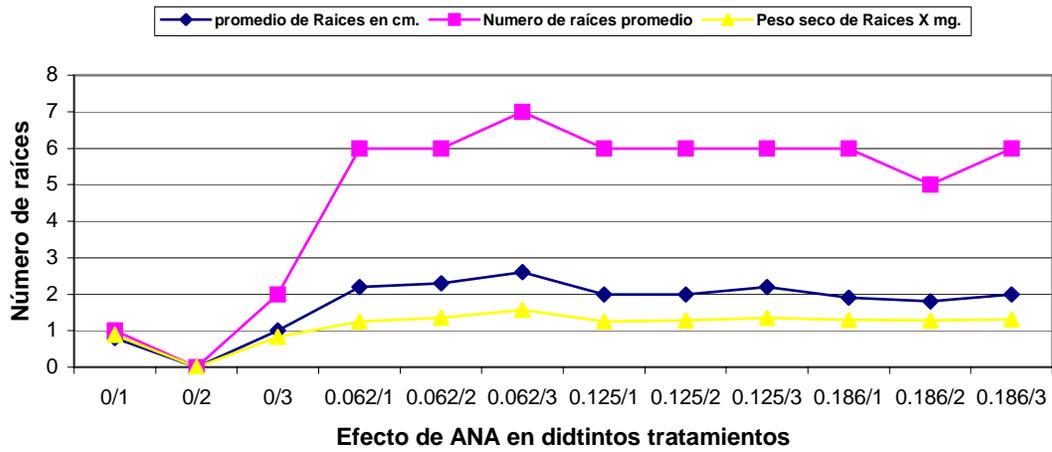


Figura 1. Respuesta al enraizamiento de plántulas de izote pony *in vitro*.

En la Figura 3, se observa claramente lo descrito con anterioridad tomando como base el cuadro de resultados. Pero es claro que el ANA contribuyó tanto al crecimiento como a la producción de raíces por plántula producida, esto en comparación con el testigo. También es obvio que tanto el número de raíces como el peso tuvieron un comportamiento uniforme en el transcurso del experimento.

Cuadro 11 Precios unitarios de los insumos, cantidades y costos de la producción de pony *in vitro*, ICTA, 2000.

Insumo	Precio unitario -- USA\$/Kg o ml --	Densidad o dosis -- mg o ml/tratamiento	Costo/tratamiento --- USA\$ --
Semilla de pony	77.0	2.2	77.0
Macro elementos	20.8	44.80	56,0
Micro elementos	33.0	386.50	30,0
Vitaminas	18.4	1200	32,8
Mano de obra	3.75	25,0	39.75
Preparación de semilleros	33.75	2	67.50

CUADRO 12. Diferencias en los costos parciales, entre lo convencional y lo obtenido en el laboratorio

ALTERNATIVAS	COSTO PARCIAL USA\$/ha---
Reproducción <i>in vitro</i>	195.80
Semillero convencional	184.25
Diferencia	11.55

En los Cuadros 7 y 8, se presentan algunos datos económicos de la producción de pony. En el Cuadro 7, se especifica la diferencia de costo promedio entre lo investigado en la producción de pony *in vitro* y a través de la producción de plantas por semilleros de manera convencional. Se observa que la diferencia en el costo de las dos formas de producción es de 11.85 dólares, siendo mayor el costo de producción *in vitro*.

Ese incremento en precio, se debe al uso de material y equipo de laboratorio, así como, el uso de compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento. Sin embargo, a través de la técnica *in vitro*, se tiene la ventajas de uso de mezclas con reguladores de crecimiento lo que simplifica la reproducción y uso en cualquier etapa de desarrollo del cultivo.

A partir de semilla pueden ser obtenidas plantas y posteriormente ser reproducidas *in vitro*, esto es práctico y aceptable. Puede ser elegidos materiales adaptados a la zona de producción y obtenerse resultados altamente satisfactorios que llegan a superar a los que se producen en el campo de forma convencional.

VIII. CONCLUSIONES

1. Hubo respuesta de los explantes de izote pony *Beaucarnea recurvata* a producir brotes bajo condiciones *in vitro* con la aplicación de bencilaminopurina en concentraciones de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/l y ácido giberèlico en concentraciones de 0.05, 0.01 y 0.15 mg/l.
2. Ni hubo diferencia significativa en el número de raíces, longitud y peso seco con las dosis de ácido naftalenacético utilizados.
3. Los mejores resultados obtenidos en la producción de brotes y raíces fue en las dosis de 0.5 de BAP y 0.062 de ANA respectivamente.

IX. RECOMENDACIONES

1. Continuar la evaluación de fases posteriores a la reproducción de plántulas *in vitro*.
2. Evaluar las dosis de 0.5 de BAP y 0.062 de ANA.
3. Observar la resistencia comportamiento de las plántulas de pony obtenidos *in vitro*, en relación a plagas y enfermedades en la fase de invernadero.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Bidwell, RGS. 1983. Fisiología vegetal. Trad. por Guadalupe Jerónimo Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, AGT Editor. 784 p.
2. Edwin, FG. 1996. Plant propagation by tissue culture in practice. 2 ed. Grand Britain, Exigencies. Part. 2, p. 5.
3. George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. US, Exegetics. s.p. v. 1, p. 640-651.
4. Hartmann, HT; Kester, DE. 1989. Propagación de plantas; principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. México, CECOSA. 760 p.
5. Hurtado, SM; Merino, ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 227 p.
6. Krijorian, AD. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación en cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. P. 41-69.
7. Mendoza Alvarado, GA. 1988. Efecto de reguladores de crecimiento y diferentes sustratos en el enraizamiento de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 49 p.
8. Roca, WM; Mroginski, LA. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
9. Rojas Garcidueñas, M. 1979. Fisiología vegetal aplicada. México, Ingramex. 262 p.
10. Samyn, GL. 1993. *In vitro* propagation pony tayl palm produce multiple shoot plants. Hortscience 28:225.
11. Standley, PC; Steyermaek, JA. 1982. Flora of Guatemala. Chicago, US, Chicago Natural History Museum. Fieldana Botany v. 24, pte. 3, p. 70-71.
12. Torpe, TA. 1988. Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. New York, US, Academic Press. 177 p.
13. Usul, K. *et al.* 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA-JOCV. 166 p.

14. Vidale, H. 1986. Cultivo *in vitro*. Trad. por Eugenia de Aragón Espejo. México, Editorial Científica. 508 p.
15. Villalobos, VM. 1986. Fundamento teóricos y prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de Postgraduados, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. 192 p.
16. Weaver, RJ. 1985. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Cotín. México, Trillas. 622 p.
17. Witjaksono, HG. 1997. Development of protocols for avocado tissue culture: somatic embryogenesis, protoplasts culture, shoot proliferation and protoplast fusion. Thesis PhD. Florida, US, University of Florida. p. 12.

Anexos

Cuadro 1. Requerimiento del Medio de cultivo Basal de Murashige y Skoog

Compuesto	Cantidad (1X) (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₂ ·7H ₂ O	22.3
Na ₂ EDTA	37.22
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.6
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.1
Glicina	2.0
Mio-inositol	100
Sacarosa	30000
Agar	7000
PH	5.7-5.8

Cuadro 2. Procedimiento para la preparación de soluciones concentradas de concentración conocida para el medio basal MS.

Soluciones concentradas	componentes	Cantidad requerida (mg/lt)	Cantidad requerida (para 1 lt)	Cantidad requerida (diferentes volúmenes)
Macro "A" (1X)	NH ₄ NO ₃	1650	1.65	Agregar directamente
	KNO ₃	1900	1.90	
Macro "B" (10X)	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	4.4	1.1
	KH ₂ PO ₄	170	1.70	0.425 (250ml)
Macro "C" (10X)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3.7	0.925 (250ml)
Micro "A" (1000X)	KI	0.83	0.83	0.2075
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.0625 (250ml)
Micro "B" (5000X)	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.125	0.0125
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.125	0.0125 (250ml)
Micro "C" (100X)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	0.86	0.215
	H ₃ BO ₃	6.2	0.62	0.155
	MnSO ₂ ·7H ₂ O	22.3	2.23	0.557 (250ml)
Solución Fe (100X)	Na ₂ EDTA	37.22	3.73	0.9315
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.6	2.76	0.69 (250ml)
Solución vitaminas (100X)	Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.05
	Piridoxina-HCl	0.1	0.1	0.02
	Tiamina-HCl	2.0	2.0	0.20
	Glicina			(100 ml)

Inositol (100X)	Mio-inositol	100	10.0	2.5 (250ml)
--------------------	--------------	-----	------	----------------