

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



**“PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL CACTUS CABEZA DE VIEJO
(*Cephalocereus maxonii* Rose) EN EL LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGIA DEL ICTA DE BARCENA, VILLA NUEVA,
GUATEMALA”**

JOSÉ BALDOMERO SANDOVAL ARRIAZA

Guatemala, noviembre 2005

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

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

POR

JOSÉ BALDOMERO SANDOVAL ARRIAZA

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

Guatemala, noviembre del año 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. M.V. Luis Alfonso Leal Monterroso

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr.	Ariel Abderramán Ortiz López
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr.	Alfredo Itzep Manuel
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr.	Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL TERCERO	Ing. Agr.	Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL CUARTO	M.E.P.U.	Elmer Antonio Álvarez Castillo
VOCAL QUINTO	P.M.P.	Miriam Eugenia Espinoza Padilla
SECRETARIO	Ing. Agr.	Pedro Peláez Reyes

Guatemala, noviembre de 2005

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el documento de graduación titulado:

“PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL CACTUS CABEZA DE VIEJO (*Cephalocereus maxonii* Rose) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL ICTA DE BARCENA, VILLA NUEVA, GUATEMALA”

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Respetuosamente,

JOSÉ BALDOMERO SANDOVAL ARRIAZA

ACTO QUE DEDICO

A:

JEHOVÁ DIOS:

Por iluminarme y permitirme culminar mi carrera.

MIS PADRES:

José Baldomero Sandoval Valladares, Nelly Arriaza Álvarez de Sandoval, por su valioso apoyo, ejemplo y consejos en mi formación.

MIS ABUELOS:

Celso de Jesús Arriaza Lara y Adelaido Sandoval Pacheco (Q.E.P.D.)
Romelia Álvarez Rodas de Arriaza y Francisca Valladares Arana de Sandoval (Q.E.P.D.)

MIS HERMANAS:

Magnolia Elieth Sandoval Arriaza de Chavarría y Mildred Gislena Sandoval Arriaza de Méndez, con cariño.

MIS SOBRINOS:

José Antonio Méndez Sandoval; Linda Marinelly, Magnolia Beatriz, Darlene Gislena y Fredy Leonel Chavarría Sandoval.

MIS TÍOS:

Por ser ejemplo de trabajo y honradez **Elías Valladares Marroquín (Q.E.P.D.), Adelaido Pacheco Sandoval, Héctor Arriaza, Francisco Melitón Álvarez Arriaza.** Especialmente a **Juana Estela Arriaza Álvarez, Conchi Valladares y Delia Sandoval Valladares.**

MIS PRIMOS:

Hugo Valladares, Rosa María Núñez Valladares viuda de Toledo, Jefry Pacheco Prieto, Nora Alvarado de Ibarra, Fabiola García de Ituriaga, Mirtala Arriaza Chinchilla, Franklin Valladares Toledo, Ervin Valladares Toledo (Q.E.P.D.), Julio Carías Ávila (Q.E.P.D.), Julio Carías Álvarez, Juan Carlos Álvarez, Celso Álvarez Calderón, Marco Tulio Sosa Carías (Q.E.P.D.).

MIS AMIGOS:

Familia Enríquez Arita; Jorge Mario, Franklin Hernández y familia; Jorge Quinteros y familia, Mario Arévalo y familia; Roberto Godínez y familia, Marco Tulio Montufar y familia; Flavio Calderón Portillo y familia; Joel Quintanilla, Oscar Segura, Camilo Medina, Raúl Gabriel, Mauricio Rosales, Guillermo y Enríque Lemus Cabrera, Marco Antonio Gálvez Madrid, Fernando Barillas, Elder Anzueto, Otto Turkein, Equipos de Fut ball, 6-22-12, Agronomía "A" y "B", Equipo de rodeo y a todos los CHITOS.

MI FAMILIA:

En general.

TESIS QUE DEDICO

A:

Dios.

Mis padres.

Colegio "Eloy Suárez Cobian".

Colegio "12 de octubre".

Instituto Técnico Vocacional "Emiliani".

Facultad de Agronomía.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Guatemala.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mis asesores **Ing. Agr. Héctor Alfredo Sagastume Mena, Domingo Amador Pérez y Luis Gerardo Molina Monterroso**, expreso mi agradecimiento sincero por su incondicional apoyo, orientación y asesoría en la realización de esta investigación.

Los ingenieros evaluadores de esta investigación, **Mirna Lissette Ayala Lemus, Francisco Javier Vásquez Vásquez, Walter Arnoldo Reyes Sanabria, y Héctor Conrado Valdez Marckwordt**, por sus recomendaciones brindadas con el afán de mejorar esta investigación.

Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), especialmente al laboratorio de Biotecnología y personal técnico y de campo por su apoyo y amistad brindada en la realización de mis prácticas supervisadas, EPSA y tesis de grado.

Profesora **Clemencia de Caballeros** por su orientación en mi adolescencia.

Maribel Bártres e hijos, Larisa Bosque Loarca e hijos y Marisol Sandoval Alarcón, por aumentar mi alegría al compartir este triunfo.

CONTENIDO GENERAL

	INDICE DE FIGURAS	iii
	INDICE DE CUADROS	iv
	RESUMEN	v
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	2
3.	MARCO TEÓRICO	3
3.1	MARCO CONCEPTUAL	3
3.1.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GENERALES DE LAS CACTÁCEAS	3
	A. Raíces	3
	B. Tallos, costillas y pezones	3
	C. Areolas y espinas	4
	D. Flores, frutos y semillas	4
3.1.2	DISTRIBUCION DE CACTÁCEAS EN GUATEMALA	5
3.1.3	IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS CACTÁCEAS	6
3.1.4	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CACTUS CABEZA DE VIEJO	7
3.1.5	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y CLAVE PARA LAS ESPECIES DE <i>Cephalocereus</i>	8
	A. Clave para las especies del género <i>Cephalocereus</i>	8
	B. Descripción de <i>Cephalocereus maxonii</i>	8
	C. Distribución de <i>Cephalocereus maxonii</i>	9
3.1.6	PARÁMETROS DE CLASIFICACIÓN DE PELIGRO DE EXTINCIÓN	9
	A. Lista Roja del CONAP	9
	B. Apéndices CITES	10
3.1.7	ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN	11
	A. Asepsia del medio de cultivo	11
	B. Multiplicación	11
	C. El enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo (aclimatización)	11
3.1.8	CALIDAD DEL EXPLANTE PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i>	12
3.1.9	COMPOSICIÓN GENERAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	12
	A. Sales inorgánicas	12
	B. Vitaminas	13
	C. Reguladores de crecimiento	14
	D. Aminoácidos	18
	E. Carbohidratos	18
	F. Agua	18
	G. Agentes solidificantes	19
	H. Suplementos no definidos	19
3.2	MARCO REFERENCIAL	20
3.2.1	LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	20
3.2.2	PROPAGACIÓN NATURAL DE CACTÁCEAS	20
	A. Propagación asexual	20
	B. Propagación sexual	20
3.2.3	GENERALIDADES DE LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE CACTÁCEAS	20

	3.2.4 INVESTIGACIONES RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS	21
4.	OBJETIVOS	23
	4.1 OBJETIVO GENERAL	23
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5.	HIPÓTESIS	24
6.	METODOLOGÍA	25
	6.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	25
	6.2 MATERIAL EXPERIMENTAL	25
	6.3 TRATAMIENTOS	25
	6.4 UNIDAD EXPERIMENTAL	27
	6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	28
	6.5.1 MODELO ESTADÍSTICO PARA LA VARIABLE NÚMERO DE BROTES CON LA COVARIABLE NÚMERO DE AREOLAS	28
	6.5.2 MODELO ESTADÍSTICO PARA LAS VARIABLES PESO UNITARIO DE BROTES Y ALTURA PROMEDIO DE BROTES	28
	A. Variables de respuesta	29
	6.6 MANEJO DEL EXPERIMENTO	30
	6.7 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	31
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
	7.1 NÚMERO DE BROTES	32
	7.2 PESO UNITARIO DE BROTES	35
	7.3 RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE Y EL PESO UNITARIO	37
	7.4 ALTURA PROMEDIO POR BROTE	38
	7.5 PRESENCIA DE CALLO Y RAÍZ	40
	7.5 RESUMEN DE LOS MEJORES TRATAMIENTOS	40
8.	CONCLUSIONES	42
9.	RECOMENDACIONES	43
10.	BIBLIOGRAFÍA	44
11.	ANEXOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cactus cabeza de viejo (<i>Cephalocereus maxonii</i> Rose), cultivado en maceta	7
Figura 2.	Unidad experimental empleada para la propagación <i>in vitro</i> del cactus Cabeza de Viejo	27
Figura 3.	Flujograma de las principales actividades durante el manejo del experimento	30
Figura 4.	Comportamiento del número de brotes por explante, al combinar el rango de 0.5 a 2.2 mg/l de BAP con dosis de 0.1 y 0.5 mg/l de ANA	34
Figura 5.	Regresión lineal entre las variables de respuesta peso fresco de brotes y número de brotes	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Tratamientos de reguladores de crecimiento que han propiciado la proliferación de brotes en cultivo de tejidos para cactáceas	22
Cuadro 2.	Combinaciones de los reguladores del crecimiento ANA y BAP para cada uno de los 30 tratamientos evaluados en la propagación <i>in vitro</i> del cactus Cabeza de Viejo	25
Cuadro 3.	Descripción de los tratamientos para la propagación <i>in vitro</i> del cactus Cabeza de Viejo	26
Cuadro 4.	Composición del medio de sales básicas MS (Murashige y Skoog, 1962)	27
Cuadro 5.	Resumen del ANDEVA para la variable de respuesta número de brotes, transformados por raíz cuadrada más uno	32
Cuadro 6.	Resumen de la prueba de T, de las medias ajustadas por mínimos cuadrados, para la separación de medias de la variable de respuesta número de brotes, con promedios transformados por raíz cuadrada más uno y ajustados por el número de areolas iniciales	33
Cuadro 7.	Identificación de los seis mejores medios de cultivo para la variable de respuesta número de brotes por explante (datos transformados por raíz cuadrada de $X + 1$)	34
Cuadro 8.	Resumen del ANDEVA para la variable de respuesta peso unitario de brotes en gramos, con transformación de raíz cuadrada de $X + 1$	35
Cuadro 9.	Resumen de la prueba de DUNCAN para el peso unitario de brotes en gramos	36
Cuadro 10.	Resumen del ANDEVA para la variable de respuesta altura de brote	38
Cuadro 11.	Resumen de la prueba de DUNCAN para la variable de respuesta altura de brote	39
Cuadro 12.	Presencia de raíz según el medio de cultivo	40
Cuadro 13.	Resumen de las variables de respuesta para los seis mejores medios de cultivo para propagar el cactus Cabeza de Viejo	41

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL CACTUS CABEZA DE VIEJO (*Cephalocereus maxonii* Rose)
EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DEL ICTA
DE BARCENA, VILLA NUEVA, GUATEMALA**

***IN VITRO* PROPAGATION OF CACTUS CABEZA DE VIEJO (*Cephalocereus maxonii* Rose)
AT THE LABORATORY OF BIOTECHNOLOGY ICTA, BARCENA, VILLA NUEVA,
GUATEMALA.**

RESUMEN

El cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose) es una especie de la familia Cactaceae en peligro de extinción, ya que se encuentra en la categoría II de la Lista Roja de Flora Silvestre para Guatemala publicada por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) en el año 2002 (6). Con el objetivo de contribuir al desarrollo de un protocolo para su propagación *in vitro*, se evaluaron 30 tratamientos, consistentes en combinaciones de los reguladores del crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), en un medio de sales básicas MS (Murashige y Skoog, 1962) (13) para la reproducción de esta especie y contribuir así con su conservación. De los 30 tratamientos evaluados para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo se encontró dos combinaciones que son las mejores, tanto en términos de producción de brotes como en términos de peso fresco y altura de brotes, así como también presencia de raíz y callo. Los dos tratamientos son los siguientes: medio de cultivo basal MS suplementado con un miligramo por litro de ácido naftalenacético más 2.2 miligramos por litro de bencilaminopurina y el medio MS suplementado con 0.1 miligramo por litro de ácido naftalenacético más 0.5 miligramos por litro de bencilaminopurina, que produjeron 4.93 y 4.58 brotes, con un peso medio de 280 miligramos y 300 miligramos, altura de 2.89 y 2.87 milímetros, respectivamente. Ambos medios manifestaron la presencia de raíces y callo. Con esta investigación se contribuyó al desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo, al lograrse el establecimiento *in vitro*, a partir de semillas botánicas, en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores del crecimiento y también se logró su propagación *in vitro*. Para terminar el desarrollo del protocolo para la propagación se recomienda evaluar combinaciones de reguladores del crecimiento para inducir el enraizamiento *in vitro* y, posteriormente, evaluar sustratos para la aclimatización de las plántulas en invernadero.

1. INTRODUCCIÓN

Los cactus pertenecen a la familia Cactaceae y frecuentemente son cultivados como plantas ornamentales, algunos son de valor económico como hortalizas o como fuente de frutos en lugares semiáridos, por lo que preocupa su conservación como especies en peligro de extinción (2). El cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose) es una especie en peligro de extinción, ya que se encuentra en la categoría II de la Lista Roja de Flora Silvestre para Guatemala publicada por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) en el año 2002 (6). Algunas especies de la familia Cactaceae son nativas del continente Americano y se encuentran desde Canadá hasta el sur de Argentina. Los cactus evolucionaron en los últimos 80 millones de años, a partir de plantas no suculentas con hojas desarrolladas, con fotosíntesis C3 que vivieron en territorios emergidos del Caribe. El origen filogenético de estas formas ancestrales se encuentra entre las antiguas dicotiledóneas del orden Caryophyllales. De dichos ancestros se originaron las primeras Pereskioideas, Opuntioideas y Cactoideas, que constituyen, en orden evolutivo, las subfamilias de las cactaceas, que migraron hacia el sur y hacia el norte a lo largo del continente, alcanzando regiones donde la mayoría se diferenció en géneros que alcanzaron un endemismo muy notable (2).

Numerosos tipos de cactus han sido micropropagados por medio de la multiplicación de brotes axilares. Dependiendo del género, los explantes han consistido en brotes terminales de plántulas, secciones laterales o verticales de plántulas o cladodios (tallo aplanado fotosintético, típico del género *Opuntia*), areolas simples (una areola es una yema axilar en la cual, cuando está formada, inmediatamente produce un grupo de primordios de espinas, o tubérculos individuales (a veces llamados mamilas). Este trabajo es la primera acción para la conservación de esta especie, a través del cultivo *in vitro*, para lo cual se evaluaron 30 combinaciones de los reguladores del crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), en un medio de sales básicas MS (Murashige y Skoog, 1962) para la reproducción de esta especie (13). El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), en Bárcena, Villa Nueva, Guatemala. Con esta investigación se contribuyó al desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo, al lograrse el establecimiento *in vitro*, a partir de semillas botánicas, y también se logró su propagación *in vitro*.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El área donde se encuentran los cactus sufre de varias amenazas, entre las cuales está la agricultura y el pastoreo. El ecosistema es destruido por la necesidad de tierras que fuerza a los campesinos a deforestar para establecer monocultivos estacionales de autoconsumo, especialmente frijol y maíz, la construcción de carreteras y el avance urbano. De tal manera que la diversidad biológica desaparece, perdiéndose flora y fauna probablemente no descrita o endémicas del lugar, que se acaban al desaparecer su hábitat natural (2, 4).

El cultivo del melón se ha incrementado en Guatemala en los últimos diez años, de tal manera que algunos habitats han desaparecido y con ellos especies endémicas las cuales han reducido las poblaciones de cactáceas existentes, siendo una consecuencia de esto la pérdida de la diversidad genética de la población, así como la posible utilidad de algunas especies (4).

Actualmente, el cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose) se ha visto amenazado por la deforestación y la sobrecolecta para uso comercial, más que todo como ornamental, lo que contribuye no sólo a la pérdida de este material, sino también a la desertificación del suelo alterando las comunidades bióticas y su regeneración. Al coleccionar a las plantas maduras, éstas ya no dejan descendientes en la zona, no hay reproducción vegetativa ni reproducción sexual que permita la propagación de las especies, de tal manera que los individuos van siendo cada vez más escasos, y restringidos a áreas más pequeñas dentro de la zona. Esta especie se incluye en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES).

Actualmente no existe ninguna referencia sobre la propagación de ésta especie, por lo que únicamente se puede utilizar como referencia lo investigado en otros géneros de la misma familia. De acuerdo con esto, la presente investigación es un punto de partida para conservar y propagar esta especie, utilizando la propagación *in vitro* ya que es una especie amenazada y con un potencial ornamental que debe ser estudiada y aprovechada más a fondo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GENERALES DE LAS CACTÁCEAS

Las cactáceas son plantas xerófitas, suculentas y generalmente provistas de una armadura de espinas. Son plantas perennes que se han adaptado maravillosamente para vivir en condiciones de extrema aridez. Se caracterizan por lo tanto, por una serie de modificaciones morfológicas que les permite almacenar agua en grandes cantidades y retenerla por largos períodos (14).

A. Raíces

Sus raíces están adaptadas para absorber un gran volumen de agua en forma muy rápida, por lo que, generalmente, son muy ramificadas y extendidas (14).

Las raíces de las cactáceas presentan un gran poliformismo. En el caso del género *Mammillaria*, sus raíces son superficiales y muy ramificadas, captan rápidamente cualquier humedad. En otros casos, como en el género *Peniocereus*, por ejemplo, las raíces desempeñan la función de almacenar el agua. Separada del tallo por un cuello estrecho, está hinchada y puede pesar varios kilogramos, esta raíz napiforme. Las plantas del género *Epyphillum* son las que desarrollan las raíces aéreas, esto es señal de buena salud (17).

B. Tallos, costillas y pezones

Su tallo ha evolucionado hacia formas cilíndricas o globosas, que a mayor volumen presentan una menor superficie, reduciendo así el área expuesta a la evaporación. Sus hojas se redujeron y se transformaron en espinas, desapareciendo casi por completo (salvo en los géneros *Pereskia* y *Pereskiaopsis*), perdurando tan solo como hojas vestigiales muy reducidas en los tallos jóvenes de los nopales. Al desaparecer las hojas el tallo tuvo que asumir las funciones clorofilianas y de respiración de las hojas, por lo que los tallos de las cactáceas son verdes y están provistos de estomas y parénquimas clorofilianos (14).

Por tener la función de órgano de almacenamiento, el tallo está, la mayoría de las veces, hinchado. Puede tener forma de bola (*Mammillaria*), alargada (*Cereus*) o aplanada. Según la

especie y el género, el tallo presenta divisiones: costillas, que a su vez pueden estar divididas en pezones. Para clasificar las cactáceas, son fundamentales estos datos, ya que describen la planta (17).

C. Areolas y espinas

El carácter más distintivo de las cactáceas es la presencia de areolas en sus tallos y frecuentemente en sus flores y frutos. Las areolas son órganos especializados que corresponden a los nudos de otras plantas, de donde emergen las hojas, ramas y flores. Las areolas en general son redondeadas y consisten de yemas que dan origen a fieltro, lana, pelos, cerdas, glóquidas y espinas que corresponden a las hojas de las otras plantas; dan origen también a otras ramas y a las flores (14).

La areola, pequeña mata de pelos que no es más que una yema lateral, en el caso de la *Opuntia* los pequeños aguijones redondos que crecen de las areolas, pueden causar pinchazos muy dolorosos. En otros géneros, crecen del centro y del radio de las areolas los aguijones. Los aguijones son lisos u ondulados (por una cara) y tienen aspectos muy variados. En las *Mammillaria* y *Ferocactus* pueden ser de forma de gancho, largos y en forma de papiro (como de papel) en *Leuchtenbergia* y *Toumeyia*, con forma de sierra, en algunos *Echinocereus*, *Sulcorebutia* o *Pelecyphora* largos y fuertes (17).

D. Flores, frutos y semillas

Todas las cactáceas florecen. Quizás sea para compensar su aspecto austero, con una floración espectacular. Menos el azul, todos los colores están con gran intensidad. Las flores son muy extrañas: en las *Mammillaria*, pequeñas y en forma de corona, en los *Melocactus* salen de un cefalio, en las *Epiphyllum* las flores son muy grandes. Amarillas, malva, rojas incluso bicolores (*Sulcorebutia*), sus pétalos sedosos aparecen durante todo el año. De enero a junio florecerán las *Mammillaria*, en verano los *Notocactus* y *Parodia*, en otoño las *Neoporteria* y en navidades las *Schlumbergera* (17).

Después de la polinización aparecen los frutos, a veces más espectaculares que las flores. Pueden ser redondos, alargados u ovalados. El tamaño puede ser muy diferente, unos pocos

milímetros (*Epithelantha*) o más de 10 cm (*Hylocereus*). Suelen ser carnosos y rojos, para atraer los animales. La dispersión de las semillas ocurre cuando el fruto se pudre o lo ingiere un animal.

Los frutos en algunas especies son poco carnosos. Cuando el fruto madura, las semillas quedan libres, después de abrirse una tapa (*Ferocactus*) o al desprenderse la base (*Thelocactus*, *Oroya*, *Sclerocactus*). En algunos casos, al hacerse una herida vertical, las semillas caen rápidamente hacia la base (*Matucana*). Las hormigas, atacan los frutos cerrados, diseminándolas (17).

Según el género las semillas tienen tamaños y cantidades diferentes. Así, en el fruto globoso del género *Islaya* sólo hay unas pocas semillas y en los frutos carnosos de los géneros *Echinocereus*, *Carnegia* o *Trixanthocereus* se puede encontrar miles de semillas de color negro, naranjas o crema, lisas. Estas semillas pueden medir unas pocas décimas de milímetros (*Parodia microsperma*, *Aztekium ritteri*) o de cinco mm para arriba en las *Opuntia* y *Tephrocactus* (gracias a su gruesa cutícula, antes de plantarlas hay que escarificarlas para que puedan germinar) (17).

Las cactáceas abarcan las plantas comúnmente llamadas: nopales, órganos y biznagas, cuyos frutos reciben los nombres genéricos de tunas, pitayas, pitahayas y chilitos. En la antigüedad, las cactáceas jugaron un papel importante en la alimentación de las diversas tribus indígenas de México, y actualmente, por sus bizarras, forma y alto valor estético, son objeto de intenso cultivo alrededor del mundo (14).

3.1.2 DISTRIBUCIÓN DE CACTÁCEAS EN GUATEMALA

En Guatemala existen alrededor de 35 especies de cactáceas y suculentas, de las cuales ocho especies, agrupadas en cuatro géneros, son endémicas nativas y corresponden a: *Ephiphyllum*, *Myrtylocactus*, *Nyctocereus* y *Opuntia*, las que se encuentran en diferentes departamentos.

- A. **Cactus epífitos:** Chimaltenango, Quetzaltenango y Santa Rosa.
- B. **Cactus de zonas áridas:** Zacapa, El Progreso, Baja Verapaz, Guatemala, Jutiapa, Costa del Pacífico, Chiquimula y Huehuetenango.

Dentro del bosque subtropical espinoso, que comprende los departamentos de El Progreso y Zacapa, con un área de 928 kilómetros cuadrados, alturas sobre el nivel del mar en el rango de los 140 a 560 metros y una extensión de 75 kilómetros cuadrados, que abarca la sierra de Las Minas, al norte, la montaña de Jalapa, al sur y la Sierra del Merendón al este, se encuentran alrededor de 165 especies (4, 21).

3.1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LAS CACTÁCEAS

Las cactáceas crecen generalmente en zonas áridas, lo cual es una ventaja comparativa puesto que no se les encuentra en Asia, África ni Europa, salvo algunas especies que han sido llevadas a esos lugares y se han aclimatado.

Estados Unidos, España, Alemania, Japón y otros países, cultivan cactus en grandes cantidades para la venta, por ser consideradas como plantas raras y extrañas, lo que hace que sean muy apreciadas. Cada planta pequeña tiene un valor entre cinco y 10 dólares, o incluso más, dependiendo de la especie. Asimismo, existen clubes de cactófilos en todo el mundo, incluso en Rusia y en Europa (11).

Corea es el mayor productor en el ámbito mundial y exporta a los países nórdicos por ser las cactáceas un producto nuevo y exótico. En los últimos 15 años la demanda se ha incrementado tanto para las variedades selváticas como las de desierto, aunque las variedades de desierto son más populares. Los tamaños en demanda son de 1.5 a 80 cm, con preferencia del mercado de 1.5 a 15 cm, el cual se encuentra bien cubierto; sin embargo, la demanda por las cactáceas más grandes (de 20 a 80 centímetros) es mucho mayor que la producción anual (11).

Aparte de la importancia como plantas ornamentales, las cactáceas tienen importancia comercial, industrial, medicinal y también farmacológica, por la enorme cantidad de sustancias y alcaloides que contienen, por ejemplo en el peyote (*Lophophora williamsii*) se han encontrado 58 alcaloides. Se menciona también al “organo” (*Stenocereus marginatus*) utilizado por compañías que elaboran shampoo y tintes para el cabello, “grambullo” (*Myrtillocactus geometrizans*) de fruto comestible, “nopal de castilla” (*Opuntia ficus-indica*) nopal para verdura (11).

3.1.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CACTUS CABEZA DE VIEJO (8, 16)

Reino:	Plantae
Clase:	Dicotiledóneas
Subclase:	Caryophyllidae
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Cactáceae
Género:	<i>Cephalocereus</i>
Especie:	<i>Cephalocereus maxonii</i> Rose
Sinónimos:	<i>Pilocereus tehuacanus</i> , <i>Cephalocereus palmeri</i> , <i>Pilocereus palmeri</i> , <i>Pilocereus maxonii</i> , <i>Cephalocereus leucocephalus</i> , <i>Pilosocereus maxonii</i> , <i>Cereus maxonii</i> , <i>Cephalocereus cometes</i>
Nombre común:	Cabeza de Viejo, tuno, órgano.

En la Figura 1, se presenta un ejemplar de Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose), procedente del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA).



Figura 1. Cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose), cultivado en maceta.

3.1.5 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y CLAVE PARA LAS ESPECIES DE *Cephalocereus*

El género *Cephalocereus* presenta plantas arborescentes con tronco bien definido, ramas escasas o más numerosas que se ramifican secundariamente, largas y erectas, de consistencia suave, pruinosas, verde glaucas con ápice azulado; costillas más bien escasas; areolas con espinas, las productoras de flores con lana y pelos largos sedosos blancos integrando el pseudocefalio. Flores nocturnas ampliamente campanuladas, blancas o levemente rosadas; pericarpelo y tubo receptacular con podarios escasos, con escamas pequeñas y desnudas. Fruto globoso a globoso-aplanado, con podarios largos y anchos que forman surcos longitudinales, sus escamas muy reducidas por lo que se dice desnudo, al madurar rojo vino, antes verde oliva azulado, olor desagradable; conserva los restos secos del perianto. Semillas numerosas, pequeñas, testa negra finamente reticulada, brillante (3).

Éste género está distribuido desde México hasta América del Sur. De Mesoamérica han sido descritas tres especies cuya clave se presenta a continuación (3):

A. Clave para las especies del género *Cephalocereus*

- a. Ramas más bien delgadas, verde claro, espinas 15-26.....*Cephalocereus gaumeri*
- aa. Ramas gruesas verde azuladas
- b. Espinas negruzcas, pseudocefalio en varias porciones.....*Cephalocereus collinsi*
- bb. Espinas amarillentas, pseudocefalio que abarca una zona
de 30 centímetros de longitud.....*Cephalocereus maxonii*

B. Descripción de *Cephalocereus maxonii*

Plantas de dos a tres m de altura o probablemente más. Ramas escasas, largas, erectas o casi así, glaucas o verde azuladas; costillas seis a ocho, agudas; areolas pequeñas; espinas alrededor de 10, delgadas; espinas ventrales una, de cuatro cm de longitud; pseudocefalia apical en las ramas maduras, abarcando una zona como de 30 cm de longitud, integrado por abundantes pelos blancos como de cuatro cm de longitud que ocultan las espinas. Flores blancas, con leve tinte rosa, de cuatro cm de longitud; pericarpelo con algunas escamas pequeñas. Fruto globoso, de 3.5 cm de diámetro. Semillas morenas, testa reticulada (3).

C. Distribución de *Cephalocereus maxonii*

México: Chiapas, entre Comitán y Ciudad Cuauhtémoc. **Guatemala:** Planicies y laderas rocosas secas, 200 – 1000 msnm. Baja Verapaz; El Progreso (tipo El Rancho); Zacapa; Chiquimula; Jutiapa; El Quiché. **Honduras:** Valle Comayagua y posiblemente en otros valles calientes, secos, de la costa norte de Honduras (3).

3.1.6 PARÁMETROS DE CLASIFICACIÓN DE PELIGRO DE EXTINCIÓN

A. LISTA ROJA DEL CONAP

En cumplimiento de los artículos 23, 24, 25, 26 y 27 del Decreto Ley 4- 89 y sus reformas, Decretos 18- 89 y 110- 96, se emiten los listados de especies de flora amenazadas para su publicación en el Diario Oficial. Estos listados se han elaborado tomando en cuenta los requerimientos técnicos y administrativos del CONAP para proteger aquellas especies que en el ámbito interno requieran autorización para su aprovechamiento y comercialización, así como el Convenio Sobre Comercio Internacional De Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres “CITES” (6).

Para el logro de los propósitos de los listados se han tomado en consideración los parámetros siguientes:

a. Categoría 1

Incluye las especies que se encuentran en peligro de extinción. Las especies en esta categoría podrán ser utilizadas exclusivamente con fines científicos y reproductivos. Se prohíbe la libre exportación y comercialización de estas especies extraídas de la naturaleza. Podrán comercializarse aquellos especímenes, partes y derivados que se han reproducido por métodos comprobados (6).

b. Categoría 2

Incluye aquellas especies de distribución restringida a un solo tipo de hábitat (endémicas), podrán ser utilizadas de acuerdo a los siguientes lineamientos:

- i.** Con fines científicos y para reproducción.

- ii. Con fines comerciales su aprovechamiento se regulará a través de planes de manejo, los que serán aprobados siempre y cuando garanticen la supervivencia de la especie o especies de que se trate. Su uso requerirá de un Estudio de Impacto Ambiental (EIA).

c. Categoría 3

Son especies, que si bien en la actualidad no se encuentran en peligro de extinción, podrían llegar a estarlo si no se regula su aprovechamiento. Podrán ser utilizadas de acuerdo a los siguientes lineamientos:

- i. Con fines científicos y para reproducción.
- ii. Con fines comerciales podrán ser aprovechadas conforme planes de manejo técnicamente elaborados y debidamente aprobados por el organismo o institución competente. Los planes de manejo deberán garantizar la estabilidad de las poblaciones de las especies aprovechadas.

B. Apéndices CITES

a. Apéndice I

Incluye todas las especies en peligro de extinción que son o pueden ser afectadas por el comercio. El comercio en especímenes de estas especies deberá estar sujeto a una reglamentación particularmente estricta a fin de no poner en peligro aún mayor su supervivencia y se autorizará solamente bajo circunstancias excepcionales (6).

b. Apéndice II

- i. Incluye todas las especies que si bien en la actualidad no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, podrían llegar a esa situación a menos que el comercio en especímenes de dichas especies esté sujeto a una reglamentación estricta, a fin de evitar utilización incompatible con su supervivencia.
- ii. Aquellas otras especies no afectadas por el comercio, que también deberán sujetarse a reglamentación con el fin de permitir un eficaz control del comercio en las especies a que se refiere el subpárrafo primero del presente apéndice.

c. Apéndice III

Incluye todas las especies que cualquiera de las partes manifieste que se hayan sometidas a reglamentación dentro de su jurisdicción, con el objeto de prevenir o restringir su explotación, y que necesiten la cooperación de otras partes en el control de su comercio (6).

3.1.7 ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Las etapas que conlleva la micropropagación según Murashige (1974) están definidas de la manera siguiente (12): Establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación, enraizamiento y preparación del inóculo para su trasplante al suelo (aclimatización).

A. Asepsia del medio de cultivo

Los medios de cultivo son propicios para el desarrollo de microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente o llegan con el explante y reducen la calidad de las plantas producidas, además de competir por el espacio y alimento del cultivo, por lo cual es necesario que el explante se encuentre debidamente limpio y desinfectado. Los compuestos químicos más utilizados para la limpieza y desinfección de explantes son el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloruro de mercurio, el cloro comercial y el alcohol en diferentes concentraciones (10).

B. Multiplicación

Esta fase se ve influenciada por las condiciones nutritivas y microclimáticas *in vitro*, y la ganancia en peso seco da como resultado la diferenciación *de novo*. La formación de nuevas células por división, producen esa ganancia en peso (5).

C. El enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo (aclimatización)

Esta fase consta de dos pasos: El primero, se inicia con trasladar el material vegetal a otro medio de cultivo con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir; disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. El segundo paso, consiste en lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que quedan en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas, a las cuales se les van abriendo agujeros para que

las plantas se adapten paulatinamente a su nuevo hábitat. Esta última parte de esta fase se le conoce como aclimatización o endurecimiento de la planta (5).

3.1.8 CALIDAD DEL EXPLANTE PARA CULTIVO *IN VITRO*

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse a partir de cualquier parte de la planta; sin embargo, la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, dicha elección dependerá del objetivo, de la especie vegetal y del sistema de cultivo a utilizar.

Es aconsejable utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente del explante. Se seleccionan aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como las regiones meristemáticas. El éxito del cultivo de tejidos disminuye con el aumento de la edad de la planta que da el explante (planta madre), es decir, que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. Los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies (5, 20).

El tamaño del explante es otro factor a considerar en el establecimiento del cultivo *in vitro*. A mayor tamaño se facilita la proliferación callosa, pero también aumentan las posibilidades de heterogeneidad y de contaminación por microorganismos. Sin embargo, existe un tamaño mínimo del explante que varía según la especie vegetal, por debajo del cual no se obtiene respuesta (5).

La variabilidad asociada al genotipo de la especie vegetal a utilizar influye en la respuesta *in vitro* que se obtiene. Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en cuanto a los reguladores de crecimiento pueden ser de utilidad para obviar ese efecto del genotipo del material vegetal (5).

3.1.9 COMPOSICIÓN GENERAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

A. Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas se pueden dividir en dos grandes grupos: macronutrientes y micronutrientes, tal como se indica a continuación:

a. Macronutrientes

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además, carbono, hidrógeno y oxígeno. Los elementos más requeridos son principalmente: N, P, K, Ca, Mg, y S (20).

b. Micronutrientes

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co, y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (20).

B. VITAMINAS

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son (20):

a. Tiamina

Conocida también como vitamina B1. Se añade como tiamina-HCL en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de las células vegetales.

b. Piridoxina

Conocida también como vitamina B6. Se añade como piridoxina –HCl.

c. Ácido pantoténico

Ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.

d. Ácido fólico

Disminuye la proliferación de tejido en la obscuridad, mientras que en la luz aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido *P*-amino benzóico.

e. Riboflavina

Es inhibidor del crecimiento de raíces.

f. Vitamina E

Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células.

g. Myo-inositol

No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico (20).

C. Reguladores de crecimiento

En cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos: auxinas, giberelinas, citocininas y ácido abscísico

a. Auxinas

Las auxinas contribuyen a la elongación celular. Tienen como función biológica la expansión de las células del tallo y coleótilos, a través de promover el ensanchamiento de las paredes celulares en la división celular; así mismo, fomentan el desarrollo de callos, e inducen la formación de raíces a partir de este. Se utilizan también para el enraizamiento de varias especies vegetales (22).

La auxina se sintetiza principalmente en los ápices de tallos y raíces, de donde migra a la zona de elongación y otras zonas donde ejercerá su acción (1).

i. Uso de las auxinas en cultivo de tejidos vegetales

Las auxinas son ampliamente utilizadas en trabajos de micropropagación y son incorporadas al medio nutritivo para promover el crecimiento de callo, suspensiones celulares u órganos y para regular la morfogénesis, conjuntamente con las citocininas. La selección de auxinas a utilizar y la concentración requerida dependerá de:

- i.1** El tipo de crecimiento o desarrollo requerido.
- i.2** Los niveles naturales de auxina dentro del explante cuando es disectado.
- i.3** La capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar auxina en forma natural.
- i.4** La interacción (si hay) entre las auxinas sintéticas aplicada y las hormonas endógenas naturales (1).

ii. **Modo de acción de las auxinas y respuesta fisiológica en la planta**

Las auxinas actúan promoviendo el crecimiento y en morfogénesis como sigue:

ii.1 **Promoviendo el crecimiento**

Induciendo la secreción de iones H^+ en y a través de la pared celular. El enlace de la auxina conduce al rompimiento y acidificación de la pared, incrementando su tamaño. Por un efecto sobre el metabolismo del ARN (y por tanto la síntesis de proteína), posiblemente por inducción de la transcripción de moléculas de ARN mensajero específico (ARNm). Los ARNm codifican proteínas que son requeridas para mantener (sostener) el crecimiento (1).

ii.2 **Morfogénesis**

Las auxinas aplicadas son capaces de borrar la fisiología programada genéticamente de tejidos de plantas completas, que fuera previamente determinada en su estado diferenciado (1).

Las respuestas fisiológicas que las auxinas provocan en las plantas se pueden resumir en forma general como sigue:

Afectan una expansión celular a través del aumento de la plasticidad de la pared celular. Este efecto de estimular la expansión celular se traduce en un estímulo al crecimiento, en escala macroscópica.

La síntesis de ARN es el estímulo de la división celular que ocurre en algunas situaciones después de la aplicación de auxina exógena, contribuye al estímulo del crecimiento. La formación de raíces en esquejes de distintos tipos.

Dominancia apical. Una auxina producida en el meristemo apical impone un estado de dominancia en las yemas axilares localizadas abajo del meristemo apical, inhibiendo su crecimiento. Si el meristemo apical es removido, las yemas axilares son liberadas de la dominancia y comienzan a crecer. Otros efectos más específicos son la inducción de la floración (1).

iii. Auxinas reguladoras del crecimiento comúnmente utilizadas

Las auxinas más comúnmente utilizadas son: El 2,4-D; ácido 3-indolbutírico (AIB); ácido α -naftalenacético (ANA). Junto con las citocininas, el 2,4-D es utilizado para la inducción de callo y cultivos en suspensión, siendo reemplazado por ANA y AIB cuando es requerida la morfogénesis. ANA y AIB son auxinas favoritas para el cultivo de tejidos vegetales. Otras auxinas utilizadas con menos frecuencia son: 4-CPA: ácido 4-clorofenoxiacético; MCPA: ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético; 2,4,5-T: ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético; Dicamba: ácido 3,6-dicloroanísico; Picloram: ácido 4-amino,3,5,6-tricloropicolínico (1).

iii.1 Efectos de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales

Inducción de la formación de callo.

Inhibición de formación de clorofila.

Morfogénesis: formación de raíz y brote.

Embriogénesis somática: altos niveles de auxina 2,4-D.

Cultivo de órganos; una auxina es casi invariablemente requerida para promover el crecimiento inicial de explantes de meristemo y puntas de brotes (1).

iv. Estabilidad de las auxinas en los medios de cultivo

AIA y AIB son termolábiles y son descompuestos durante la esterilización en autoclave, pero el AIA no es estable en el medio de cultivo aun si es esterilizado por ultrafiltración (1).

v. Ruta de biosíntesis del ácido indolacético

El AIA es formado a partir del aminoácido *L*-triptofano y los niveles endógenos de las auxinas se incrementan rápidamente en tejidos incubados en un medio de cultivo conteniendo este aminoácido. *L*-triptofano puede también actuar como una auxina en algunas plantas, en estos casos puede estimular el crecimiento o inducir morfogénesis (crecimiento de callo de híbridos de *Nicotiana glauca* X *N. Langsdorfii* y la formación de callos embriogénicos en algunos cultivares de arroz) (1).

b. Citocininas

Promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son: benciladenina (BAP), cinetina y zeatina, en concentración de 0.03 – 30 mg/l. La BAP es la

citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y de yemas adventicias (20).

La función biológica de las citocininas es estimular principalmente la división celular o citocinesis. Perea, citado por Villacinda (19), menciona que en cultivos *in vitro*, las citocininas han permitido grandes progresos, especialmente, en micropropagación, por su función de proliferación celular mediante la división celular y la diferenciación de los explantes. Las citocininas más utilizadas son la bencilaminopurina (BAP), siendo ésta más utilizada que la cinetina (KIN) y la 6-4-hidroxi-e-metil but-tran-2-erilamino-purina (ZEA).

i. Biosíntesis y transporte de las citocininas

Las citocininas parecen ser sintetizadas por la incorporación de una cadena lateral, generalmente con cinco carbonos en la posición N₆ de la base nitrogenada adenina. Esta base nitrogenada tiene la estructura idéntica a la adenina que ocurre en los ácidos nucleicos. Los diferentes tipos de citocininas difieren entre sí por la modificación de las cadenas laterales (1).

Las citocininas naturales son encontradas en todas las plantas superiores, en las algas y en los hongos y en ciertas bacterias como moléculas libres (1).

El meristemo apical de la raíz es el principal lugar de síntesis de citocininas en plantas. Las citocininas son transportadas por el xilema y el floema (1).

ii. Mecanismos de acción de las citocininas

Las hormonas, de una manera general, probablemente se integran con receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Recientemente fue identificada una proteína que actúa como receptor para una citocinina a la cual fue denominada Cytokinin Binding Factor (CBF1). Se sugiere que este receptor sea una proteína del ribosoma y que este complejo citocinina receptor regula la síntesis de proteínas (1).

Existen indicativos de que las citocininas aumentan la concentración de calcio en el citoplasma, promoviendo su absorción del medio externo. El calcio a través de la unión con la proteína calmodulina. La calmodulina es inactiva como regulador, pero el complejo calmodulina-

calcio puede activar un gran número de enzimas. Las citocininas parecen estimular la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto, estabilizando ciertos ARNm específicos que tienen su degradación difícil (1).

iii. Efecto de las citocininas en cultivo de tejidos vegetales (1)

- iii.1** Estimulación de la división celular.
- iii.2** Formación de brotes adventicios.
- iii.3** Promueven la formación de callos embriogénicos.
- iii.4** Uso en cultivo de brotes.
- iii.5** Proliferación de brotes adventicios.
- iii.6** Formación de yemas adventicias de brote.
- iii.7** Inhibición de formación de raíz.

D. Aminoácidos

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; *L*-argina estimula raíces; *L*-serina es empleada en cultivo de microsporas y *L*-cisteína es un agente reductor (20).

E. Carbohidratos

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. Sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen, en importancia, glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa. La concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 20 a 45 g/l (20).

F. Agua

El agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada, de cualquier forma el empleo de un destilador de vidrio es requerido en la destilación final (20).

G. Agentes solidificantes (20)

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de “soporte” para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- a. Con agua el agar forma geles que se derriten a 100 °C y se solidifican a 45 °C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- b. El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- c. El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- d. No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros compuestos se han empleado para substituir el agar; sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que ha alcanzado más popularidad es el “Gelrite”. Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir este soporte .

H. Suplementos no definidos

Algunos de los suplementos no definidos son los siguientes (20):

- a. Extracto de levadura.
- b. Jugos y extractos de varios frutos (plátano, tomate y agua de coco).
- c. Caseína hidrolizada (proteínas).
- d. Antioxidantes, como el ácido ascórbico.
- e. Absorbentes, como el carbón activado.

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), ubicado en el kilómetro 21.5 carretera a Amatitlán, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala.

3.2.2 PROPAGACIÓN NATURAL DE LAS CACTÁCEAS

En general las especies de la familia de las cactáceas se reproducen naturalmente, ya sea de forma sexual o asexual.

A. Propagación asexual

Se realiza cuando se desprenden segmentos que una vez en el suelo brotan por sus areolas y si las condiciones de humedad y sustrato son las apropiadas, luego iniciará la formación de raíces hasta formar una nueva planta, la cual podrá iniciar de nuevo el proceso (2).

B. Propagación sexual

Para ello primero es necesario que la flor se abra, entre en anthesis y luego por el néctar que produce, los colores, el olor agradable o desagradable y forma de la corola, entre otros, atraiga agentes polinizadores como avispas, abejas, mariposas, aves y murciélagos para que realicen una polinización cruzada (alógama), pues normalmente sucede que el polen madura antes que el estigma pueda recibirlo para formar el tubo polínico; luego si hay fecundación se producirá un fruto del cual contendrá pocas o numerosas semillas y es en este punto donde dependerá de las condiciones del medio en que caigan las semillas que germine aunque sea un mínimo porcentaje de ellas (2).

3.2.3 GENERALIDADES DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LAS CACTÁCEAS

La selección del explante es un aspecto muy importante que debe considerarse en la propagación *in vitro*. Cualquier porción de explante que se seleccione debe contener suficiente cantidad de areolas (al menos cinco) pues éstas constituyen los centros meristemáticos de las cactáceas capaces de generar yemas axilares, espinas y yemas florales; sin embargo, es importante trabajar a nivel de explante conteniendo areolas, que con areolas separadas, pues según la especie de que se trate así será su tamaño y distribución en el tallo.

El explante de ápice de brote de plántulas de semillero, ya sea germinadas *in vitro* o en invernaderos; secciones verticales o laterales del tallo o cladodio (el tallo aplanado típico de *Opuntia*) y tubérculos (llamados a veces mamilas) que son proyecciones suculentas del tallo que en algunas especies ocurren en una forma espiral. La punta del tallo de plántulas de invernadero o de plantas maduras de campo se pueden esterilizar y funcionan exitosamente como explantes o bien epicotilos de plántulas *in vitro* (8, 9).

3.2.4 INVESTIGACIONES RELACIONADAS CON LA PRESENTE TESIS

Se conoce relativamente poco sobre la propagación *in vitro* de cactáceas y específicamente sobre *Cephalocereus maxonii*, no se reporta ninguna investigación realizada.

Para la micropropagación de cactáceas se han utilizado diferentes medios de cultivo, pero el medio basal de Murashige y Skoog (1962) (13) ha sido recomendado como el más adecuado, pero es conveniente suplementarlo con reguladores de crecimiento, en general se requieren bajos niveles o nada de auxina en combinación con niveles moderados a elevados de citocinina para la proliferación de cactus. Entre las citocininas se prefiere el uso de la bencilaminopurina o 6-bencilaminopurina (BAP), la cinetina y 2iP, en un rango de concentración entre 1 – 10 mg/l. De las auxinas se prefieren los ácidos naftalenacético, indolbutírico e indolacético, pero en rango mucho más bajos que las citocininas (entre 0.02 y 2 mg/l). Muchos cactus tienen la capacidad de sintetizar endógenamente auxinas, lo que causa una inhibición del proceso morfogénico en presencia de altas concentraciones de auxinas, también el exceso de éstas estimula la formación de callo (9, 15).

Es conveniente aplicar reguladores de crecimiento para la micropropagación *in vitro* de cactáceas, siendo algunas combinaciones apropiadas para las siguientes especies las que se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos de reguladores de crecimiento que han propiciado la proliferación de brotes en cultivo de tejidos para cactáceas.

TRATAMIENTO	ESPECIE	BAP (mg/l)	ANA (mg/l)
1	<i>Akersja</i> sp.	5	0.1
2	<i>Epiphyllum chrysocordium</i>	1	1
3	<i>Epiphyllum chrysocordium</i>	1	0.1
4	<i>Gymnocalycium mihanovichii</i>	5	0.1
5	<i>Leuchtenbergia principis</i>	10	0.1
6	<i>Echinopsis = Lobivia</i> sp.	5	0.1
7	<i>Mediocactus coccineus</i>	1	0.5
8	<i>Mammillaria san-angelensis</i>	0.1-1	0.01

Fuente: George, 1996 (8)

Quizá el trabajo más relacionado con la presente tesis es la propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* realizado por Corona y Yáñez (7), empleando el medio de cultivo Murashige y Skoog de 1962 con las auxinas 2,4-D, ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA) y la citoquinina kinetina a diferentes concentraciones.

Resultado de la investigación se tuvo que todas las combinaciones de ANA, AIB y AIA con kinetina resultaron en la muerte de los explantes debido a las reacciones de oxidación e intoxicación por compuestos fenólicos que los mismos explantes producían con respuesta a la toxicidad del tratamiento; sin embargo, la combinación de kinetina con 2,4-D fue positiva, siendo la más apropiada para micropropagar a *Cephalocereus senilis* la de cuatro mg/l de kinetina con 2 mg/l de 2,4-D (7).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose).

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar el efecto de 30 tratamientos, consistentes en diferentes dosis de ácido naftalenacético en combinación con diferentes dosis de bencilaminopurina, sobre la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo, en términos de número, peso y altura de brotes.

5. HIPÓTESIS

Existe, al menos, un tratamiento, dentro de los 30 evaluados, que resulta más favorable para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo.

6. METODOLOGÍA

6.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

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

6.2 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal con que se trabajó consistió en secciones de plántulas del cactus Cabeza de Viejo (explantos iniciales de esta investigación) que fueron previamente germinadas *in vitro*, en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores del crecimiento, en el laboratorio de Biotecnología. Las semillas fueron colectadas en los departamentos de El Progreso y Zacapa.

6.3 TRATAMIENTOS

Debido a que no se contaba con una referencia específica para la propagación *in vitro* de *Cephalocereus maxonii*, se tomó como base las referencias de investigaciones hechas en otras especies de cactáceas (ver cuadro 1), por lo que se evaluó un total de 30 tratamientos (Cuadros 2 y 3) que consistieron en 30 combinaciones de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), en un medio de cultivo de sales básicas MS (Murashige y Skoog, 1962) para la reproducción *in vitro* (Cuadro 4).

Cuadro 2. Combinaciones de los reguladores del crecimiento ANA y BAP para cada uno de los 30 tratamientos evaluados en la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo.

		BAP (mg/l)					
		0	0.5	1	2.2	5	10
ANA (mg/l)	0	1	2	3	4	5	6
	0.01	7	8	9	10	11	12
	0.1	13	14	15	16	17	18
	0.5	19	20	21	22	23	24
	1	25	26	27	28	29	30

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
1	Medio MS suplementado con 0.0 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP (testigo)
2	Medio MS suplementado con 0.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP
3	Medio MS suplementado con 0.0 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP
4	Medio MS suplementado con 0.0 mg/l de ANA y 2.2 mg/l de BAP
5	Medio MS suplementado con 0.0 mg/l de ANA y 5.0 mg/l de BAP
6	Medio MS suplementado con 0.0 mg/l de ANA y 10.0 mg/l de BAP
7	Medio MS suplementado con 0.01 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP
8	Medio MS suplementado con 0.01 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP
9	Medio MS suplementado con 0.01 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP
10	Medio MS suplementado con 0.01 mg/l de ANA y 2.2 mg/l de BAP
11	Medio MS suplementado con 0.01 mg/l de ANA y 5.0 mg/l de BAP
12	Medio MS suplementado con 0.01 mg/l de ANA y 10.0 mg/l de BAP
13	Medio MS suplementado con 0.10 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP
14	Medio MS suplementado con 0.10 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP
15	Medio MS suplementado con 0.10 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP
16	Medio MS suplementado con 0.10 mg/l de ANA y 2.2 mg/l de BAP
17	Medio MS suplementado con 0.10 mg/l de ANA y 5.0 mg/l de BAP
18	Medio MS suplementado con 0.10 mg/l de ANA y 10.0 mg/l de BAP
19	Medio MS suplementado con 0.50 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP
20	Medio MS suplementado con 0.50 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP
21	Medio MS suplementado con 0.50 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP
22	Medio MS suplementado con 0.50 mg/l de ANA y 2.2 mg/l de BAP
23	Medio MS suplementado con 0.50 mg/l de ANA y 5.0 mg/l de BAP
24	Medio MS suplementado con 0.50 mg/l de ANA y 10.0 mg/l de BAP
25	Medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP
26	Medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP
27	Medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de BAP
28	Medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 2.2 mg/l de BAP
29	Medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 5.0 mg/l de BAP
30	Medio MS suplementado con 1.0 mg/l de ANA y 10.0 mg/l de BAP

NOTA: MS = Murashige y Skoog (1962)

Cuadro 4. Composición del medio de sales básicas MS (Murashige y Skoog, 1962).

COMPONENTES	REACTIVO	CANTIDAD (mg/l)
Macronutrientes	KNO ₃	1,900
	NH ₄ NO ₃	1,650
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ • 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	MnSO ₄ • 4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	8.6
	H ₃ BO ₃	6.2
	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0.025
	NaMoO ₄ • 2H ₂ O	0.25
	CoCl • 6 H ₂ O	0.025
	NaFeEDTA (mM)	0.1
Vitaminas	Myo-Inositol	100
	Tiamina HCl	0.1
	Ácido nicotínico	0.5
	Pyridoxina HCl	0.5
Aminoácidos	Glicina	2
Azúcares	Sacarosa	30,000

6.4 UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental la constituyó un tubo de cultivo de 25 por 150 mm, conteniendo cinco ml del medio de cultivo y un explante por cada tubo de cultivo (Figura 2).

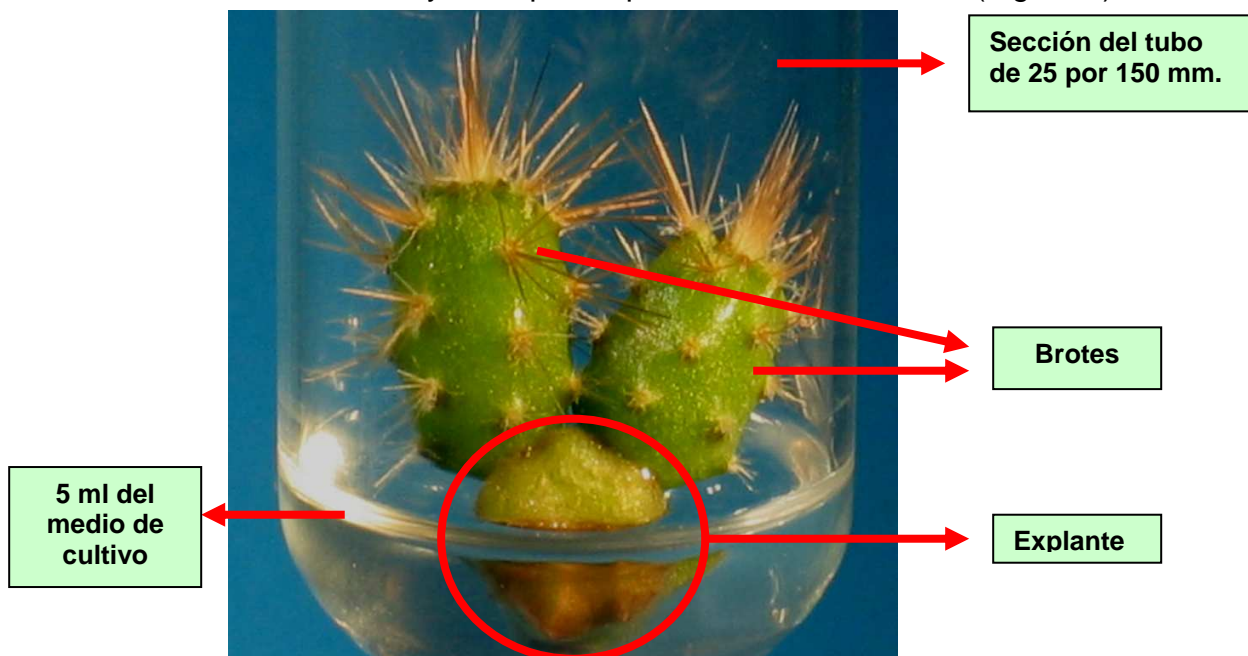


Figura 2. Unidad experimental empleada para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo.

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño empleado en el experimento fue un Completamente al Azar con 30 tratamientos y 30 repeticiones por tratamiento, para un total de 900 unidades experimentales, cuyo modelo estadístico se presenta a continuación.

6.5.1 MODELO ESTADÍSTICO PARA LA VARIABLE NÚMERO DE BROTES CON LA COVARIABLE NÚMERO DE AREOLAS

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta(X_{ij} - x_{..}) + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = es j-ésima observación de la variable número de brotes tomada bajo el i-ésimo tratamiento.

X_{ij} = es el efecto de la covarianza (número de areolas) correspondiente a cada unidad experimental.

$x_{..}$ = es el promedio de las X_{ij} .

μ = efecto de la media general.

T_i = es el efecto del i-ésimo medio de cultivo.

β = es el coeficiente de regresión lineal que indica la dependencia entre Y_{ij} y X_{ij} .

E_{ij} = componente de error aleatorio.

6.5.2 MODELO ESTADÍSTICO PARA LAS VARIABLES PESO UNITARIO DE BROTES Y ALTURA PROMEDIO DE BROTES

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Y_{ij} = Variable de respuesta (peso unitario de brotes y altura promedio de brotes).

μ = efecto de la media general.

T_i = es el efecto del i-ésimo medio de cultivo.

E_{ij} = componente de error aleatorio.

A. VARIABLES DE RESPUESTA

Las variables de respuesta fueron las siguientes:

- a. Número de brotes por explante:** Con la ayuda de un microscopio-estereoscopio se contó el número de brotes por explante, a los 37 días después de la siembra de los mismos.
- b. Peso unitario de brotes:** Con la ayuda de una balanza analítica, con una precisión de 0.1 miligramos, se pesó cada brote producido y se anotó su peso en miligramos.
- c. Altura de brotes:** Con la ayuda de un microscopio-estereoscopio y una regla milimetrada, se midió cada brote producido, y se anotó su altura en milímetros.
- d. Presencia o ausencia de callo y raíz:** Con la ayuda de un microscopio-estereoscopio, para cada brote producido se anotó la presencia o ausencia de callo y raíz.

6.6 MANEJO DEL EXPERIMENTO

En la Figura 3 se presenta un flujograma generalizado de las actividades centrales del manejo del experimento.

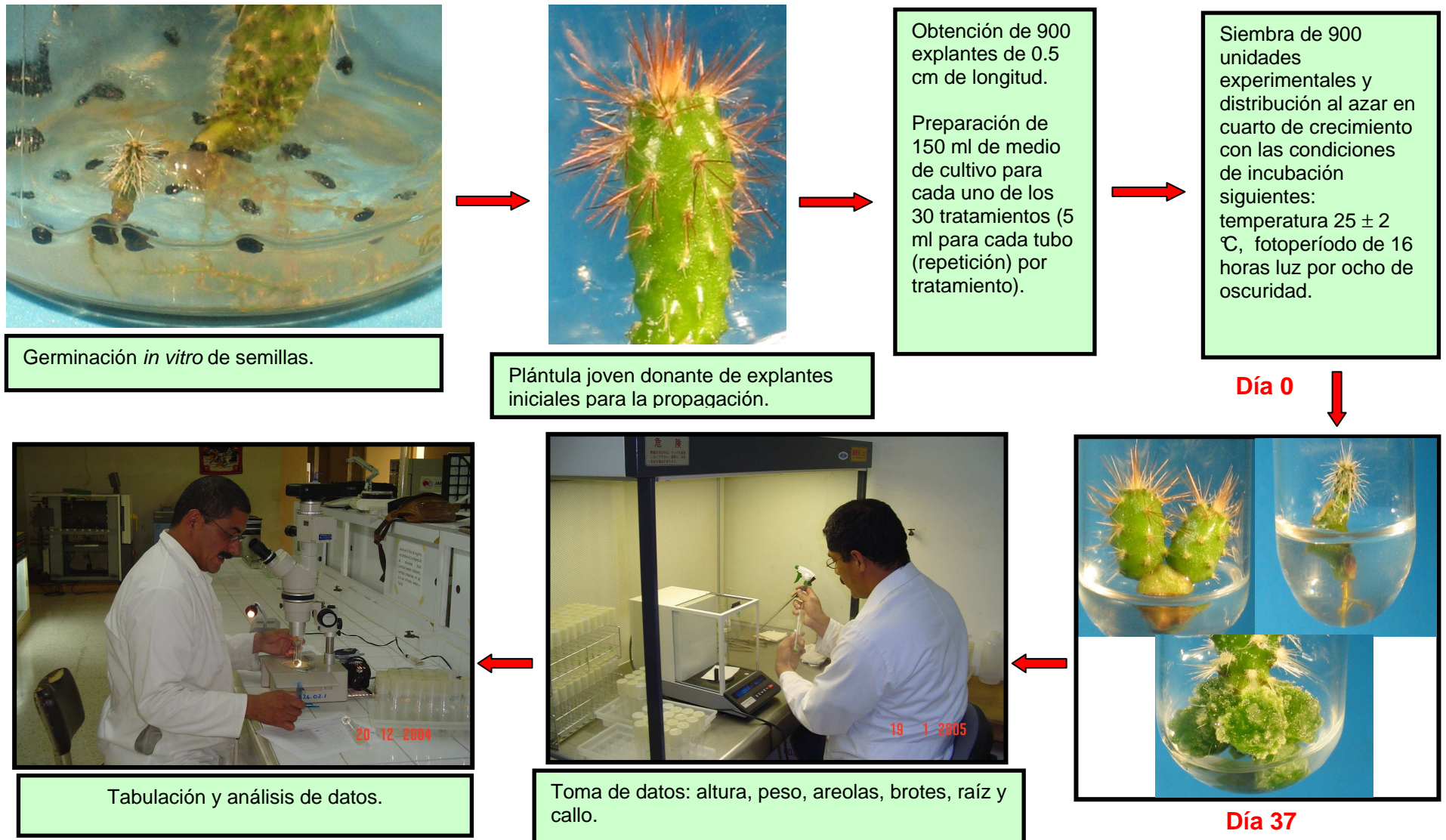


Figura 3. Flujograma de las principales actividades durante el manejo del experimento.

6.7 ANÁLISIS DE LA INFORMACION

Para procesar la información, previo al análisis de varianza, se analizaron los supuestos del ANDEVA y, en los casos en que los supuestos no se cumplieron, se hicieron las transformaciones necesarias. Se hizo un ANDEVA para cada una de las variables de respuesta y en los casos en que se presentaron diferencias significativas se procedió a realizar la prueba múltiple de medias de Duncan. Para el ANDEVA de número de brotes, se utilizó como covariable el número de areolas iniciales y para la separación de medias se utilizó una prueba de T para las medias ajustadas por mínimos cuadrados.

Se realizó un análisis de regresión simple que explica el peso unitario de los brotes en función del número de brotes por tubo de cultivo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos, por variable de respuesta, a los 37 días de cultivo *in vitro*.

7.1 NÚMERO DE BROTES

El análisis de varianza (ANDEVA), detectó alta significancia para la covariable (número de areolas iniciales), lo cual indica que el número de areolas iniciales en cada tratamiento fue diferente y que influye sobre el número de brotes, por lo tanto se debe incluir en el modelo y se debe ajustar las medias por la covariable. La prueba de Shapiro-Wilks detectó que los datos no se ajustan a una distribución normal, razón por la cual se empleó la transformación de raíz cuadrada de $(x+1)$. El ANDEVA detectó diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo, lo cual implica que en al menos en un medio de cultivo se obtuvo un número de brotes de *Cephalocereus maxonii* distinto al de los demás (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resumen del ANDEVA para la variable de respuesta número de brotes, transformados por raíz cuadrada más uno.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	F Calculada	Pr > Fc
Medios de cultivo	29	102.74872	8.66	0.0001**
Número de aréolas iniciales (covariable)	1	6.05064	14.8	0.0001**
Error	2361	965.50135		
Total Corregido	2391	1074.30071		

Pr > Fc = Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada.
Coeficiente de variación: 28.92 %.

Habiendo existido diferencias significativas entre los medios de cultivo, se procedió a realizar la prueba de T para las medias ajustadas por mínimos cuadrados, al 10 % de significancia, la cual separó los medios de cultivo en 12 grupos, siendo el mejor grupo el "A", que incluye seis de los 30 tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resumen de la prueba de T, de las medias ajustadas por mínimos cuadrados, para la separación de medias de la variable de respuesta número de brotes, con promedios transformados por raíz cuadrada más uno y ajustados por el número de areolas iniciales.

Tratamiento	Suplementos del medio MS (Murashige y Skoog 1962)		No. Brotes por tubo Ajustados	Prueba de "T" para las medias ajustadas por mínimos cuadrados
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)		
20	0.5	0.5	5.18	A
28	1	2.2	4.93	A B
22	0.5	2.2	4.91	A B
23	0.5	5	4.75	A B C
14	0.1	0.5	4.58	A B C D
16	0.1	2.2	4.42	A B C D E
17	0.1	5	4.13	C D E F
15	0.1	1	3.84	D E F G
18	0.1	10	3.83	D E F G H
24	0.5	10	3.77	E F G H I
6	0	10	3.76	E F G H I
29	1	5	3.75	E F G H I
21	0.5	1	3.59	F G H I J
12	0.01	10	3.57	F G H I J
30	1	10	3.31	G H I J
10	0.01	2.2	3.10	H I J K
27	1	1	3.05	I J K
11	0.01	5	3.03	I J K
9	0.01	1	2.84	J K
4	0	2.2	2.68	J K L
5	0	5	2.58	J K L
8	0.01	0.5	2.09	K L
25	1	0	2.09	K L
3	0	1	1.75	L
2	0	0.5	1.75	L
26	1	0.5	1.36	L
13	0.1	0	1.26	L
19	0.1	0	1.12	L
7	0.01	0	1.09	L
1	0	0	0.79	L

El número brotes por explante es mayor cuando se combinan las dosis de 0.1 y 0.5 mg/l de ANA con 0.5 y 2.2 mg/l de BAP, pues este juego de combinaciones incluye cuatro de los seis medios de cultivo del primer grupo de los 12 que se separaron. Para visualizar mejor lo enunciado se presenta el cuadro 7, donde se aprecia que los tratamientos 14, 16, 20 y 22 cumplen con ésta combinación lo cual deja ver un patrón de comportamiento.

Cuadro 7. Identificación de los seis mejores medios de cultivo para la variable de respuesta número de brotes por explante (datos transformados por raíz cuadrada de $X + 1$).

		BAP (mg/l)					
		0	0.5	1	2.2	5	10
ANA (mg/l)	0	1	2	3	4	5	6
	0.01	7	8	9	10	11	12
	0.1	13	14	15	16	17	18
	0.5	19	20	21	22	23	24
	1	25	26	27	28	29	30

Es importante resaltar que empleando una dosis constante de ANA (ya sea 0.1 ó 0.5 mg/l) e incrementar la dosis de BAP en el rango de 0.5 a 1 se produce un decremento del número de brotes en los tratamientos 15 y 21 respectivamente, pero luego al incrementar desde 1 mg/l hasta 2.2 mg/l de BAP se vuelve a incrementar el número de brotes por tubo en los tratamientos 16 y 22, respectivamente. Para visualizar mejor este aspecto se presenta la gráfica respectiva que muestra el comportamiento (Figura 4).

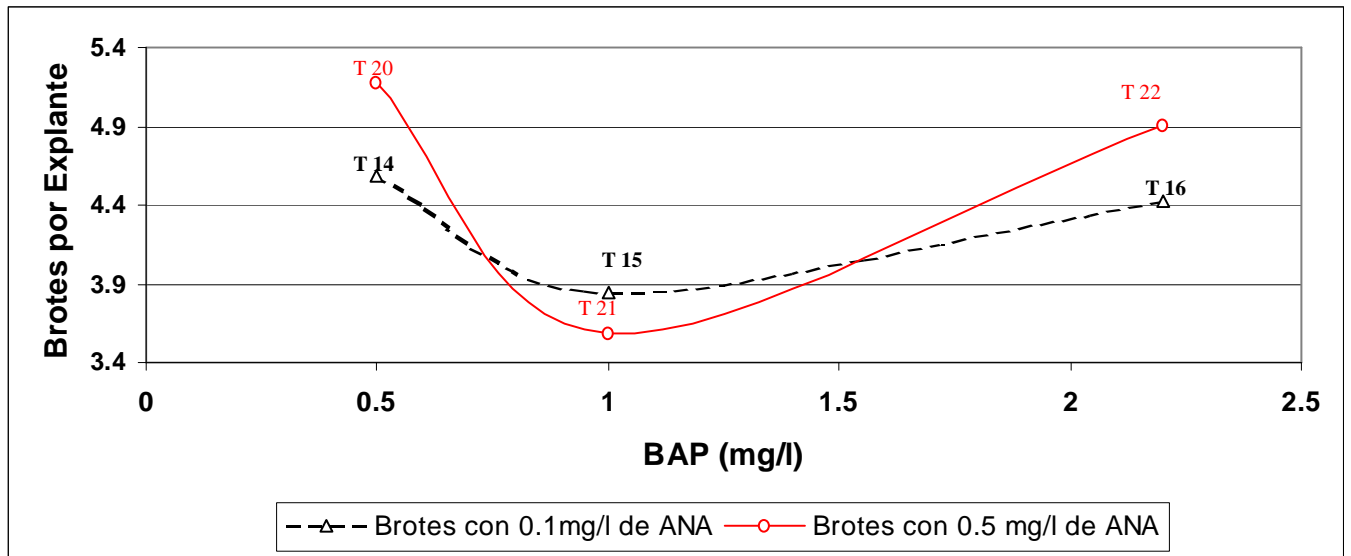


Figura 4. Comportamiento del número de brotes por explante, al combinar el rango de 0.5 a 2.2 mg/l de BAP con dosis constante de 0.1 y 0.5 mg/l de ANA.

No se encontró una explicación para este comportamiento, sin embargo, se deja de referencia como un resultado de la investigación ya que se observa una tendencia para ambos casos. Se sugiere explorar combinaciones de 0.5 mg/l de ANA con 0.35, 0.40, 0.45, 2.5, 2.30,

2.35 mg/l de BAP, porque podría incrementarse el número de brotes por explante de seguir el comportamiento observado.

7.2 PESO UNITARIO DE BROTES

La segunda variable de respuesta, en orden de importancia, es el peso unitario de brotes. El ANDEVA para esta variable de respuesta detectó diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo (Cuadro 8), por lo que se procedió a realizar la prueba de separación de medias de Duncan, al 10 por ciento de significancia, cuyo resumen se presenta en el Cuadro 9.

Cuadro 8. Resumen del ANDEVA para la variable de respuesta peso unitario de brotes en gramos, con transformación de raíz cuadrada de $X + 1$.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Pr>Fc
Medios de cultivo	29	1.31498	0.04534	2.25	0.0002**
Error	588	11.85304	0.02016		
Total Corregido	617	13.16802			

Pr > Fc = Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada.
Coeficiente de variación = 12.51%.

Los mejores tratamientos fueron el tres (1 mg/l BAP) y el dos (0.5 mg/l BAP) con 0.6 y 0.5 gramos de peso por brote, sin embargo, estos tratamientos no producen muchos brotes. De los seis tratamientos que producen la mayor cantidad de brotes, ninguno se encuentra en el primer grupo Duncan de peso unitario, sino que se ubican en el segundo grupo a excepción del tratamiento 23 que se ubica hasta el cuarto grupo Duncan con 0.200 gramos por brote. Una discusión más amplia para elegir el mejor tratamiento considerando esta variable de respuesta y el número de brotes por tubo, así como la altura promedio por brote se realiza en el inciso 7.4.

Cuadro 9. Resumen de la prueba de DUNCAN para el peso unitario de brotes en gramos.

Tratamiento	Suplementos del medio MS (Murashige y Skoog 1962)		Peso Unitario en gramos	Grupo Duncan al 10 por ciento
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)		
3	0	1	0.63	A
2	0	0.5	0.47	A B
9	0.01	1	0.40	B C
6	0	10	0.38	B C
19	0.1	0	0.38	B C
21	0.5	1	0.33	B C D
26	1	0.5	0.33	B C D
16	0.1	2.2	0.32	B C D
14	0.1	0.5	0.30	B C D
18	0.1	10	0.29	B C D
17	0.1	5	0.29	B C D
11	0.01	5	0.29	B C D
10	0.01	2.2	0.28	B C D
4	0	2.2	0.28	B C D
28	1	2.2	0.28	B C D
30	1	10	0.27	B C D
29	1	5	0.27	B C D
27	1	1	0.26	B C D
24	0.5	10	0.25	B C D E
22	0.5	2.2	0.24	B C D E
20	0.5	0.5	0.24	B C D E
15	0.1	1	0.24	B C D E
12	0.01	10	0.23	C D E
8	0.01	0.5	0.23	C D E
23	0.5	5	0.20	C D E
13	0.1	0	0.15	D E
5	0	5	0.14	D E
25	1	0	0.13	D E
7	0.01	0	0.12	D E
1	0	0	0.04	D E

7.3 RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE Y EL PESO UNITARIO

Se observó que los tratamientos que producían bastantes brotes estos eran pequeños y de poco peso, y por el contrario, los tratamientos que producían pocos brotes estos eran grandes y de mayor peso, por lo que se decidió determinar si existía una relación lineal entre ambas variables de respuesta. Se realizó un análisis de regresión lineal para determinar el tipo de relación que existe entre ambas variables de respuesta, encontrándose la ecuación de regresión lineal siguiente:

$$\text{Peso Unitario de Brotes} = 0.3196 - 0.01629 (\text{Número de Brotes})$$

La ecuación anterior indica que por cada brote presente en el tubo de cultivo el peso unitario por brote se reducirá en 0.016 gramos, es decir que a medida que se incrementa el número de brotes en el tubo, el peso unitario de los brotes va disminuyendo en forma proporcional. Esta relación se ejemplifica con la Figura 5.

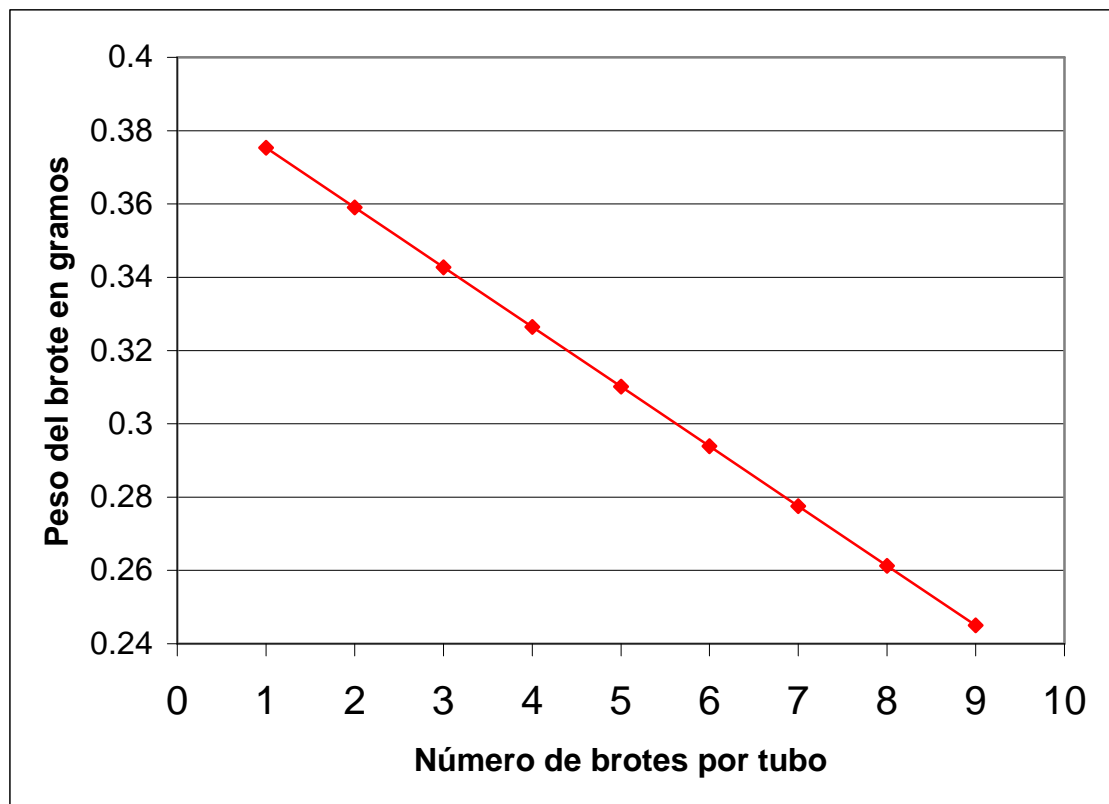


Figura 5 Regresión lineal entre las variables de respuesta peso fresco de brotes y número de brotes.

7.4 ALTURA DE BROTE

El análisis de varianza (ANDEVA) para la variable de respuesta altura de brote, medido en milímetros, detectó diferencias significativas entre medios de cultivo (Cuadro 10), por lo que se procedió a efectuar una separación de medias por medio de la prueba de Duncan al 10 por ciento de significancia (Cuadro 11).

Cuadro 10. Resumen del ANDEVA para la variable de respuesta altura de brote.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Pr>Fc
Medios de cultivo	29	1041.1136	35.9005	29.45	0.0001**
Error	2851	3474.9107	1.2188		
Total Corregido	2880	4516.0243			

Pr > Fc = Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada.
 Coeficiente de variación = 38.94%.

Los medios de cultivo, en relación a la variable de respuesta altura, quedaron agrupados en nueve grupos, siendo el mejor grupo el "A" con los tratamientos 9 (0.01 mg/l ANA y 1 mg/l BAP), 2 (0.5 mg/l BAP) y 3 (1 mg/l BAP), con 4.5, 4.3 y 4.3 mm de altura, respectivamente. Aquí sucedió lo mismo que para el caso de peso unitario, es decir, los tratamientos que produjeron mayores alturas de brote produjeron poca cantidad de los mismos, y viceversa.

Cuadro 11. Resumen de la prueba de DUNCAN para la variable de respuesta altura de brote.

Tratamiento	Suplementos del medio MS (Murashige y Skoog 1962)		Altura en milímetros	Grupo Duncan al 10 por ciento
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)		
9	0.01	1	4.53	A
2	0	0.5	4.30	A
3	0	1	4.30	A
6	0	10	3.46	B
10	0.01	2.2	3.33	B C
8	0.01	0.5	3.21	B C D
4	0	2.2	3.16	B C D E
5	0	5	2.93	B C D E F
28	1	2.2	2.89	B C D E F G
14	0.1	0.5	2.87	B C D E F G
16	0.1	2.2	2.70	C D E F G H
18	0.1	10	2.65	C D E F G H I
17	0.1	5	2.64	C D E F G H I
22	0.5	2.2	2.63	C D E F G H I
12	0.01	10	2.60	C D E F G H I
15	0.1	1	2.57	C D E F G H I
29	1	5	2.55	D E F G H I
24	0.5	10	2.51	D E F G H I
23	0.5	5	2.51	D E F G H I
20	0.5	0.5	2.46	D E F G H I
11	0.01	5	2.45	D E F G H I
30	1	10	2.40	E F G H I
13	0.1	0	2.38	E F G H I
21	0.5	1	2.35	F G H I
26	1	0.5	2.21	F G H I
27	1	1	2.16	F G H I
7	0.01	0	2.11	G H I
1	0	0	2.00	H I
25	1	0	2.00	H I
19	0.1	0	1.86	I

7.5 PRESENCIA DE CALLO Y RAÍZ

Todos los medios de cultivo produjeron, en mayor o menor grado, callo, inclusive los medios de cultivo que no tenían regulador de crecimiento tipo auxina (ANA), lo cual indica que los brotes produjeron su propia auxina para la producción de callo en respuesta a la herida que se produjo en los explantes, lo cual es normal en toda planta y es una respuesta para reparar el daño causado.

Respecto a la presencia de raíces se pudo observar que existe una tendencia a que con dosis bajas de BAP (0.0 a 2.2 mg/l) y cualquier dosis de ANA (0.0 hasta 1 mg/l), se produjeron raíces. Esto fue debido a que dosis altas de BAP inhiben el efecto del ANA. En el caso de 0 mg/l de ANA las raíces se produjeron por producción endógena de los brotes (Cuadro 12).

Cuadro 12. Presencia de raíz según el medio de cultivo

		BAP (mg/l)					
		0	0.5	1	2.2	5	10
ANA (mg/l)	0	1	2	3	4	5	6
	0.01	7	8	9	10	11	12
	0.1	13	14	15	16	17	18
	0.5	19	20	21	22	23	24
	1	25	26	27	28	29	30

7.6 RESUMEN DE LOS MEJORES TRATAMIENTOS

El Cuadro 13, presenta el resumen de los seis mejores tratamientos, de acuerdo el número de brotes por explante y se adicionan en orden de importancia los datos de las variables de respuesta peso promedio por brote, altura promedio por brote y presencia de raíz, para que sean elementos discriminatorios para seleccionar aquellos que para las cuatro variables de respuesta presenten las mejores condiciones. Para cada dato de cada variable de respuesta aparece entre paréntesis el grupo Duncan o de mínimos cuadrados respectivo.

Cuadro 13. Resumen de las variables de respuesta para los seis mejores medios de cultivo para propagar el cactus Cabeza de Viejo.

Tratamiento	Suplementos del medio MS (Murashige y Skoog 1962)		No. Brotes por tubo Ajustados	Peso brote gramos	Altura brote milímetros	Presencia de raíz
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)				
28	1	2.2	4.93 (G1)	0.28 (G2)	2.89 (G2)	SI
14	0.1	0.5	4.58 (G1)	0.30 (G2)	2.87 (G2)	SI
20	0.5	0.5	5.18 (G1)	0.24 (G2)	2.46 (G4)	SI
22	0.5	2.2	4.91 (G1)	0.24 (G2)	2.63 (G3)	NO
16	0.1	2.2	4.42 (G1)	0.32 (G2)	2.70 (G3)	NO
23	0.5	5	4.75 (G1)	0.2 (G4)	2.51 (G4)	NO
		Mínimo	0.8	0.04	1.86	
		Máximo	5.2	0.63	4.53	

Para propagar el cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose), y de esta forma contribuir a su conservación los tratamientos 28 y 14 son los que ofrecen los mejores resultados, ya que producen 4.93 y 4.58 brotes, con una altura de 2.89 y 2.87 mm (el segundo mejor grupo) y un peso de 280 y 300 mg (el segundo mejor grupo), respectivamente. Adicionalmente a ello presentan la ventaja de que a los 37 días después de la siembra manifiestan la presencia de raíces.

8. CONCLUSIONES

- 8.1. Se contribuyó al desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose), al lograrse el establecimiento *in vitro*, a partir de semillas botánicas, en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores del crecimiento y también se logró su propagación *in vitro*.
- 8.2. De los 30 tratamientos evaluados para la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo se encontró dos combinaciones que son las mejores, tanto en términos de producción de brotes como en términos de peso fresco y altura de brotes, así como también presencia de raíz y callo. Los dos tratamientos son los siguientes: medio de cultivo basal MS suplementado con un miligramo por litro de ácido naftalenacético más 2.2 miligramos por litro de bencilaminopurina y el medio MS suplementado con 0.1 miligramo por litro de ácido naftalenacético más 0.5 miligramos por litro de bencilaminopurina, que produjeron 4.93 y 4.58 brotes, con un peso medio de 280 miligramos y 300 miligramos, altura de 2.89 y 2.87 milímetros, respectivamente. Ambos medios manifestaron la presencia de raíces.

9. RECOMENDACIONES

- 9.1 Si se desea optimizar la propagación *in vitro* del cactus Cabeza de Viejo (*Cephalocereus maxonii* Rose) se recomienda evaluar el medio basal de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con una combinación de ANA (dosis entre 0.1 y 1 mg/l) y BAP (dosis entre 0.5 y 2.2 mg/l).
- 9.2 Para terminar el desarrollo del protocolo para la propagación se recomienda evaluar combinaciones de reguladores del crecimiento para inducir el enraizamiento *in vitro* y, posteriormente, evaluar sustratos para la aclimatización de las plántulas en invernadero.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Amador, D. 2000. Reguladores del crecimiento utilizados en cultivo de tejidos vegetales: términos y conceptos fundamentales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 73 p.
2. Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. 2 ed. México, Universidad Autónoma de México, Dirección General de Publicaciones. v. 1, 743 p.
3. Bravo-Hollis, H; Sánchez Mejorada, H. 1984. Datos preliminares acerca de las cactáceas de mesoamérica. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 29(1):11-12.
4. Castañeda, C; Vargas, HA. 1996. Vida en la zona semiárida de Guatemala. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Cuadernos Chac. 36 p.
5. CIAT, CO. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. In *Cultivo de tejidos en agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Ed. William Roca; Luis Mroginski. Colombia. p.19-40.
6. CONAP (Consejo Nacional de Areas Protegidas, GT). 2001. Listado de especies de flora silvestre amenazadas de extinción (Lista Roja de Flora). Guatemala, Secretaria Ejecutiva Departamento de Vida Silvestre. p. 23-50.
7. Corona, V; Yáñez, L. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 29(1):3-7.
8. George, EF. 1996. *Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice*. 2 ed. England, Exegetics. p. 903.
9. Hubstenberger, JF. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). In *Bajaj, YPS. Biotechnology in agriculture and forestry*. Germany, Springer-Verlag. p. 49-68.
10. Litz, RE; Jarret, RL. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos; embriogénesis somática y organogénesis. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Ed. William Roca; Luis Mroginski. Colombia, CIAT. p. 143-172.
11. Meyran Camacho, AJ; García Pinedan, M; Martínez Marcial, DJ. 2000. México lindo y sus cactus. México, UNAM, Iztacala. *Órgano Informativo de la UNAM, Campus Iztacala* 7(150):2.
12. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
13. Murashige, T; Skoog, F. 1962. A reviser medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

14. Reyes, SJ; Brachet, ICh; Pérez, CJ; Gutiérrez, RA. 2004. Cactaceas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca. México, Ed. Sociedad Mexicana de Cactología e Instituto de Biología UNAM. p. 196.
15. Rubluo, A. 1990. Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de cactáceas en peligro de extinción. BIOTAM. México 1(3):13-19.
16. Standley, P; Steyermark, J. 1958. Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany. v. 24, p. 192-193.
17. Stewt, R. 2004. El mundo de las cactáceas (en línea). Consultado 10 ago 2005. Disponible en http://www.geocities.com/euskal_kaktus/MORFOcastellano.html.
18. Usui, K; Okabe, K; Vítores, R; Ramírez, AE. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA / JOCV. p. 157-164.
19. Villacinda Maldonado, RW. 1990. Respuesta de la especie tres puntas (*Neurolona lobata* L.) a la propagación in vitro. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 93.
20. Villalobos, VM. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma, Italia, FAO. p. 3-41. (Cuadernillo 105).
21. Villar, L. 1998. La flora silvestre de Guatemala. Guatemala, USAC, Editorial Universitaria. v. 6, 59 p. (Colección Manuales).
22. Weaber, RJ. 1987. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.

11. ANEXOS

ANEXO 1. BASE DE DATOS DE LABORATORIO PARA CADA TRATAMIENTO (MEDIO DE CULTIVO) CON SU REPETICIÓN (TUBO) Y LAS VARIABLES DE RESPUESTA BROTES, ALTURA, PRESENCIA DE RAÍZ Y CALLO CON LA COVARIABLE AREOLAS

MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA		
				(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO
1	1	2	30	4	.	3	.	.	4	16	3	8	3	.	.	+
1	2	3	1	1	6	2	.	+	4	16	4	12	3	.	.	+
1	3	3	2	4	16	5	6	3	.	.	+
1	4	3	2	4	16	6	7	2	.	.	+
1	5	3	4	4	16	7	.	2	.	.	+
1	6	3	5	1	.	2	.	.	4	16	8	.	2	.	.	+
1	7	3	6	1	13	3	+	.	4	16	9	.	2	.	.	+
1	8	3	7	1	15	5	.	+	4	16	10	.	2	.	.	+
1	9	3	7	2	4	4	.	+	4	17
1	10	3	7	3	.	4	.	+	4	18	1	4	3	.	.	+
1	11	3	7	4	.	4	.	+	4	18	2	6	4	.	.	+
1	12	.	.	.	+	3	7	5	.	4	.	+	4	18	3	4	2	.	.	+
1	13	3	7	6	.	4	.	+	4	18	4	.	2	.	.	+
1	14	3	8	1	5	2	.	.	4	18	5	.	2	.	.	+
1	15	3	9	4	19	+
1	16	1	1	2	+	3	10	1	4	2	+	+	4	20	+
1	17	.	.	.	+	3	11	1	.	6	.	.	4	21	+
1	18	3	11	2	.	5	.	.	4	22	1	6	2	.	.	+
1	19	.	.	.	+	3	11	3	.	5	.	.	4	23
1	20	3	11	4	.	5	.	.	4	24
1	21	3	11	5	.	5	.	.	4	25
1	22	3	11	6	.	3	.	.	4	26	1	.	5	.	.	.
1	23	3	12	1	20	5	.	.	4	26	2	.	6	.	.	.
1	24	.	.	.	+	3	12	2	.	7	.	.	4	26	3	4	7	.	.	.
1	25	3	12	3	.	9	.	.	4	26	4	.	5	.	.	.
1	26	.	.	.	+	3	12	4	.	7	.	.	4	26	5	.	3	.	.	.
1	27	3	12	5	.	4	.	.	4	26	6	.	2	.	.	.
1	28	3	12	6	.	8	.	.	4	26	7	5	3	.	.	.
1	30	.	.	.	+	3	13	1	.	2	.	.	4	26	8	6	3	.	.	.
2	1	1	6	2	.	3	13	2	.	2	.	.	4	27	1	8	4	.	.	.
2	2	3	13	3	.	2	.	.	4	27	2	6	3	.	.	+
2	3	3	14	1	7	3	.	.	4	27	3	4	2	.	.	+
2	4	3	14	2	.	4	.	.	4	27	4	3	4	.	.	+
2	5	1	1	2	.	3	14	3	.	2	.	.	4	27	5	5	2	.	.	+
2	6	1	13	3	+	3	14	4	.	2	.	.	4	27	6	6	3	.	.	+
2	7	1	15	5	.	3	15	1	12	5	.	.	4	27	7	.	2	.	.	+
2	7	2	4	4	.	3	15	2	.	2	.	.	4	27	8	.	4	.	.	+
2	7	3	.	4	.	3	16	1	.	3	.	+	4	27	9	.	4	.	.	+
2	7	4	.	4	.	3	17	1	.	3	.	.	4	27	10	.	3	.	.	+
2	7	5	.	4	.	3	17	2	.	3	.	.	4	28
2	7	6	.	4	.	3	17	3	.	3	.	.	4	29	1	8	5	+	.	+
2	8	1	5	2	.	3	17	4	.	3	.	.	4	29	2	6	5	+	.	+
2	9	3	18	1	.	5	.	+	4	29	3	.	4	+	.	+
2	10	1	4	2	+	3	18	2	.	3	.	+	4	30	1	4	5	.	.	+
2	11	1	.	6	.	3	19	4	30	2	3	4	.	.	+
2	11	2	.	5	.	3	20	1	8	7	.	+	4	30	3	4	2	.	.	+
2	11	3	.	5	.	3	20	2	10	7	.	+	5	1
2	11	4	.	5	.	3	20	3	.	2	.	+	5	2	1	.	7	.	.	.
2	11	5	.	5	.	3	20	4	12	3	.	+	5	2	2	.	3	.	.	.
2	11	6	.	3	.	3	20	5	.	2	.	+	5	2	3	.	3	.	.	.
2	12	1	20	5	.	3	20	6	.	3	.	+	5	2	4	5	3	.	.	.
2	12	2	.	7	.	3	21	1	.	2	.	.	5	3	1	6	2	.	.	.
2	12	3	.	9	.	3	21	2	.	5	.	.	5	3	2	.	2	.	.	.
2	12	4	.	7	.	3	21	3	.	2	.	.	5	4	1	2	2	.	.	+
2	12	5	.	4	.	3	21	4	.	3	.	.	5	5	+
2	12	6	.	8	.	3	21	5	.	2	.	.	5	6	+
2	13	1	.	2	.	3	22	+	5	7	+
2	13	2	.	2	.	3	23	1	8	4	.	.	5	8	+
2	13	3	.	2	.	3	23	2	9	4	.	.	5	9	1	.	3	.	.	.
2	14	1	7	3	.	3	23	3	10	2	.	.	5	10	1	.	3	.	.	+
2	14	2	.	4	.	3	23	4	6	2	.	.	5	10	2	.	3	.	.	+
2	14	3	.	2	.	3	23	5	.	9	.	.	5	11	+
2	14	4	.	2	.	3	23	6	.	8	.	.	5	12
2	15	1	12	5	.	3	23	7	.	9	.	.	5	13	1	5	3	.	.	+
2	15	2	.	2	.	3	23	8	.	9	.	.	5	13	2	6	4	.	.	+
2	16	1	.	3	.	3	24	1	22	9	.	+	5	13	3	4	2	.	.	+
2	17	1	.	3	.	3	24	2	16	4	.	+	5	13	4	4	2	.	.	+
2	17	2	.	3	.	3	25	+	5	13	5	5	6	.	.	+
2	17	3	.	3	.	3	26	1	30	9	.	.	5	13	6	3	3	.	.	+
2	17	4	.	3	.	3	26	2	33	7	.	.	5	13	7	.	2	.	.	+

CONTINUACIÓN ANEXO 1

										ALTURA													ALTURA		
MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	(mm)	RAIZ	CALLO	MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	(mm)	RAIZ	CALLO	MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	(mm)	RAIZ	CALLO					
6	3	+	7	13	+	9	8	7	.	.	.	3	.	+			
6	4	1	4	5	.	+	7	14	+	9	8	8	.	.	4	.	.	+			
6	4	2	3	4	.	+	7	15	1	5	3	+	+	9	9	1	6	3	.	.	.	+			
6	4	3	6	3	.	+	7	16	+	9	9	2	7	4	.	.	.	+			
6	4	4	8	4	.	+	7	17	1	5	2	+	+	9	9	3	8	3	.	.	.	+			
6	4	5	10	2	.	+	7	17	2	5	2	+	+	9	9	4	4	4	.	.	.	+			
6	4	6	6	3	.	+	7	18	.	.	.	+	+	9	10	1	12	4	.	.	.	+			
6	4	7	4	5	.	+	7	19	.	.	.	+	+	9	10	2	.	3	.	.	.	+			
6	4	8	4	5	.	+	7	20	.	.	.	+	+	9	11	1	.	2	.	.	.	+			
6	4	9	5	2	.	+	7	21	.	.	.	+	+	9	12	1	14	4	.	.	.	+			
6	4	10	4	2	.	+	7	22	.	.	.	+	+	9	12	2	12	5	.	.	.	+			
6	4	11	6	2	.	+	7	23	.	.	.	+	+	9	12	3	10	4	.	.	.	+			
6	4	12	4	2	.	+	7	24	1	5	2	+	+	9	12	4	10	3	.	.	.	+			
6	4	13	3	3	.	+	7	25	1	2	2	+	+	9	12	5	8	5	.	.	.	+			
6	4	14	3	3	.	+	7	26	1	4	2	+	+	9	12	6	.	5	.	.	.	+			
6	5	1	7	6	.	+	7	26	2	4	2	+	+	9	12	7	.	5	.	.	.	+			
6	5	2	6	5	.	.	7	27	.	.	.	+	.	9	12	8	.	4	.	.	.	+			
6	5	3	.	3	.	.	7	28	.	.	.	+	+	9	12	9	.	5	.	.	.	+			
6	5	4	.	2	.	.	7	29	.	.	.	+	+	9	12	10	.	4	.	.	.	+			
6	6	+	7	30	.	.	.	+	+	9	13	1	20	7	.	.	.	+			
6	7	+	8	1	.	.	.	+	+	9	13	2	.	4	.	.	.	+			
6	8	1	14	5	.	+	8	2	.	.	.	+	+	9	13	3	.	3	.	.	.	+			
6	8	2	12	5	.	+	8	3	1	5	2	+	+	9	13	4	.	4	.	.	.	+			
6	8	3	10	4	.	+	8	4	.	.	.	+	+	9	14	1	18	4	.	.	.	+			
6	8	4	6	3	.	+	8	5	.	.	.	+	+	9	14	2	14	3	.	.	.	+			
6	9	+	8	6	.	.	.	+	+	9	14	3	14	2	.	.	.	+			
6	10	+	8	7	.	.	.	+	+	9	14	4	12	3	.	.	.	+			
6	11	+	8	8	.	.	.	+	+	9	14	5	.	3	.	.	.	+			
6	12	+	8	9	1	14	5	+	+	9	14	6	.	3	.	.	.	+			
6	13	+	8	9	2	.	4	+	+	9	14	7	.	4	.	.	.	+			
6	14	+	8	9	3	.	3	+	+	9	14	8	.	3	.	.	.	+			
6	15	+	8	10	1	.	4	+	+	9	15	1	.	3	.	.	.	+			
6	16	1	6	5	.	+	8	11	1	4	5	+	+	9	15	2	.	3	.	.	.	+			
6	16	2	7	3	.	+	8	11	2	.	4	+	+	9	15	3	.	3	.	.	.	+			
6	16	3	.	2	.	+	8	12	1	8	6	+	+	9	16	1	12	5	.	.	.	+			
6	16	4	.	3	.	+	8	13	.	.	.	+	+	9	16	2	15	5	.	.	.	+			
6	17	1	4	3	.	+	8	14	.	.	.	+	+	9	16	3	13	5	.	.	.	+			
6	17	2	3	4	.	+	8	15	.	.	.	+	+	9	16	4	12	4	.	.	.	+			
6	17	3	.	2	.	+	8	16	1	12	5	+	+	9	16	5	14	4	.	.	.	+			
6	17	4	.	2	.	+	8	16	2	.	3	+	+	9	16	6	.	4	.	.	.	+			
6	17	5	.	3	.	+	8	16	3	.	2	+	+	9	16	7	.	3	.	.	.	+			
6	17	6	.	6	.	+	8	16	4	.	3	+	+	9	16	8	.	2	.	.	.	+			
6	17	7	.	4	.	+	8	17	1	12	5	+	+	9	16	9	.	3	.	.	.	+			
6	17	8	.	5	.	+	8	17	2	10	4	+	+	9	17	1	34	10	.	.	.	+			
6	17	9	.	5	.	+	8	17	3	8	3	+	+	9	17	2	.	3	.	.	.	+			
6	17	10	.	6	.	+	8	17	4	6	2	+	+	9	18	1	.	3	.	.	.	+			
6	18	1	8	5	.	.	8	17	5	8	2	+	+	9	18	2	.	2	.	.	.	+			
6	18	2	.	2	.	.	8	17	6	8	2	+	+	9	19	1	14	4	.	.	.	+			
6	18	3	5	3	.	.	8	17	7	.	3	+	+	9	19	2	15	5	.	.	.	+			
6	18	4	6	3	.	.	8	17	8	.	3	+	+	9	19	3	20	3	.	.	.	+			
6	18	1	8	4	.	.	8	18	1	.	2	+	+	9	19	4	22	5	.	.	.	+			
6	18	2	7	5	.	.	8	19	.	.	.	+	+	9	19	5	10	5	.	.	.	+			
6	18	3	8	5	.	.	8	20	1	10	4	+	+	9	19	6	12	3	.	.	.	+			
6	18	4	9	4	.	.	8	20	2	5	5	+	+	9	19	7	14	2	.	.	.	+			
6	18	5	7	4	.	.	8	20	3	8	3	+	+	9	19	8	10	3	.	.	.	+			
6	18	6	8	5	.	.	8	20	4	6	2	+	+	9	19	9	.	3	.	.	.	+			
6	18	7	7	6	.	.	8	20	5	.	2	+	+	9	19	10	.	5	.	.	.	+			
6	18	8	6	5	.	.	8	20	6	.	2	+	+	9	19	11	.	4	.	.	.	+			
6	18	9	5	2	.	.	8	21	.	.	.	+	+	9	19	12	.	5	.	.	.	+			
6	18	10	6	2	.	.	8	22	1	4	3	+	+	9	20	1	.	4	.	.	.	+			
6	18	11	7	3	.	.	8	23	.	.	.	+	+	9	20	2	.	4	.	.	.	+			
6	18	12	8	3	+	.	8	24	.	.	.	+	+	9	20	3	.	4	.	.	.	+			
6	19	8	25	1	2	5	+	+	9	21	1	6	4	.	.	.	+			
6	20	1	5	2	.	.	8	25	2	2	2	+	+	9	21	2	5	4	.	.	.	+			
6	20	2	4	2	.	.	8	25	3	5	2	+	+	9	21	3	4	4	.	.	.	+			
6	21	1	13	5	.	+	8	26	.	.	.	+	+	9	21	4	.	2	.	.	.	+			
6	21	2	12	5	.	+	8	27	1	.	2	+	+	9	21	5	.	3	.	.	.	+			
6	21	3	14	5	.	+	8	28	.	.	.	+	+	9	21	6	.	2	.	.	.	+			
6	22	1	.	3	.	.	8	29	.	.	.	+	+	9	22	1	.	3	.	.	.	+			
6	22	2	.	3	.	+	8	30	1	.	2	+	+	9	23	1	25	10	.	.	.	+			
6	22	3	.	3	.	+	9	1	1	10	10	+	+	9	23	2	18	4	.	.	.	+			
6	22	4	.	2	.	+	9	1	2	10	10	+	+	9	23	3	10	3	.	.	.	+			

CONTINUACIÓN ANEXO 1

MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA		
				(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO
10	6	6	12	5	+	+	10	30	7	.	2	.	+	11	27	8	5	2	.	.
10	6	7	.	3	.	+	10	30	8	.	3	.	+	11	27	9	4	2	.	.
10	6	8	.	5	+	+	11	1	1	8	3	.	+	11	27	10	2	3	.	.
10	6	9	.	2	+	+	11	1	2	12	5	.	+	11	28	1	4	3	.	+
10	6	10	.	4	.	+	11	1	3	2	2	.	+	11	28	2	3	3	.	+
10	7	+	11	1	4	.	2	.	+	11	28	3	2	3	.	+
10	8	1	9	3	.	+	11	1	5	.	4	.	+	11	28	4	6	4	.	+
10	8	2	8	4	.	+	11	2	1	8	3	.	+	11	28	5	1	2	.	+
10	9	+	11	2	2	4	2	.	+	11	28	6	2	2	.	+
10	10	1	18	4	.	.	11	2	3	.	2	.	+	11	28	7	4	2	.	+
10	10	2	14	3	.	.	11	2	4	.	2	.	+	11	28	8	2	3	.	+
10	10	3	12	3	.	.	11	2	5	.	2	.	+	11	28	9	4	3	.	+
10	10	4	9	3	.	.	11	3	1	4	4	.	+	11	28	10	3	3	.	+
10	10	5	6	4	.	.	11	3	2	.	2	.	+	11	29	1	9	2	.	+
10	10	6	9	4	.	.	11	3	3	.	2	.	+	11	29	2	9	3	.	+
10	10	7	18	2	.	.	11	3	4	.	1	.	+	11	29	3	9	3	.	+
10	10	8	20	3	.	.	11	4	1	4	3	.	+	11	29	4	6	2	.	+
10	10	9	.	3	.	.	11	4	1	.	2	.	+	11	29	5	4	2	.	+
10	10	10	.	2	.	.	11	5	1	.	3	.	+	11	29	6	5	2	.	+
10	10	11	.	4	.	.	11	6	1	5	5	.	+	11	29	7	6	1	.	+
10	10	12	.	3	.	.	11	6	2	3	2	.	+	11	29	8	3	2	.	+
10	11	+	11	6	3	.	2	.	+	11	29	9	2	2	.	+
10	12	1	14	5	.	+	11	6	4	.	2	.	+	11	30	1	5	2	.	+
10	12	2	13	4	.	+	11	7	1	2	2	.	+	12	1	1	3	2	.	.
10	12	3	10	4	.	+	11	8	1	.	3	.	+	12	1	2	2	2	.	.
10	13	1	6	3	.	+	11	9	1	5	3	.	+	12	2	1	3	3	.	+
10	14	1	4	3	.	+	11	9	2	3	3	.	+	12	2	2	2	2	.	+
10	14	2	3	3	.	+	11	9	3	.	.	.	+	12	2	3	1	2	.	+
10	14	3	5	2	.	+	11	10	1	7	3	.	+	12	2	4	.	1	.	+
10	14	4	.	2	.	+	11	10	2	12	2	.	+	12	3	1	6	2	.	+
10	14	5	.	3	.	+	11	10	3	.	2	.	+	12	3	2	5	2	.	+
10	15	1	8	5	.	+	11	10	4	.	2	.	+	12	3	3	4	2	.	+
10	15	2	12	4	.	+	11	11	4	.	.	.	+	12	3	4	3	2	.	+
10	15	3	6	2	.	+	11	12	1	7	2	.	+	12	3	5	2	3	.	+
10	15	4	8	3	.	+	11	12	2	5	2	.	+	12	3	6	2	2	.	+
10	15	5	12	4	.	+	11	12	3	2	1	.	+	12	3	7	1	1	.	+
10	15	6	6	3	.	+	11	12	4	2	1	.	+	12	3	8	1	2	.	+
10	15	7	.	4	.	+	11	12	5	.	3	.	+	12	4	1	5	2	.	+
10	15	8	.	4	.	+	11	13	1	.	2	.	+	12	5	1	1	2	.	+
10	15	9	.	4	.	+	11	14	1	8	4	.	+	12	6	1	7	3	.	.
10	15	10	.	4	.	+	11	14	2	7	3	.	+	12	6	2	8	3	.	.
10	16	+	11	14	3	5	2	.	+	12	6	3	9	4	.	.
10	17	+	11	14	4	2	3	.	+	12	6	4	6	3	.	.
10	18	1	14	5	.	+	11	14	5	.	2	.	+	12	6	5	8	3	.	.
10	18	2	12	5	.	+	11	14	6	.	2	.	+	12	6	6	9	4	.	.
10	18	3	12	5	.	+	11	14	7	.	2	.	+	12	6	7	7	4	.	.
10	18	4	10	5	.	+	11	15	1	5	2	.	+	12	6	8	6	4	.	.
10	19	1	5	3	.	+	11	15	2	4	2	.	+	12	6	9	5	3	.	.
10	19	2	.	2	.	+	11	15	3	3	3	.	+	12	6	10	9	2	.	.
10	20	1	8	4	.	+	11	15	4	2	1	.	+	12	6	11	6	2	.	.
10	20	2	6	3	.	+	11	16	1	8	4	.	+	12	6	12	7	4	.	.
10	20	3	6	2	.	+	11	16	2	2	3	.	+	12	7
10	20	4	8	2	.	+	11	16	3	2	2	.	+	12	8	1	15	5	.	+
10	21	1	24	5	.	+	11	17	1	8	3	.	+	12	8	.	10	4	.	+
10	21	2	20	8	.	+	11	17	2	4	2	.	+	12	8	3	6	3	.	+
10	21	3	12	6	.	+	11	17	3	1	1	.	+	12	8	4	5	2	.	+
10	21	4	10	4	.	+	11	17	4	1	1	.	+	12	8	5	.	2	.	+
10	21	5	.	4	.	+	11	18	1	16	3	.	+	12	8	6	5	3	.	+
10	21	6	.	4	.	+	11	18	2	15	4	.	+	12	9	1	1	2	.	.
10	21	7	.	3	.	+	11	18	3	12	3	.	+	12	10	1	3	3	.	.
10	21	8	.	3	.	+	11	18	4	15	3	.	+	12	10	2	4	3	.	.
10	22	1	.	2	.	+	11	18	5	14	3	.	+	12	10	3	12	4	.	.
10	22	2	.	2	.	+	11	18	6	8	4	.	+	12	10	4	4	3	.	.
10	22	3	.	2	.	+	11	18	7	10	3	.	+	12	10	5	3	2	.	.
10	23	1	24	5	.	+	11	18	8	.	2	.	+	12	10	6	12	4	.	.
10	23	2	22	6	.	+	11	18	9	4	2	.	+	12	10	7	2	2	.	.
10	23	3	18	4	.	+	11	18	10	3	2	.	+	12	11	1	5	3	.	.
10	23	4	10	3	.	+	11	18	11	.	3	.	+	12	12	2	2	2	.	+
10	23	5	10	2	.	+	11	18	12	.	2	.	+	12	12	3	3	2	.	+
10	23	6	.	3	.	+	11	19	1	9	2	.	+	12	12	4	2	2	.	+
10	23	7	.	3	.	+	11	19	2	10	2	.	+	12	12	5	2	1	.	+
10	23	8	.	3	.	+	11	19	3	12	3	.	+	12	12	6	2	1	.	+

CONTINUACIÓN ANEXO 1

MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA		
				(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO
12	19	2	1	2	.	.	14	9	21	5	3	.	.	15	1	1	.	1	.	+
12	19	3	.	2	.	.	14	10	15	2	1	12	3	.	+
12	20	1	12	5	.	+	14	11	1	4	1	.	+	15	2	2	15	3	.	+
12	20	2	.	2	.	+	14	11	2	6	2	.	+	15	2	3	10	3	.	+
12	21	1	6	3	.	.	14	12	1	6	3	.	.	15	2	4	2	2	.	+
12	21	2	3	2	.	.	14	12	2	5	3	.	.	15	3	1	10	3	.	+
12	21	3	.	2	.	.	14	12	3	4	2	.	.	15	3	2	10	3	.	+
12	21	4	.	2	.	.	14	12	4	.	2	.	.	15	3	3	9	3	.	+
12	22	1	1	2	.	.	14	12	5	.	2	.	.	15	3	4	6	3	.	+
12	23	1	6	4	.	+	14	13	1	6	3	.	.	15	3	5	2	2	.	+
12	23	2	3	4	.	+	14	13	2	8	3	.	.	15	3	6	.	2	.	+
12	23	3	2	3	.	+	14	13	3	9	3	.	.	15	3	7	.	2	.	+
12	23	4	.	3	.	+	14	13	4	10	3	.	.	15	4	1	12	3	.	+
12	24	1	2	2	.	+	14	13	5	5	3	.	.	15	4	2	9	3	.	+
12	24	2	1	2	.	+	14	13	6	.	2	.	.	15	4	3	9	2	.	+
12	25	1	1	2	.	+	14	13	7	.	2	.	.	15	4	4	10	3	.	+
12	26	14	13	8	.	2	.	.	15	4	5	6	2	.	+
12	27	1	2	2	.	+	14	14	1	8	3	.	.	15	4	6	.	2	.	+
12	28	1	12	3	.	+	14	14	2	10	3	.	.	15	4	7	.	2	.	+
12	28	2	4	2	.	+	14	14	3	12	3	.	.	15	4	8	.	2	.	+
12	28	3	4	3	.	+	14	14	4	10	3	.	.	15	5	1	6	2	.	.
12	28	4	3	2	.	+	14	14	5	10	3	.	.	15	5	2	4	2	.	.
12	28	5	.	2	.	+	14	14	6	10	4	.	.	15	6
12	28	6	.	2	.	+	14	14	7	.	3	.	.	15	7	1	10	3	.	.
12	29	1	3	3	.	+	14	15	1	6	3	.	+	15	7	2	4	2	.	.
12	29	2	2	2	.	+	14	15	2	6	3	.	+	15	8	+
12	30	14	15	3	.	2	.	+	15	9
13	1	+	14	16	1	5	3	.	+	15	10	1	13	8	.	.
13	2	+	14	16	2	2	2	.	+	15	10	2	12	5	.	.
13	3	+	14	16	3	2	2	.	+	15	10	3	14	3	.	.
13	4	+	14	16	4	2	2	.	+	15	10	4	13	4	.	.
13	5	+	14	16	5	1	1	.	+	15	10	5	10	3	.	.
13	6	+	14	16	6	1	1	.	+	15	11	1	4	2	.	.
13	7	+	14	17	1	10	3	.	+	15	12	1	9	2	.	+
13	8	+	14	17	2	10	3	.	+	15	12	2	8	2	.	.
13	9	1	4	2	.	+	14	17	3	9	3	.	+	15	12	3	5	2	.	.
13	10	+	14	17	4	11	4	.	+	15	12	4	3	2	.	.
13	11	1	1	1	.	+	14	17	5	10	3	.	+	15	12	5	4	2	.	.
13	12	1	1	2	.	+	14	17	6	.	2	.	+	15	12	6	.	2	.	.
13	13	+	14	18	1	15	5	.	.	15	13	1	10	4	.	+
13	14	1	5	3	.	+	14	18	2	12	3	.	.	15	13	2	12	3	.	+
13	14	2	3	2	.	+	14	18	3	10	5	.	.	15	14
13	15	1	1	3	.	.	14	18	4	13	4	.	.	15	15	1	20	4	.	+
13	15	2	1	3	.	.	14	18	5	10	3	.	.	15	15	2	12	3	.	+
13	15	3	1	3	.	.	14	18	6	.	3	.	.	15	15	3	.	2	.	+
13	16	+	14	18	7	.	3	.	.	15	15	4	1	2	.	+
13	17	+	14	18	8	8	2	.	.	15	16	1	15	3	.	+
13	18	+	14	18	9	10	2	.	.	15	16	2	14	3	.	+
13	19	+	14	19	1	5	4	.	+	15	16	3	13	3	.	+
13	20	+	14	19	2	4	2	.	+	15	16	4	.	2	.	+
13	21	+	14	20	1	.	4	.	.	15	16	5	.	1	.	+
13	22	+	14	20	2	.	3	.	.	15	16	6	.	2	.	+
13	23	+	14	20	3	.	3	.	.	15	17
13	24	+	14	20	4	.	2	.	.	15	18	1	10	3	.	+
13	25	+	14	20	5	18	5	.	.	15	18	2	8	3	.	+
13	26	+	14	20	6	18	4	.	.	15	18	3	.	2	.	+
13	27	+	14	20	7	16	5	.	.	15	19	1	12	4	.	+
13	28	+	14	20	8	15	3	.	.	15	19	2	6	3	.	+
13	29	+	14	20	9	20	3	.	.	15	19	3	6	3	.	+
13	30	+	14	20	10	10	3	.	.	15	19	4	.	2	.	+
14	1	1	4	3	.	+	14	20	11	10	3	.	.	15	20	1	14	4	.	+
14	1	2	2	2	.	+	14	21	1	32	11	.	+	15	20	2	12	3	.	+
14	1	3	.	1	.	+	14	21	2	23	8	.	+	15	20	3	8	2	.	+
14	1	4	.	1	.	+	14	22	1	10	3	.	.	15	20	4	1	2	.	+
14	2	1	.	2	.	+	14	22	2	12	3	.	.	15	21	1	12	3	.	+
14	3	+	14	22	3	15	4	.	+	15	21	2	6	2	.	+
14	4	+	14	22	4	13	4	.	+	15	21	3	8	2	.	+
14	5	1	12	4	.	.	14	22	5	11	3	.	+	15	21	4	.	2	.	+
14	6	1	6	4	.	.	14	22	6	9	3	.	+	15	22	+
14	6	2	8	4	.	.	14	22	7	10	3	.	+	15	23	1	8	3	.	+
14	6	3	12	3	.	.	14	22	8	4	2	.	+	15	23	2	10	3	.	+
14	6	4	14	4	.	.	14	22	9	4	2	.	+	15	23	3	2	3	.	+

CONTINUACIÓN ANEXO 1

MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA		
				(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO
15	27	19	9	2	+	+	17	1	2	15	2	.	+	17	16	10	12	3	.	.
15	28	1	.	2	.	.	17	1	3	14	2	.	+	17	16	11	12	3	.	.
15	28	2	.	2	.	.	17	1	4	12	2	.	+	17	16	12	13	2	.	.
15	28	3	.	2	.	.	17	1	5	4	2	.	+	17	17	1	12	3	.	.
15	29	1	.	2	.	+	17	1	6	5	2	.	+	17	17	2	15	3	.	.
16	1	1	12	2	.	+	17	2	1	18	4	.	+	17	17	3	8	2	.	.
16	1	2	13	4	.	+	17	2	2	15	3	.	+	17	18
16	1	3	15	3	.	+	17	2	3	16	3	.	+	17	19	1	5	3	.	+
16	1	4	14	3	.	+	17	2	4	12	3	.	+	17	20	1	12	3	.	.
16	1	5	11	3	.	+	17	2	5	10	4	.	+	17	20	2	9	3	.	.
16	1	6	10	3	.	+	17	2	6	9	3	.	+	17	20	3	8	4	.	.
16	1	7	19	2	.	+	17	2	7	10	3	.	+	17	20	4	10	3	.	.
16	1	8	20	2	.	+	17	2	8	10	4	.	+	17	20	5	15	4	.	.
16	1	9	13	2	.	+	17	2	9	6	3	.	+	17	20	6	20	2	.	.
16	1	10	15	4	.	+	17	2	10	7	3	.	+	17	20	7	23	4	.	.
16	1	11	16	4	.	+	17	2	11	18	2	.	+	17	20	8	22	3	.	.
16	1	12	17	4	.	+	17	3	1	18	8	.	+	17	20	9	.	2	.	.
16	2	1	8	3	.	+	17	3	2	12	4	.	+	17	20	10	.	2	.	.
16	2	2	12	4	.	+	17	3	3	10	4	.	+	17	20	11	.	2	.	.
16	2	3	10	3	.	+	17	3	4	8	3	.	+	17	20	12	.	2	.	.
16	2	4	7	3	.	+	17	4	1	6	3	.	+	17	20	13	.	3	.	.
16	2	5	.	2	.	+	17	4	2	.	2	.	+	17	20	14	.	3	.	.
16	2	6	.	2	.	+	17	4	3	.	3	.	+	17	20	15	.	3	.	.
16	2	7	10	3	.	+	17	5	1	20	3	.	+	17	20	16	.	3	.	.
16	3	1	12	3	.	+	17	5	2	21	3	.	+	17	21	1	.	2	.	.
16	3	2	12	3	.	+	17	5	3	22	2	.	+	17	21	2	.	2	.	.
16	3	3	14	5	.	+	17	5	4	19	2	.	+	17	21	3	.	2	.	.
16	3	4	14	5	.	+	17	5	5	15	2	.	+	17	21	4	.	2	.	.
16	3	5	13	4	.	+	17	5	6	20	2	.	+	17	21	5	.	2	.	.
16	3	6	12	4	.	+	17	5	7	15	2	.	+	17	21	6	8	3	.	.
16	3	7	12	4	.	+	17	5	8	13	2	.	+	17	21	7	8	2	.	.
16	3	8	10	3	.	+	17	5	9	12	2	.	+	17	21	8	6	2	.	.
16	3	9	9	3	.	+	17	5	10	.	.	.	+	17	21	9	5	3	.	.
16	3	10	8	3	.	+	17	5	11	.	2	.	+	17	21	10	4	3	.	.
16	3	12	10	2	.	+	17	6	1	8	4	.	.	17	21	11	12	3	.	.
16	3	13	12	2	.	+	17	6	2	6	3	.	.	17	21	12	10	3	.	.
16	3	14	10	2	.	.	17	6	3	6	3	.	.	17	21	13	10	2	.	.
16	3	15	10	3	.	.	17	6	4	8	3	.	.	17	21	14	11	2	.	.
16	4	1	6	3	.	.	17	6	5	4	3	.	.	17	22	1	12	4	.	+
16	4	2	4	2	.	.	17	6	6	3	2	.	.	17	22	2	15	4	.	+
16	4	3	3	2	.	.	17	6	7	.	2	.	.	17	22	3	18	4	.	+
16	4	4	2	2	.	.	17	6	8	.	2	.	.	17	22	4	9	3	.	+
16	4	5	3	2	.	.	17	6	9	.	2	.	.	17	22	5	10	3	.	+
16	4	6	4	1	.	.	17	6	10	.	2	.	.	17	22	6	6	2	.	+
16	4	7	6	3	.	.	17	6	11	.	2	.	.	17	22	7	7	2	.	+
16	5	1	12	3	.	.	17	7	1	8	3	.	+	17	22	8	5	3	.	+
16	5	2	3	2	.	.	17	7	2	6	3	.	+	17	22	9	10	3	.	+
16	5	3	2	1	.	.	17	7	3	4	2	.	+	17	22	10	5	3	.	+
16	5	4	1	2	.	.	17	7	4	5	2	.	+	17	23	1	8	3	.	+
16	5	5	2	1	.	.	17	8	1	8	2	.	+	17	23	2	12	3	.	+
16	5	6	2	2	.	.	17	8	2	7	2	.	+	17	23	3	6	3	.	+
16	6	1	1	2	.	+	17	8	3	5	2	.	+	17	23	4	5	2	.	+
16	7	1	2	2	.	+	17	8	4	3	3	.	+	17	24	1	6	2	.	+
16	8	1	15	5	.	.	17	8	5	4	3	.	+	17	24	2	4	4	.	+
16	8	2	14	4	.	.	17	8	6	3	3	.	+	17	24	3	5	2	.	+
16	8	3	13	3	.	.	17	8	7	4	3	.	+	17	24	4	3	2	.	+
16	8	4	13	3	.	.	17	9	1	12	3	.	.	17	24	5	2	2	.	+
16	8	5	14	4	.	.	17	9	2	12	3	.	.	17	25	1	12	3	.	+
16	8	6	14	4	.	.	17	9	3	12	2	.	.	17	25	2	15	3	.	+
16	8	7	14	3	.	.	17	9	4	14	4	.	.	17	25	3	13	3	.	+
16	8	8	13	3	.	.	17	9	5	8	3	.	.	17	25	4	20	2	.	+
16	8	9	14	3	.	.	17	9	6	.	2	.	.	17	25	5	.	2	.	+
16	8	10	13	3	.	.	17	9	7	.	2	.	.	17	25	6	.	2	.	+
16	9	1	19	6	.	+	17	9	8	.	2	.	.	17	26	1	5	2	.	+
16	9	2	4	2	.	+	17	9	9	.	3	.	.	17	26	2	5	2	.	+
16	10	1	4	3	.	.	17	9	10	.	4	.	.	17	26	3	8	3	.	+
16	10	2	3	4	.	.	17	10	1	12	3	.	.	17	27	1	.	1	.	+
16	10	3	4	4	.	.	17	10	2	9	3	.	.	17	28	1	7	4	.	.
16	10	4	.	3	.	.	17	10	3	15	2	.	.	17	28	2	7	3	.	.
16	10	5	.	3	.	.	17	10	4	6	2	.	.	17	28	3	8	3	.	.
16	10	6	.	2	.	.	17	10	5	5	2	.	.	17	28	4	7	2	.	.
16	10	7	.	2	.	.	17	10	6	12	2	.	.	17	28	5	6	3	.	.

CONTINUACIÓN ANEXO 1

MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA			MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA		
				(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO					(mm)	RAIZ	CALLO
18	8	4	9	3	.	.	19	8	.	.	.	+	+	20	19	10	12	2	.	+
18	8	5	11	3	.	.	19	9	.	.	.	+	+	20	20	1	.	1	.	+
18	8	6	7	3	.	.	19	10	.	.	.	+	+	20	20	2	.	1	.	+
18	8	7	10	2	.	.	19	11	.	.	.	+	+	20	21	1	1	2	.	+
18	8	8	12	2	.	.	19	12	.	.	.	+	+	20	21	2	3	2	.	+
18	8	9	.	2	.	.	19	13	+	20	22	+
18	8	10	.	2	.	.	19	14	.	.	.	+	+	20	23	1	.	1	.	+
18	9	1	5	4	.	+	19	15	1	6	3	.	+	20	23	2	.	1	.	+
18	9	2	10	4	.	+	19	16	+	20	23	3	.	1	.	+
18	9	3	12	4	.	+	19	17	+	20	24	1	12	3	.	+
18	9	4	11	3	.	+	19	18	+	20	24	2	14	3	.	+
18	9	5	7	3	.	+	19	19	+	20	24	3	12	3	.	+
18	9	6	6	2	.	+	19	20	+	20	24	4	12	2	.	+
18	9	7	15	2	.	+	19	21	+	20	24	5	15	2	.	+
18	9	8	.	2	.	+	19	22	1	2	1	.	.	20	24	6	18	2	.	+
18	9	9	.	3	.	+	19	23	+	20	24	7	8	2	.	+
18	9	10	.	3	.	+	19	24	20	24	8	9	2	.	+
18	10	1	12	3	.	+	19	25	20	24	9	10	2	.	+
18	10	2	14	3	.	+	19	26	+	20	24	10	6	3	.	+
18	10	3	12	3	.	+	19	27	+	20	24	11	5	3	.	+
18	10	4	15	3	.	+	19	28	20	25	1	18	3	.	+
18	10	5	12	3	.	+	19	29	20	25	2	15	3	.	+
18	11	1	20	4	.	+	19	30	20	25	3	14	3	.	+
18	11	2	15	3	.	+	20	1	1	4	1	.	.	20	25	4	12	2	.	+
18	12	1	15	3	.	+	20	1	2	1	.	.	.	20	25	5	10	2	.	+
18	12	2	20	3	.	+	20	2	1	8	3	.	+	20	25	6	7	2	.	+
18	12	3	12	3	.	+	20	2	2	7	2	.	+	20	25	7	7	2	.	+
18	12	4	13	3	.	+	20	2	3	6	2	.	+	20	25	8	8	2	.	+
18	12	5	11	3	.	+	20	2	4	.	2	.	+	20	25	9	7	2	.	+
18	12	6	10	2	.	+	20	2	5	4	3	.	+	20	25	10	10	2	.	+
18	13	1	1	2	.	.	20	2	6	4	3	.	+	20	25	11	4	2	.	+
18	14	1	1	2	.	.	20	2	7	14	3	.	+	20	25	12	5	2	.	+
18	15	+	20	2	8	18	3	.	+	20	25	13	3	2	.	+
18	16	20	2	9	20	3	.	+	20	25	14	4	2	.	+
18	17	1	20	2	10	10	3	.	+	20	25	15	5	2	.	+
18	17	2	20	2	11	12	2	.	+	20	25	16	5	2	.	+
18	17	3	15	3	.	.	20	2	12	10	2	.	+	20	26	1	20	4	.	+
18	17	4	20	3	.	+	20	2	13	9	3	.	+	20	26	2	20	4	.	+
18	18	1	10	3	.	+	20	3	1	7	3	.	.	20	26	3	18	3	.	+
18	18	2	12	3	.	+	20	3	2	10	3	.	.	20	26	4	18	3	.	+
18	18	3	7	2	.	+	20	3	3	11	3	.	.	20	26	5	16	3	.	+
18	18	4	14	2	.	+	20	3	4	10	4	.	.	20	26	6	10	3	.	+
18	18	5	.	2	.	+	20	3	5	10	3	.	.	20	26	7	12	3	.	+
18	18	6	.	2	.	+	20	3	6	6	2	.	.	20	26	8	6	2	.	+
18	18	7	.	2	.	+	20	3	7	7	2	.	.	20	26	9	8	2	.	+
18	18	8	.	2	.	+	20	3	8	7	2	.	.	20	26	10	4	2	.	+
18	19	1	10	5	.	.	20	4	20	27	1	20	4	.	+
18	19	2	10	3	.	.	20	5	1	10	3	.	+	20	27	2	15	4	.	+
18	19	3	11	4	.	.	20	5	2	7	3	.	+	20	27	3	14	3	.	+
18	19	4	15	3	.	.	20	5	3	7	4	.	+	20	27	4	18	3	.	+
18	19	5	8	2	.	.	20	5	4	2	1	.	+	20	27	5	12	3	.	+
18	19	6	7	2	.	.	20	5	5	2	1	.	+	20	27	6	5	2	.	+
18	20	1	.	2	.	.	20	5	6	2	1	.	+	20	27	7	4	2	.	+
18	21	1	.	2	.	.	20	6	1	13	3	.	+	20	27	8	3	2	.	+
18	21	2	.	2	.	.	20	6	2	13	2	.	+	20	28	1	20	4	.	+
18	21	3	.	3	.	.	20	6	3	12	2	.	+	20	28	2	22	4	.	+
18	22	1	12	4	.	.	20	6	4	12	3	.	+	20	28	3	12	3	.	+
18	22	2	8	3	.	+	20	6	5	12	3	.	+	20	28	4	10	3	.	+
18	22	3	10	2	.	+	20	6	6	11	1	.	+	20	28	5	9	2	.	+
18	22	4	5	2	.	+	20	6	7	11	1	.	+	20	28	6	10	2	.	+
18	23	1	24	9	.	+	20	7	1	5	3	.	+	20	28	7	12	3	.	+
18	23	2	8	2	.	+	20	7	2	10	3	.	+	20	28	8	4	3	.	+
18	23	3	8	1	.	+	20	7	3	6	2	.	+	20	28	9	4	2	.	+
18	23	4	6	2	.	+	20	7	4	7	2	.	+	20	28	10	4	2	.	+
18	24	1	14	8	.	.	20	7	5	4	2	.	+	20	28	11	4	2	.	+
18	24	2	15	4	.	.	20	7	6	4	2	.	+	20	28	12	3	2	.	+
18	24	3	16	3	.	.	20	8	+	20	28	13	2	2	.	+
18	24	4	12	3	.	.	20	9	1	3	3	.	+	20	28	14	4	2	.	+
18	25	+	20	10	1	14	3	.	+	20	28	15	4	2	.	+
18	26	1	12	3	.	+	20	10	2	13	3	.	+	20	29	1	12	3	.	+
18	26	2	12	2	.	+	20	10	3	13	3	.	+	20	29	2	12	3	.	+
18	26	3	13	2	.	+	20	10	4	13	3	.	+	20	29	3	10	2	.	+

CONTINUACIÓN ANEXO 1

				ALTURA							ALTURA							ALTURA		
MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	(mm)	RAIZ	CALLO	MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	(mm)	RAIZ	CALLO	MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	(mm)	RAIZ	CALLO
29	5	9	6	2	.	+	29	21	2	4	3	.	+	30	5
29	5	10	6	2	.	+	29	21	3	2	2	.	+	30	6
29	5	11	6	2	.	+	29	21	4	.	2	.	+	30	7	1	5	3	.	+
29	6	1	7	3	.	+	29	21	5	.	2	.	+	30	7	2	5	3	.	+
29	6	2	7	3	.	+	29	22	1	18	3	.	+	30	7	3	5	3	.	+
29	6	3	7	3	.	+	29	22	2	20	3	.	+	30	7	4	4	2	.	+
29	6	4	5	3	.	+	29	22	3	16	3	.	+	30	7	5	6	2	.	+
29	6	5	5	3	.	+	29	23	1	.	2	.	+	30	7	6	6	2	.	+
29	6	6	6	2	.	+	29	24	1	6	3	.	+	30	7	7	7	2	.	+
29	6	7	6	2	.	+	29	24	2	7	3	.	+	30	8	1	5	2	.	+
29	7	1	4	3	.	+	29	24	3	2	2	.	+	30	8	2	6	2	.	+
29	7	2	5	3	.	+	29	24	4	2	2	.	+	30	8	3	5	3	.	+
29	7	3	3	2	.	+	29	24	5	2	2	.	+	30	9	1	2	2	.	+
29	7	4	2	2	.	+	29	25	1	8	4	.	+	30	9	2	2	2	.	+
29	7	5	4	2	.	+	29	25	2	7	4	.	+	30	9	3	1	2	.	+
29	7	6	3	2	.	+	29	25	3	8	3	.	+	30	10	+
29	7	7	2	2	.	+	29	25	4	7	3	.	+	30	11	1	4	2	.	+
29	8	1	1	2	.	+	29	25	5	7	4	.	+	30	11	2	2	2	.	+
29	9	1	2	2	.	+	29	25	6	6	2	.	+	30	11	3	3	2	.	+
29	9	2	1	2	.	+	29	25	7	10	2	.	+	30	12	+
29	10	1	12	3	.	+	29	26	1	4	3	.	+	30	13	1	4	3	.	+
29	11	1	2	2	.	+	29	26	2	5	3	.	+	30	13	2	5	3	.	+
29	11	2	1	2	.	+	29	26	3	6	2	.	+	30	13	3	5	3	.	+
29	12	1	2	2	.	+	29	26	4	4	2	.	+	30	13	4	4	2	.	+
29	12	2	1	2	.	+	29	26	5	3	2	.	+	30	13	5	3	2	.	+
29	12	3	1	2	.	+	29	27	+	30	13	6	1	3	.	+
29	13	1	2	2	.	+	29	28	1	4	2	.	+	30	13	7	3	2	.	+
29	13	2	2	2	.	+	29	28	2	4	2	.	+	30	14	1	8	3	.	+
29	13	3	2	2	.	+	29	29	1	6	3	.	+	30	14	2	6	3	.	+
29	13	4	1	2	.	+	29	29	2	1	2	.	+	30	14	3	5	3	.	+
29	13	5	1	2	.	+	29	29	3	1	2	.	+	30	14	4	4	3	.	+
29	13	6	2	2	.	+	29	30	1	7	4	.	+	30	14	5	5	3	.	+
29	14	1	1	2	.	+	29	30	2	5	3	.	+	30	14	6	5	2	.	+
29	15	1	1	2	.	+	29	30	3	4	3	.	+	30	15	1	6	3	.	+
29	16	1	16	3	.	+	29	30	4	3	2	.	+	30	15	2	6	2	.	+
29	17	1	8	3	.	+	30	1	1	9	3	.	+	30	15	3	5	2	.	+
29	17	2	10	3	.	+	30	1	2	10	3	.	+	30	15	4	5	2	.	+
29	17	3	12	3	.	+	30	1	3	8	2	.	+	30	15	5	4	2	.	+
29	17	4	15	3	.	+	30	1	4	10	3	.	+	30	15	6	5	1	.	+
29	17	5	9	2	.	+	30	1	5	5	2	.	+	30	15	7	3	1	.	+
29	17	6	10	2	.	+	30	1	6	5	2	.	+	30	15	8	1	2	.	+
29	17	7	7	3	.	+	30	2	1	6	3	.	+	30	16	1	12	2	.	+
29	17	8	8	3	.	+	30	2	2	7	3	.	+	30	16	2	12	2	.	+
29	17	9	6	2	.	+	30	2	3	5	2	.	+	30	16	3	10	2	.	+
29	17	10	5	3	.	+	30	2	4	5	2	.	+	30	16	4	8	3	.	+
29	17	11	11	3	.	+	30	2	5	4	2	.	+	30	16	5	10	3	.	+
29	18	1	6	3	.	+	30	3	1	9	3	.	+	30	17	1	4	2	.	.
29	18	2	6	2	.	+	30	3	2	7	3	.	+	30	17	2	3	1	.	.
29	18	3	4	2	.	+	30	3	3	10	3	.	+	30	17	3	2	3	.	.
29	18	4	5	2	.	+	30	3	4	9	3	.	+	30	17	4	1	2	.	.
29	18	5	3	2	.	+	30	3	5	8	3	.	+	30	18	1	6	2	.	+
29	18	6	2	2	.	+	30	3	6	7	3	.	+	30	18	2	4	2	.	+
29	18	7	5	2	.	+	30	3	7	5	3	.	+	30	18	3	5	2	.	+
29	18	8	3	3	.	+	30	3	8	5	3	.	+	30	18	4	2	2	.	+
29	19	1	2	2	.	+	30	3	9	3	3	.	+	30	19	+
29	19	2	1	2	.	+	30	3	10	5	3	.	+	30	20	1	.	2	.	+
29	20	1	2	2	.	+	30	4	1	6	2	.	+	30	20	2	.	2	.	+
29	20	2	2	2	.	+	30	4	2	5	2	.	+	30	20	3	.	1	.	+
29	21	1	5	3	.	+	30	4	3	5	2	.	+	30	21	1	4	3	.	+

CONTINUACIÓN ANEXO 1

MEDIO	TUBO	BROTE	AREOLAS	ALTURA (mm)	RAIZ	CALLO
30	21	3	2	2	.	+
30	21	4	2	2	.	+
30	22	1	10	3	.	+
30	22	2	7	3	.	+
30	22	3	10	2	.	+
30	22	4	12	2	.	+
30	22	5	6	2	.	+
30	22	6	5	2	.	+
30	22	7	4	3	.	+
30	22	8	5	3	.	+
30	22	9	2	3	.	+
30	23	1	5	3	.	+
30	23	2	5	3	.	+
30	23	3	5	3	.	+
30	23	4	4	2	.	+
30	23	5	4	2	.	+
30	23	6	4	1	.	+
30	24	1	7	3	.	+
30	24	2	7	3	.	+
30	24	3	7	3	.	+
30	24	4	9	2	.	+
30	24	5	9	2	.	+
30	24	6	10	2	.	+
30	24	7	5	2	.	+
30	24	8	4	2	.	+
30	25	1	12	4	.	+
30	25	2	10	4	.	+
30	25	3	7	3	.	+
30	25	4	6	3	.	+
30	25	5	5	3	.	+
30	25	6	5	2	.	+
30	25	7	10	3	.	+
30	25	8	5	2	.	+
30	26	1	2	1	.	.
30	26	2	1	2	.	.
30	27	1	1	2	.	.
30	28	1	.	2	.	.
30	29
30	30	1	10	3	.	+
30	30	2	10	2	.	+
30	30	3	6	2	.	+
30	30	4	6	3	.	+

ANEXO 2. PESO Y NÚMERO DE BROTES POR TUBO

MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTES	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTES	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTES
1	1	0	0	3	1	0.838	4	5	1	.	.
1	2	0.009	1	3	2	2.67	2	5	2	1.364	5
1	3	0	0	3	3	2.076	9	5	3	0.585	2
1	4	0	0	3	4	2.681	1	5	4	0.013	1
1	5	0	0	3	5	2.647	1	5	5	0	0
1	6	0	0	3	6	2.865	16	5	6	0	0
1	7	0	0	3	7	1.615	4	5	7	0	0
1	8	0	0	3	8	0	0	5	8	0.058	2
1	9	0	0	3	9	2.269	2	5	9	0	0
1	10	0	0	3	10	0.22	4	5	10	0	0
1	11	0	0	3	11	1.901	12	5	11	0	0
1	12	0.047	1	3	12	0.302	5	5	12	.	.
1	13	.	.	3	13	0.022	1	5	13	0.857	10
1	14	0	0	3	14	2.315	1	5	14	0.345	7
1	15	0.086	1	3	15	0	0	5	15	0.021	1
1	16	0.031	1	3	16	0.268	1	5	16	0	0
1	17	0	0	3	17	1.153	6	5	17	0	0
1	18	0	0	3	18	1.321	10	5	18	0	0
1	19	0	0	3	19	1.991	8	5	19	0	0
1	20	0	0	3	20	1.561	1	5	20	0.252	3
1	21	0	0	3	21	1.261	11	5	21	0.365	2
1	22	0	0	3	22	0	0	5	22	2.23	12
1	23	0	0	3	23	0.479	1	5	23	0.008	1
1	24	0	0	3	24	0.584	3	5	24	0	0
1	25	0	0	3	25	1.946	2	5	25	0.995	1
1	26	0	0	3	26	2.584	2	5	26	0.211	3
1	27	0	0	3	27	1.313	3	5	27	0.404	3
1	28	0	0	3	28	2.68	6	5	28	0.008	1
1	29	0	0	3	29	2.887	3	5	29	0.015	1
1	30	0	0	3	30	1.31	7	5	30	0.275	2
2	1	3.196	30	4	1	0.748	2	6	1	0.574	2
2	2	0.039	1	4	2	0	0	6	2	1.732	11
2	3	.	.	4	3	1.825	13	6	3	0.905	3
2	4	0	0	4	4	0.043	1	6	4	1.933	12
2	5	1.678	29	4	5	.	.	6	5	0.777	4
2	6	0.053	1	4	6	0.591	4	6	6	0	0
2	7	1.942	5	4	7	0	0	6	7	0	0
2	8	2.51	14	4	8	0	0	6	8	1.439	6
2	9	.	.	4	9	0.138	1	6	9	0	0
2	10	0.044	1	4	10	0.676	2	6	10	0	0
2	11	3.665	6	4	11	2.473	2	6	11	0	0
2	12	3.148	7	4	12	.	.	6	12	0	0
2	13	0.742	3	4	13	0	0	6	13	0	0
2	14	0.848	4	4	14	0	0	6	14	0	0
2	15	1.326	4	4	15	0	0	6	15	.	.
2	16	0.241	1	4	16	2.08	13	6	16	0.922	5
2	17	0.995	4	4	17	0	0	6	17	5.024	6
2	18	3.408	5	4	18	0.66	6	6	18	3.616	17
2	19	2.533	1	4	19	0	0	6	19	1.009	1
2	20	4.113	9	4	20	0	0	6	20	3.17	1
2	21	1.028	5	4	21	0	0	6	21	0.985	3
2	22	0.267	1	4	22	0.176	1	6	22	1.313	21
2	23	3.427	9	4	23	0	0	6	23	0	0
2	24	2.92	2	4	24	.	.	6	24	1.569	13
2	25	3.496	3	4	25	0	0	6	25	0	0
2	26	3.283	3	4	26	3.129	10	6	26	0.575	3
2	27	1.205	6	4	27	2.359	.	6	27	0	0
2	28	0.513	3	4	28	0	0	6	28	0.1	1
2	29	3.065	2	4	29	1.432	4	6	29	2.795	18
2	30	1.865	4	4	30	3.07	.	6	30	0.071	1

CONTINUACIÓN ANEXO 2

MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS
7	1	0.023	1	9	1	4.499	8	11	1	1.366	8
7	2	0.093	1	9	2	3.698	7	11	2	2.246	4
7	3	0	0	9	3	1.304	5	11	3	0.046	1
7	4	0.037	1	9	4	0.371	4	11	4	0.798	3
7	5	0.075	1	9	5	.	.	11	5	0.011	1
7	6	0.699	1	9	6	0.059	1	11	6	2.665	3
7	7	0.221	1	9	7	0.132	1	11	7	0.788	2
7	8	0.251	1	9	8	3.998	11	11	8	1.106	2
7	9	0.102	1	9	9	1.264	4	11	9	3.727	7
7	10	0	0	9	10	0.501	1	11	10	0.15	3
7	11	0.073	1	9	11	2.19	1	11	11	0	0
7	12	0	0	9	12	2.8	10	11	12	0.033	2
7	13	0.045	1	9	13	1.08	3	11	13	0.655	1
7	14	0	0	9	14	1.785	8	11	14	3.456	7
7	15	0.022	1	9	15	0	0	11	15	1.613	5
7	16	0	0	9	16	3.511	8	11	16	0.357	3
7	17	0.368	2	9	17	2.609	2	11	17	1.3	5
7	18	0.109	1	9	18	0.83	1	11	18	1.425	11
7	19	0	0	9	19	2.403	11	11	19	2.186	7
7	20	0.039	1	9	20	2.33	8	11	20	0.413	4
7	21	0.27	1	9	21	1.843	4	11	21	0.013	1
7	22	0.166	1	9	22	0.062	1	11	22	0.954	5
7	23	0.055	1	9	23	1.026	3	11	23	1.095	4
7	24	0.006	1	9	24	1.096	6	11	24	2.27	5
7	25	0.018	1	9	25	0.1	2	11	25	0.4	4
7	26	0.151	4	9	26	2.044	8	11	26	0.937	6
7	27	0.091	1	9	27	0.662	1	11	27	2.225	12
7	28	0	0	9	28	0.243	2	11	28	0.851	12
7	29	0	0	9	29	1.962	3	11	29	0.961	10
7	30	0	0	9	30	2.539	9	11	30	2.482	2
8	1	0	0	10	1	0.042	1	12	1	0.297	3
8	2	0	0	10	2	0	0	12	2	0.234	3
8	3	0	0	10	3	0.211	1	12	3	.	.
8	4	0.012	1	10	4	2.289	4	12	4	0.432	2
8	5	0	0	10	5	0.22	1	12	5	0	0
8	6	0.093	2	10	6	2.42	12	12	6	.	.
8	7	0.085	1	10	7	0	0	12	7	0.287	1
8	8	0	0	10	8	4.656	8	12	8	0.8	7
8	9	0.964	3	10	9	0	0	12	9	0	0
8	10	0.904	6	10	10	3.313	16	12	10	3.255	14
8	11	2.708	6	10	11	2.594	3	12	11	0.318	1
8	12	0.707	1	10	12	1.996	3	12	12	0.092	7
8	13	0	0	10	13	0.57	1	12	13	3.392	15
8	14	0	0	10	14	2.437	7	12	14	0.242	1
8	15	0	0	10	15	1.8	8	12	15	0.891	3
8	16	2.22	5	10	16	0	0	12	16	1.203	8
8	17	2.373	10	10	17	0.158	1	12	17	0.769	6
8	18	0.469	5	10	18	1.356	4	12	18	0	0
8	19	0	0	10	19	0.209	2	12	19	0.378	2
8	20	0.962	6	10	20	0.649	6	12	20	0.251	1
8	21	0.006	1	10	21	1.611	8	12	21	2.793	8
8	22	0.222	3	10	22	0.434	2	12	22	0.158	1
8	23	0.085	1	10	23	2.741	10	12	23	1.706	5
8	24	0.054	1	10	24	2.342	10	12	24	0.127	1
8	25	0.08	1	10	25	0.075	1	12	25	0.312	4
8	26	0.037	1	10	26	2.617	10	12	26	.	.
8	27	0.978	7	10	27	0	0	12	27	0	0
8	28	0.041	1	10	28	0	0	12	28	0.833	4
8	29	0.206	1	10	29	0.995	10	12	29	0.458	2
8	30	1.89	1	10	30	2.51	11	12	30	1.196	1

CONTINUACIÓN ANEXO 2

MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS
13	1	0.02	1	15	1	0	0	17	1	3.366	9
13	2	0.089	1	15	2	1.108	5	17	2	2.045	11
13	3	0	0	15	3	0.285	9	17	3	0.652	4
13	4	0	0	15	4	1.032	4	17	4	0.318	3
13	5	0.076	1	15	5	2.005	3	17	5	1.289	13
13	6	.	.	15	6	0.209	1	17	6	3.412	23
13	7	0.484	1	15	7	2.344	4	17	7	0.995	9
13	8	0	0	15	8	0.053	1	17	8	1.412	7
13	9	0.201	2	15	9	0	0	17	9	2.547	8
13	10	0	0	15	10	2.825	5	17	10	2.993	18
13	11	0.463	2	15	11	0.068	1	17	11	.	.
13	12	0.133	2	15	12	0	0	17	12	1.877	2
13	13	.	.	15	13	1.143	3	17	13	0.658	3
13	14	0.742	2	15	14	.	.	17	14	0.029	1
13	15	0.823	5	15	15	0	0	17	15	2.586	8
13	16	0	0	15	16	0.364	6	17	16	2.419	18
13	17	0	0	15	17	0.488	2	17	17	1.635	10
13	18	.	.	15	18	0.84	3	17	18	.	.
13	19	0	0	15	19	0.162	3	17	19	0.343	1
13	20	0.013	1	15	20	0.178	2	17	20	2.413	1
13	21	0	0	15	21	0	0	17	21	2.204	10
13	22	0.06	1	15	22	0.558	4	17	22	3.594	12
13	23	0.089	1	15	23	0.195	4	17	23	1.097	8
13	24	0	0	15	24	1.561	9	17	24	0.618	5
13	25	0.368	1	15	25	0.387	1	17	25	1.524	8
13	26	0.013	1	15	26	3.267	11	17	26	0.096	1
13	27	0	0	15	27	2.226	20	17	27	0	0
13	28	0	0	15	28	0.461	1	17	28	1.328	4
13	29	0	0	15	29	0	0	17	29	0	0
13	30	0.092	1	16	30	.	.	17	30	.	.
14	1	0.597	4	16	1	1.044	12	18	1	2.108	9
14	2	0.288	2	16	2	0.775	5	18	2	0.974	4
14	3	0	0	16	3	4.539	14	18	3	1.627	1
14	4	.	.	16	4	2.305	10	18	4	0.023	1
14	5	0.27	1	16	5	2.845	7	18	5	0.888	9
14	6	3.143	11	16	6	0.055	1	18	6	0.568	5
14	7	0.874	4	16	7	0.039	1	18	7	1.013	4
14	8	0.564	2	16	8	2.472	12	18	8	2.526	11
14	9	.	.	16	9	1.317	3	18	9	1.912	9
14	10	.	.	16	10	4.335	11	18	10	1.154	5
14	11	2.275	4	16	11	2.623	6	18	11	2.013	2
14	12	1.504	7	16	12	0	0	18	12	1.262	13
14	13	1.938	7	16	13	.	.	18	13	0	0
14	14	4.03	7	16	14	0	0	18	14	0	0
14	15	0.686	4	16	15	2.143	1	18	15	0.127	1
14	16	1.397	8	16	16	.	.	18	16	0	0
14	17	1.395	7	16	17	1.114	10	18	17	0	0
14	18	1.049	4	16	18	.	.	18	18	1.251	5
14	19	0.827	2	16	19	0.632	7	18	19	0.229	7
14	20	2.044	10	16	20	.	.	18	20	0	0
14	21	4.232	5	16	21	0.584	3	18	21	0.689	2
14	22	2.513	14	16	22	.	.	18	22	1.04	4
14	23	1.935	6	16	23	.	.	18	23	0	0
14	24	1.572	5	16	24	.	.	18	24	1.917	7
14	25	.	.	16	25	.	.	18	25	0	0
14	26	.	.	16	26	.	.	18	26	1.784	6
14	27	0.672	1	16	27	.	.	18	27	2.114	12
14	28	2.379	9	16	28	.	.	18	28	1.748	5
14	29	0.669	4	16	29	.	.	18	29	.	.
14	30	2.798	13	16	30	.	.	18	30	.	.

CONTINUACIÓN ANEXO 2

MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS
19	1	.	.	21	1	0.446	2	23	1	.	.
19	2	0	0	21	2	0.228	1	23	2	0.537	5
19	3	.	.	21	3	2.135	1	23	3	.	.
19	4	0	0	21	4	2.09	11	23	4	.	.
19	5	0.938	1	21	5	3.45	6	23	5	2.252	15
19	6	1.527	4	21	6	1.538	10	23	6	2.097	11
19	7	0	0	21	7	0.449	2	23	7	.	.
19	8	0	0	21	8	1.96	8	23	8	.	.
19	9	0.044	1	21	9	0.641	7	23	9	1.363	1
19	10	0	0	21	10	0.235	2	23	10	2.294	11
19	11	0.064	1	21	11	0.37	2	23	11	0.729	10
19	12	0	0	21	12	2.792	9	23	12	0.84	8
19	13	0	0	21	13	2.182	5	23	13	0.182	1
19	14	.	.	21	14	0.782	5	23	14	1.62	8
19	15	.	.	21	15	0.488	2	23	15	0.113	2
19	16	0.345	1	21	16	0	0	23	16	0.797	12
19	17	0	0	21	17	0	0	23	17	0.159	1
19	18	0.063	1	21	18	0.217	1	23	18	2.249	6
19	19	0.868	1	21	19	2.087	9	23	19	0.458	3
19	20	.	.	21	20	0.032	1	23	20	1.459	6
19	21	0.277	1	21	21	2.65	2	23	21	2.481	10
19	22	0	0	21	22	0	0	23	22	1.05	5
19	23	0.11	1	21	23	1.362	6	23	23	1.108	12
19	24	.	.	21	24	1.631	5	23	24	1.737	13
19	25	0.895	1	21	25	0	0	23	25	.	.
19	26	0	0	21	26	3.743	15	23	26	3.464	22
19	27	0	0	21	27	1.246	7	23	27	1.034	16
19	28	.	.	21	28	2.661	6	23	28	0.292	4
19	29	.	.	21	29	0.275	2	23	29	1.035	4
19	30	.	.	21	30	.	.	23	30	0.406	2
20	1	1.575	3	22	1	0.445	17	24	1	0	0
20	2	2.388	18	22	2	2.439	2	24	2	0	0
20	3	2.28	10	22	3	0.815	4	24	3	0.828	4
20	4	.	.	22	4	3.221	9	24	4	0.594	6
20	5	0.51	4	22	5	1.776	6	24	5	0.714	4
20	6	0.844	6	22	6	2.014	11	24	6	0.236	3
20	7	0.807	7	22	7	2.687	12	24	7	0.026	1
20	8	0	0	22	8	0.89	9	24	8	2.95	10
20	9	2.01	2	22	9	2.901	15	24	9	1.789	14
20	10	2.521	10	22	10	3.254	18	24	10	1.978	7
20	11	0.557	3	22	11	0.61	3	24	11	2.184	3
20	12	0.136	1	22	12	0.713	4	24	12	0	0
20	13	0.177	1	22	13	1.85	11	24	13	1.099	7
20	14	0.219	3	22	14	0	0	24	14	2.457	6
20	15	0.892	2	22	15	.	.	24	15	0	0
20	16	1.445	12	22	16	1.062	5	24	16	2.53	6
20	17	0.438	1	22	17	1.895	12	24	17	3.231	9
20	18	0	0	22	18	2.529	5	24	18	0	0
20	19	2.412	11	22	19	2.416	15	24	19	1.453	5
20	20	0	0	22	20	2.667	9	24	20	1.027	6
20	21	0.343	2	22	21	.	.	24	21	.	.
20	22	0	0	22	22	0.719	8	24	22	.	.
20	23	0	0	22	23	1.6	9	24	23	.	.
20	24	2.076	10	22	24	1.971	12	24	24	.	.
20	25	1.44	11	22	25	.	.	24	25	.	.
20	26	2.865	12	22	26	.	.	24	26	.	.
20	27	3.239	9	22	27	.	.	24	27	.	.
20	28	1.504	10	22	28	.	.	24	28	.	.
20	29	0.749	4	22	29	.	.	24	29	.	.
20	30	2.17	12	22	30	.	.	24	30	.	.

CONTINUACIÓN ANEXO 2

MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS	MEDIO	TUBO	PESO (g)	BROTOS
25	1	0.052	1	27	1	0.262	3	29	1	1.015	2
25	2	0	0	27	2	0.192	1	29	2	1.373	6
25	3	0	0	27	3	0.367	1	29	3	3.393	15
25	4	0	0	27	4	2.172	14	29	4	1.263	11
25	5	0.046	1	27	5	0.729	6	29	5	2.049	12
25	6	0.049	1	27	6	0.645	7	29	6	1.663	7
25	7	0.089	1	27	7	0.806	2	29	7	1.129	6
25	8	0	0	27	8	1.956	4	29	8	0.288	1
25	9	.	.	27	9	0	0	29	9	0.076	1
25	10	0.078	1	27	10	0	0	29	10	0.253	1
25	11	0.068	1	27	11	1.3	10	29	11	0.077	1
25	12	0	0	27	12	1.376	9	29	12	1.566	3
25	13	0	0	27	13	0	0	29	13	0.937	6
25	14	0.16	1	27	14	4.252	4	29	14	0	0
25	15	0.198	1	27	15	0	0	29	15	0	0
25	16	0.965	2	27	16	0	0	29	16	1.405	3
25	17	0	0	27	17	0	0	29	17	2.59	13
25	18	.	.	27	18	0.047	1	29	18	0.988	5
25	19	0.26	2	27	19	1.52	1	29	19	2.975	6
25	20	.	.	27	20	0	0	29	20	0	0
25	21	0	0	27	21	0	0	29	21	0.932	6
25	22	0	0	27	22	0.231	1	29	22	1.984	3
25	23	0	0	27	23	0	0	29	23	0	0
25	24	0.378	1	27	24	0.521	2	29	24	1.228	7
25	25	0.086	1	27	25	0.026	1	29	25	1.833	7
25	26	0.021	2	27	26	0.014	1	29	26	1.238	6
25	27	0	0	27	27	0.016	1	29	27	2.471	5
25	28	0.038	1	27	28	0	0	29	28	1.626	5
25	29	.	.	27	29	0	0	29	29	0.191	1
25	30	.	.	27	30	0.031	1	29	30	2.092	10
26	1	0.111	1	28	1	1.177	3	30	1	0.67	5
26	2	0.072	1	28	2	0.811	3	30	2	0.462	6
26	3	0.026	2	28	3	1.581	3	30	3	1.027	6
26	4	1.385	5	28	4	2.172	5	30	4	0.237	3
26	5	0	0	28	5	2.11	11	30	5	1.895	7
26	6	0.01	1	28	6	3.727	18	30	6	2.329	2
26	7	0.054	1	28	7	0.18	2	30	7	1.867	6
26	8	0	0	28	8	0.138	1	30	8	0.186	2
26	9	0	0	28	9	3.112	18	30	9	0.682	4
26	10	3.422	1	28	10	2.611	10	30	10	0.867	1
26	11	0	0	28	11	0	0	30	11	0.12	3
26	12	0	0	28	12	1.129	6	30	12	0	0
26	13	0	0	28	13	1.736	8	30	13	2.452	12
26	14	.	.	28	14	1.599	7	30	14	1.598	5
26	15	0.272	3	28	15	3.358	13	30	15	2.327	10
26	16	0.031	1	28	16	1.143	8	30	16	1.033	5
26	17	1.171	2	28	17	2.915	7	30	17	2.07	5
26	18	0.544	2	28	18	1.369	7	30	18	0.211	2
26	19	0	0	28	19	0.555	2	30	19	0	0
26	20	0	0	28	20	3.767	15	30	20	0.051	1
26	21	0.131	3	28	21	0	0	30	21	0.513	5
26	22	2.453	4	28	22	0.077	3	30	22	0.759	5
26	23	0.07	1	28	23	1.901	4	30	23	1.9	3
26	24	0	0	28	24	0.744	4	30	24	2.596	5
26	25	0	0	28	25	0.768	1	30	25	1.228	7
26	26	0	0	28	26	0.507	3	30	26	1.238	4
26	27	0	0	28	27	2.248	4	30	27	0.373	1
26	28	0	0	28	28	1.39	6	30	28	0.131	1
26	29	0	0	28	29	.	.	30	29	0	0
26	30	0	0	28	30	.	.	30	30	1.093	4

ANEXO 3. GLOSARIO DE TÉRMINOS (18)

2,4-D:	Auxina sintética. Se utiliza en gran cantidad como agroquímico (herbicida), aunque funciona estimulando la división celular y la formación de callo. Puede causar mutaciones.
2iP:	Regulador del crecimiento que pertenece a las citocininas. Se utiliza en las plantas que no presentan diferenciación con el uso de BAP.
Aclimatización:	Proceso en que las plantas se adaptan artificialmente al ambiente.
Auxina:	Reguladores del crecimiento que se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces. Generalmente, como fuente de auxinas, se usan los compuestos siguientes: AIA, ANA, AIB y 2,4-D.
BAP:	Citocinina sintética. Se utiliza más frecuentemente que las otras. Puede causar vitrificación en altas concentraciones.
Citocininas:	Se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos. Los compuestos más utilizados, como fuente de citocininas, son los siguientes: cinetina, BAP, 2iP y zeatina.
Brote:	Parte de la planta constituida por hojas y yemas.
Callo:	Tejido vegetal no diferenciado que se forma en heridas. En cultivo de tejidos vegetales se induce debido a la presencia de auxina en el medio.
Desinfección:	Proceso de eliminar selectivamente microorganismos de una manera artificial.
Desinfección Superficial:	Desinfección de la superficie vegetal con una solución desinfectante.
Desinfectante:	Agente que sirve para desinfectar superficialmente las plantas. Principalmente se utiliza hipoclorito de calcio y de sodio entre tres y cinco por ciento. También se utiliza alcohol etílico al 70 por ciento.
Esterilización:	Proceso de eliminación completa de microorganismos vivos, de una manera artificial.
Explante:	Fragmento o parte de material vegetal que se coloca en un medio nutritivo para iniciar el cultivo <i>in vitro</i> .
Fitohormonas:	Sustancias que se producen en las plantas, y compuestos sintéticos, que tienen la misma función que las naturales, de regular ciertos procesos del metabolismo y desarrollo vegetal.
IN VITRO:	En latín significa "dentro de vidrio". Normalmente, indica el ambiente estéril de un recipiente de vidrio con medio de cultivo.

Medio MS:	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Se desarrolló originalmente para el cultivo de callos de tabaco, pero actualmente es el más utilizado en la mayoría de cultivos.
Micropropagación:	Propagación de plantas mediante cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .
pH:	Potencial de hidrógeno. Unidad para indicar la concentración de acidez y/o alcalinidad. Se expresa en una escala de 1 a 14.
Propagación Vegetativa:	Propagación sin usar semillas. La injertación y la micropropagación son técnicas de la propagación vegetativa.
Yema:	Punto activo (o pasivo) de crecimiento de una planta. Las yemas se desarrollan en partes apicales y/o laterales de la planta. Las yemas adventicias se forman a partir de un órgano determinado. Las yemas dormidas de las plantas de clima templado y frío, son aquellas que están preparadas para pasar la época de invierno en fase de latencia

ANEXO 4. LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS EMPLEADOS

%	Por ciento	H₂O	Agua
2,4,5-T	Acido 2,4,5 triclorofenoxiacético	HCl	Hydroclorado
2,4-D	Acido 2,4 diclorofenoxiacético	ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas
2iP	2 isopentil adenina	Ing.Agr.	Ingeniero Agrónomo
AIA	Acido indol acético	K	Potasio
AIB	Acido indol butírico	KIN	Cinetina
ANA	Acido naftalenacético	m	Metros
ANDEVA	Análisis de varianza	MCPA	Acido 2-metil-4- clorofenoxiacético
ARN	Acido ribonucléico	Mg	Magnesio
ARNm	Acido ribonucéico mensajero	mg	Miligramos
BAP	6-bencilaminopurina	mg/l	Miligramos por litro
Bo	Boro	ml	Mililitros
Ca	Calcio	mM	Milimolar
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical	mm	Milímetros
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres	Mn	Manganeso
cm	Centímetros	Mo	Molibdeno
Co	Cobalto	MS	Murashige y Skoog (1962)
CONAP	Consejo Nacional de Áreas Protegidas	msnm	Metros sobre el nivel del mar
CPA	Acido 4-clorofenoxiacético	N	Nitrógeno
Cu	Cobre	No.	Número
Ed.	Editorial	°C	Grados centígrados
FAO	Food Agricultural Organization	P	Fósforo
FAUSAC	Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala	p.	Página
Fe	Hierro	pH	Potencial de hidrógeno
g	Gramos	Physiol.	Physiología
g/l	Gramos por litro	Plant.	Plantarum
H⁺	Iones de hidrógeno	S	Azufre
		UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
		V.	Volumen
		ZEA	Zeatina
		Zn	Zin