

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

**PRODUCCIÓN DE PLANTULAS DE IZOTE PONY (*Beaucarnea recurvata* Rose)
UTILIZANDO EMBRIONES INMADUROS COMO EXPLANTE**

TESIS

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

POR

JOSE HORACIO GOMEZ CULAJAY

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2006

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Lic. CARLOS ESTUARDO GALVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Dr. 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	Br. Duglas Antonio Castillo Alvarez
VOCAL QUINTO	P. A. José Mauricio Franco Rosales
SECRETARIO	Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes

Guatemala, octubre de 2006

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

Distinguidos Miembros

En cumplimiento a las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**PRODUCCIÓN DE PLANTULAS *IN VITRO* DE IZOTE PONY (*Beaucarnea reurvata* Rose)
UTILIZANDO EMBRIONES INMADUROS COMO EXPLANTE**

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola en el grado de Licenciado.

Atentamente

José Horacio Gómez Culajay

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Todo poderoso, luz que guía mi vida en todo momento, fuente de sabiduría, que me ha dado la vida, y ha permitido que cumpla uno de mis objetivos.

MIS PADRES

JOSÉ FRANCISCO GÓMEZ LORENZO (Q.E.P.D), que diosito lindo te tenga en un lugar muy especial, y te agradezco por el esfuerzo realizado para cumplir uno de mis sueños.

JUANA RAYMUNADA CULAJAY PEREZ

Como muestra de agradecimiento a su amor, esfuerzos y sacrificios. Que sea el fruto de sus jornadas llenas de luchas y apoyo para lograr mi superación.

MIS HERMANOS

Victor Antonio Gómez y en especial a Blanca Iris Gómez, por tanto esfuerzo y sacrificio.

MIS TIOS

A gusto Baldomero Gómez (Q.E.P.D.), Leonidas Gómez (Q.E.P.D), Fidencio Catalina Gómez, Juventino Culajay, Basilio Culajay (Q.E.P.D), Juan Culajay, Juan Lorenzo, Ismael Chavez, Luis Francisco Gómez, como muestra de agradecimiento por su cariño y consejos, que dios los bendiga siempre.

MIS PRIMOS

Con especial Cariño

MIS AMIGOS

Alfredo Cabrera, Julio Cordón, Wenceslao Robledo, Julio Verdugo, German Chamale, Julio Sandoval, Edwin López, Flor de María Mas, Werner Alonzo, Yasil Cumez , Estuardo Galicia, Eduardo Sunun, José Luis Chajcoj, Oswaldo Tuquer, Nadia Espinoza, Mayra Gonzáles, Fernando Conde, Luis Felipe León, Mario Núñez, Maynor Calderón, Maynor Hernandez, Marvin Mejia. Por su sincera amistad en todo momento que hemos compartido a lo largo de nuestra formación profesional en la Facultad de Agronomía.

A LAS FAMILIAS

Mérida Cano, Reyes Fernández, Paz Amado, Herrera López, como un agradecimiento a su amistad brindada.

TESIS QUE DEDICO

A:

DIOS

MI PATRIA GUATEMALA

ALDEA LA SELVA, VILLA NUEVA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA OFICIAL RURAL MIXTA EL CALVARIO

COLEGIO RAFAEL ALVAREZ OVALLE

AGRADECIMIENTOS

A:

MI ASESOR

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez por la orientación y asesoría del presente trabajo de tesis.

Ing. Agr. Alfredo Cabrera Morales

Por su valioso y desinteresado apoyo y amistad brindada.

Ing. Agr. Macmilan Cruz

Por su colaboración en el desarrollo de la investigación.

I. ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1. MARCO CONCEPTUAL	3
3.1.1. Generalidades del cultivo	4
3.1.2. Genero <i>Beaucarnea</i>	4
3.1.3. Reproducción	4
3.1.4. Técnicas de cultivo	4
3.1.5. Plagas y Enfermedades	5
3.1.6. Distribución geográfica en Guatemala	5
3.1.7. Importancia económica	5
3.1.8. Variedades comerciales	6
3.1.9. Plantas por hectárea	6
3.1.10. Forma de preparación y tipo de planta para exportación	6
3.1.11. Empaque y transporte	7
3.1.12. Cultivo de tejidos	7
3.1.13. Método de micropropagación	8
3.1.14. Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	8
3.1.15. Técnica del cultivo de embriones <i>in vitro</i>	8
3.1.16. Trabajos realizados con embriones cigóticos, utilizando la técnica de propagación <i>in vitro</i>	9
3.1.17. Propagación <i>in vitro</i> del izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i> Rose), a Partir de semilla	9
3.1.18. Requerimientos para el cultivo de embriones a partir de semillas	10
3.1.19. El embrión cigótico en los vegetales	10
3.1.20. Semilla	12
3.1.21. Germinación	12
3.1.22. El embrión	13
3.1.23. Diferenciación del embrión	13
3.1.24. Desarrollo de embriones inmaduros	13
3.1.25. Organogenesis	13
3.1.26. Medios de cultivos	14
3.1.27. Macronutrientes	14
A. Nitrógeno	15
B. Fósforo	15
C. Potasio	15
D. Calcio	15
3.1.28. Micronutrientes	15
A. Hierro	15
B. Magnesio	15
3.1.29. Vitaminas	15
3.1.30. Fuente de carbono	16
3.1.31. pH del medio	16

3.1.32. Asepsia	16
3.1.33. Desinfección del explante	17
3.1.34. Reguladores de crecimiento	17
3.1.35. Citoquinina	18
3.1.36. Giberelinas	19
3.1.37. Aplicación de los reguladores del crecimiento al cultivo <i>in vitro</i>	20
3.2. MARCO REFERENCIAL	22
3.2.1. Ubicación del área experimental	22
3.2.2. Condiciones ambientales	22
3.2.3. Clasificación taxonómica	22
3.2.4. Descripción morfológica	22
3.2.4.1. Tallo	23
3.2.4.2. Hojas	23
3.2.4.3. Flores	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. General	24
4.2. Específicos	24
5. HIPÓTESIS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Localización del experimento	26
6.2. Reactivos y materiales	26
6.3. Cristalería y equipo	26
6.4. Medio de cultivo	26
6.4.1. Preparación de las soluciones madres	26
A. Solución madre de macronutrientes del medio nutritivo murashige y skoog	27
B. Solución madre de micronutrientes	27
C. Solución madre de hierro a 200X	28
D. Solución madre de vitaminas a 1000X	28
E. Solución madre de myo inositol a 1000X	28
F. Reguladores de crecimiento	28
6.4.2. Preparación de los medios de cultivo	28
6.4.3. Desinfección y siembra de explantes	29
A. Material vegetal	29
B. Desinfección de semilla	29
C. Desinfección de semilla a nivel de laboratorio	29
D. Extracción de los embriones	30
E. Incubación de cultivos	30
6.4.4. Descripción de los tratamientos	31
6.4.5. Descripción de la unidad experimental	31
6.4.6. Factores evaluados	31
6.5. Variable de respuesta	32
6.5.1. Análisis de resultados	32
6.5.2. Presentación de resultados	32
7. RESULTADO Y SU DISCUSIÓN	33
7.1. Limpieza del tejido inicial de microorganismos contaminantes	33
7.1.1. Colecta, transporte y almacenamiento de la semilla	33
7.1.2. Preparación de la solución desinfectante	33
7.1.3. Desinfección de la semilla	33

7.1.4. Extracción de embriones	33
7.1.5. Siembra de embriones	34
7.1.6. Inoculación de los cultivos	34
7.2. Germinación de embriones inmaduros de izote pony	35
7.3. Embriones germinados a los 5 días de inoculado el explante	36
7.4. Embriones germinados a los 10 días de inoculado el explante	37
7.5. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de izote pony	39
7.6. Altura de las plántulas obtenidas	41
7.7. Número de hojas por plántula de izote pony	43
7.8. Número de raíces por planta de izote pony	45
8. CONCLUSIONES	47
9. RECOMENDACIONES	49
10. BIBLOGRAFÍA	50
11. APÉNDICE	53

II. ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Componentes de macronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog a 20X	26
CUADRO 2. Componentes de micronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog	26
CUADRO 3. Descripción de los tratamientos utilizados en la germinación de embriones de izote pony	31
CUADRO 4. Factores y niveles que se evaluaron en la germinación de embriones de izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i> Rose)	34
CUADRO 5. Respuesta de los embriones de izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 5 días de inoculados los explantes en el medio basal MS, suplementado con diferentes concentraciones de BAP y GA ₃ .	36
CUADRO 6. Respuesta de los embriones de izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 10 días de inoculados los explantes en el medio basal MS, suplementado con diferentes concentraciones de BAP y GA ₃ .	38
CUADRO 7. Comportamiento de sobrevivencia de embriones germinados de izote Pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 60 días de aculados los explantes	40
CUADRO 8. Altura de plantas de izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 60 días de inoculados los explantes.	42
CUADRO 9. Número de hojas por planta de izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 60 días de inoculado el explante.	44
CUADRO 10. Número de raíces por planta de izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 60 días de inoculado el explante.	45
CUADRO 11. Concentración de los componentes del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (1962)	53

III. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Proceso de fecundación de una angiosperma	11
FIGURA 2.	Desarrollo del embrión de dicotiledónea	12
FIGURA 3.	Embrión inmaduro de izote pony	35
FIGURA 4.	Embrión germinado de izote pony	35
FIGURA 5.	Respuesta de los embriones de Izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 5 días de inoculados los explantes en el medio basal MS, con diferentes combinaciones de BAP y GA ₃ .	37
FIGURA 6.	Respuesta de los embriones de Izote pony (<i>Beaucarnea recurvata</i>), a los 10 días de inoculados los explantes en el medio basal MS, con diferentes combinaciones de BAP y GA ₃ .	38
FIGURA 7.	Embrión de izote pony presentando quemaduras en los extremos	39
FIGURA 8.	Comportamiento de los embriones germinados de izote pony, a los 60 días de inoculados los explantes, en el medio basal MS, con diferentes combinaciones de BAP y GA ₃ .	40
FIGURA 9.	Planta de izote pony, con crecimiento normal	41
FIGURA 10.	Planta de izote pony en forma de roseta	41
FIGURA 11.	Planta de izote pony que formo roseta	43
FIGURA 12.	Planta de izote, mostrando un crecimiento limitado de la raíz	46

PRODUCCION DE PLANTULAS *IN VITRO* DE IZOTE PONY (*Beaucarnea recurvata* Rose)
UTILIZANDO EMBRYONES INMADUROS COMO EXPLANTE

IZOTE PONY (*Beaucarnea recurvata* Rose) *IN VITRO* PLANT PRODUCCIÓN USING
IMMATURE EMBRYOS AS EXPLANTE

RESUMEN

El izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), es una planta de uso ornamental, lo exótico de su apariencia se obtiene del contraste de sus hojas y tallo.

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

Para el presente trabajo se utilizó semilla proveniente del campo por esto fue necesario establecer un proceso de desinfección, en la que se utilizó una solución desinfectante, la cual contenía cobre pentahidratado a 1500 mg/L, benomyl a 1000 mg/L, cloranfenicol + amoxiciclina a 500 mg/L y ácido cítrico + ácido ascórbico a 800 mg/L. En esta solución desinfectante se colocó la semilla durante un periodo de 24 horas, luego se trasladó la solución desinfectante con la semilla de izote pony a la campana de flujo laminar, donde se realizaron tres lavados con agua estéril, para eliminar residuos de la solución desinfectante, se sumergió la semilla en una solución de alcohol al 70% durante un tiempo de 3 minutos. Se realizaron nuevamente tres lavados con agua estéril para quitar el exceso de alcohol, para luego colocar la semilla en una solución de cloro al 3% durante un tiempo de 5 minutos, se realizaron nuevamente tres lavados con agua estéril, para quitar residuos de cloro.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberelico (GA_3) en la germinación de embriones inmaduros de izote pony, utilizando el medio de inducción MS (Murashige & Skoog). Los niveles utilizados fueron para el BAP 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/L y para el GA_3 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/L.

Al final del experimento y con base a los datos y resultados obtenidos, se pudo determinar que con la aplicación de reguladores de crecimiento, existió respuesta por parte de los embriones, en la mayoría de unidades experimentales utilizadas, no así en las unidades experimentales donde no se utilizó regulador de crecimiento.

El tratamiento que presentó mayor número de embriones germinados en los primeros 10 días de inoculado el explante fue el número 5 (1.5 mg/L + 0.1 mg/L), con un 70% de germinación, esto demuestra que al extraer el embrión de la semilla y colocarla en un medio nutritivo con las diferentes dosis de reguladores de GA₃ y BAP, aumenta el porcentaje de germinación, ya que en condiciones normales la semilla presenta un 50% de germinación.

1. INTRODUCCIÓN

El Izote Pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), está constituido como un producto no tradicional de exportación, dentro de las plantas ornamentales, y específicamente en el área de follajes, lo que lo hace importante por la demanda que existe en los mercados internacionales como Holanda, Italia, Alemania, Estados Unidos, Dinamarca, España. En Guatemala, según la revista National Directory of Exporters (23), existen cinco fincas que producen, preparan y exportan Izote Pony en sus diferentes formas y tamaños.

La planta de Izote Pony, es utilizada en la jardinería de interiores y exteriores, de uso estrictamente ornamental, lo exótico de su apariencia se obtiene del contraste de sus hojas y tallo. En Guatemala el Izote Pony se encuentran distribuidos en forma natural en los departamentos de el Peten, Alta y Baja Verapaz, Huehuetenango, Jalapa y Chiquimula (2).

Para su producción se requiere tomar en cuenta rígidas normas de calidad y sanidad, para que las plantas a exportarse se encuentren libres de plagas y enfermedades y que sean plantas vigorosas.

El izote pony, es un recurso fitogenético de gran valor económico en nuestro país, es una especie endémica en peligro de extinción, debido a la extracción de semilla desmedida, así como de plantas, por parte de pobladores.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual consistió, en la germinación de embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), y la obtención de plantas, utilizando como medio de inducción el medio Murashige y Skoog (MS), con diferentes combinaciones de ácido bencil amino purina (BAP) y ácido giberelico (GA_3), logrando obtener un 70% de germinación de los embriones.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

Por la importancia económica del cultivo de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), que contribuye al ingreso de divisas, pues ha cobrado gran importancia por la demanda y el precio que tiene a nivel internacional, según datos del CONAP, para el año 2000, se exportaron a países europeos una cantidad de 1210719 unidades, provocando un ingreso de divisas en dólares de 2450547.

El porcentaje de germinación de las semillas de izote pony, según los productores esta entre el 40% y 50%, la viabilidad oscila entre los 30 a 40 días, por lo que no se puede almacenar más de un mes sin ponerla a germinar, lo cuál hace que la reproducción por medio de semilla, através de semillero a campo abierto sea muy difícil y requiera por parte del productor gran cantidad de semilla, debido al bajo porcentaje de germinación que presenta, lo que provoca que la semilla tenga gran demanda y además su costo sea elevado, llegando a un precio de Q. 400.00 por libra, por lo que se busca un método de propagación que asegure un porcentaje elevado de germinación y además lograr obtener plantas en un tiempo más corto, que las obtenidas por el método tradicional.

En la propagación vegetativa del izote pony es necesario explorar nuevos métodos de propagación masivos y eficientes, que mejoren en forma sustancial la tasa de multiplicación, aportando una mayor cantidad de plantas sanas en un menor tiempo, espacio y homogeneidad. Uno de estos métodos es la propagación por cultivo de tejidos *in vitro*, esta técnica consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente através de un medio nutritivo las condiciones físicas y químicas apropiadas, para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido.

Por el bajo porcentaje de germinación, el poco tiempo de viabilidad que presenta la semilla de izote pony y por todas las normas de control que se requieren para la exportación del izote pony, se plantea la necesidad de utilizar nuevos métodos modernos y efectivos respecto a la propagación de dicho cultivo, por lo que la micropropagación puede ser una alternativa para la reproducción de izote pony, en la que se pueda obtener una mayor cantidad de plantas sanas y se pueda disminuir el tiempo de producción.

3. MARCO TEORICO

3.1. MARCO CONCEPTUAL

3.1.1. Generalidades del cultivo

El pony tail (*Beaucarnea recurvata* Rose), en la época gloriosa de la civilización maya, los sacerdotes y los principales, lo sembraban alrededor de sus casas, templos y palacios, con la convicción que limpiaba y protegía de malas influencias y espíritus (1).

Dentro de la casa de habitación ayuda a absorber ruidos e impurezas del ambiente con mucha eficiencia y rapidez, aportando oxígeno y eliminando partículas de carbono disueltas en el aire que caracteriza a las ciudades modernas (1).

Esta familia se restringe a las áreas secas del sur de los Estados Unidos de Norte América, México, Guatemala, y en menor escala Belice y Honduras (1).

Son plantas estrictamente de uso ornamental, lo exótico de su apariencia se obtiene del contraste de sus hojas rizadas en la punta de sus tallos, hojas de base dilatadas hasta ir en disminución a las puntas de los tallos leñosos y rústicos al madurar y con forma de cebolla en las raíces (1).

Se conocen plantaciones comerciales desde el nivel del mar en la Costa Sur hasta alturas como en los Cuchumatanes. Lo determinante para que el cultivo se desarrolle de una manera adecuada, es que el suelo donde se realizan las plantaciones sean suelos bien drenados que en ninguna época del año guarden mucha humedad (1).

- a. Zonas de producción. Toda la republica, aunque en general las producidas en tierras templadas y secas son de mejor calidad.
- b. Época de producción. Todo el año, pero el trasplante de los semilleros a campo abierto se dificulta, debido a que se necesita riego los primeros meses, lo que se limita a áreas que puedan tener riego o únicamente a la época de invierno.
- c. Post cosecha. Alcanzando el tamaño de la planta que el mercado demande, la planta se arranca del campo y se le cortan las hojas laterales, dejándole solo la candela, para que no se deshidrate en el trayecto del campo hacia la procesadora (1).

3.1.2. Género *Beaucarnea*

Este género comprende 6 especies nativas de zonas cálidas y secas de México. La especie más cultivada como ornamental es *Beaucarnea recurvata*, a veces incluida en el género *Nolina* (24).

Estas plantas son utilizadas a menudo en jardinería de exteriores de zonas cálidas, llegando a formar árboles de gran porte y con la característica base ensanchada (24).

Las plantas de muy lento crecimiento, pueden emplearse como plantas de mesa, recordando en cierto modo a los bonsái, o como grandes ejemplares, que necesariamente son costosos por el tiempo requerido para la producción. Sus hojas son cortantes y prestan distinto aspecto según se cultivan al aire libre o bajo protección (14).

El género *Beaucarnea* se distribuye desde México hasta Centro América. De sus diez especies, nueve se encuentran en México y siete son endémicas. Por su valor ornamental, se sobre recolectan las plantas silvestres de *Beaucarnea* y se extraen ilegalmente del país. Este problema es crítico por la grave reducción de poblaciones naturales, su lento crecimiento e intensa extracción de semillas, exponiendo a la especie a un estado de amenaza o posible extinción. En publicaciones oficiales se citaban ocho especies de *Beaucarnea* como amenazadas, pero no se contaba con información para respaldar esto, por lo que se propuso evaluar las poblaciones de cada especie con fines de conservación y manejo. Se detectaron las poblaciones de cada especie de acuerdo a la literatura, revisión de herbarios y mapas; se seleccionaron al menos dos poblaciones conservadas por especie y se muestrearon en transectos de 10 X 100 m para analizar su demografía (densidad, estructura) y biología floral. Como resultado se observó que las poblaciones con menor densidad, estructuras poblacionales con menor número de plantas pequeñas, con lento crecimiento y problemas en su reproducción, son las de *Beaucarnea purpusii*, por lo que debe considerarse como en peligro de extinción. El resto de las especies presentan problemas combinados quedando *Beaucarnea hiriartiae*, *Beaucarnea inermis*, *Beaucarnea recurvata* y *Beaucarnea sanctomariana* como seriamente amenazadas, mientras que *Beaucarnea goldmanii*, *Beaucarnea gracilis*, *Beaucarnea pliabilis* y *Beaucarnea stricta* como amenazadas. La información generada sirve como base para programas de conservación y manejo de estas especies (24).

3.1.3. Reproducción

El mecanismo más usual es la reproducción por semilla. Esta tarda unas 5 a 6 semanas en germinar, y a veces una ligera escarificación con ácido sulfúrico ayuda a mejorar el rendimiento. También debe regarse cada diez o quince días con una solución fungicida (14).

3.1.4. Técnicas de cultivo

Con esta planta pueden practicarse dos sistemas de producción: el cultivo en tierra, al aire libre en zonas donde las temperaturas mínimas no descienda de 10°C, o el cultivo en maceta o contenedor bajo protección (14).

Las plantas de los semilleros para poderlas trasladar al campo definitivo, se necesita que tenga cabeza o bulbo. Tanto en semilleros como en plantaciones definitivas, la planta responde al rápido crecimiento a la sombra (1).

En el primero de los casos, el cultivo es muy simple, colocando las plantas a una distancia de unos 30-40 cm entre sí, regando y abonando de acuerdo con las necesidades. Se suele aplicar, en el periodo de más crecimiento, unos 10 gr/mts² de un abono con un equilibrio 1: 0.5: 1. de N: P₂O₅: K₂O,

respectivamente. Cuando las plantas alcanzan el tamaño idóneo para trasplantar, se pasan a invernadero, procurando no regar excesivamente y aplicando antitranspirantes. Para aclimatar la planta habrá que reducir luz paulatinamente hasta llegar a 20.000-30.000 lux o menos (14).

3.1.5. Plagas y enfermedades

Se han citado podredumbres de raíz, causado por *Phthium* y por *Fusarium*, además de un hongo foliar *Phyllosticta* (14).

Las enfermedades reportadas por Elías Hernández (10), para el género *Beaucarnea* son las siguientes: *Aspergillus* sp, (pudrición del tallo), *Fusarium* sp, *Pestalotia* sp, *Rizoctonia* sp, (10).

Si la zona de producción es excesivamente húmeda y calurosa, la bacteria *Erwinia* puede atacar los tallos y las hojas (14).

Entre las plagas destacan los ataques de cochinillas, escamas y ácaros (14).

3.1.6. Distribución geográfica en Guatemala

Se conocen cerca de 9 especies de plantas pertenecientes al género *Beaucarnea*, distribuidos tanto en Guatemala como en México. Se reportan para Guatemala tres especies: *Beaucarnea ameliae*, *Beaucarnea lundell*, *Beaucarnea guatemalensis* Rose., y *Beaucarnea petenensis* Lundell, aunque existen dudas en cuanto a que *Beaucarnea ameliae* sea distinta a *Beaucarnea petenensis* (17).

Todo los miembros de este género son endémicos y se encuentran distribuidos en forma natural en los departamentos de: El Petén, Alta y Baja Verapaz, Huehuetenango, Jalapa y Chiquimula (17).

Los nombres mayas reportados para esta especie en Yucatán, México fueron: tsipil y chit y en Huehuetenango como chicú, aunque también se le conoce como: corcho, izote, izote real, izote de montaña (17), planta pie de elefante, pony tail (7).

3.1.7. Importancia económica

El izote pony ha tenido un gran impacto, entre lo que se ha denominado follajes para interiores, esto ha incidido en forma directa en los volúmenes de este producto que han sido exportados, siendo los países que importan las mayores cantidades: Holanda, Italia, Alemania, Japón, Korea, España, Estados Unidos, Taiwán (9) y (1).

3.1.8. Variedades comerciales

Por el grosor de su tallo, el color y la textura de sus hojas y su forma de sus hojas principalmente, se ha logrado diferenciar 7 a 8 plantas distintas. Un embarque comercial actualmente lleva mezclados todas las diferentes variedades. Sin embargo, las variedades “Punk” o que tienen sus hojas paradas muy similares al izote, se aceptan un 10% máximo dentro de un embarque. Hay dos variedades tipo “Punk”,

las provenientes del norte de Alta Verapaz y una de las de Petén. No es recomendable, por lo tanto, hacer plantaciones 100% de este tipo ya que se tendrán problemas de comercialización (1).

3.1.9. Plantas por hectárea

En los sistemas tradicionales una hectárea de pony puede tener 15,000 a 20,000 planta, sin embargo tendencias más progresistas han colocado hasta 30,000 plantas por hectárea (1).

3.1.10. Forma de preparación y tipo de planta para exportación

Esta planta se comercializa por pulgada de bulbo. Una plantación de 2 años de campo definitivo, puede tener un promedio de hasta 3 pulgadas de diámetro de bulbo (1).

En la procesadora, se lava y recortan las raíces viejas, para poder colocarle hormona de enraizamiento (ácido indolbutírico), se le coloca un medio neutral como lo es el pitmost, y se sujeta con un lienzo de plástico (1).

Al establecer raíces nuevas, se le corta el follaje a la medida del tallo demandado por el cliente, todo este proceso puede variar desde 2 hasta 4 meses, dependiendo del clima, el origen y manejo de las plantas, pero principalmente de la calidad del proceso (1).

La planta lista para exportación debe de estar bien enraizada. Puede llevar inicios de brotación (“pumps” o hinchamiento) o brotes pequeños, dependiendo del medio de transporte, del tipo de planta o de los requerimientos del cliente (2).

Según el número de tallos y el tamaño del bulbo, el pony se divide en los siguientes tipos comerciales: (2).

- a. De tallo único o liso. Con bulbos de tamaño variado, siendo los más comunes de 2 pulgadas a 8 pulgadas. En presentación de: Liso común o regular, con una proporción diámetro bulbo/altura de tallo de 1:3. Liso long neck, que tiene una proporción de 1:5 y liso de maceta (2).
- b. De tallo múltiples, también llamados rameado pequeños y medianos, con bulbos de 2 pulgadas a 8 pulgadas y alturas de 6 pulgadas a 15 pulgadas, del tipo: Bonsáii, de tallos múltiples, también llamados de rameados grandes, con bulbos de 7 pulgadas en adelante y alturas desde 36 pulgadas hasta 10 pulgadas, dependiendo de el número de ramas, grosor, disposición y largo (2).

3.1.11. Empaque y transporte

El izote pony se empaqueta en estructuras de madera llamadas jivas o crates, el que implica todo un procedimiento, por la delicadeza y cuidado que se deben tener con los brotes nuevos. El 99% de estos se transporta vía marítima, cuando en raras ocasiones el cliente demanda producto de 2 a 3 pulgadas y enraizadas e inicio de brotes, estos se pueden empacar en cajas tipo banana y enviarse vía aérea (1).

3.1.12. Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos, como técnica consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (6).

Para establecer los cultivos se utilizan pequeños segmentos de tejidos empleándose generalmente medios semisólidos o líquidos. A partir de los segmentos inoculados es posible inducir con cierta facilidad la formación de callos. Por otro lado manipulando los componentes del medio el tejido puede formar órganos de *novo* (raíces, brotes, o embriones). La respuesta observada durante el cultivo depende de la fuente de tejido (tipo de tejido, posición de la planta, especie, etc.) y de las condiciones de cultivo (composición del medio sintético y factores físicos) (26).

La parte de la planta de la cual se obtienen los explantes va a depender de:

- a. El tipo de cultivo que se va iniciar
- b. El propósito del cultivo y
- c. La especie vegetal que se utilice (8).

Por otra parte la investigación en cultivo de tejidos puede cubrir un rango amplio de actividades, por ejemplo desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para utilizar esta investigación en la propagación clonal o en el mejoramiento genético de las plantas (15).

En cultivo de tejidos es posible distinguir los siguientes tipos de cultivos asépticos de origen vegetal.

- a. Cultivos de plántulas obtenidas a partir de semillas.
- b. Cultivo de embriones a partir de embriones maduros e inmaduros.
- c. Cultivo de órganos a partir de órganos aislados (incluye cultivos derivados de ápices de raíz, ápices de tallo, primordios foliares o partes inmaduros de la flor.
- d. Cultivo de tejidos en epidermis y cambium.
- e. Cultivo de protoplasmas a partir de células separadas de su pared (6).

3.1.13. Método de micropropagación

Una de las aplicaciones mayores del cultivo *in vitro* es la micropropagación en grandes escalas de las plantas especialmente de uso agrícola. Se describen a continuación algunos métodos (8).

- a. Por multiplicación de tallos a partir de yemas terminales y axilares; permite en general obtener plantas genéticamente idénticas. Para ello existen los siguientes procedimientos.
 - Cultivo de meristemos o de ápices de tallo.
 - Cultivo de nudos con una yema axilar.

- b. Por organogenesis directa; tallos y raíces son regeneradas directamente del tejido en cultivo, sin pasar por la formación de callo.
 - iniciación directa de tallos
 - embriogenesis somática directa
- c. Por la formación de órganos de almacenamiento
- d. Por microinjerto (8).

3.1.14. Cultivo de embriones *in vitro*

El embrión de la semilla puede ser aislado y puesto a germinar en un medio que permita su desarrollo para formar una planta. Este proceso es útil ya que permite la rápida producción de plántulas provenientes de semillas de baja viabilidad o con problemas de incompatibilidad (25).

El cultivo de embriones maduros de café ha permitido obtener un gran número de plantas, de algunos materiales valiosos, a partir de unas pocas semillas. Una vez que estos han germinado, y se tienen una planta de tamaño adecuado, se inicia la fase de multiplicación por la técnica de microestacas (25).

Lhotová, M. 1990. Mencionado por Ramos (22) dice que el cultivo de embriones también es útil para inducir la pronta germinación de semillas maduras en letargos y acortar con ello el ciclo de vida.

3.1.15. Técnica del cultivo de embriones *in vitro*

Un cultivo de embriones se prepara mediante la remoción aséptica del embrión de la semilla, y su colocación en un medio de cultivo esterilizado para que desarrolle. Debido a que las exigencias nutritivas de un embrión en desarrollo se vuelven menos complejas a medida que se aproxima a su madurez, el medio de cultivo a utilizar dependerá del estado de desarrollo del embrión. Por lo común para el cultivo de embriones el mejor resultado se obtiene con un medio de agar. Para preparar un cultivo se esteriliza la superficie del fruto con un desinfectante como ácido fénico (al 5% durante 5 minutos), alcohol, hipoclorito de calcio o de sodio o meramente se le da un lavado prolijo. Se abre el fruto cortándose si es suave y rompiéndose con un torniquete si es duro. Se extrae la semilla (óvulo) con unos fórceps estériles y se coloca en una caja petri esterilizada. Se remueven las cubiertas de la semilla o se corta y se abre el óvulo para extraer el embrión (11 y 27).

Torrey en (1973) describió algunos de los métodos empleados en la excisión y cultivo de embriones de plantas vasculares. Encontró que los embriones están alojados en un ambiente aséptico, por lo que no es necesaria una desinfección superficial. En la práctica, el óvulo entero, las semillas o las cápsulas que contienen a los óvulos, son desinfectados superficialmente y el embrión es removido del tejido. En el caso de semillas con cubierta dura. El procedimiento de aislamiento comienza remojándolas en agua durante algunas horas, luego es separado el embrión (26).

3.1.16. Trabajos realizados con embriones cigóticos, utilizando la técnica de propagación *in vitro*

Mendoza (19), utilizando embriones cigóticos de zarzaparrilla, aplicando la técnica de micropropagación. El trabajo consistió en la respuesta de la germinación de los embriones.

El medio de cultivo utilizado para dicho trabajo fue el de Murashige y skoog (1962), por considerarse él más apropiado y además por ser el más utilizado en diversos estudios, completando con reguladores de crecimiento: ácido naftalanacético (ANA) también se le aplicó bencilaminopurina (BAP) como promotor de la germinación, para evaluar la respuesta. El resultado de esta investigación lo constituye el bajo porcentaje de germinación de los embriones, bajo las condiciones de este experimento, los tratamientos sobresalientes con dos repeticiones con respuesta de diez que se realizaron por cada tratamiento: 0.1 BAP / 0.50 ANA, Y 1.5 BAP/ 0.50 ANA, los niveles de reguladores de crecimiento utilizados para dicho trabajo fueron los siguientes, para el BAP 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, para ANA 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 respectivamente (19).

3.1.17. Propagación *in vitro* del Izote pony (*Beaucarnea Recurvata* Rose), a partir de semilla

Alvarado (3), Trabajo en izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), teniendo como objetivo la propagación *in vitro* del izote pony, utilizando tejido de semilla botánica como explante. El trabajo consistió en dos etapas: a) germinación de semilla e inducción de brotes b) inducción de raíces, utilizando como medio nutritivo Murashige y Skoog y utilizando tres concentraciones diferentes de BAP (bencilaminopurina) y GA₃ (ácido giberelico) (3).

Los tratamientos 0.15/0.25, 0.1/0.25, 0.1/0.75 y 0.05/0.25 de GA₃/BAP, fue el que proporcionó el mayor número de semillas germinadas, con un 47%, los otros tratamientos donde se utilizaron 0.15 de GA₃ y 0.75 de BAP, germinó un 26.68 % y con un 14.66 % de germinación donde se utilizó 0.15 y 0.5 de GA₃ y BAP. Las combinaciones que lograron los mejores porcentajes de germinación de semillas de izote pony fueron 0.15 y 0.25 de BAP, y los mejores resultados obtenidos en la producción de raíces fue en la dosis de 0.5 de BAP y 0.062 de ANA respectivamente (3).

Samyn (23) en 1993, trabajando con semillas de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rosa), a través de la propagación *in vitro* logro brotes, utilizando 0.5 mg/l de bencilaminopurina (BAP).

3.1.18. Requerimientos para el cultivo de embriones a partir de semillas

El primer cultivo de embriones fue obtenido a partir de embriones inmaduros extirpados de semillas (Hanning, 1904), y no de embriones inmaduros aislados de óvulos. La razón para que esto ocurriera es explicable, ya que, con pocas excepciones, el embrión que se encuentra en la semilla está totalmente desarrollado en una estructura bipolar, lo cual contiene un meristemo en cada polo, y además los cotiledones. Por consiguiente, al momento de cultivar el embrión, éste contiene células que potencialmente están preparadas para efectuar la división, alargamiento y diferenciación permitiendo el desarrollo progresivo de la raíz y los brotes axilares de la plántula. De esta manera, los requerimientos nutricionales para este tipo de embriones son mínimos. Así, el tamaño relativamente grande de estos embriones, y la facilidad con que pueden aislarse han contribuido en gran parte a utilizarlos en los primeros estudios desarrollados en este campo (26).

Dentro de los componentes nutritivos, la fuente de nitrógeno, carbohidratos, vitaminas y reguladores del crecimiento han sido de vital importancia para el desarrollo de embriones *in vitro* (26).

3.1.19. El embrión cigótico en los vegetales

Las partes masculinas de la flor subsecuentemente se desarrollan para formar flores completas. El ciclo sexual completo comprende el desarrollo de las estructuras masculina (polen) y femenina (saco embrionario) de la flor. En esta parte del ciclo se efectúa la división reduccional de los cromosomas para producir el número haploide (N) del mismo. Ver fig. 1.

Los gametos masculino y femenino (N) están contenidos respectivamente en los granos de polen y en el saco embrionario de ocho núcleos. Durante la floración, el polen se transfiere de la antera al estigma (polinización), en donde germina. Un tubo polínico crece en el sitio hacia abajo hasta que llega al saco embrionario que ésta dentro del óvulo. En el saco embrionario son descargados dos gametos masculinos, uno que se unirá con el gameto femenino (fecundación) para producir el cigoto y otro que se unirá con los dos núcleos polares para producir el endospermo. Ver fig. 1.

El cigoto es diploide ($2N$) y se divide para convertirse en el embrión; el endospermo es triploide ($3N$) y se desarrolla para formar un tejido nutriente para el embrión en desarrollo. Ambas estructuras están encerradas dentro de la nucela (en el interior del óvulo), que inicialmente funciona como un tejido nodriza para el embrión y el endospermo en desarrollo. Ver fig. 1.

En el ciclo normal de una plántula la embriogénesis (el embrión), prosigue del desarrollo de una célula totípote o cigoto unicelular, lo cuál resulta de la unión de óvulo y un grano de polen, hacia la iniciación y desarrollo de un embrión. En las angiospermas, el ovario está contenido en las flores. En su interior hay gránulos en número variables llamados primordios seminales que encierran un saco embrionario. Cuando el tubo polínico ha penetrado hasta el micrópilo de los núcleos espermáticos o espermatozoides que lleva, fecunda al óvulo, mientras que el otro se fusiona con el núcleo secundario, proporcionando así una doble fecundación. Ver fig. 1.

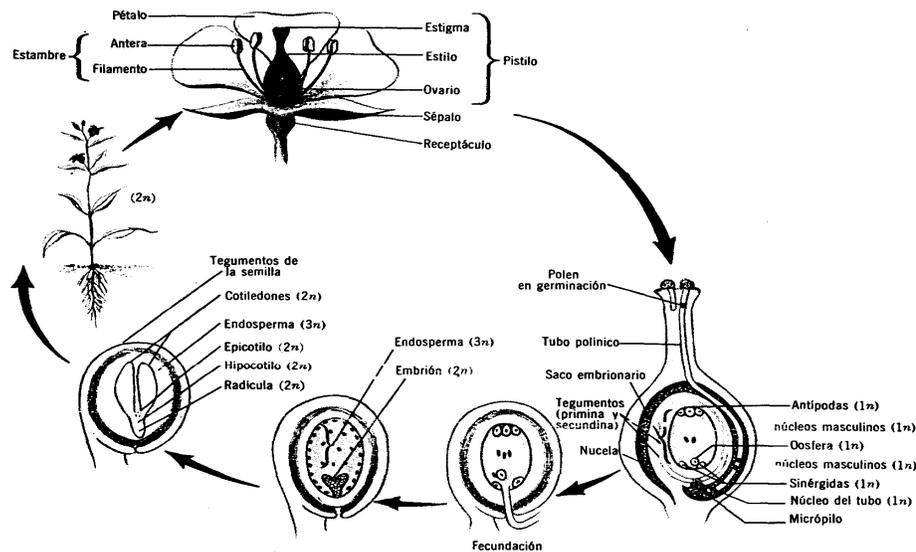


Fig. 1. Representación gráfica del proceso de fecundación de una angiosperma (5).

El óvulo fecundado origina el embrión, mientras que la otra fecundación da lugar a un tejido nutricional llamado endosperma. El primordio seminal se transforma en semilla. El embrión, en un principio, es un cuerpo redondeado y pluricelular, más tarde se diferencia en una radícula (parte que mira al micropilo), cotiledones y el punto vegetativo, quedando en estado de vida latente. El embrión normal es un eje polarizado con un meristemo apical y uno radical. Los cotiledones tienen una morfología y estructura particular sirviendo de órgano de reserva. El desarrollo del embrión sigue una secuencia bien definida: estado globular, estado corazón, estado torpedo, etc. (5).

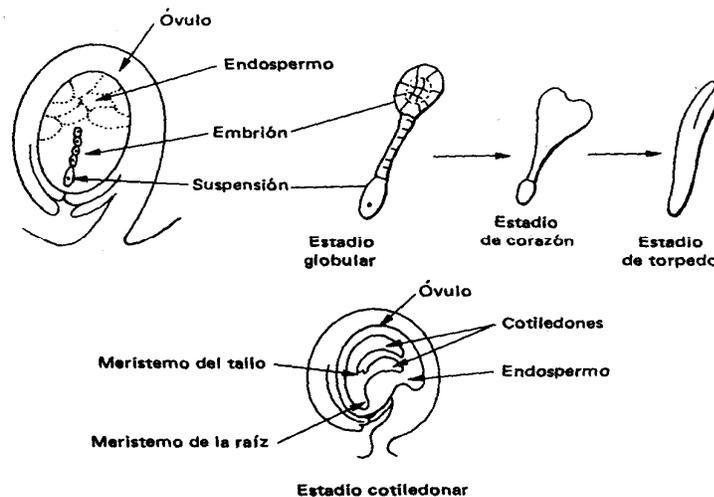


Fig. 2. Estadios en el desarrollo del embrión de dicotiledónea (20).

3.1.20. Semilla

Bidwell menciona que la semilla es el sitio de parcial desarrollo del nuevo esporofilo (embrión) y el lazo de unión entre generaciones sucesivas. Es además, la estructura que permite supervivencia y dispersión en diferentes condiciones ambientales; así como una subsiguiente germinación exitosa. Hay una inmensa diversidad en la estructura externa e interna de la semilla, que se relaciona en gran parte con diferentes estrategias de dispersión y germinación. Estas variaciones incluyen el tamaño y posición del endospermo y el embrión, estructura, textura y color de la cubierta seminal, forma y dimensiones de la semilla. En el desarrollo de la semilla pueden identificarse tres fases, desde un punto de vista funcional. Al inicio hay una serie de divisiones celulares que dan origen a los tejidos vegetativos en la cubierta seminal y el embrión. Sin embargo en vez de continuar hacia la formación de la plántula los cambios ontogenéticos se orientan hacia una nueva fase que tiene como objetivo garantizar el éxito de la descendencia como unidad independiente, en esta etapa se acumulan sustancias de reserva. La tercera fase se caracteriza por una drástica reducción de la actividad metabólica, acompañada de la desecación de la semilla. Durante la dispersión y antes de la germinación, el metabolismo debe permanecer inactivo; la inactividad es desencadenada por el bajo contenido de agua, la impermeabilidad de la cubierta seminal y la posible presencia de inhibidores (5).

3.1.21. Germinación

La semilla es una estructura en reposo, que por lo general está deshidratada ya que puede tener entre 5 a 20% de humedad en relación a su peso corporal, está compuesta principalmente de tejido de reserva y rodeada por una cubierta esencialmente impermeable. Los procesos metabólicos están suspendidos o tienen lugar muy lentamente; la semilla está en una condición de vida interrumpida, debido principalmente a su carencia de agua y oxígeno (5).

El proceso de germinación consiste en la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento. La semilla contiene un embrión; uno de cuyo extremos, la radícula, formará la raíz de la planta; el otro extremo, la plúmula, formará el tallo y las hojas (5).

3.1.22. Embrión

El huevo fertilizado o cigoto representa el inicio del embrión en las espermatofitas. El cigoto es un sistema unicelular que a través de una secuencia programada de eventos, da origen a un embrión multicelular con órganos diferenciados, que contiene en sí mismo las potencialidades de una planta adulta. En las angiospermas, el embrión se localiza en el extremo micropilar del saco embrionario, con su extremo basal unido a la pared del saco y su porción apical proyecta hacia la célula central (20).

3.1.23. Diferenciación del embrión

El crecimiento tridimensional del embrión se inicia cuando las paredes verticales se depositan en la célula terminal del proembrión. Luego, mediante divisiones en varios planos, alcanza una forma globular. La diferencia se inicia, en el proembrión globular, con el establecimiento de los loci cotiledonar y epicotiledonar en el polo del vástago; también se distinguen la región hipocotiledonar y el polo radical en la hipófisis. La región hipocotiledonar contribuye a la formación de crecimiento diferencial del embrión conduce al establecimiento de los meristemas y a una acentuación de las diferencias entre vástago y raíz (20).

3.1.24. Desarrollo de embriones inmaduros

Schilde y Schimiediche mencionado por Ramos (22), describe que la antesis del grano empieza a formarse pasando a través de 3 estados, denominados estado de leche, estado blando y estado duro. Aproximadamente nueve días después de la antesis, en el último estado de leche, el embrión es viable al ojo como un disco amarillo pálido de 1-2 mm en diámetro del endospermo. De este estado al estado de madurez el embrión puede ser extraído para iniciación de callo. En general explantes jóvenes pueden soportar más transferencias, dentro de la inducción de callo sin perder la capacidad de totipotencia en relación a los explantes viejos (22).

3.1.25. Organogenesis

Es la integración y coordinación del crecimiento y los eventos de diferenciación que ocurren a nivel celular, y es el proceso que toma en cuenta el origen de caracteres morfológicos y la forma tosca. La

embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas que se desarrollan sobre las zonas de corte del explante (embriogénesis directa) o mediante la formación y regeneración de callo (embriogénesis indirecta) (5) (26).

3.1.26. Medios de cultivos

Para que se pueda dar un cultivo *in vitro*, las células allí establecidas para crecer requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados en plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y uno micro (16).

Existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento a menudo la necesidad de los factores orgánicos de crecimientos se hace evidente solo cuando se considera un crecimiento largo y continuado o potencialmente definido (16).

Los medios de cultivo, empleados para los tejidos aislados de plantas, tienen diversas composiciones y se emplean como líquidos o geles. Los constituyentes básicos que incluyen todos los elementos minerales esenciales para el desarrollo de la planta; azúcar, usualmente sacarosa o algunas veces glucosa, una o más vitaminas del grupo B; tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, inositol y agua por lo menos destilada (18).

El desarrollo de los cultivos lo determinan el suplemento de hormonas, particularmente auxinas y citocininas. El agente tradicionalmente utilizado para la preparación de los medios sólidos (gel) el agar (18).

Conger, citado por Cabrera (6) menciona que un número grande de sistemas utilizan el medio Murashige Skoog y es particularmente notable desde que el medio se publico en 1962. es convenido generalmente que el desarrollo del medio Murashige Skoog constituyo uno de los descubrimientos más importantes en el cultivo de tejidos.

Los medios de cultivo están normalmente constituidos por los siguientes componentes

- a. Macronutrientes (siempre agregados)
- b. Micronutrientes (siempre agregados)
- c. Vitaminas (generalmente incorporados aunque su número varia)
- d. Aminoácidos y otra fuente de nitrógeno
- e. Azucars (fuente de carbohidratos)
- f. Fuentes de hierro
- g. Compuestos de origen indefinido (agua de coco, jugos de frutas) (8).

3.1.27. Macronutrientes

Los medios actuales en relación con los primeros propuestos aportan varias mejoras, como lo es el aumento de las concentraciones de KNO_3 en el medio, introducción de N en la forma NH (amonio). Estas mejoras permiten un mejor crecimiento de callos pero también la formación de órganos (8).

Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento (16).

A. Nitrógeno

Mientras que la planta esta en crecimiento activo, necesita de gran cantidad de nitrógeno. Este se encuentra en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 (15).

Sin embargo la adición en los medios se hace en forma de nitrato de amonio (NH_4NO_3) y esto debido a efectos prácticos de control del pH (16).

Existen varias influencias del nitrógeno, en concentraciones altas promueve el enraizamiento, mientras que en bajas promueve el desarrollo de callo (16).

B. Fósforo

El fósforo es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas, principalmente es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía. Dentro de los medios de cultivo las plantas lo absorben en forma de PO_4 (16).

C. Potasio

Existe relación entre el potasio iónico y la diferenciación de órganos (16).

D. Calcio

El calcio es componente de la pared celular (16).

3.1.28. Micronutrientes.

A. Hierro

Para los vegetales, el hierro es importante particularmente ya que es un componente de la clorofila. Normalmente se da en forma de quelatos (Fe-EDTA) en los medios de cultivo, en otra forma se precipitaría (16).

Inicialmente fue suministrada bajo la forma de sulfato férrico o de nitrato férrico, pero existía el problema de precipitación a pH ácidos (8).

B. Magnesio

El magnesio es un componente importante de la molécula de clorofila (11) los otros microelementos son el Zn, B, Cu, Mo, y el Mn, son indispensables en el desarrollo de las plantas en micropropagación (8).

3.1.29. Vitaminas

De todas las empleadas sólo las vitaminas del complejo B (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina (HCl)) son necesarias y de estas sólo la tiamina es indispensable en el medio (8).

Tienen un papel muy importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Solamente la tiamina es considerada como esencial, mientras otras como el ácido nicotínico y piridoxina son agregados para estimular procesos específicos (12).

3.1.30. Fuentes de carbono

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. Las sacarosa (2% a 5%) es la fuente de carbono que más se utiliza y se puede remplazar por glucosa y en menor medida fructosa, en general la maltosa y la galactosa son menos efectivas. Así también la incorporación del mioinositol al medio (100 mg/l) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares (6).

3.1.31. pH del medio

Closal y Cueva citado por Cabrera (6) mencionan que cuando se prepara un medio de cultivo después de añadir todos sus componentes se procede a ajustar el pH final al valor deseado añadiendo OHNa 0.1 N ó HCl 0.1 N al medio. Una vez ajustado el pH se procede a esterilizar el medio.

El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones.

- a. Valores bajos inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos.
- b. Si la evolución del pH de medio lo hace bajar por debajo de 3.5 se puede producir su licuación.
- c. El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo.
- d. El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante (por ejemplo la absorción de iones NO_3 aumenta con la acidez del medio).
- e. El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas.

Por todas estas razones conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general no obstante en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8 (6).

3.1.32. Asepsia

La asepsia es fundamental para el cultivo de tejidos vegetales. Todos los microorganismos asociados superficialmente, no infecciosos, pueden utilizarse con los métodos y reactivos corrientes de desinfección para la eliminación de virus, viroides, micoplasmas, hongos y bacterias internos y otros agentes infecciosos. Hay disponibles procedimientos especiales para desinfección de explantes, o partes de plantas que son separadas y puestas en cultivo se obtiene fácilmente tratando los órganos o

secciones donantes con soluciones de hipocloritos (blanqueadores basándose en sodio de calcio). Las preparaciones antisépticas comerciales, son menos efectivas con la exposición del peróxido de hidrógeno y los alcoholes. Los medios de cultivos se introducen y se autoclavean por cinco minutos para esterilizarlos, a una presión de 1.05 kilogramos por centímetro cuadrado. Para prevenir reinfecciones, la subdivisión de tejidos y la transferencia de tejidos, desde y hacia los medios de cultivos se realizarán en cámaras protegidas, comúnmente en una campana de flujo laminar. Los recipientes de cultivo tienen cierre para excluir el polvo, las esporas de hongos y otros contaminantes aéreos. Los cultivos son inoculados en cuartos ó cámaras limpias (18).

3.1.33. Desinfección del Explante

Según Mendoza, es necesario desinfectar el material (semilla) para asegurarse que este libre de microorganismos contaminantes, en el trabajo realizado en zarzaparrilla utilizando tejido embrionario, procedió a lavar las semillas con agua y jabón, por lo menos cinco veces, luego colocó el material en etanol al 70% durante dos minutos, posteriormente traslado a un beacker de 200 ml con hipoclorito de sodio al 20% y finalmente dentro de la cámara de flujo laminar, enjuago el material con agua destilada esterilizada (19).

El desinfectante utilizado para la desinfección superficial fue el hipoclorito de sodio (NaOCl), encontrándose comúnmente a una concentración de 5-6% en los blanqueadores comerciales (magia blanca, clorox), durante un tiempo de 5-15 minutos que duro el remojo (19).

3.1.34. Reguladores de Crecimiento

La primera evidencia escrita acerca del empleo de los reguladores del crecimiento en cultivos *in vitro*, fue en 1936 por la Rue, donde se indica que el ácido indolacético (AIA) promovió el desarrollo de embriones de varias especies, *Zea mays*. Años más tarde se determinó que el AIA combinado con la cinetina era indispensable para el desarrollo de embriones globulares de *capsella* (26).

Son compuestos orgánicos, diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o el arreglo de su molécula fomentan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas (8).

Según Hartmann y Kester, dicen que adicionalmente a los nutrientes es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces, también giberelinas o ácido abscísico, para así mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos (11).

El papel exógeno de los reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico) durante el crecimiento de los embriones induce modificaciones en el crecimiento y morfogénesis de raíces (26).

3.1.35. Citoquinina

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristematicos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo debido al uso anterior del hombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adopta el termino citoquinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemos en la punta de las raíces (13).

Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo ambos sufriendo una rápida división celular. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles (13).

Entre los efectos generales de las citoquininas en los procesos fisiológicos de las plantas se encuentran: (13).

- a. Estimulación de la germinación de las semillas.
 - b. Estimulación de la formación de frutas sin semillas.
 - c. Ruptura de letargo de la semilla.
 - d. Inducción de la formación de brotes.
 - e. Mejora la floración.
 - f. Alteración en el crecimiento de frutos.
 - g. Ruptura de la dominancia apical.
 - h. Mantiene la síntesis de proteínas.
- i. Cestmir mencionado por Cabrera (6) indica que aumenta la división y diferenciación celular. Su acción ocurre en dos etapas.
- Durante la mitosis aumenta la cantidad de ADN
 - En la citocinesis estimulan la síntesis de proteínas específicas de la división celular (6).

Cinetina

BA (6-Benciladenina).

BAP (6-Bencilaminopurina) estimula la proliferación de yemas axilares

2ip (N-Isopentaniminopurina).

Zeatina; promueve el crecimiento del tallo principal (16).

A. Ruta de biosíntesis

Las citoquininas están presentes en todos los tejidos. Su metabolismo es complicado, estas sustancias están presentes en el tejido bajo varias formas:

- a. Bases libres
- b. Ribonucleosis
- c. Ribonucleótidos

como constituyente de ciertos (ARNT) existen dos mecanismos de biosíntesis:

- a. Isopentenilación de la adenina monofosfato (AMP)

AMP + Ip – PPI 2iP y zeatina

Las tres primeras formas se originan por esta vía.

- b. Por degradación de moléculas de ARN. Por esta vía se produce muy poca Citoquinina (6).

B. Modo de acción

Se considera que actúan a través del control de la síntesis de proteínas específicas para el desencadenamiento de la mitosis (6).

3.1.36. Giberelinas

Es la hormona del crecimiento, son diterpenoides tetracíclicos ácidos derivados del ent – kaureno (6) todas tienen la misma estructura química, el ent-giberelano y las diferentes giberelinas difieren por las características de los grupos laterales (-CH₃, -CH₂OH, CHO, etc.). (6) existen dos tipos:

- de 20 carbonos
- de 19 carbonos (+ activos) (6)

entre los efectos fisiológicos en las plantas se encuentran los siguientes:

- a. Producen el alargamiento de entrenudos, en plantas enteras. (su déficit produce plantas enanas).
- b. Estimulan la floración sobre todo en plantas de roseta, al favorecer la elongación de los entrenudos.
- c. Estimulan el crecimiento de hojas y de frutos (partenocarpia).
- d. Estimulan la germinación y la brotación de yemas, al suprimir la inhibición causada por procesos de dormancia.
- e. Revierte planta adulta en juvenil.
- f. Baja desarrollo de fruto y maduración
- g. Vernalización (6)

A. Ruta de biosíntesis

- a. Clossal y Cueva mencionado por Cabrera (6) dice que el precursor primario, el ácido mevalónico (MVA), a partir de él se generan una serie de compuestos intermediarios hasta llegar al Kaureno y luego al aldehído del AG₁₂. De este se derivan las múltiples giberelinas que se conocen (6).
- b. Pero antes de llegar al Kaureno existe un paso intermedio que forma el Farnesil – Pirofosfato (FPP). Es un paso clave ya que a partir de él podemos orientar la síntesis hacia el ácido giberélico o desviarla hacia el ácido abscísico (ABA). Esto dependerá de la situación fisiológica de la planta (6).

- c. Sitios de síntesis. Las síntesis ocurren en aquellas regiones que presentan división celular activa (ápices de tallo y raíces, en las hojas, en el embrión) (6).

B. Mecanismos de acción

- a. Estimula la síntesis de la α -amilasa. Enzima encargada de hidrolizar el almidón para formar compuestos energéticos necesarios al crecimiento del embrión.
- b. Efecto sobre la organización de la membrana. Participán en la síntesis activa de enzimas implicadas en la formación de los lípidos que conforman la membrana celular (6).

3.1.37. Aplicación de los reguladores del crecimiento al cultivo *in Vitro*.

Adicionalmente a los nutrientes generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como la finalidad del cultivo *in vitro* (12).

A. Citoquinina

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 1N (12).

In vitro inhibe las auxinas-oxidadas (mediante el nivel de auxina en los tejidos). Esta también implicado en el metabolismo de los carbohidratos, en la actividad enzimática de las vías glucolítica y oxidativa de las pentosas fosfato (12).

A. Efectos en los tejidos *in vitro*

- a. Estimulación de la división celular. En su ausencia, la metafase de la mitosis es considerablemente afectada.
- b. Involucradas en la síntesis de proteína.
- c. La proliferación de callo proveniente de tejidos de dicotiledoneas requiere la presencia tanto de auxina como de citoquinina. Pero la aplicación en forma secuencial es más provechosa.
- d. Modificación de la dominancia apical (12).

B. Giberelinas

Según Hurtado y Merino citado por Ortega, dice que las giberelinas tienen un amplio espectro de actividad biológica principal es la regulación del crecimiento, además son las responsables de la hidrólisis de las reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de las semillas (21).

Existen multitud de giberelinas conocidas. La de mayor uso es el GA₃, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor (se pierde el 90%) de su actividad después del autoclaveado. Comparado con las auxinas y citoquininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones, subapicales. El GA₃ es soluble en agua fría hasta 1000 mg/L (12).

Las giberelinas influyen en la biosíntesis o la actividad de enzimas y pueden consecuentemente afectar la producción de metabolitos secundarios vegetales *in vitro* (síntesis de amarantina y antocianina puede ser inhibida por la presencia de GA₃ en el medio) (4).

Cuando el ácido giberélico GA₃ es agregado al medio de cultivo, a menudo produce efectos de similar naturaleza a las auxinas. Altas concentraciones de GA₃ (cerca de 1 – 8 mg/L) induce al crecimiento de células de callo no diferenciado y puede promover el crecimiento de callos en combinación con auxinas y bajas dosis de citocininas (4).

La germinación de embriones somáticos preformados de diversas especies puede ser estimulada por la incorporación de GA₃ (entre 0.3 – 1 mg/L) (4).

El ácido giberélico tiene un pequeño efecto en la diferenciación celular *in vitro* mediando la acción de auxina. En plantas intactas la formación de xilema es estimulada por tratamiento con GA₃ o con auxina y GA₃ combinadas (4).

3.2. MARCO REFERENCIAL

3.2.1. Ubicación del área experimental

La investigación se desarrollo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subarea de Manejo y Mejoramiento de Plantas, Área Tecnológica de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, localizado en la Ciudad Universitaria zona 12.

3.2.2. Condiciones ambientales

Las unidades experimentales se colocarán en la cámara de cultivo, en la cuál se contará con las siguientes condiciones ambientales:

- a. 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.
- b. Temperatura, 25°C, con una oscilación de 1°C.
- c. Intensidad de luz de 1,000 a 3,000 Lux.

4.2.3. Clasificación taxonómica de la especie en estudio

REINO:	Plantae
SUBREINO:	Embryoobionta
DIVISIÓN:	Magnoliophyta
CLASE:	Liliopsida
SUBCLASE:	Lilidae
ORDEN:	Liliales
FAMILIA:	Liliaceae
GENERO:	Beaucarnea
ESPECIE:	(<i>Beaucarnea recurvata</i> Rose) (7)

3.2.3. Descripción morfológica

El izote pony es una planta arborescente en los primeros años de su crecimiento, con tronco engrosado en la base, poco ramificado en la parte superior, hojas recurvadas, delgadas, planas, verdes, con los márgenes ligeramente aserrados (24).

Las plantas pequeñas son ideales como especies de interiores, ya que debido a su lento crecimiento, mantienen un tamaño conveniente por muchos años (17).

3.2.3.1. Tallo

Tallos altos, limpios, con base gruesamente bulbosa, densamente frondosas en los extremos; con alturas que van de los 3 a los 12 metros y con diámetros comprendidos entre los 20 a 45 cm. (17).

3.2.3.2. Hojas

Poseen hojas relativamente delgadas con longitudes que alcanzan algunas veces un metro o menos; teniendo de 2 a 3 centímetros de ancho, con los bordes lisos o rugosos, siendo la superficie de las hojas ásperas al tacto (17).

3.2.3.3. Flores

Las flores se encuentran agrupadas en panículas ovoides alargadas, abundantemente ramificadas, siendo las ramificaciones de las panículas de 30 cm de longitud o menos, teniendo las flores un perianto segmentado aproximadamente de 3 mm de largo; fruto elíptico y ovalado de 15 a 18 mm de longitud y 13 a 15 mm de ancho, marginado en la base y en el ápice, semillas de 5 mm de diámetro, irregularmente trilobados y lisos (17).

Planta de interior, Planta arborescente con tronco engrosado en la base, poco ramificado en la parte superior. Hojas recurvadas, delgadas, planas, verdes, con los márgenes ligeramente aserrados (24).

4. OBJETIVOS

4.1. GENERALES

Establecer un protocolo para la micropropagación del Izote Pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), utilizando embriones inmaduros como explantes.

4.2. ESPECIFICOS

- 4.2.1. Determinar las combinaciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido giberelico (GA_3), para inducir la germinación y formación de raíz de los embriones de Izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose)
- 4.2.2. Determinar los tratamientos que inducen una mayor altura de las plántulas de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose).
- 4.2.3. Determinar los tratamientos que inducen mayor formación de hojas en las plántulas de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose).

5. HIPÓTESIS

- 5.1. al menos una combinación de bencilaminopurina y ácido giberelico promoverá la germinación y formación de raíz en embriones inmaduros de Izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose).

- 5.2. Existe un tratamiento que inducirá al crecimiento en altura de las plántulas de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose) provenientes de embriones inmaduros.

- 5.3. Al menos un tratamiento inducirá una mayor formación de hojas en las plántulas de izote pony *Beaucarnea recurvata* Rose, provenientes de embriones inmaduros.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización del experimento

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala campus central.

6.2. Reactivos y materiales

Sales minerales, constituyentes de los medios de cultivo, agua destilada, agua desmineralizada, hipoclorito de sodio, alcohol al 70 y 90%, sacarosa, ácido giberélico, ácido indolbutírico, bencil amino purina, agar, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio 1 N, papel aluminio, papel toalla, masking tape, marcadores, mesas, frascos de 100 ml de capacidad.

6.3. Cristalería y equipo

Balanza analítica, potenciómetro, horno microondas, autoclave, campana de flujo laminar, refrigerador, agitador magnético, pipetas de 1, 5, 10 y 25 mililitros, micro pipetas de 100 y 1000 mililitros, probetas de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 mililitros, erlenmeyer de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mililitros, frascos, mecheros, papel parafina, agujas de disección, micro espátulas, tijeras, bisturí, pinzas, pizetas, cajas petri, frascos de 100 mililitros, incubadora.

6.4. Medio de cultivo

6.4.1. Preparación de las soluciones madres

Las soluciones madres se realizaron en función de los componentes del medio Murashige y Skoog (MS). A continuación se describe la forma en que se realizó la preparación de las soluciones patrón para el medio Murashige y Skoog.

A. Solución madre de macronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog

Se prepararon 500 ml de esta solución, para lo cual se utilizó un beacker de 1 litro, en el que se agregaron los componentes que se describen en el cuadro No. 1.

Cuadro 1. Componentes de macronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog a concentración 10 X.

Sustancia	Peso (grs.)
NH ₄ NO ₃	8.25
KNO ₃	9.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.85
KH ₂ PO ₄	0.85

Pesados los componentes se agregaron a un beacker conteniendo 250 ml de agua desmineralizada estéril, se agitaron hasta observar que todas las sustancias se disolvieran, el contenido se traslado a una probeta de 1000 ml luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardo en frascos esterilizados identificados y tapados adecuadamente, estos se guardaron hasta su huso en refrigeradora a una temperatura de 4 °C. De igual forma se preparo una solución patrón a 100X de macronutrientes consistentes en CaCl₂ · 2H₂O para lo cual se prepararon 500 ml.

B. Solución madre de micronutrientes

Se prepararon dos soluciones por aparte de 100 ml cada una, a las que se les nombro micro A y micro B, para ello se le agregaron 50 ml de agua desmineralizada estéril en un beacker de 250 ml luego de pesados se agregaron los componentes que se describen en el cuadro No. 2.

Cuadro 2. Componentes de micronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog

Sustancia	Peso (grs.)
	MICRO A a 1000X
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.23
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.86
H ₃ BO ₃	0.62
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025
	MICRO B a 5000X
CoCl ₂ · 2H ₂ O	0.0125
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0125

Pesados los componentes se agregaron al beacker conteniendo 50 ml de agua desmineralizada estéril esta se mantuvo en constante agitación en el agitador magnético hasta observar que todas las sustancias se disolvieran, el contenido se traslado a una probeta de 100 ml luego se aforo con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardo en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente, además se les colocó forro de papel aluminio, estos se guardaron hasta su huso en refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

Por aparte se preparó otra solución de micro nutriente de KI a 1000X para ello se preparó 100 ml en la que se agregó 0.0415 gramos del compuesto mencionado.

C. Solución madre de hierro a 200X

Se preparó una solución de 250 ml de la siguiente forma:

- a. En un beacker se colocó 100 ml de agua desmineralizada estéril
- b. Seguidamente el beacker se colocó en la estufa
- c. Se agregó al agua caliente 1.865 grs de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$.
- d. Disuelto lo anterior se agregó 1.3925 grs de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
disueltos los elementos, la solución se aforo en una probeta al volumen deseado, se volvió a agitar y luego se traslado la solución a su envase, colocándole su respectiva etiqueta, además se le colocó forro de papel aluminio, se tapo debidamente y se guardo en refrigeradora a 4°C.

D. Solución madre de vitaminas a 1000X

Se preparó una solución de 50 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se pesó 0.02 grs. de tiamina y se agregó al beacker, después de disuelto el compuesto se aforo en una probeta de 50 ml según el volumen deseado, la solución se trasladó a un envase de vidrio y se guardó en refrigeradora a 4°C.

E. Solución madre de myo inositol a 1000X

Se preparó una solución de 100 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se pesó 1.5 grs. de myo inositol y se agregó al beacker, después de haber disuelto el compuesto se aforo en una probeta de 100 ml según el volumen deseado, la solución se trasladó a un envase de vidrio y se guardó en refrigeradora a 4°C.

F. Reguladores de crecimiento

Los reguladores que se utilizaron son los siguientes: BAP (bencil-amino purina), GA3 (ácido giberelico) previo a su utilización el BAP se disolvió en hidróxido de sodio 1 N.

6.4.2. Preparación de los medios de cultivo

Se preparó la cantidad de medio basal según conveniencia, para lo cual se siguió la siguiente metodología. En un beacker se agregó agua desmineralizada estéril, se introdujo al recipiente una barra magnética y se colocó sobre el agitador magnético, el cual se mantuvo en constante agitación, luego se agregaron los componentes del medio Murashige y Skoog (cuadro 6) según cantidad deseada, el orden es el siguiente.

- a) Macro nutrientes; NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- b) Micronutrientes A; $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KI
- c) Micronutrientes B; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- d) Hierros, Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- e) Vitaminas; tiamina
- f) Myo inositol

- g) Reguladores de crecimiento según las dosis a evaluar, de bencil amino purina (BAP) 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y 1.5 mg/L y de ácido giberelico (GA3) 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y 1.5 mg/L a excepción de los tratamientos testigos que tendrán cero dosis de reguladores.
- h) Sucrosa
- i) Se aforó la solución.
- j) Se midió el pH a 5.7 para ello se utilizó según sea necesario una solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
- k) Se agregó agar (8.0 gr/L).
- l) Se calentó en horno microondas hasta disolver el agar.
- m) La solución se agregó en las unidades experimentales consistiendo en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad (10 ml de medio por frasco).
- n) Cada frasco se rotulo según tratamiento.
- ñ) Todas las unidades experimentales se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos a una presión de 1.05 kg/cm cuadrado a una temperatura de 120 °C.
- o) Las unidades experimentales se colocaron en el cuarto de incubación hasta su utilización.

6.4.3. Desinfección y siembra de explantes

A. Material vegetal

El material que se utilizó para la micropropagación fueron embriones inmaduros de semillas de la planta de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose).

B. Desinfección de semilla

Se lavaron con agua estéril, jabón y alcohol y se secaron con papel toalla. Luego estos se colocaron en una solución desinfectante de fungicidas - bactericidas para contrarrestar la contaminación del material vegetal por hongos y bacterias. Se preservó en frío por 24 horas en refrigeradora a 4° centígrados.

C. Desinfección de semilla a nivel de laboratorio

- a) Luego de haber introducido y mantenido el material en la solución desinfectante de fungicida-bactericida, durante un tiempo de 24 horas, se trasladaron a un beacker conteniendo una solución de alcohol al 70% por dos minutos.
- b) Se trasladaron a un beacker conteniendo agua esterilizada para quitar el exceso de alcohol.
- c) Se trasladaron a un beacker conteniendo una solución de cloro al 5% v/v, por 5 minutos.
- d) El beacker conteniendo la solución de cloro con semillas se trasladaron a la campana de flujo laminar debidamente esterilizada, en donde se realizarón tres lavados con agua estéril.

D. Extracción de los embriones

- a) Se procedió a la siembra de explantes (embriones) en las unidades experimentales, las cuales se realizaron en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar la cual se encendió 30 minutos antes de empezar a trabajar en ella.
- b) En una caja de petri, y con la ayuda de un bisturí y pinzas para sujetar la semilla se procedió a quitar la cubierta seminal para poder observar el endospermo y lograr extraer el embrión sin dañarlo.
- c) Después de haber extraído el embrión con una pinza debidamente esterilizada, se inoculó dentro del medio de cultivo (frasco conteniendo 10 ml de medio), se colocó un embrión por unidad experimental (frasco), se tapó cuidadosamente con papel aluminio y se identificó debidamente.

E. Incubación de cultivos

Después de haber realizado la incubación de todos los explantes en sus respectivas unidades experimentales, estas se trasladarán al cuarto de incubación en donde estuvieron en condiciones propicias para el desarrollo de los mismos. El cuarto de incubación estuvo equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad, con un fotoperiodo programado de 16 horas luz.

Descripción de los tratamientos

A continuación se describen las concentraciones de bencil amino purina (BAP) y ácido giberelico (GA3) que se evaluarán, a excepción del testigo absoluto al cual no se le agregó ninguna dosis de BAP ni de GA3. Los tratamientos evaluados consistieron en 16 combinaciones de reguladores de crecimiento; bencil aminopurina (BAP) y ácido giberelico (GA3), en el medio nutritivo MS y un explante (embrión), más un tratamiento testigo (no se le aplicó regulador de crecimiento). Se realizaron 10 repeticiones, las cuales sumaron 170 unidades experimentales. A continuación se presenta el cuadro con las concentraciones de reguladores de crecimiento de los tratamientos utilizados.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos utilizados en la germinación de embriones de Izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose)

TRATAMIENTO	COMBINACIÓN HORMONAL	
	BAP mg/L	GA3 mg/L
1	0.0	0.0
2	0.1	0.1
3	0.5	0.1
4	1.0	0.1
5	1.5	0.1
6	0.1	0.5
7	0.5	0.5
8	1.0	0.5
9	1.5	0.5
10	0.1	1.0
11	0.5	1.0
12	1.0	1.0
13	1.5	1.0
14	0.1	1.5
15	0.5	1.5
16	1.0	1.5
17	1.5	1.5

6.4.4. Descripción de la unidad experimental

Se utilizaron como unidades experimentales frascos de vidrio transparente de 4.3 cm de diámetro en la boca y de 5.5 cm de diámetro en el fondo y con capacidad de 100 ml, en donde se agregaron 10 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog con los reguladores de crecimiento correspondientes y un explante (embrión), por unidad experimental.

6.4.5. Factores evaluados

Los factores que se sometieron a evaluación son los reguladores de crecimiento BAP y GA3 en 16 combinaciones, donde al testigo absoluto no se les agregó ninguna dosis de bencil amino purina ni de ácido giberelico.

Cuadro 4. Factores y niveles que se evaluaron en la germinación de embriones de Izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose)

FACTORES	NIVELES (mg/L)			
Bencil aminopurina	0.1	0.5	1.0	1.5
Acido giberélico	0.1	0.5	1.0	1.5

6.5. Variables de respuesta

- a. Embriones germinados; se tomaron lecturas cada 5 días después de haber realizada la inoculación, durante los primeros 20 días, realizando un conteo visual por cada unidad experimental, relacionando para ello el número de embriones germinados con el número total de embriones por tratamiento.
- b. Altura de la plántula, se realizó lectura a los 60 días después de sembrados los embriones, para ello se retiró la plántula del medio de cultivo y se midió con la ayuda de una regla graduada. Esto se realizó dentro de la campana de flujo laminar debidamente esterilizada.
- c. Hojas por plántula a los 60 días, la lectura se realizó contando las hojas de cada plántula en cada unidad experimental.
- d. Raíces. Se realizó un conteo por cada repetición, a los 60 días después de haber inoculado los embriones en el medio de cultivo.

6.5.1. Análisis de los resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos, se realizó en forma descriptiva, ya que no fue factible aplicar estadísticos paramétricos, solo porcentaje de las variables de respuesta, detallando en una forma precisa cada uno de los eventos más relevantes y los cambios que ocurrieron en dicho experimento, para poder cumplir con los objetivos de la investigación. Ya que no se pretendió medir las diferencias entre los tratamientos evaluados, si no solo conocer la respuesta de los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), en el medio de cultivo MS, aplicando diferentes dosis de bencil amino purina (BAP) y ácido giberélico (GA₃).

6.5.2. presentación de resultados

Con los resultados obtenidos se elaboraron tablas y figuras para una mejor ilustración de los resultados.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* es mantener los explantes libres de microorganismos contaminantes, debido a que los explantes pueden llevar contaminantes en su superficie (microorganismos exógenos) o en su interior (microorganismos endógenos), por lo que es importante utilizar una solución desinfectante que logre contrarrestar estos microorganismos, para lo cual es necesario evaluar diferentes concentraciones de soluciones desinfectantes, así como también el tiempo de exposición del explante dentro de dicha solución.

7.1. Limpieza del tejido inicial de microorganismos contaminantes

7.1.1. Colecta, transporte y almacenamiento de la semilla

La semilla se recolectó de plantas silvestres ubicadas en la Laguneta, Santa Cruz, municipio de Cobán, Alta Verapaz. Para la obtención de la semilla se procedió a cortar las inflorescencias con ayuda de un gancho de metal, debido a que las plantas son relativamente altas y no se puede alcanzar fácilmente. Debido a que resulta incómodo transportar toda la inflorescencia se procedió a separar las semillas en forma individual. Las semillas se colocaron en bolsas plásticas con agujeros para evitar la acumulación de humedad. Para transportarla directamente al laboratorio, la semilla se colocó en una solución desinfectante. Esta solución estaba formada de los siguientes ingredientes: 1 mg/L de benomyl y sulfato de cobre, así como 500 mg/L de tetraciclina y 500 mg/L de amoxicilina. La semilla sumergida en la solución fue colocada en una hielera para evitar cambios de temperatura. En laboratorio la semilla se colocó por 20 minutos en la solución desinfectante fresca, conteniendo los mismos productos, las mismas concentraciones. Después de los veinte minutos se sacó la semilla de la solución y se secó al aire libre. Luego la semilla fue colocada en una bandeja plástica y conservándola en frío en la refrigeradora a ± 4 °C, hasta iniciar la siguiente fase.

7.1.2. Preparación de la solución desinfectante

Debido a que la semilla de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), provenía directamente del campo, fue necesario realizar varias desinfecciones para contrarrestar la contaminación en cultivo de tejido, para la fase de laboratorio se utilizó otro tipo de solución desinfectante, utilizando para la misma estreptomycin + tetraciclina a 500 mg/L, sulfato de cobre pentahidratado a 1500 mg/L, benomyl a 1000 mg/L, cloranfenicol + amoxicilina a 500 mg/L y ácido cítrico + ácido ascórbico a 800 mg/L, todos estos productos se mezclaron en un frasco de vidrio con capacidad de 500 ml, utilizando agua desmineralizada para disolver los productos, seguidamente se procedió a agitar durante 20 minutos para luego preservar la semilla en frío.

7.1.3. Desinfección de la semilla

Es importante tener en cuenta el procedimiento de desinfección, el cual influyó no solo en la contaminación del embrión si no también en la germinación del mismo. Tanto la concentración y la duración de exposición para la desinfección son importantes, por lo que se evaluó distintos productos así como el tiempo de exposición que tuvieron las semillas sumergidos en el agente desinfectante. En concentraciones muy altas y/o en periodos muy largos de exposición de la semilla, dentro de la solución desinfectante, esta penetra el tejido de la semilla, provocando daños al embrión, al extremo que el mismo ya no germina satisfactoriamente.

Para poder contrarrestar la contaminación de la semilla, y poder extraer el embrión, se necesitó partir la semilla, por lo que si esta no estaba lo necesariamente desinfectada provocaba que se contaminara el embrión, fue necesario utilizar una solución desinfectante, descrita anteriormente, en esta solución la semilla se sumergió durante un tiempo de 24 horas, luego se trasladó a la campana de flujo laminar donde se realizaron tres lavados con agua estéril, para eliminar residuos de la solución desinfectante, luego se sumergió en una solución de alcohol al 70%, durante un tiempo de 3 minutos, se procedió a lavar con agua esterilizada para quitar residuos de alcohol, para luego sumergirla en una solución de cloro al 3% durante un tiempo de 5 minutos, luego se realizaron tres lavados con agua estéril, para eliminar residuos de cloro.

Para la desinfección de los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), se utilizó una solución bactericida que incluyó tetraciclina + amoxicilina a 100 mg/L, en la que el embrión se sumergió durante un tiempo de 5 minutos, para contrarrestar la contaminación por bacterias.

7.1.4. Extracción de embriones

Luego de realizado el proceso de desinfección de la semilla, se inició la extracción del embrión, dentro de la campana de flujo laminar, debidamente esterilizada, con alcohol al 70%, así como las pinzas y bisturís, en la que la semilla, se partió por la mitad, teniendo siempre el cuidado, que el corte no fuera muy profundo, para así no dañar el embrión, al observarlo y tenerlo listo, se flamearon las pinzas y bisturís, para poder así extraerlo y no contaminarlo, para sumergirlo en la solución bactericida descrita anteriormente, durante 5 minutos, para luego inocular el explante, al medio de cultivo.

7.1.5. Siembra de embriones

Al extraer el embrión, y desinfectarlo debidamente, dentro de la campana de flujo laminar, se procedió a sembrarlo en cada unidad experimental, la cual contenía el medio nutritivo, colocando un embrión por cada unidad, para su inoculación se utilizaron pinzas debidamente esterilizadas.

7.1.6. Incubación de los cultivos

Después de realizada la siembra de los embriones en cada una de las unidades experimentales, dentro de la campana de flujo laminar, se procedió a trasladar a cada unidad experimental al cuarto de incubación, donde se cuenta con 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, una temperatura de 25°C, con una oscilación de 1°C, la intensidad de luz es de 1,000 a 3,000 Lux, siendo las apropiadas para la germinación de los embriones.

7.2. Germinación de embriones inmaduros de izote pony

A los 3 días después de inoculados los embriones de izote pony, el tratamiento que primero comenzó a germinar fue el número 5 (1.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA₃), presentando un 30% de germinación, del total de unidades experimentales del tratamiento. Al momento de revisar cada una de las unidades experimentales, se pudo observar que en el tratamiento número cinco los embriones inoculados presentaban un alargamiento y engrosamiento mayor que los demás, así como también el cambio de coloración de blanco a verde y una curvatura donde se comienza a diferenciar el crecimiento del embrión (ver figura 4), seguidamente el resto de los tratamientos germinaron a los 5 días después de haber realizado la inoculación, lo cuál demuestra que la mayoría de los tratamiento evaluados

favorecen a la germinación de los embriones de izote pony a excepción del testigo que no presentó ningún embrión germinado.



Fig.3. embrión inmaduro de Izote pony



Fig. 4. embrión germinado de Izote pony

De alguna manera los reguladores de crecimiento GA_3 + BAP, en concentraciones diferentes estimulan y promueven la germinación de los embriones de izote pony, como se observa en el cuadro 5, que la mayoría de los tratamientos presentaron al menos una repetición germinada a los primeros cinco días de inoculados los explantes, mientras que el tratamiento 5 (1.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA_3), fue el que presentó el mayor número de explantes germinados con 7 embriones germinados de un total de 10, utilizados en el tratamiento, lo que equivale a un total del 70% de germinación, lo cuál se puede apreciar en la figura 5. Lo que demuestra que al extraer el embrión de la semilla y colocarla en un medio nutritivo con las diferentes dosis de reguladores de GA_3 y BAP, aumenta el porcentaje de germinación de la semilla ya que en condiciones normales la semilla presenta una 50% de germinación.

En el cuadro 5, se muestra el efecto de diferentes combinaciones de BAP en mg/L (0.1, 0.5, 1.0, 1.5) y GA_3 en mg/L (0.1, 0.5, 1.0, 1.5), donde se puede observar el comportamiento que presentan los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a la germinación, donde los tratamientos T2, T3, T4, y T5, que tienen una menor cantidad de GA_3 , presentaron una mayor germinación que el resto de tratamientos al aumentar la concentración del BAP (1.5 mg/L) y con una concentración de ácido giberélico de (0.1 mg/L), se demuestra que las citocininas influyen en la estimulación de la germinación y que también interactúan con las auxinas y giberelinas para regular el crecimiento y diferenciación de plantas.

7.2. Embriones germinados a los 5 días de inoculado el explante

Cuadro 5. Respuesta de los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose), a los 5 días de inoculado el explante, en el medio basal MS, suplementado con diferentes concentraciones de BAP y GA₃.

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/L	Embriones germinados	Porcentaje de embriones germinados	Embriones no germinados	Porcentaje de embriones no germinados
T1	0 BAP + 0 GA ₃	0	0	10	100
T2	0.1 BAP + 0.1 GA ₃	3	30	7	70
T3	0.5 BAP + 0.1 GA ₃	5	50	5	50
T4	1.0 BAP + 0.1 GA ₃	5	50	5	50
T5	1.5 BAP + 0.1 GA ₃	7	70	3	30
T6	0.1 BAP + 0.5 GA ₃	4	40	6	60
T7	0.5 BAP + 0.5 GA ₃	2	20	8	80
T8	1.0 BAP + 0.5 GA ₃	1	10	9	90
T9	1.5 BAP + 0.5 GA ₃	3	30	7	70
T10	0.1 BAP + 1.0 GA ₃	2	20	8	80
T11	0.5 BAP + 1.0 GA ₃	2	20	8	80
T12	1.0 BAP + 1.0 GA ₃	2	20	8	80
T13	1.5 BAP + 1.0 GA ₃	1	10	9	90
T14	0.1 BAP + 1.5 GA ₃	3	30	7	70
T15	0.5 BAP + 1.5 GA ₃	2	20	8	80
T16	1.0 BAP + 1.5 GA ₃	1	10	9	90
T17	1.5 BAP + 1.5 GA ₃	1	10	9	90

BAP = bencil aminopurina

GA₃ = Acido Giberelico

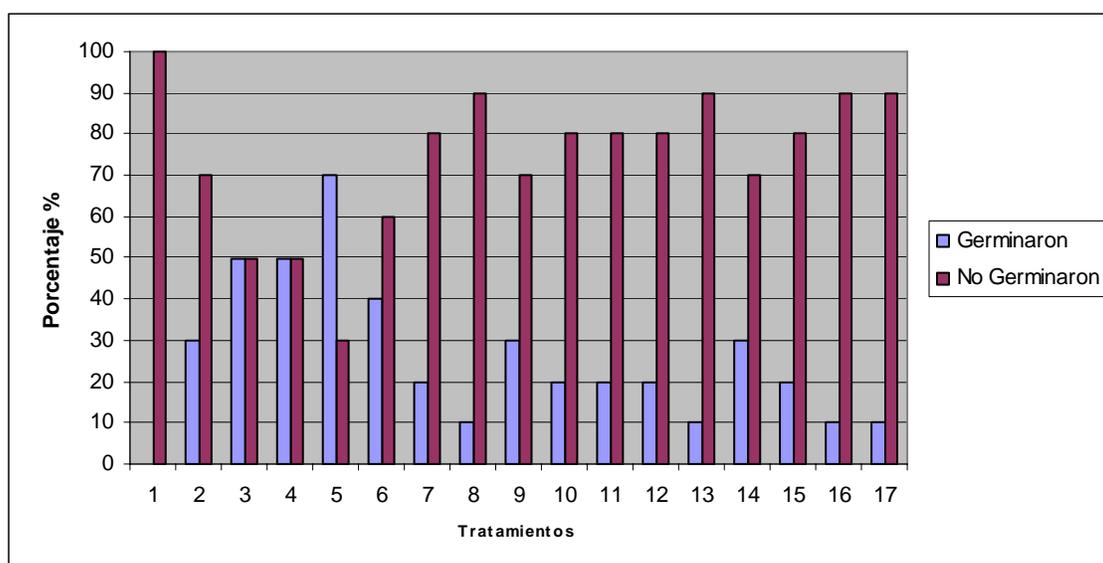


Fig. 5. Respuesta de los embriones de Izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 5 días de inoculados los explantes, en el medio basal MS, con diferentes combinaciones de BAP y GA₃.

7.3. embriones germinados a los 10 días de inoculado el explante

Luego de haberse realizado la segunda lectura, a los 10 días de inoculado los explantes (cuadro 6), se pudo determinar que en la mayoría de los tratamientos se incremento el número de embriones germinados, como se observa en la figura 6, donde el tratamiento que presentó mayor número de embriones germinados después de realizada la lectura a los 5 días de inoculados los explantes fue el tratamiento 17, observando que la germinación del embrión fue más lenta que el resto de los demás tratamientos.

Luego de realizadas las cuatro lecturas, durante los primeros 20 días, se pudo determinar que la mayoría de los embriones germinaron durante los primeros 10 días. Lo que demuestra que con la aplicación de reguladores de crecimiento específicamente BAP y GA₃, así como extraer el embrión de la semilla se disminuye considerablemente los días de germinación, que en condiciones normales la semilla germina entre los 30 a 40 días. En el cuadro 6, se observa que los tratamientos con 0.1/0.1, 0.5/0.1, 1.0/0.1 y 1.5/0.1 mg/L de BAP/GA₃, respectivamente es donde se obtuvo el mayor número de embriones germinados. El ácido giberelico en concentraciones bajas promueve la germinación de los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), no así, cuando se incrementa la cantidad de ácido giberelico. Se determinó que el porcentaje de germinación de los embriones disminuyó considerablemente (ver figura 6), esto debido al tipo de explante utilizado, que el GA₃, en concentraciones altas en lugar de mejorar la germinación, puede ser que sea toxico y provoca que el embrión se muera en lugar de germinar, lo que se pudo observar en los embriones que no germinaron, los que se tornaron de una coloración oscura en lugar de tornarse verdes (ver figura 7).

Cuadro 6. Respuesta de los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 10 días de inoculado el explante en el medio basal MS, suplementado con diferentes concentraciones de BAP y GA₃.

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/L	Embriones germinados	Porcentaje de embriones germinados	Embriones no germinados	Porcentaje de embriones no germinados
T1	0 BAP + 0 GA ₃	0	0	10	100
T2	0.1 BAP + 0.1 GA ₃	5	50	5	50
T3	0.5 BAP + 0.1 GA ₃	6	60	4	40
T4	1.0 BAP + 0.1 GA ₃	5	50	5	50
T5	1.5 BAP + 0.1 GA ₃	7	70	3	30
T6	0.1 BAP + 0.5 GA ₃	4	40	6	60
T7	0.5 BAP + 0.5 GA ₃	2	20	8	80
T8	1.0 BAP + 0.5 GA ₃	3	30	7	70
T9	1.5 BAP + 0.5 GA ₃	3	30	7	70
T10	0.1 BAP + 1.0 GA ₃	2	20	8	80
T11	0.5 BAP + 1.0 GA ₃	2	20	8	80
T12	1.0 BAP + 1.0 GA ₃	3	30	7	70
T13	1.5 BAP + 1.0 GA ₃	1	10	9	90
T14	0.1 BAP + 1.5 GA ₃	3	30	7	70
T15	0.5 BAP + 1.5 GA ₃	2	20	8	80
T16	1.0 BAP + 1.5 GA ₃	2	20	9	80
T17	1.5 BAP + 1.5 GA ₃	5	50	5	50

BAP = Bencil amino purina

GA₃ = Acido giberelico

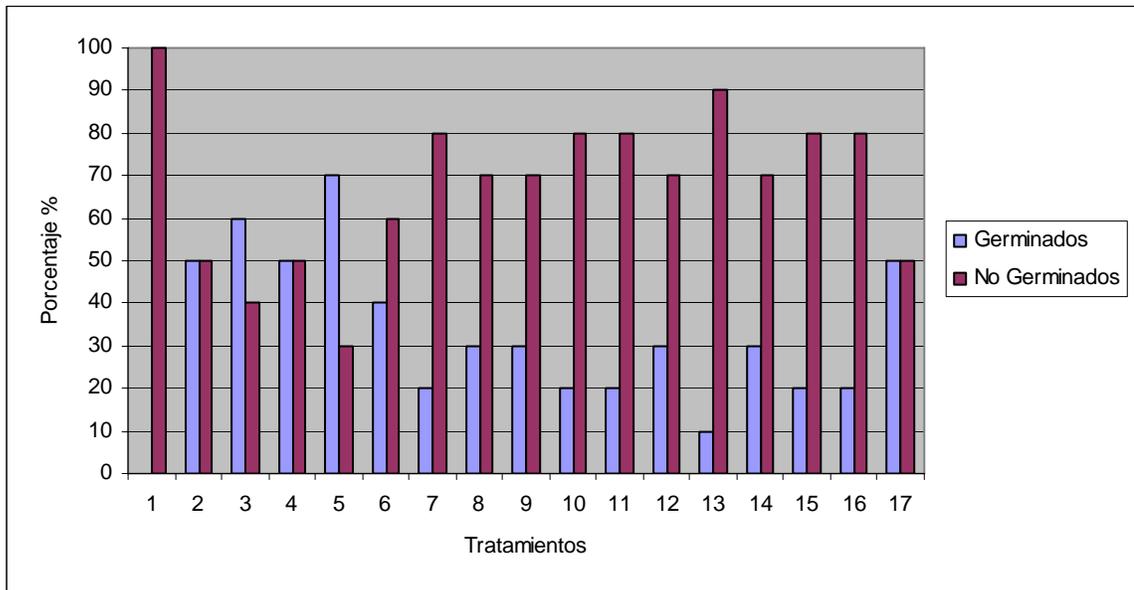


Fig. 6. Respuesta de los embriones de Izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 10 días de inoculados los explantes, en el medio basal MS, suplementado con diferentes combinaciones de BAP y GA₃



Fig. 7. embrión de izote pony presentando quemaduras en los extremos.

7.4. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de izote pony (*Beaucarnea recurvata*).

Al realizar la última lectura a los 60 días después de inoculados los explantes, se determinó que existió una gran cantidad de embriones que murieron debido a que el explante únicamente en algunas ocasiones solamente germinó y no logró desarrollarse adecuadamente dentro del medio MS. Las concentraciones de los reguladores de crecimiento en lugar de promover el desarrollo del embrión resultó ser tóxico, provocando la muerte del explante, como se puede observar en el cuadro 7 y figura 8, que los tratamientos 5, 9 y 17, presentaron un 30%, 30% y 50% de embriones muertos del total de embriones germinados por tratamiento. Los tratamientos que presentan la concentración de BAP de 1.5 mg/L es donde existió una mayor cantidad de explantes muertos, lo cual demuestra que la citocininas arriba de 1.5 mg/L provoca la mayor cantidad de explantes muertos en lo que se refiere a los embriones de izote pony. En la figura 8, se puede observar que los tratamientos 6 y 7, en concentraciones de 0.1/0.5, 0.5/0.5, mg/L de BAP/GA₃ respectivamente, fue donde no se observó ningún explante muerto, lo que demuestra que las concentraciones arriba de estas dosis provoca daños a los explantes y no logran desarrollarse adecuadamente. En relación a lo anterior es necesario cambiar el explante al mismo medio pero bajando las concentraciones de BAP en los primeros 30 días de germinado el embrión para que el explante no se muera y pueda desarrollarse adecuadamente.

Cuadro 7. Comportamiento de sobrevivencia de embriones germinados de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 60 días de inoculados los explantes.

Tratamiento	Combinación de reguladores mg/L	Explantes muertos	Porcentaje de explantes muertos	Explantes vivos	Porcentaje de explantes vivos
T1	0 BAP + 0 GA ₃	0	0	0	0
T2	0.1 BAP + 0.1 GA ₃	2	20	3	30
T3	0.5 BAP + 0.1 GA ₃	1	10	5	50
T4	1.0 BAP + 0.1 GA ₃	1	10	4	40
T5	1.5 BAP + 0.1 GA ₃	3	30	4	40
T6	0.1 BAP + 0.5 GA ₃	0	0	4	40
T7	0.5 BAP + 0.5 GA ₃	0	0	2	20
T8	1.0 BAP + 0.5 GA ₃	2	20	1	10
T9	1.5 BAP + 0.5 GA ₃	3	30	0	0
T10	0.1 BAP + 1.0 GA ₃	1	10	1	10
T11	0.5 BAP + 1.0 GA ₃	1	10	1	10
T12	1.0 BAP + 1.0 GA ₃	2	20	1	10
T13	1.5 BAP + 1.0 GA ₃	1	10	0	0
T14	0.1 BAP + 1.5 GA ₃	2	20	1	10
T15	0.5 BAP + 1.5 GA ₃	2	20	0	0
T16	1.0 BAP + 1.5 GA ₃	2	20	0	0
T17	1.5 BAP + 1.5 GA ₃	4	40	1	10

BAP = Bencil amino purina

GA₃ = Acido giberelico

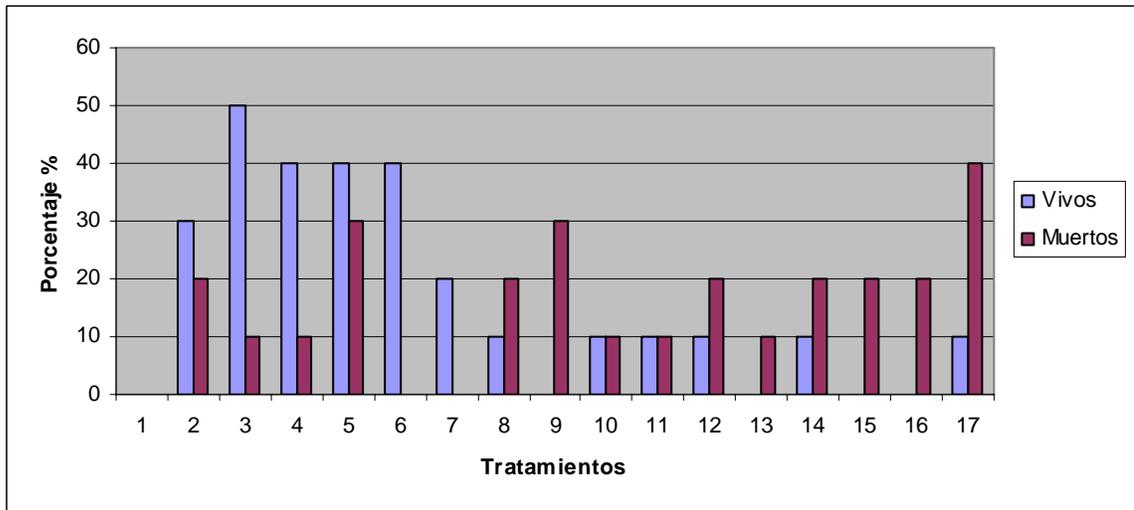


Fig. 8. Comportamiento de los embriones germinados de Izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 60 días de inoculados los explantes, en el medio basal MS, con diferentes combinaciones de BAP y GA₃.

7.5. Altura de las plántulas obtenidas

En el cuadro 8, se presenta la altura de las plantas de izote pony que se obtuvieron de los embriones germinados, donde se puede observar el crecimiento que presentaron a los 60 días de inoculados los embriones de izote pony en el medio nutritivo MS, con diferentes combinaciones de BAP y GA₃ (ver figura 9). Algunas plantas en lugar de tener un crecimiento normal formaron un tipo de roseta y no un crecimiento vertical, (ver figura 10), los cuales se presentaron en los tratamientos donde la concentración de BAP es de 1.0 a 1.5 mg/L. En los tratamientos donde las concentraciones de BAP fue menor de 1.0 mg/L, el desarrollo de la planta fue normal variando únicamente la longitud de la plántula, como se puede determinar en el cuadro 8, donde el tratamiento que presentó un mayor crecimiento fue el número 6, con una combinación de reguladores de crecimiento de 0.1/0.5 mg/L de BAP y GA₃ respectivamente. Lo que demuestra que la citocinina en concentraciones arriba de 1.0 mg/L en plántulas de izote pony provoca que el crecimiento no sea adecuado por lo que es necesario utilizar dosis abajo de estas concentraciones para obtener un buen desarrollo de la planta. Las citocininas en dosis altas promueven muchos brotes pequeños que no se alargan y las hojas se deforman.



fig. 9. Planta de izote pony con crecimiento normal



Fig. 10. Planta de izote pony en forma de roseta

Cuadro 8. Altura de plántulas de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 60 días de inoculados los explantes.

Tratamiento	Combinación Hormonal mg/L	Formación de Plántulas a los 60 días	
		No. repetición con respuesta	Altura de plántula en cm.
1	0 BAP + 0 GA3	0	0
2	0.1 BAP + 0.1 GA3	1	1.5
		3	2.0
		6	2.5
3	0.5 BAP + 0.1 GA3	3	1.2
		4	1.9
		6	1.4
		8	1.3
		9	1.7
4	1.0 BAP + 0.1 GA3	1	0.8 (formo roseta)
		6	1.3 (formo roseta)
		7	0.8 (formo roseta)
		10	No desarrollo
5	1.5 BAP + 0.1 GA3	1	1.5 (formo roseta)
		5	1.3 (formo roseta)
		6	1.0 (formo roseta)
		9	0.8 (formo roseta)
6	0.1 BAP + 0.5 GA3	4	1.9
		5	2.1
		7	2.0
		10	2.3
7	0.5 BAP + 0.5 GA3	4	1.3
		8	0.7
8	1.0 BAP + 0.5 GA3	1	No desarrolló
9	1.5 BAP + 0.5 GA3	6	0
10	0.1 BAP + 1.0 GA3	5	1.3
11	0.5 BAP + 1.0 GA3	8	No desarrolló
12	1.0 BAP + 1.0 GA3	1	1.5 (formo roseta)
13	1.5 BAP + 1.0 GA3	3	1.4 (formo roseta)
14	0.1 BAP + 1.5 GA3	1	1.0
		2	1.8
15	0.5 BAP + 1.5 GA3	0	0
16	1.0 BAP + 1.5 GA3	0	0
17	1.5 BAP + 1.5 GA3	7	1.3 (formo roseta)

BAP = Bencil amino purina

GA₃ = Acido giberelico

7.6. Número de hojas por plántula de izote pony

En cuanto al número de hojas por plantas de izote pony, las que tuvieron un desarrollo normal, presentaron un total de 3 a 5 hojas. Las que formaron roseta presentaron un total de 8 a 12 hojas por cada roseta (ver figura 11), lo cual demuestra que la citoquinina influye en lo que es la formación de órganos de la plántula, provocando malformación o en casos más extremos la planta no logra desarrollarse y provoca la muerte, como se muestra en el cuadro 9, donde los tratamientos con dosis de BAP, entre 1.0 y 1.5 mg/L, no tuvieron un crecimiento normal, si no que formaron roseta.



Fig. 11. Planta de izote pony que formo roseta

Cuadro 9. Número de hojas por planta de izote pony (*Beaucarnea recurvata*) a los 60 días de inoculado el explante.

Tratamiento	Combinación Hormonal mg/L	Formación de Plántulas a los 60 días	
		No. repetición con respuesta	Número de hojas
1	0 BAP + 0 GA3	0	0
2	0.1 BAP + 0.1 GA3	1	4
		3	3
		6	3
3	0.5 BAP + 0.1 GA3	3	6
		4	4
		6	3
		8	5
		9	4
4	1.0 BAP + 0.1 GA3	1	10 (formo roseta)
		6	12 (formo roseta)
		7	9 (formo roseta)
		10	No desarrolló
5	1.5 BAP + 0.1 GA3	1	8 (formo roseta)
		5	9 (formo roseta)
		6	10 (formo roseta)
		9	8 (formo roseta)
6	0.1 BAP + 0.5 GA3	4	3
		5	2
		7	4
		10	3
7	0.5 BAP + 0.5 GA3	4	4
		8	3
8	1.0 BAP + 0.5 GA3	1	No desarrolló
9	1.5 BAP + 0.5 GA3	0	0
10	0.1 BAP + 1.0 GA3	5	4
11	0.5 BAP + 1.0 GA3	8	No desarrolló
12	1.0 BAP + 1.0 GA3	1	8 (formo roseta)
13	1.5 BAP + 1.0 GA3	3	10 (formo roseta)
14	0.1 BAP + 1.5 GA3	1	4
		2	3
15	0.5 BAP + 1.5 GA3	0	0
16	1.0 BAP + 1.5 GA3	0	0
17	1.5 BAP + 1.5 GA3	7	10 (formo roseta)

BAP = Bencil amino purina

GA₃ = Acido giberelico

7.7. Número de raíces por planta de izote pony

Las plantas presentaron únicamente una raíz principal, debido a que no se utilizó ningún regulador de crecimiento que estimulara la formación de raíces. Es necesario en la siguiente fase evaluar diferentes concentraciones de auxina para determinar qué concentración es la mejor para promover un buen enraizamiento en las plantas de izote pony, como se observa en el cuadro 10, donde ninguna planta formó más de una raíz, si no que únicamente solo una raíz principal, que no logró un buen desarrollo, como se observa en la figura 12.

Cuadro 10. Número de raíces por planta de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), a los 60 días de inoculado el explante.

Tratamiento	Combinación Hormonal mg/L	Formación de Plántulas a los 60 días	
		No. repetición con respuesta	Número de raíces
1	0 BAP + 0 GA3	0	0
		1	1
2	0.1 BAP + 0.1 GA3	3	1
		6	1
		3	1
3	0.5 BAP + 0.1 GA3	4	1
		6	1
		8	1
		9	1
		1	1
4	1.0 BAP + 0.1 GA3	6	1
		7	1
		10	1
5	1.5 BAP + 0.1 GA3	1	1
		5	1
		6	1
6	0.1 BAP + 0.5 GA3	9	1
		4	1
		5	1
		7	1
7	0.5 BAP + 0.5 GA3	10	1
		4	1
		8	1
8	1.0 BAP + 0.5 GA3	1	1
9	1.5 BAP + 0.5 GA3	6	0
10	0.1 BAP + 1.0 GA3	5	1
11	0.5 BAP + 1.0 GA3	8	No desarrolló
12	1.0 BAP + 1.0 GA3	1	1
13	1.5 BAP + 1.0 GA3	3	1
14	0.1 BAP + 1.5 GA3	1	1
		2	1
15	0.5 BAP + 1.5 GA3	0	0
16	1.0 BAP + 1.5 GA3	0	0
17	1.5 BAP + 1.5 GA3	7	1



Fig. 12. planta de izote, donde muestra un crecimiento limitado de raíz

8. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos sugieren las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de una solución desinfectante compuesta por una mezcla de antibióticos y funguicidas sistémicos (tetraciclina, amoxicilina, cloranfenicol, estreptomina a 500 mg/L, así como benomyl a 1000 mg/L y sulfato de cobre 1500 mg/L), es útil para el transporte de la semilla en el lugar de colecta. Esta misma solución es útil para realizar nuevas desinfecciones de la semilla en el laboratorio, previo a la extracción de embriones y siembra en los medios de cultivo.
2. Previo a la extracción de embriones, la semilla debe ser tratada de la siguiente manera: lavarla tres veces con agua destilada estéril; luego sumergirla en alcohol al 70% por tres minutos; lavar con agua destilada estéril; sumergirla en una solución de cloro comercial al 3% v/v por cinco minutos; finalmente lavarla nuevamente por tres veces con agua destilada estéril.
3. Para asegurar la desinfección del tejido, los embriones extraídos previos a la siembra en el medio de cultivo se trataron con una solución bactericida compuesta de tetraciclina + amoxicilina a 100 mg/L.
4. La aplicación de diferentes concentraciones de bencil amino purina y ácido giberelico al medio MS, utilizado para germinar embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), favoreció considerablemente la germinación, promoviéndola en los primeros 10 días de inoculado el explante, no así en el tratamiento testigo donde no se observó ningún embrión germinado.
5. La combinación de BAP y GA₃, que mostró un mayor número de embriones germinados de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), fue la dosis de 1.5 mg/L de bencil amino purina + 0.1 mg/L de ácido giberelico, presentando un 70% de germinación.
6. Las dosis arriba de 1.0 y 1.5 mg/L de BAP, favorecen considerablemente la germinación de los embriones de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), pero provocan daño al momento del crecimiento de los mismos, por lo que es necesario utilizarlo únicamente con fines de germinación.
7. La dosis arriba de 1.0 mg/L de BAP, promueven la germinación de embriones, pero estos una vez germinados, deben ser transferidos a medio MS suplementado con dosis igual o menor de 0.5 mg/L.
8. El tratamiento que presentó el mayor número de explantes vivos a los 60 días, después de inoculados los explantes fue la combinación de 0.5 BAP + 0.1 GA₃, en mg/L, presentando un 50% del total de embriones germinados en el tratamiento.

9. Los tratamientos con dosis de BAP y GA₃, entre 0.1 y 0.5 mg/L, presentaron plantas con crecimiento normal, a los 60 días de inoculados los explantes.
10. En los tratamientos donde el crecimiento de la planta fue normal presentaron un total de 3 a 5 hojas por cada planta, mientras donde se formó rosetas el número de hojas varió de 8 a 12 hojas.
11. Ninguna combinación de BAP y GA₃, favoreció en la formación y desarrollo de raíces en las plántulas obtenidas.

9. RECOMENDACIONES

1. Para obtener una buena desinfección de la semilla, es necesario mantenerla durante un periodo de 24 horas, en la solución desinfectante.
2. En la desinfección de la semilla, dentro de la campana de flujo laminar se recomienda utilizar cloro al 3%, durante un tiempo de 5 minutos, para evitar daños al embrión.
3. Para propagar adecuadamente el izote pony (*Beaucarnea recurvata*), se sugiere utilizar dosis de BAP entre 0.1 y 0.5 mg/L, combinados con dosis de GA₃ entre 0.5 y 1.0 mg/L.
4. Para favorecer la formación de raíces en la plantas de izote pony (*Beaucarnea recurvata*), es necesario evaluar diferentes dosis de reguladores de crecimiento, como el ácido naftalanacético o el ácido indol butírico en un rango de 0.1 a 1.0 mg/L.
5. El material que se utilizó fue semilla, por lo tanto, va a existir variación genética dentro de los materiales obtenidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. AGEXPRONT (Asociación Gremial de Exportadores de Productos no Tradicionales, GT) . s.f. Perfil de pony tail. Guatemala. 4 p.
2. _____ . 2000. National directory of exporters, of ornamentall plants, foliage ande flowers: Guatemala 1999-2000. Guatemala. p. 9–18.
3. Alvarado López, BE. 2004. Respuesta del izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose) a la propagación *in vitro*, utilizando tejido de semilla botánica como explante. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 47 p.
4. Amador, D. 2002. Curso de cultivo de tejidos vegetales (correspondencia personal). Guatemala, Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Area Tecnológica. 40 p.
5. Bidwell, RGS. 1983. Fisiología vegetal. Trad. por Guadalupe Jerónimo Cano, Manuel Rojas Garcidueñas. México, AGT. 784 p.
6. Cabrera Morales, A. 2003. Efecto de antioxidantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación *in vitro* del cultivo de yemas axilares de melocotón (*Prunus persica* (L) Batsch var. Salcajá). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 80 p.
7. Cronquist, A. 1984. Introducción a la botánica. Trad. por Antonio Marino Ambrosio. México, CECSA. 848 p.
8. Cultivo de tejidos. 1987. *In* Curso de cultivo de tejidos (2., 1987, CR); Curso regional sobre el cultivo de tejidos en café (2., 1987, CR). Turrialba, Costa Rica, IICA. p. 22-80.
9. DIGESA (Dirección General de Servicios Agrícolas, GT). 1990. Boletín del programa de exportación e importación de productos agrícolas del comercio exterior. Guatemala. 230 p.
10. Elías Hernández, EL. 2002. Determinación y caracterización de enfermedades fungosas y bacterianas en plantas ornamentales de follaje de caña en zonas de producción para exportación. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 57 p.
11. Hartmann, HT; Kester, DE. 1989. Propagación de plantas; principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. México, CECSA. 760 p.
12. ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, GT). 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala. 166 p.
13. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, ES). 2002. Laboratorio de cultivo de tejidos; cultivo de tejidos (en línea). España. Consultado 15 may 2002. Disponible en <http://www.inia.org.uy/investigación/biotecnologia/cultivos.htm>

14. Jiménez Mejías, R; Caballero Ruano, M. 1990. El cultivo industrial de plantas en maceta. España, REUS. 664 p.
15. Kanji, U. 1996. Principios básicos de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA / JOCV. 166 p.
16. Kanji, U. 1995. Cultivo de embriones de melocotón *in vitro*; informe final de las actividades realizadas desde mayo 1994, hasta septiembre 1996. Guatemala, ICTA. p. 24–35.
17. Maas Ibarra, RE. 1992. Inducción de enraizamiento en izote pony (*Beaucarnea guatemalensis* Rose.) con dos reguladores de crecimiento y dos colores de lienzo de polietileno. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 56 p.
18. Martínez Arroyo, FJ. 1992. Regeneración *in vitro* de cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a partir de brotes ápicales. Tesis Ing. Agr. Nuevo León, México, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. p. 3-30.
19. Mendoza Gaitan, NM. 2001. Respuesta de la zarzaparrilla (*Smilax domingensis* Willdenow) a la micropropagación, utilizando tejido embrionario. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 55 p.
20. Nason, A. 1982. Biología. México, LIMUSA. 726 p.
21. Ortega Orellana, EA. 2001. Prueba preliminar de propagación *in vitro* de shate (*Chamaedorea elegans* Martius) mediante embriones cigóticos. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 40 p.
22. Ramos Sierra, SA. 1994. Evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas en embriones inmaduros de trigo (*Triticum aestivum* L.) en las variedades de Chocoyo y Xequijel. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 41 p.
23. Samyn, GL. 1993. *In vitro* propagation pony tayl palm produce multiple shoot plants. Hortscience 28:225.
24. Sociedad Botánica de México, MX. 2003. XV congreso mexicano de botánica, conservación y manejo de recursos; XV congreso mexicano de botánica (en línea). México. Consultado 20 oct 2003. Disponible en [http:// www.socbot.org.mx/resumenes/resumenes.htm](http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumenes.htm)
25. Treviño, RJ. 1990. Estudio del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de *Coffea arabica* L. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, Universidad de Costa Rica. p. 170–178.
26. Villalobos, VM. 1986. Fundamento teórico-practico del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, FAO . 160 p.
27. Villegas, L. 1989. Cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola. Caracas, Venezuela, FAO. 218 p.

10. APÉNDICE

Cuadro 11. Concentración de los componentes para preparar un litro de solución del medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (1962).

COMPONENTES	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
MnSO ₄ .7H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Vitaminas	
Thiamina-HCl	0.10
Nicotinamida	0.50
Pyridoxina HCl	0.50
(iso-) o myo Inositol	100
glicina	2
Sucrosa	30000
Agar	0.7%
pH	5.7