

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Evaluación de métodos de desinfección de tejido, hormonas de crecimiento y hormonas de enraizamiento en la propagación de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) por medio del cultivo de meristemos

Trabajo de investigación presentado por José Guillermo Alvarado Zúñiga  
para optar al grado de Ingeniero Agrónomo

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Guatemala

2005



Evaluación de métodos de desinfección de tejido, hormonas de crecimiento y hormonas de enraizamiento en la propagación de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) por medio del cultivo de meristemos

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

Evaluación de métodos de desinfección de tejido, hormonas de crecimiento y hormonas de enraizamiento en la propagación de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis R.*) por medio del cultivo de meristemos

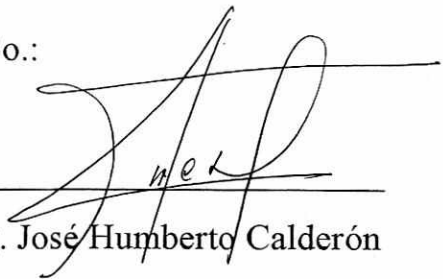
Trabajo de investigación presentado por José Guillermo Alvarado Zúñiga  
para optar al grado de Ingeniero Agrónomo

Guatemala

2005

Vo. Bo.:

(f)

  
Ing. José Humberto Calderón

Asesor

(f)

  
Lic. Marco Tulio Urizar

Asesor

Tribunal:

(f)

  
Ph. D. Rolando Cifuentes

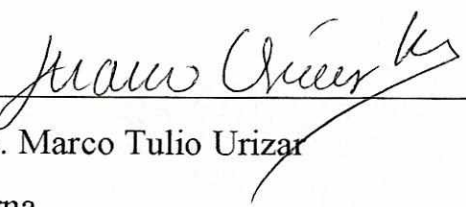
Terna

(f)

  
Ing. Monica Espinoza

Terna

(f)

  
Lic. Marco Tulio Urizar

Terna

Fecha de aprobación: 17 de junio de 2005

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS .....	vi
LISTA DE ILUSTRACIONES .....	viii
RESUMEN .....	ix
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	2
A. Justificación.....	2
B. Objetivos .....	3
C. Hipótesis .....	3
III. REVISIÓN LITERARIA.....	4
A. Marco conceptual.....	4
1. Historia de la biotecnología y el cultivo de tejidos .....	4
2. Áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos .....	6
3. Equipo para el laboratorio .....	7
4. Control preventivo de la contaminación microbiana .....	8
5. Esterilización .....	9
6. Preparación del explante .....	10
7. Procedimientos de esterilización .....	10
8. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	13
9. Propagación clonal <i>in vitro</i> .....	23
10. Propagación vegetativa convencional y su aplicación en la propagación clonal .....	25
11. Cultivo de <i>pony tail</i> .....	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
V. RESULTADOS .....	34
VI. DISCUSIÓN .....	37
VII. CONCLUSIONES .....	39
VIII. RECOMENDACIONES .....	40
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	41
X. APÉNDICES .....	47

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Presentaciones de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.) con mayor aceptación en el mercado.....	27
2. Exportaciones realizadas por Guatemala clasificadas por producto durante los años 2000-2003 .....	29
3. Estadísticas sobre las exportaciones de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.) de los años 1996-1999 de Guatemala. ....	29
4a. Componentes del medio MS y dosis utilizadas para la elaboración de 1 litro. ....	31
4b. Concentraciones de las hormonas de crecimiento utilizadas para la etapa de crecimiento. ....	31
5. Soluciones desinfectantes y las concentraciones utilizadas en cada tratamiento de desinfección. ....	32
6. Meristemas contaminados según tratamiento de desinfección y concentración del tratamiento de hormonas de crecimiento .....	34
7. Resumen del análisis de varianza relativo a los métodos de desinfección del explante. ....	34
8. Resumen de la contaminación de meristemas según el tratamiento de desinfección utilizado. ....	35
9. Número de meristemas y porcentaje de crecimiento total de meristemas por método de desinfección de tejido y tratamiento con hormonas de crecimiento. ....	35
10. Número de meristemas que desarrollaron raíces y porcentaje de desarrollo de raíces por tratamiento de hormonas de enraizamiento. ....	36
11. Resumen del análisis de varianza relativo a las concentraciones de hormonas de enraizamiento. ....	36
12. Características de reguladores de crecimiento y hormonas importantes. ....	55
13. Medio MS. Salts: Murashinge & Skoog .....	56

14. Solución Stock de Macronutrientes utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.).....	56
15. Solución Stock de Micronutrientes utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.).....	57
16. Solución Stock de Calcio utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.).....	57
17. Solución Stock de Hierro utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.).....	57
18. Solución Stock de Vitamina B5 utilizada en la preparación del medio MS para la propagación de <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R) .....	58

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración	Página
1. Distribución centroamericana del <i>pony tail</i> ( <i>Beaucarnea guatemalensis</i> R.) .....	28
2. Cronograma de actividades .....	59

## RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar el efecto de a) dos desinfectantes de tejido (cloro y ácido peracético), b) diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento (ácido naftalen acético, ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y bencil amino purina complementando al medio nutritivo desarrollado por Murashige & Skoog en 1962 y c) tres concentraciones de la hormona de enraizamiento ácido indol butírico, para la propagación del *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) por medio de la técnica de cultivo de meristemas. En general, los métodos de desinfección, las hormonas de crecimiento y la hormona de enraizamiento tienen un efecto similar en la propagación de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) por cultivo de meristemas, por lo que para fines de implementación de la metodología se puede utilizar cualquiera de las opciones evaluadas en cada etapa.

## I. INTRODUCCIÓN

Los países que conforman el llamado Tercer Mundo perciben la mayor parte de sus ingresos de la exportación de productos generados en actividades agropecuarias y de la explotación de sus recursos naturales. Guatemala no ha escapado a este proceso. A finales del siglo XVIII se inicia el proceso de exportación de Productos Tradicionales de Exportación (café, caña de azúcar, hule y banano) y en las tres últimas décadas se dan las condiciones para que se inicien las exportaciones de Productos No Tradicionales de Exportación (papaya, limón, melocotón, piña, aguacate, brócoli, arveja china, pitahaya, anturios, *pony tail* y otros).

El *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* Rose) se ha constituido en un recurso filogenético de gran valor económico y hoy se cataloga como un importante producto no tradicional de exportación, dentro del rubro de las plantas ornamentales y específicamente en el área de los follajes, tanto por los volúmenes que se exportan, como por los precios que alcanza en el mercado internacional.

El manejo de este cultivo no representa mayores problemas. Éstos se presentan en la reproducción de la planta, ya que ésta presenta un largo período de crecimiento previo a la floración (10 años aproximadamente) y su semilla presenta bajas tasas de germinación.

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido meristemático es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo.

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta herramienta permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos, plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. El enorme potencial que posee esta metodología ha propiciado que en los últimos 25 años se haya incrementado el número de laboratorios de cultivo de tejidos en el país para la producción comercial de plantas ornamentales y frutales lo que ha motivado que algunos productores de flores ornamentales la estén utilizando como una alternativa viable en sus programas de producción.

En el presente estudio se evaluaron varios factores a utilizar en la propagación por medio de la técnica de cultivo de meristemas de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.). Entre los factores evaluados se incluyeron: dos diferentes sustancias desinfectantes a dos diferentes concentraciones cada una en la desinfección del tejido, dos diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento y tres diferentes concentraciones de hormona de enraizamiento en el medio de cultivo.

## II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### A. Justificación

En Guatemala existe poco conocimiento de los métodos de propagación vegetativa eficientes para especies ornamentales nativas, producto de la falta de investigaciones científicas en este campo. Existe la necesidad de desarrollar métodos de propagación eficientes que permitan contar con material de siembra de mejor calidad y de forma sistematizada para el establecimiento de plantaciones, de tal manera que se aprovechen al máximo estas especies en un corto plazo.

A principios de la década de 1980, en Guatemala se principia a manejar la exportación de *pony tail* como planta ornamental. Esta planta presenta uno de los mercados más promisorios en el ámbito nacional e internacional y tiene una demanda estable y regular durante todo el año por lo que representa un nicho importante en el desarrollo socioeconómico del país. Primero, porque, por ser un cultivo de manejo constante, requiere de mano de obra. Segundo, porque muestra una tasa elevada de penetración y aceptación en el mercado nacional e internacional, lo cual evita las difíciles labores de inducción de consumo masivo de un nuevo producto.

Sin embargo, se presentan diferentes problemas que afectan la productividad de este cultivo. Necesita tener disponibles paquetes tecnológicos completos: plantas o semilla de óptima calidad, prácticas agronómicas adecuadas, así como un sistema de postcosecha conforme con los requerimientos del mercado.

El cultivo es tradicionalmente establecido mediante siembra de semillas. Sin embargo, esta propagación tradicional presenta problemas sanitarios y en la mayoría de casos presenta un bajo porcentaje de germinación y consume mucho tiempo y recursos.

La propagación por medio de cultivo de tejidos de especies vegetales representa la tecnología más eficaz para erradicar estos problemas.

Como no se cuenta con una metodología establecida para propagar este tipo de planta ornamental, que ha aumentado últimamente su demanda en el mercado, se ha elegido esta biotecnología debido a que ofrece una serie de ventajas, entre las cuales se pueden mencionar: uniformidad genética, manejo de grandes volúmenes de plantas en áreas pequeñas, florecimiento temprano, las plantas producidas *in vitro* están exentas del control sanitario y facilita el movimiento de grandes cantidades de plantas entre distintas zonas geográficas, entre otras.

Se utilizaron dos métodos de desinfección a diferentes concentraciones: uno, a base de hipoclorito de sodio, como fuente de cloro y método tradicional y otro alternativo, a base de ácido peracético, que es biodegradable, poco tóxico y de bajo costo. Con esto se pretende sustituir el uso de soluciones de cloro, que son tóxicas y afectan al ambiente, además de proponer un procedimiento con mayor bioseguridad.

Por otra parte, se utilizaron dos concentraciones diferentes de hormonas de crecimiento en el medio de cultivo y tres concentraciones diferentes de hormona de enraizamiento. Las dosis utilizadas son las recomendadas por la literatura, por el Laboratorio de Cultivos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala y por el Ing. José Calderón, quien anteriormente trabajó en el cultivo de tejidos del *pony tail*.

## B. Objetivos

1. **General.** Generar información para desarrollar una metodología de propagación *in vitro* de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) a través del cultivo de meristemos.

2. **Específicos.** Evaluar dos métodos de desinfección de tejido meristemático utilizando hipoclorito de sodio y ácido peracético, evaluar dos concentraciones de hormonas de crecimiento utilizando bencil amino purina (BAP), ácido giberélico ( $GA_3$ ) y ácido naftalen acético (NAA) y estimular el enraizamiento de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) utilizando ácido indol butírico (IBA) con tres diferentes concentraciones.

## C. Hipótesis

Los agentes desinfectantes (hipoclorito de sodio y ácido peracético), las diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento (BAP, NAA y  $GA_3$ ) y las diferentes concentraciones de hormona de enraizamiento (IBA) presentan un efecto similar en la propagación de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) en cada etapa del proceso utilizando la técnica de cultivo de meristemos.

### III. REVISIÓN LITERARIA

#### A. Marco Conceptual

1. Historia de la biotecnología y el cultivo de tejidos. Schleiden y Schwann en 1858 describen en su teoría celular, que la célula es capaz de subsistir por sí sola si las condiciones externas le son favorables.

A Morgan se le atribuye el término de la totipotencialidad celular propiamente dicho, que dice que una célula es capaz de desarrollarse hasta formar un organismo completo si las condiciones ambientales le son favorables y si se le aplican los estímulos adecuados.

Haberlandt, con la idea de la totipotencialidad celular, desarrolla el primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en 1902. Desafortunadamente sus trabajos no fueron exitosos debido a que utilizó un medio de cultivo relativamente simple y por otra parte, tejidos vegetales demasiado diferenciados. En 1909, se introduce el término gen para describir la unidad de herencia. En 1921, se obtiene el primer maíz híbrido comercial.

En 1926 dos científicos japoneses descubrieron un compuesto hormonal, actualmente de uso ordinario en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales denominado giberelina el cual es producido por un hongo *Gibberella fujikuroi*; este compuesto fue descubierto cuando ellos estudiaban la causa de la pudrición en plántulas de arroz. El efecto que producía dicha sustancia era un alargamiento excesivo en los tallos, sin desarrollo proporcional de la raíz. Actualmente se le atribuyen otros efectos como la inducción de germinación en semillas, brotación en algunos tubérculos como la papa etc.

White, en 1932, logra el primer cultivo *in vitro* estable utilizando en sus experimentos ápices de raíces de tomate. Los tejidos meristemáticos del ápice radical propiciaron crecimiento en longitud de los mismos en el medio de cultivo.

La falla en los intentos realizados por varios investigadores entre 1902 y 1932 se debió, como lo menciona White, a la mala elección del material vegetativo y a la simplicidad de los medios de cultivo utilizados.

El logro de White le da un buen impulso al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*; sin embargo en sus trabajos realizados hasta entonces no obtiene proliferación celular en forma, los ápices de raíz solo crecen en longitud como lo harían normalmente como parte de la raíz de la planta intacta.

No es sino hasta 1934 cuando Gautheret logra proliferación celular *in vitro* en tejidos cambiales provenientes de plantas adultas. En 1939 el mismo Gautheret, Nobecourt (en tejidos de zanahoria) y White (en tejidos de tabaco) publican casi simultáneamente la formación de una masa de células parenquimatosas (callo) a partir de los explantes (tejidos) utilizados en sus experimentos. Este hecho significativo constituye en sí el despegue de las técnicas de cultivo *in vitro*.

Un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento. Overbeek, en 1941, observa el efecto de una sustancia presente en el agua de coco que estimulaba la división celular (efecto citocinínico). Cuando el agua de coco se combinaba con 2,4-D, tenía un efecto positivo en el desarrollo de tejidos de zanahoria y papa (Caplin y Steward 1948, 1952).

En 1944, Avery, MacLeod y McCarty establecen que el ADN es el material genético investigando la transformación de las bacterias. E. Ball obtiene, en 1946, plantas completas de *Lupinus* y *Tropaeolum* partiendo de cultivos *in vitro* de ápices. Skoog y colaboradores observaron que el esperma de arenque, desnaturalizado por calor, tenía un efecto muy marcado en la formación de brotes a partir de tejidos de tabaco. De este ácido desoxirribonucleico (ADN) desnaturalizado, Miller y colaboradores aislaron un compuesto de naturaleza purínica denominado 6- furfuriil-aminopurina o cinetina.

En 1952, Morel y Martin obtienen plantas de dalia libres de virus mediante el cultivo de ápices *in vitro*. F. Skoog y C.O. Millar (1957) demuestran la interacción entre auxina y citocinina en la formación de órganos vegetales en los callos de tabaco.

En 1960, E. C. Cocking obtiene protoplastos de raíces empleando celulasa. En ese mismo año, Morel observa que el cultivo de puntas de brotes es un método promisorio para la propagación vegetativa rápida de las orquídeas.

En 1966, S. Guha, S.C. Maheshwari y J.P. Nitsch obtienen plantas haploides mediante el cultivo de anteras de *Datura* y de tabaco. G. Labib y G. Melchers regeneran plantas de tabaco a partir de cultivos de protoplastos.

Es en 1975 que se establece la primera empresa de Biotecnología dedicada a la agricultura.

En Guatemala, en la década de los 80, en el Laboratorio de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala, se realizan operaciones para la propagación por medio del cultivo de tejidos de diferentes especies vegetales, incluyendo arroz, trigo, cítricos, orquídeas y *pony tail* y estudios sobre el virus enrollador de la hoja de la papa y el virus del mosaico del cardamomo.

En octubre de 1994, se inicia la operación de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, en el Colegio Profesional de Biólogos del Estado de Veracruz A.C., México, con la finalidad de desarrollar técnicas para la propagación de especies vegetales de interés ecológico y económico.

En enero de 1995, se inician las labores de siembra de tejidos de especies ornamentales de interés económico en la región de Guatemala. A partir de esta fecha, se dan pláticas a cargo de investigadores nacionales como internacionales a estudiantes de las Facultades de Biología y Agronomía de diferentes universidades y se facilita la entrada y uso de laboratorios para que los alumnos se puedan capacitar en esta disciplina.

En 1998, se inician actividades de micropropagación de ápices en el Instituto de Ciencias y Tecnologías Agrícolas (ICTA), siendo las especies prioritarias la frambuesa, papa, vid y orquídeas. La producción anual de plantas se aproximaba a 20,000 individuos.

En el año 2000, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala comienza a trabajar, con propósitos de investigación, el cultivo y micropropagación de ápices de ajo, gypsophila, orquídeas y otras especies ornamentales.

En la actualidad son varias las empresas e instituciones nacionales que se han embarcado en el campo de la propagación por cultivo de tejidos.

2. **Áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos.** Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas separadas para diferentes funciones que se desarrollarán en él. Sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas o secciones principales son:

a. **Área de preparación.** Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico, y los reactivos químicos. Este ambiente debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios y para colocar las balanzas, el medidor de pH, los platos caliente con agitación, y otros elementos; también debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para el equipo de refrigeración, y para la incubadora o la cámara de crecimiento.

b. **Área de lavado y de esterilización.** Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente, y puede estar localizada dentro del área general de preparación. El área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada; para el efecto se debe usar un destilador de vidrio o de material no tóxico y un desionizador de agua colocado entre el destilador y el lavadero. Esta área debe disponer de un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe proveer basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se deseche. El área de esterilización debe tener espacio para el autoclave. Esta área también puede incluir espacio para estufas, secadores y un lavadero con agua caliente y fría.

c. **Área de transferencia.** En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de escisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Debido a que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo de aire. Sin embargo, ciertas operaciones de inoculación, como la escisión y el cultivo de ápices y meristemas en tubos de ensayo de boca angosta, se pueden realizar sobre una mesa limpia, ubicada en un lugar del laboratorio libre de corrientes de aire y polvo.

d. **Área de incubación.** Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental. El área de incubación o

crecimiento *in vitro* debe proporcionar un buen control de la temperatura, entre 20 y 28° C, de iluminación (variable, según las necesidades: de 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa, entre 70 y 80%. En el cuarto de incubación se instalan estanterías para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variables. Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces.

e. **Área de observación y examen.** Generalmente los microscopios (estéreo, compuesto, invertido y otros) se localizan tanto en el área de incubación como en la de transferencia, pero opcionalmente pueden estar en un área separada. El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos en los medios.

Las áreas arriba descritas se pueden considerar como el núcleo del laboratorio de cultivo de tejidos. Los laboratorios de investigación y desarrollo y los de producción comercial deben contar, además, con:

f. **Área de crecimiento.** Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o camas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en casas de malla o invernaderos, dependiendo de las condiciones climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias.

Después del trasplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, lo cual se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de plástico, etc.

g. **Áreas de cuarentena y de control fitosanitario.** Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales elites de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras. Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario. En el área de control sanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad del material vegetal, especialmente de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos.

La seguridad física del personal del laboratorio es importante; por esta razón se deben tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como duchas para baños del cuerpo entero y de los ojos. Lo más indicado es prevenir los accidentes con medidas de seguridad como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos (solventes orgánicos, ácidos, alcohol) ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio; la capacitación del personal en las técnicas de manipulación y uso apropiado del equipo, material de vidrio, reactivos, y otros elementos es la mejor forma de prevenir accidentes en el laboratorio.

3. **Equipo para el laboratorio.** Para poner en funcionamiento un laboratorio de cultivo de tejidos se requieren las siguientes piezas de equipo estándar:

- En el área de preparación: refrigerador, balanzas (una microbalanza y una de precisión), potenciómetro, plancha eléctrica con agitador magnético, frascos erlenmeyer (125, 250 y 500 ml), botellas y material de vidrio o plástico.

- En el área de lavado y esterilización: autoclave manual o automático (grande o de mesa), destilador de vidrio, gradillas para secado, bandejas de aluminio y de plástico de varios tamaños, recipientes de plástico grandes, y estufas para esterilización y secado.

- En el área de transferencia: gabinete de flujo laminar, microscopio de disección con luz incidente, e instrumentos de disección: cuchillas no. 10 y no. 11, mangos para cuchillas, agujas de disección, pinzas, tijeras, navaja de afeitar. También se necesitan frascos con alcohol, mechero de alcohol, máscaras, guantes, marcadores a prueba de agua, bandejas y basurero.

- En el área de incubación: un cuarto con temperatura, iluminación y humedad relativa controladas; estanterías con iluminación para los cultivos, bandejas, termómetros de máxima y mínima y gradillas para tubos de varios tamaños.

- En el área de examinación: microscopio estereoscópico, microscopio compuesto, lentes de aumento y elementos ópticos complementarios.

- En el área de crecimiento *in vitro*: macetas, sustrato, bandejas y cámaras de alta humedad.

Aunque no es esencial, otro equipo útil para algunas tareas del laboratorio o para trabajos de investigación y desarrollo incluye: microscopio invertido, microscopio compuesto con objetivo de inmersión, agitador (horizontal y el auxiliar de Steward) para cultivos en suspensión, centrifugadora de mesa, sistema de filtración para producir agua tipo reactivo, filtros para la esterilización de medios de cultivo, gabinete para el secado por aire caliente, lavadora de pipetas, desionizador de agua, gabinete para guardar solventes y congeladora. También se deben considerar las jeringas, pipetas y cajas Petri desechables, las pipetas Pasteur y automáticas, y los distribuidores automáticos. Son útiles además el horno de microondas, el extractor de vapores, las cámaras de crecimiento controladas y el propagador de nebulización.

**4. Control preventivo de la contaminación microbiana.** Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminadores.

Las siguientes son las fuentes de donde proceden los contaminadores; cada una requiere diversas medidas de prevención:

Los tejidos pueden llevar contaminadores en su superficie o en su interior, o en ambas partes. Los que lleva el explante sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar. En este último caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo. El tratamiento de las plantas donantes del explante por medio de altas temperaturas (de 35 a 40° C) también es efectivo para la obtención de segmentos de tejido libres de bacterias y hongos sistémicos.

En el área de trabajo, los contaminadores más comunes son las bacterias y las esporas de hongos que habitan en el ambiente. La utilización de cabinas o cuartos adaptados con un sistema de flujo laminar de aire, el cual penetra a través de filtros a prueba de microbios, permite mantener la asepsia durante el trabajo.

Si el área de trabajo carece de estas instalaciones, se hace necesario limpiar las paredes y las mesas con desinfectantes y trabajar en lo posible durante cortos periodos de tiempo.

Los instrumentos de trabajo se deben esterilizar antes de usarlos. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que los instrumentos inicialmente estériles pueden contaminarse con microbios del aire, de superficies vegetales mal desinfectadas, de las manos o de la exhalación del investigador.

Lo más aconsejable es trabajar con varios juegos de las mismas herramientas y mantener la asepsia de las que se han usado, colocando los instrumentos en alcohol etílico al 70% de 2 a 3 minutos, y flameándolos luego cuidadosamente. La exposición excesiva a la llama hace que el metal pierda temple y se oxide; además, se propicia la acumulación en el metal de materia orgánica carbonizada difícil de remover. Por lo tanto, se debe alternar el flameo hecho después de la inmersión de los instrumentos en alcohol, con la colocación de los mismos contra la corriente de aire de la cabina de trabajo para mantener su esterilidad mientras que el alcohol residual se evapora.

Existe la posibilidad de que, durante el tiempo transcurrido entre la esterilización de los recipientes con los medios de cultivo y el momento de usarlos, se localicen en su exterior ciertos contaminadores, de tal manera que se mantenga estéril sólo el interior de los tubos; por lo tanto, se debe flamear obligatoriamente la boca de cada tubo antes y después de sembrar el explante.

El investigador es una fuente primaria de contaminación. El uso de batas de laboratorio y de guantes limpios y la protección del cabello, la boca y la nariz reducen la contaminación. Las batas limpias y las máscaras son necesarias sobre todo cuando se trabaja en un laboratorio sin flujo laminar de aire. Es esencial que el investigador se limpie bien las manos y los brazos (lavándolos con líquido con desinfectante y agua y enjuagándolos con alcohol al 70%) antes de iniciar una sesión de trabajo.

**5. Esterilización.** La esterilización es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. Se dice que tales materiales o sitios son estériles o se han esterilizado. En la terminología médica se utiliza generalmente la palabra asepsia para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos patógenos; quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra aséptico como sinónimo de estéril.

La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos. Se utiliza la palabra axénico para las preparaciones que están libres de virus, tiroides o micoplasmas.

6. **Preparación del explante.** Generalmente se considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial.

La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), en concentraciones de 1% a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante. Sirve para la esterilización superficial de materiales de todo tipo, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora.

Durante muchos años se ha utilizado el NaOCl como un esterilizante superficial en los tejidos de las plantas (Wilson, 1915:423). Se supone que tiene la ventaja de que se enjuaga más fácilmente de las superficies después de la esterilización y así se eliminan los residuos oxidantes indeseables. A causa de la indeseable alcalinidad de cualquier hipoclorito residual, en algunas situaciones podría ser útil un enjuague rápido con agua acidulada (HCl en una solución muy diluida y en cantidad suficiente para neutralizar cualquier exceso de bases).

Como esterilizante superficial también se utiliza la solución de bicloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ). Sin embargo, este producto es altamente tóxico y se debe utilizar con mucha cautela; generalmente, basta con una solución acuosa entre 0.1% a 1.5% (p/v) y una exposición de 3 a 10 minutos para que la esterilización tenga efecto. El problema principal del bicloruro de mercurio no sólo es su naturaleza altamente venenosa y corrosiva, sino la dificultad para removerlo mediante el enjuague; a pesar de esto, tiene su valor en la esterilización (Yao y Krikorian, 1981:256).

7. **Procedimientos de esterilización.** El calor es uno de los agentes que se utiliza con más frecuencia en la esterilización. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor) o de calor seco (aire caliente); cuando se utiliza el calor húmedo puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión. Ocasionalmente se puede usar agua caliente pero no hirviendo.

El éxito en el logro de esterilidad en cualquier preparación depende de muchos factores, como son la naturaleza de la sustancia que se esteriliza, el volumen contenido en cada unidad, el tamaño del recipiente y el número de unidades que se pueden manejar en una sola operación. A continuación se presentan sugerencias generales relacionadas con los procedimientos de esterilización.

a. **Calor seco.** Los recipientes de vidrio secos que se utilizan para operaciones estériles se pueden esterilizar por medio de aire caliente; para el efecto se colocan en una estufa de aire caliente a una temperatura mínima de 170° C, preferiblemente durante dos horas, pero nunca menos de una hora. El algodón (debidamente envasado) a menudo se esteriliza por intervalos más largos, ya que tiende a contener esporas altamente resistentes; puesto que tanto el algodón como el papel toman un color marrón a temperatura de 190° C o superiores, para estos materiales se debe usar una temperatura menor de 170° C, manteniéndolos bajo ella por lo menos durante una hora.

Es obvio que todos los materiales esterilizados mediante calor seco deberán estar limpios, e incluso libres de trazas de materia orgánica.

b. Vapor bajo presión (autoclave). El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo (siempre y cuando no contengan componentes termolábiles).

El autoclave más utilizado actualmente en el laboratorio es la contraparte de mayor tamaño de la olla de presión común. Al utilizarlo, es necesario extraer todo el aire antes de empezar el proceso de esterilización ya que, a presiones iguales, la temperatura de una mezcla de aire y vapor no es tan alta como la del vapor puro; la extracción del aire se logra automáticamente al permitir que el vapor expulse el aire del aparato, antes de cerrar la válvula correspondiente. La temperatura dentro del autoclave se regula mediante la presión y es directamente proporcional a ésta; la presión se lee en un manómetro que forma parte del autoclave.

Para esterilizar los materiales relacionados con el cultivo de tejidos se acostumbra usar una presión de 15lb durante 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121° C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos. Sin embargo, se debe recalcar que el tiempo de exposición requerido dependerá tanto del tipo del material que se va a esterilizar como de su cantidad. Si se desea que la esterilización sea completa, el calor debe penetrar en cada porción del material; ninguna sustancia es estéril si queda en ella un organismo viable o espóra. La siguiente es una guía para presiones variables:

- 10 lb de presión (115.5° C) durante 30 minutos
- 15 lb de presión (121.5° C) durante 20 minutos
- 20 lb de presión (126.5° C) durante 15 minutos

Para las operaciones mayores se recomienda colocar detectores de esterilización en diferentes puntos dentro del autoclave o dentro de la masa de material que se trata, para asegurarse de que todas las partes han alcanzado la temperatura deseada.

c. Calor húmedo a 100° C. Con este método probablemente sea suficiente una sola exposición de 15 minutos al calor vivo (100° C) para matar todas las formas vegetativas microbianas. Sin embargo, así no se atan necesariamente todas las formas de espóra y puede ser práctico, por consiguiente, efectuar la esterilización intermitente, siempre y cuando se disponga de cierto equipo. En este caso, la exposición puede ser de 30 a 60 minutos y se repite diariamente durante tres días consecutivos, conservando el material a la temperatura del cuarto o en una incubadora entre una exposición y otra. Teóricamente la primera exposición destruye todas las formas microbianas; durante las próximas 24 horas, generalmente germinan las esporas convirtiéndose en formas vegetativas que mueren en la segunda exposición; la tercera exposición es simplemente un medio de prevención para destruir las esporas vivas que hayan podido tener una germinación lenta.

A veces el procedimiento se modifica utilizando temperaturas inferiores a la del agua hirviendo y aumentando el número de las exposiciones hasta cuando haya una seguridad razonable de esterilidad. Se utilizan temperaturas de 60 a 80° C y se repiten sucesivamente las exposiciones durante 4 a 7 días.

Este método del calor húmedo a 100° C, conocido como método de Koch se utiliza en la esterilización de medios que contienen componentes capaces de soportar la exposición a temperaturas de vapor vivo, pero no a las temperaturas mayores que tiene el vapor bajo presión.

No obstante, este método no está exento de problemas; las esporas pueden no desarrollarse en las soluciones no nutritivas como el agua corriente, por lo cual se recomienda reemplazarlo, cuando sea posible, por el método de filtración; sin embargo, se menciona como una alternativa cuando no se dispone de las instalaciones o medios para esterilizar por filtración.

En términos generales, los medios para el cultivo de tejidos de plantas son bastante ricos en componentes que pueden servir de sustento a los microorganismos y existe la posibilidad de que los contaminantes aparezcan durante los intervalos sucesivos.

**d. Filtración.** La esterilización de líquidos va acompañada rutinariamente de la filtración a través de filtros especiales a prueba de hongos y bacterias. Es claro que los filtros y otros aparatos se deben esterilizar antes de tratar de utilizarlos para remover los contaminantes de un líquido.

Obviamente el tamaño del poro es el principal factor en la capacidad de retención de bacterias de estos filtros; otros factores que afectan la penetrabilidad del filtro por los microorganismos son el pH, la carga eléctrica del material filtrado, la temperatura, la presión y la duración del procedimiento de filtración así como el efecto de la absorción de proteínas y otras sustancias en el filtro; también puede haber contaminación en el filtrado a causa de una presión excesiva en el filtro o de fugas de las líneas al vacío cuando se utiliza presión negativa.

En el mercado se encuentra una amplia gama de aparatos de filtración entre los cuales está el *millipore*. Se encuentran disponibles además los filtros desechables que, aunque costosos, pueden ahorrar tiempo y son preesterilizados.

**e. Limpieza de los recipientes de vidrio.** La limpieza de los recipientes de vidrio y otros utensilios es de importancia vital en el trabajo de cultivo de tejidos vegetales. Nunca se debe utilizar jabón; cuando sea posible, se deben adoptar detergentes que se laven y enjuaguen fácilmente. Se debe utilizar agua caliente con el detergente, enjuagar luego con agua caliente sola, hacerlo después con agua desionizada y finalmente con agua destilada.

Bajo circunstancias especiales puede ser necesario exponer los recipientes de vidrio a soluciones limpiadoras de ácido crómico, durante varias horas. Pero es necesario reconocer que sería imposible remover los iones de cromato residuales y que éstos a su vez serían dañinos o tóxicos para las células y tejidos de las plantas (Richards, 1936:250; Henry y Smith., 1946:426; Butler y Johnston, 1954:543).

Adicionalmente, las soluciones limpiadoras son peligrosas y se debe utilizar con cautela para evitar quemaduras y problemas de contaminación ambiental. Los residuos de iones de cromo se podrían remover lavando con detergente, pero el proceso de limpieza se volvería más intensivo en el uso de recursos humanos.

También existen soluciones inorgánicas para el lavado, las cuales son tan efectivas como las soluciones de ácido crómico y, a diferencia de ellas, se dice que son inocuas para el medio ambiente.

8. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Esta acepción amplia, si bien imprecisa, es actualmente aceptada; sin embargo, existen sugerencias de algunos autores (Street, 1977:7; Steward y Caplin, 1951:519) para restringir su empleo.

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: i) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; ii) bioconversión y producción de compuestos útiles; iii) incremento de la variabilidad genética; iv) obtención de plantas libres de patógenos; v) propagación de plantas; y vi) conservación e intercambio de germoplasma.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido. En otras palabras, las técnicas que se emplean para cultivar protoplastos no son exactamente las mismas que se usan para cultivar meristemos; del mismo modo, un determinado sistema de cultivo puede ser de gran utilidad para el logro de un objetivo pero puede no ser útil para otro.

La respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Es necesario recalcar que, para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras.

a. Explante. La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que cultivado en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemos caulinares, en hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la

proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados.

En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callos no esté limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro*; es probable que en estos casos se opte por explantes proveniente de plantas jóvenes que crecen en invernaderos, y una alternativa interesante sería usar los provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. Sin embargo, hay otros vegetales más recalcitrantes en lo que respecta a la obtención de callos, y en estos casos se hace necesario utilizar ciertos explantes; esto ocurre con muchas plantas leñosas y algunas gramíneas.

La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. El establecimiento de cultivos que persiguen determinados objetivos puede limitar aún más la elección del tipo de explante. Para la obtención de haploides se cultivan anteras y, en menor medida, inflorescencias, microsporas u ovarios. Para la obtención de plantas libres de patógenos se cultivan meristemos, lo mismo que para la conservación de germoplasma.

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado.

Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para obviar este efecto del genotipo del material vegetal.

Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. El éxito en la obtención de plantas haploides por cultivo de anteras depende en gran medida de su estado de desarrollo al momento de su cultivo (Mroginski, 1975:103; Sunderland, 1974:115). La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explante provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980:27; Dodds, 1983:178); en planta herbáceas, la regeneración de plantas a partir de hojas está limitada al empleo de explantes jóvenes (Mroginski, 1975:109; Rubluo *et al.*, 1982:151).

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

El efecto del tamaño del explante puede apreciarse en cualquier sistema de cultivo e independientemente de la fuente de donde proviene dicho explante; su importancia ha sido señalada en cultivos de meristemos (Hu y Wang, 1983:185), anteras (Xu y Sunderland, 1982:964), suspensiones celulares (Street, 1977:8), embriones (Monnier, 1976:113) y protoplastos (Kao y Michayluk, 1980:137). En general, el cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios

acondicionados (Street, 1977:6); otra alternativa es el cultivo de varios explantes en un mismo recipiente, en lugar de su incubación en forma individual.

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

b. Asepsia. La asociación explante – medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo.

Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en los cultivos. Hecha esta salvedad, para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: i) trabajar en ambientes adecuados; ii) esterilizar los medios de cultivo; iii) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y iv) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia antes descritas.

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico (agua de lavandina). Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio  $[Ca(OCl)_2]$ , 6% a 12% y el cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ , 0.1% a 1.5%), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante.

En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tenso activo (*v.gr.* Tween-20, del 0.01% al 0.1%), pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol 70%. Asimismo, es conveniente agitar (entre 80 y 150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante.

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la cámara de transferencia. Es aconsejable lavar los explantes con un volumen de 10 a 20 veces mayor de agua estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos.

Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes. Sin embargo, en general, su empleo solamente se justifica en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los antibióticos implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos; además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes.

El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicida o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad.

Por asepsia en el establecimiento y ulterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas a que se llevan a cabo en la cámara de transferencia, así:

- Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.

- Es necesario que las manos y, eventualmente, los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%. El uso de máscaras y gorros no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.

- Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones (generalmente cajas Petri) debe estar esterilizado al igual que las pipetas que comúnmente se usan en trabajos con suspensiones celulares y protoplastos.

- Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero. Evitar exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos.

c. Medios de cultivo. Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación.

1) Componentes del medio. En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

- Carbono
- Nutrientes minerales
- Vitaminas
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- Sustancias reguladoras del crecimiento
- Otros compuestos

Generalmente se hace referencia al conjunto de componentes a + b + c como medio basal (MB).

a) Fuentes de carbono. Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2% a 5%) es el azúcar que más se utiliza, y se puede

reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas. La incorporación de mioinositol al medio (100 mg/litro) generalmente da como resultado un mejor crecimiento de los callos y suspensiones celulares.

b) Nutrientes minerales. Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micro nutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. En los medios de reciente desarrollo (MS, B5, N6) cabe destacar las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio con respecto al medio de White. El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y amonio; aunque los cultivos pueden prosperar con solo nitrato o solo amonio como fuente nitrogenada, en este último caso el medio debe contener también ácido cítrico, succínico o málico. Otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada (CH).

Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en concentraciones de 1 a 3 mM. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) lo hace disponible en un amplio rango de pH.

c) Vitaminas. Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina.

d) Agente gelificantes. En los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

e) Reguladores de crecimiento. En algunos casos se obtienen en los cultivos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del medio basal sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas.

Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-D, ANA, AIA y AIB; las citocininas que más se emplean son: KIN, BAP y ZEA.

Las giberelinas, especialmente el  $\text{AG}_3$ , han demostrado ser necesaria para el cultivo de ápices o meristemos caulinares de varias especies vegetales. El ácido absísico (ABA) se emplea en ocasiones.

f) Otros componentes. Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos, y otros. Entre ellos están el agua de coco, AC (5% a 15%, v/v), el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura y el extracto de tubérculos de papa.

Además de glicina, en ocasiones se incorporan al medio otros aminoácidos como asparagina, cistina y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios e inclusive, en concentraciones relativamente altas, pueden tener efectos inhibitorios sobre los cultivos.

En algunos medios se adicionan ácidos orgánicos como el cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico, como precursores de aminoácidos; también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (0.1% a 1%).

El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de los explantes. En estos casos también es útil usar las soluciones antioxidantes durante la preparación del explante, como también incubar los cultivos en la oscuridad o a bajas intensidades de luz. También se suele acortar el intervalo de tiempo entre subcultivos, como un medio para disminuir los efectos nocivos de la oxidación de polifenoles.

El carbón activado (0.1% a 5%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos.

2) Preparación del medio de cultivo. Es necesario preparar el medio utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada-destilada (H<sub>2</sub>O, DD). Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá, en primera instancia, del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. En general, se pueden distinguir:

a) Medio semisólidos sin sustancias termolábiles; su preparación consta de los siguientes pasos:

- Incorporación del medio basal, de los reguladores de crecimiento o de otros compuestos. Ajuste del pH.
- Adición y disolución del agar. Distribución en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.).
- Esterilización en el autoclave.

b) Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles. Para su preparación se sigue el mismo procedimiento de a., pero sin adicionar agar, y haciendo esterilización por filtración en el caso de medios que contengan sustancias termolábiles.

c) Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles. Para su preparación se sugieren las siguientes operaciones:

- Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos). Ajuste del pH.
- Adición y disolución del agar y posterior esterilización en el autoclave.
- Incorporación (operando en la cámara de transferencia) de la(s) sustancia(s) termolábil(es), previamente esterilizada(s) por filtración. Los componentes esterilizados (paso 3) se deben mantener a una temperatura entre 40 y 50° C.
- Distribución (operando en la cámara de transferencia) del medio en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.) previamente esterilizados en el autoclave.

3) Condiciones ambientales para la incubación. Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martin, 1980:145; Hughes, 1981:286), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert y Kadkade, 1980:134; Hughes, 1981:288).

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo *luz de día*) y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo / escotoperíodo de 16/8 h. En general, temperaturas entre 25 y 28° C son adecuadas para el establecimiento de los cultivos.

#### 4) Generalidades, composición y preparación.

a) Principios generales y estrategias de diseño. Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, 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 crecimiento se hace evidente sólo cuando se considera un crecimiento largo y continuado o potencialmente indefinido. Aunque una planta verde intacta es autótrofa, las células de sus regiones de crecimiento pueden ser acentuadamente heterótrofas y requerir la aplicación de un número de estimulantes orgánicos complejos que, en el caso de la planta intacta, generalmente se derivan de las células verdes.

b) Medio basal: elementos minerales. El primer objetivo de la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macro elementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los micro elementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl); además, existe evidencia de que se debería añadir níquel en la lista (Eskew, 1984:622).

En los primeros tiempos del estudio de la nutrición mineral, los investigadores solían suministrar los elementos por medio de soluciones de cultivo de tres sales:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{MgSO}_4$ ; se incluía un poco de hierro, generalmente como fosfato ferroso  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ . Actualmente se sabe que los micro elementos se suministraban involuntariamente como contaminantes. El conocimiento acerca de los requerimientos de nutrimentos minerales y de la formulación de las soluciones ha progresado mucho desde esos primeros tiempos (Hewitt, 1966; Lauchli, 1983; Saric, 1983), pero cabe recordar la base tan antigua de las fórmulas más recientes.

c) Nomenclatura general. Existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan corrientemente en el cultivo de tejidos vegetales (Dougall, 1972:376; Kruse y Patterson, 1973; Gamborg *et al.*, 1976:153; Rechcigl, 1977; Thorpe, 1981; George y Sherrington., 1984). Según se mencionó antes, estas fórmulas generalmente recibieron su nombre de investigadores; hubiese sido preferible que nunca se hubieran adoptado estos nombres como códigos de fórmulas específicas, pero el hecho es que se han utilizado así.

Con el fin de evitar cualquier posible confusión se definirán las sales minerales como el medio basal; una B mayúscula indica que se trata de sales minerales. Si se utiliza la fórmula de sales minerales de Murashige y Skoog, la designamos como  $B_{MS}$ ; si se utilizan las sales minerales de White entonces escribimos  $B_W$ ; las de Shenck y Hildebrandt se reducen a  $B_{SH}$  y así sucesivamente. Si la concentración de las sales se disminuye a un cuarto o a la mitad, o si se aumenta al doble o a otro factor, se deben hacer los respectivos ajustes al subíndice; por ejemplo:  $B_{MS}^{1/4}$ , o  $B_{MS}^{1/2}$  o  $B_{MS \times 2}$ .

Como ha habido una confusión considerable en relación con las fórmulas de hierro que se han utilizado o se utilizan actualmente en varios laboratorios, se recomienda suministrar con precisión la que se utilice (Singh y Krikorian, 1980:808). La fuente de carbono se designa más convenientemente por el porcentaje del peso en el volumen (p/v). Aditivos como las vitaminas, el nitrógeno reducido en forma de caseína hidrolizada (ácida o enzimáticamente) o el inositol pueden designarse por + CH (seguido por la cantidad exacta), o + INOS (seguido por la cantidad exacta), respectivamente. Los aditivos tales como el AC y los reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas o giberelinas) también pueden designarse por las abreviaturas correspondientes.

d) Componentes del medio de cultivo. Casi cualquiera de las fórmulas salinas basales de las soluciones de cultivo que se tienen actualmente como estándar debería ser más que suficiente para suministrar un mínimo esencial de los elementos requeridos. Sin embargo, sería útil ensayar estas soluciones a diferentes concentraciones totales.

Todos los medios parecen beneficiarse en cierto grado con los suplementos vitamínicos, a menos que las células se vuelvan verdes o hasta que ello ocurra; los aditivos mínimos usuales son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina. Por consiguiente, los suplementos vitamínicos son más o menos estándar; en realidad, la tiamina - HCl, como única vitamina añadida, puede ser suficiente en muchos casos (Linsmaier y Skoog, 1965:113).

Las principales diferencias entre los medios de cultivo se relacionan con los diferentes compuestos utilizados para estimular la división celular. Para esto, se emplean generalmente: AC (5-15% v/w), o también 2,4-D, ANA, AIA, o benzotiazol-2-oxiacético (BTOA) solos o en combinación con el AC; éstos han resultado, generalmente adecuados para iniciar y mantener cultivos de callos de la mayoría de los tejidos de plantas.

d.1) Micro elementos suplementarios. Los microelementos presentan un problema especial. Se supone que todos los conocidos y necesarios para las plantas enteras lo son también para las células y

tejidos cultivados. En resumen, un medio de cultivo general (preparado con reactivos analíticos), con un suplemento de AC, muy raras veces resulta tóxico o deficiente a causa de los micro elementos.

Nuevamente, el crecimiento está más limitado por las sustancias promotoras de la división celular que por los micro elementos; sin embargo, cuando estas sustancias se conozcan totalmente, se puede investigar acerca de sus interacciones con los macro o los micro elementos.

d.1.1) Agua de coco y otros endospermas líquidos. En 1942, van Overbeek, Conklin y Blakeslee mostraron que los embriones en desarrollo de *Datura* se podían cultivar *in vitro* hasta su madurez, utilizando el endosperma líquido del coco (*Cocos nucifera*) como suplemento de un medio de cultivo estándar (van Overbeek *et al.*, 1942:475; van Oberbeek, 1942:130). Rápidamente aparecieron otros usos del agua de coco (Ball, 1946:310).

En 1948, Caplin y Steward se dieron cuenta del potencial del agua de coco para inducir la división celular en tejidos diferenciados; lo observaron por primera vez en el parénquima del floema secundario de la raíz de la zanahoria cultivada. Se sabía que el agua de coco era sólo uno de los líquidos que, al ser nutritivos para los embriones inmaduros, podía producir el mismo efecto en tejidos y en células explantadas.

El endosperma líquido de *Zea mays* suministra una fuente alterna del agua de coco para promover el crecimiento, pero con una diferencia importante. En el coco, una gran cantidad de endosperma líquido se desarrolla muy precozmente, y sirve para almacenar nutrimentos para el embrión en desarrollo; mientras el embrión siga latente, el endosperma líquido del coco inducirá la división celular. En el maíz, el endosperma crece inmediatamente después de la fertilización, y sólo en la llamada etapa lechosa presenta una actividad estimuladora del crecimiento; esto generalmente ocurre, como máximo, dos semanas después de la polinización. En la madurez del grano, la actividad casi desaparece.

Los endospermas líquidos de los *Juglans* (nuez) (Steward y Caplin., 1952:497) y de *Aesculus woerlitzensis* (castaña de Indias) (Steward y Shantz, 1959:387) provocan respuestas similares a las del agua de coco (Shantz, 1964:425).

Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco, a niveles relativamente bajos (de 5% a 10% v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí sola era ineficiente. El uso del agua de coco y de 2,4-D en tubérculos de papa (Steward y Caplin, 1951:519) y del agua de coco y ANA por Morel y Wetmore (1951:139) en las monocotiledóneas, fueron otros progresos importantes. Estas observaciones constituyen las bases para el uso del agua de coco y sus sinergias en la nutrición de células y tejidos cultivados *in vitro*.

d.2) Aminoácidos como suplementos del medio basal. Generalmente se ha reconocido que los aminoácidos, suministrados como extracto de levadura (Sandstedt y Skoog, 1960:254) o como CH (Shantz., 1964:430), pueden promover el crecimiento de ciertos cultivos. Otros investigadores han encontrado que algunos aminoácidos en forma individual pueden ser inhibidores mientras que otros no lo son.

Frecuentemente, y por razones que no son claras, los aminoácidos adicionados al medio de cultivo corresponden a la forma *dl*, la cual es a menudo inhibidora, mientras la forma *l* es benéfica; además, obtener muestras estrictamente puras de muchas de estas sustancias es más difícil de lo que se espera. Por otra parte, si los aminoácidos se esterilizan en un autoclave en contacto con un medio de cultivo, a menudo los compuestos de nitrógeno simples producen muchos otros que pueden ser inhibidores.

En cualquier caso, el papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales cultivadas se debe considerar como un problema complejo, ya que muchos tejidos responden diferentemente a los suplementos de aminoácidos.

d.3) Vitaminas. Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por conveniencia. Desde hace mucho tiempo se sabe que las puntas radicales escindidas son incapaces de sintetizar la tiamina y presentan un requerimiento definitivo por la misma cuando se van a cultivar continuamente. En realidad, en la planta intacta las raíces deben obtener su tiamina del vástago donde es sintetizada.

Otras vitaminas (ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina) pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias. El ácido ascórbico (de 10 a 100 mg/litro) se considera benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben el crecimiento, y no debido a su papel como vitamina.

d.4) Reguladores del crecimiento. Se sabe que las líneas habituadas y los tumores son capaces de proliferar en un medio compuesto estrictamente de sales inorgánicas, una fuente de carbono y una o dos vitaminas. Por otra parte, hay una gran cantidad de tejidos que no crecen en este medio mínimo; estos últimos tejidos, que se supone son normales, sólo crecerán cuando se les suministre alguna sustancia reguladora del crecimiento. Las sustancias reguladoras (auxinas, citocininas, giberelinas, etc.) se pueden suministrar en forma de endospermas líquidos como el agua de coco o de compuestos químicos más definidos.

d.5) Relaciones entre los componentes del medio. A menudo es difícil ver las relaciones estructurales entre los varios compuestos químicos que poseen una actividad fisiológica, según se ha encontrado en pruebas de crecimiento ampliamente diferentes; el hecho de que tales compuestos puedan funcionar en algunos casos sugiere que se ensayen por lo menos en casos difíciles. La mayor parte del trabajo realizado sobre cultivo de tejidos ha girado alrededor del uso del agua de coco en presencia o en ausencia de AIA, ANA, 2,4-D o BTOA. En los casos en que los tejidos son especialmente recalcitrantes, se debería ensayar también una amplia gama de otros compuestos conocidos por sus propiedades estimuladoras del crecimiento.

d.6) El pH y otras condiciones del cultivo. Narayanaswamy y Norstog (1964:615) y Raghavan (1966:55; 1976) han revisado exhaustivamente la literatura en relación con los efectos del pH del medio, de

la temperatura y la luz y de los gases en cultivos de embriones; los mismo se aplica también a los cultivos de células y tejidos. Es suficiente decir que una especie particular puede reaccionar favorablemente a un conjunto de condiciones mientras que otras pueden no hacerlo; por consiguiente, la tarea de decidir las condiciones de cultivo adecuadas puede requerir, en algunos casos, una decisión por el método de ensayo y error (Seibert y Kadkade, 1980:134; Martin, 1980:145).

Aunque generalmente se supone que los cultivos de tejidos de plantas pueden sobrevivir en un amplio rango de pH, Steward y Caplin (1952:496), encontraron que un medio levemente ácido (pH 6.25) era óptimo para los cultivos de zanahoria. Los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4.0 a 5.5, en ausencia de varios suplementos de crecimiento. En la mayoría de los casos se requerirá ajustar el pH, aumentándolo con una solución 0.01 ó 0.1 N de hidróxido de potasio o de sodio; normalmente, el ajuste del pH se hace a 5.5, 5.8 ó 6.3 (Arditti, 1977:266).

d.7) Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos. El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos – nutrientes, azúcar y hormonas – como del agente gelatinizador (Romberger y Tabor, 1971:137; Bending, 1974:335; Lorz *et al.*, 1983:220).

El agar comercial contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del medio, afectando así directamente los tejidos y células cultivados (Kohlembach y Wernicke, 1978:468; Singha *et al.*, 1985:409).

Se han sugerido varias alternativas para el agar en el cultivo de tejidos. Entre los agentes gelatinizadores propuestos para el cultivo de tejidos se encuentra la azarosa, alginato y gelrita. El tipo y la concentración de los agentes gelatinizadores pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios cultivos de tejidos y sistemas de cultivo como la micro propagación, la inducción de raíces, el cultivo de protoplastos, y el cultivo de anteras.

9. Propagación clonal *in vitro*. Herbert J. Webber, un fitomejorador del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, introdujo el término “clon” en 1903, y lo aplicó a las plantas cultivadas que se propagaban vegetativamente. Esta palabra proporcionaba una forma clara de decir que “las plantas cultivadas de tales partes vegetativas no son individuos en el sentido común de la palabra, sino que simplemente son partes trasplantadas del mismo individuo; en términos de herencia, tales plantas son el mismo individuo”.

En 1912 el genetista George H. Shull consideró necesario limitar el uso de la palabra clon a la designación de organismos genotípicamente idénticos. Shull dio la siguiente definición: “clon es un grupo de individuos que pueden ser rastreados mediante reproducciones asexuales hasta un solo cigoto ancestral o perpetuamente asexual”.

a. **Vías para la multiplicación clonal.** Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal; entre ellas están:

1) Cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares. En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático. Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples.

En realidad, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto, el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas.

2) Organogénesis directa. Durante muchos años se han conocido sistemas mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemas adventicios llevan rápidamente este enfoque.

3) Organogénesis indirecta. En términos generales, en los cultivos de callos se inducen proliferaciones más o menos aleatorias, a partir de explantes tomados de varias partes de plantas, para formar brotes y raíces.

Para quienes buscan la multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal, tal vez sea favorable que la ruta de la organogénesis indirecta no se comprenda bien, ya que ciertas evidencias sugieren que la formación de callos en estos sistemas constituye a menudo la base para obtener variación genética e inestabilidad. Muchos investigadores recomiendan por ello que se evite este procedimiento en el clonaje aséptico de plantas. Por otra parte, quienes buscan utilizar la organogénesis indirecta por la vía del callo como un medio para fomentar la variación somaclonal y producir así un cambio deseado en el genotipo o el fenotipo (Earle y Demarly, 1983), se encuentran a veces restringidas por falta de conocimiento suficientes sobre la estimulación de la morfogénesis a partir de callos presumiblemente no diferenciados.

4) Embriogénesis somática. El nivel de precisión con que el proceso de embriogénesis somática simula la embriogénesis cigótica puede variar considerablemente pero, en general, la simulación es considerable. La gran mayoría de los sistemas que forman embriones somáticos lo hacen mediante la llamada ruta indirecta.

La embriogénesis somática puede ocurrir por medio de la ruta directa, pero con menor frecuencia que por la ruta indirecta; en el primer caso, las células del explante primario son la fuente de los embriones

somáticos sin que haya una etapa de callo. Este hecho se podría describir mejor como una formación accidental del embrión, ya que evoca situaciones similares que ocurren en el cuerpo intacto de la planta *in situ*.

En ciertos casos los embriones somáticos que se forman, ya sea directa o indirectamente, pueden seguir una modalidad de crecimiento que se describe mejor como gemación; en ella, los nuevos embriones somáticos se originan directamente de embriones somáticos preexistentes sin que intervenga una etapa de callo.

b. Etapas de la propagación *in vitro*. Murashige y otros encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

1) Etapa I. Es la etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario.

2) Etapa II. Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

3) Etapa III. Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

Frecuentemente, las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas con cada una de las etapas mencionadas y, cuando sea posible, conviene organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones. Sin embargo, no se debe llegar a la deducción de que estas etapas son siempre completamente distintas y separables.

Además de las tres etapas mencionadas pueden considerarse otras dos como parte integral del procedimiento:

4) Etapa IV. Transferencia final a la etapa de medio ambiente.

5) Etapa 0. Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

10. Propagación vegetativa convencional y su aplicación a la propagación clonal. El primero de varios requisitos que tienen que cumplirse cuando se desea lograr una manipulación exitosa en el cultivo aséptico es familiarizarse, tanto como sea posible, con la biología de la planta con la cual se trabaja. Esto significa que los aspectos de la regeneración vegetativa convencional tienen particular importancia cuando se trata de multiplicar clonalmente las plantas mediante cualquiera de las técnicas de cultivo aséptico mencionadas hasta el momento.

El desarrollo de modalidades de crecimiento especializado o de órganos para la regeneración es particularmente significativo, ya que si el explante se hace en el momento adecuado y si se le suministra el medio de cultivo correcto, puede dar origen a un sistema *in vitro* que imita o simula el natural. Esto significa que las habilidades en la propagación vegetativa son de provecho para la persona que trabaja en el

cultivo de tejidos (Browse, 1979; Hartmann y Kester., 1984; Cook, 1984:57). Igualmente, es esencial tener una buena comprensión de los reguladores de crecimiento y de las relaciones hormonales.

En teoría, todas las células de las plantas son totipotentes, o sea capaces de dar origen a una planta entera; aunque hasta el momento las puntas del tallo han tenido mayor importancia para la multiplicación clonal en varias especies, también se han utilizado otros explantes como hojas, ovarios, y capullos de flores para obtener plántulas. La capacidad que tienen los distintos explantes cultivados *in vitro* para regenerar plantas está correlacionada, aunque no invariablemente, con el hecho de que incluso bajo condiciones corrientes pueden responder en forma similar.

Cuando se considera que la mayoría de las plantas se propagan mediante el cultivo aséptico se originan generalmente en pequeños esquejes. La palabra micro propagación, utilizada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester en su libro sobre propagación de plantas, parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*.

Originalmente, la micro propagación se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. Hasta el momento, las puntas de tallos y las yemas laterales han sido los explantes más comúnmente utilizados para la Etapa I. Por esta razón, cuando se usa la palabra micro propagación muy raras veces se piensa en el uso de callos, de células libres o de otros sistemas de tejidos más exigentes.

Las plantas que pueden multiplicarse o propagarse por medios vegetativos convencionales no siempre responden igualmente bien a los métodos artificiales de propagación vegetativa.

## 11. Cultivo de *pony tail*.

a. Clasificación taxonómica del *pony tail* (Cronquist, 1984:30; Standley y Stermark, 1952:70).

Reino: Plantae

Subreino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Lillidae

Orden: Liliales

Familia: Liliaceae o Agavaceae

Género: *Beaucarnea*

Especie: *Beaucarnea guatemalensis* Rose. 1906

b. **Descripción morfológica.** Se considera que las plantas pertenecientes a esta especie son árboles pequeños con tallos altos, limpios, con la base gruesamente bulbosa, poco ramificados y estas pocas ramas son densamente frondosas en los extremos; con alturas que van de los 3 a los 12 metros y con diámetros comprendidos entre los 20 y 45 cm. Pero las plantas pequeñas son ideales como especies de interiores, ya que debido a su lento crecimiento, mantienen un tamaño conveniente por muchos años (McDonald, 1976:255). Poseen hojas relativamente delgadas con longitudes que alcanzan algunas veces un metro o menos; teniendo e 2 a 3 centímetros de ancho, con los bordes lisos o rugosos, siendo la superficie de las hojas áspera al tacto (Standley y Stermark, 1952:70-71).

Las flores se encuentran agrupadas en panículas ovoides alargadas, abundantemente ramificadas, siendo las ramificaciones de las panículas de 30 cms de longitud o menos, teniendo las flores un periantro segmentado aproximadamente de 3 mm de largo; fruto elíptico y ovado 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.

Se puede multiplicar por semillas o por partes de la planta (vegetativamente). La planta florece cuando la planta tiene más de 10 años en primavera. Dependiendo de la altura, una planta producida por semillas necesita entre 4 y 6 meses en el semillero.. La planta se caracteriza por desarrollar, entre 18 y 24 meses, una base del tallo que alcanza desde 2 hasta 4 pulgadas de diámetro. El desarrollo del tallo y el crecimiento del mismo deben estar en relación para que exista una planta bien balanceada y estética (Especialidades Tropicales, S.A., 2001).

El cultivo de *pony tail* se ha venido diversificando, tomando como base la demanda de los importadores y el apareamiento de nuevas especies en el campo, producto de mutaciones naturales que presenta la naturaleza.

Cuadro 1. Presentaciones de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) con mayor aceptación en el mercado.

	Diámetro de la cabeza (en pulgadas)	Alto del Tallo (en pulgadas)
Pony Pequeño	2.5	6.0
Pony Mediano	2.5 a 4.0	6.0
Pony Grande	Mayor de 4.0	hasta 16

c. **Requerimientos edafoclimáticos.** La planta puede crecer desde 0 metros de altitud, hasta 2,000 metros sobre el nivel del mar, siendo su mejor hábitat las áreas de terrenos ubicadas entre 0 y 900 msnm. La planta requiere temperaturas de 16 a 30° C. con mucha humedad o bien disponibilidad de agua para riego, los suelos deben ser sueltos y demandan fertilización para acelerar su crecimiento y desarrollo. El inconveniente de producir en terrenos ubicados en la parte baja, es que la incidencia de plagas y algunas enfermedades es mayor (Especialidades Tropicales, S.A., 2001).

#### d. Distribución geográfica.

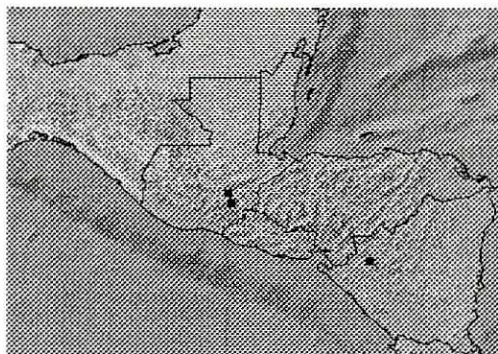


Ilustración 1: Distribución Centroamericana del *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

Esta planta es originaria de Guatemala y México, donde se le encuentra en forma silvestre, existen varias especies y variedades, que presentan variaciones en el ancho y en lo erecto o caído de las hojas.

Standley y Stermark (1952:71) señalan que son conocidas cerca de nueve especies de plantas pertenecientes al género *Beaucarnea*, distribuidas tanto en Guatemala como en México. Este autor reporta 3 especies para Guatemala: *B. ameliae* Lundell, *B. guatemalensis* Rose y *B. petenensis* Lundell, aunque existen dudas en cuanto a que *B. ameliae* sea distinta a *B. petenensis*.

Todos los miembros de este género son endémicos y se encuentran distribuidos en forma natural en los departamentos de: Petén, Alta y Baja Verapaz, Huehuetenango, Jalapa y Chiquimula (Standley y Stermark, 1952:71). Pero a partir del inicio del proceso de exportación de esta planta, ya se cultiva en la mayor parte de la República. 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 (Standley y Stermark, 1952:71), planta pie de elefante, *pony tail* (McDonald, 1976:210), izote pony, pony, etc.

e. Usos. El principal uso de esta planta es para decoración en jardines interiores o exteriores o bien para adornos individuales en residencias, restaurantes, bancos, hoteles, hospitales, fábricas e instituciones diversas.

f. Importancia económica. El *pony tail* 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.

Los volúmenes de *pony tail* exportados por Guatemala en el período de 1987 hasta 1990 sumó 1, 119,022 kg., a un costo mayor de Q 587,700.00 (Programa de exportación e importación de productos agrícolas del comercio exterior, Departamento de Cuarentena Vegetal, Dirección General de Servicios Agrícolas, 1990).

En el año 2003, en Guatemala, el negocio de exportación de plantas ornamentales floreció favorablemente, ya que registró un crecimiento del valor de las exportaciones del 22.3 por ciento, en comparación al 2002, alcanzando US\$ 52.13 millones, según datos registrados hasta septiembre (Moneda, El Periódico Financiero, 2004).

Cuadro 2. Exportaciones realizadas (FOB) por Guatemala clasificadas por producto durante los años 2000-2003 (en miles de US\$).

Principales Productos	2000	2001	2002	2003
Flores, plantas y similares	38,879.5	44,419.8	36,267.2	29,944.3

g. **Oferta local.** En el país existen cerca de 8 viveros privados que se dedican a la producción de este producto, el cual se destina especialmente para la exportación. Actualmente se estima en cerca de seis millones de plantas las que están sembradas en el país, este inventario se esta renovando constantemente, pues se exportan ciertas cantidades y se plantan de nuevo otra cantidad, que balancea el inventario citado.

Cuadro 3. Estadísticas sobre las exportaciones de *pony tail* (*Beucarnea guatemalensis* R.) de los años 1996-1999.

Año	Volumen en Kg.
1996	2,192,135
1997	n.d.
1998	2,761,339
1999	5,939,525

Fuente: Especialidades Tropicales, S.A. 2001.

Al observar los volúmenes exportados se nota el incremento experimentado.

h. **Mercado internacional.** El *pony tail* se destina hacia la exportación casi en su totalidad, pues lo que se comercializa en el mercado interno es poco significativo. Los principales mercados en orden de importancia son los siguientes: Holanda, Italia, U.S.A., Canadá, Japón, Dinamarca, China y Nueva Zelanda.

i. **Épocas de demandas.** La demanda por este producto por los países importados se mantiene uniforme durante todo el año con pequeños decrementos durante la época de verano de los países mencionados anteriormente.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Sitio de colecta del material

El material vegetal consistió en tejidos provenientes de plantas de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) producidas en la Finca Alejandría, ubicada en el municipio de San Vicente Pacaya, departamento de Escuintla, en las coordenadas 14° 22'10.05" latitud Norte y 90° 37'6.86" longitud Oeste, a una altitud de 275 metros sobre el nivel mar.

El clima que predomina en la mayor parte del municipio es cálido, registrándose temperaturas desde 15 hasta 35° C, con temperaturas medias anuales de 25° C (CATIE y MAGA, 2001). Se observa una precipitación pluvial (1200 – 3000 mm) abundante durante los meses de mayo a octubre, mientras que en los meses de noviembre a abril se considera una época seca. Aunque hay lluvias esporádicas, la humedad se encuentra entre el 75% y el 80% (CATIE y MAGA, 2001).

De acuerdo con Holdridge, en Escuintla se pueden apreciar claramente dos zonas de vida vegetal: la zona bh-S(c) que es bosque húmedo sub-tropical cálido y la zona bmh-S(c) que es bosque muy húmedo sub-tropical cálido. En la región de San Vicente Pacaya, se aprecia la zona de bosque muy húmedo sub-tropical cálido (Cruz, 1981). En lo que respecta al tipo de suelo del municipio, la mayoría de suelos están constituidos de material volcánico (corrientes de lava y lodo, ceniza volcánica).

### B. Colecta del material en campo y traslado

Los explantes iniciales consistieron de meristemos apicales tomados de brotes laterales de plantas jóvenes y vigorosas. Se identificaron las plantas, entre 3 y 7 años de edad, que tuvieran brotes laterales en abundancia y éstos fueron removidos cuidadosamente utilizando una navaja desinfectada con alcohol isopropílico al 70%. Los brotes se cortaron a ras del tronco a manera que la base del brote no fuera dañada, ya que es en esta parte en donde se encuentra el meristemo apical. Los brotes colectados en campo fueron lavados con agua, envueltos en papel periódico húmedo para evitar su deshidratación y colocados en una hielera. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad del Valle de Guatemala y almacenadas en un refrigerador a 5° C hasta el día en que fueron desinfectadas para la extracción del meristemo.

### C. Preparación del medio de cultivo

La preparación de medios, desinfección de tejido, extracción, siembra y enraizamiento de los meristemos se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala que cuenta con el equipo y materiales básicos para estos fines.

Dos semanas antes de la fecha de siembra de los meristemos, se prepararon los medios de cultivo a utilizar tanto para la etapa de crecimiento como para la etapa de enraizamiento. El medio utilizado fue el de Murashige & Skoog (MS) (1962), conteniendo macro y micronutrientes, sacarosa, agar, solución de hierro y de calcio, y vitamina B5 (Cuadro 4a). El medio se complementó con ácido naftalenacético (NAA), bencil

amino purina (BAP) y ácido giberélico ( $GA_3$ ) (Cuadro 4b).

Cuadro 4a. Componentes del medio MS y dosis utilizadas para la elaboración de 1 litro.

<i>STOCK</i> <sup>1</sup>	Para 1 litro de MSO
MS Macro	100 ml
MS Micro	1 ml
Ca	10 ml
Fe	10 ml
Vitamina B5	2 ml
Sucrosa	30 g
Agua destilada y desmineralizada	Ajustar volumen
Geltrite (agar)	2 g

<sup>1</sup> Composición de las soluciones *stock* en Apéndice F.

Cuadro 4b. Concentraciones de las hormonas de crecimiento utilizadas para la etapa de crecimiento.

Hormona de crecimiento	Tratamiento 1	Tratamiento 2
BAP	0.22 $\mu$ M	0.8 $\mu$ M
$GA_3$	0.14 $\mu$ M	10 $\mu$ M
NAA	0.11 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M

Tomando como referencia el Cuadro 4a, se prepararon 6 litros de MS para cubrir los requerimientos de cada etapa. El pH se ajustó entre 5.7 y 5.8 con NaOH 0.5 M. Luego de ajustar el volumen, se trasladó el medio preparado al autoclave, en donde fue esterilizado a 15 libras de presión durante 15 minutos a 121° C. Luego, se esperó un tiempo aproximadamente de 45 a 75 minutos para que el medio enfriara lo suficiente para agregar las hormonas vegetales sin que éstas se degradaran. Se mezclaron las hormonas, moviendo el contenedor en forma circular, y se procedió a verter el medio, dentro de la campana de flujo laminar, en los recipientes en donde se sembrarían los meristemos. Se utilizaron 250 ml de medio preparado por cada recipiente (microparcela) ha sembrar.

#### D. Desinfección.

Para la desinfección del equipo e instrumentos (bisturí, pinzas, cajas Petri) se utilizó una solución de etanol al 95% y se flamearon los instrumentos. La campana de flujo laminar fue desinfectada y puesta en funcionamiento media hora previo a su uso. Los brotes laterales fueron lavados con agua y se removieron las hojas externas utilizando un bisturí, con el cual se dejó el brote a un tamaño aproximado de 1 a 2 cm., para facilitar el proceso de extracción del meristemo. Se trasladaron los brotes a un *beaker* estéril y se trabajó a partir de este momento dentro de la campana de flujo laminar. El proceso de desinfección se realizó utilizando dos tratamientos de desinfección a dos diferentes concentraciones por tratamiento. El primer tratamiento, consistió en sumergir los meristemos apicales en una solución de hipoclorito de sodio (Cuadro 5) durante 10 minutos y luego se procedió a realizar tres enjuagues de tres minutos cada uno con

agua destilada estéril. En el segundo tratamiento, se sumergieron los meristemos en una solución de ácido peracético (Cuadro 5) durante 10 minutos y también se aplicaron tres enjuagues de tres minutos con agua destilada estéril.

Cuadro 5. Soluciones desinfectantes y las concentraciones utilizadas en cada tratamiento de desinfección.

Solución desinfectante	Concentración a utilizada (%)	
	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Hipoclorito de sodio	0.5	1
Ácido peracético	1	5

Luego del último enjuague con agua destilada estéril, se trasladaron los brotes a un recipiente estéril.

### E. Extracción, siembra y crecimiento de meristemos apicales

Se procedió a la extracción de los meristemos utilizando un estereomicroscopio. Se debieron remover todos los residuos de las hojas para llegar plenamente a lo que era el meristemo apical. Los meristemos extraídos fueron sembrados inmediatamente en las cajas plásticas conteniendo el medio de cultivo. Se adaptó el método de las microparcelas de Hardy (1966) modificado por Martini (1969), estableciéndose un diseño completamente al azar, con tres repeticiones (cada caja cultivada representó una microparcela que contenía 9 meristemos). Luego de sembrado el último meristemo, se procedió a colocar una tira de *parafilm* en la unión de tapadera y cuerpo de la caja de manera que el contenido de la misma quedara protegido de cualquier contaminación.

Los meristemos sembrados se trasladaron a un cuarto de incubación a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , y bajo una intensidad luminosa de 2000 lux por 16 horas.

### F. Etapa de enraizamiento

Los meristemos crecidos fueron trasladados a la etapa de enraizamiento luego de 6 semanas de sembrados. El traslado de los meristemos del medio de crecimiento al medio de enraizamiento se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar. Los meristemos contaminados y muertos fueron desechados de inmediato.

En esta etapa, se utilizó como medio de enraizamiento el MS antes descrito a la mitad de la concentración nutritiva, complementado únicamente con ácido indol butírico (IBA). Se evaluaron tres concentraciones de IBA, a 1.25  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  y 5.0  $\mu\text{M}$  y se utilizaron tres repeticiones para cada tratamiento. En cada medio de enraizamiento se transplantaron 6 meristemos desarrollados.

### G. Colecta de datos

En la etapa de desinfección se evaluó el porcentaje de contaminación a las dos semanas de la siembra y en la siguiente etapa, el crecimiento del explante a las cuatro semanas de sembrados los meristemos. La evaluación de la etapa de enraizamiento se hizo a las 6 semanas del transplante.

Para el análisis estadístico de cada uno de los experimentos se utilizó el análisis de varianza de una sola vía y pruebas de F y de z para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, con un nivel de confianza aceptable ( $P_{\alpha} < 0.05$ ).

## V. RESULTADOS

En el Cuadro 6 se presenta el número de meristemas contaminados por tratamiento de desinfección y por tratamiento de hormona de crecimiento.

Cuadro 6. Meristemas contaminados según tratamiento de desinfección y concentración del tratamiento de hormonas de crecimiento.

Concentración de las hormonas de crecimiento	Tratamiento de desinfección				Σ (suma)
	Hipoclorito de Sodio al 0.5%	Hipoclorito de Sodio al 1%	Ácido peracético al 1%	Ácido peracético al 5%	
Tratamiento 1 <sup>1</sup>	6	5	2	3	16
Tratamiento 1	6	4	4	3	17
Tratamiento 1	7	3	5	4	19
Tratamiento 2 <sup>2</sup>	6	7	8	3	24
Tratamiento 2	5	6	5	6	22
Tratamiento 2	5	5	4	6	20
Σ	35	30	28	25	118

<sup>1</sup> MS con 0.22μM de BAP, 0.14μM de GA<sub>3</sub> y 0.11μM de NAA.

<sup>2</sup> MS con 0.80μM de BAP, 10μM de GA<sub>3</sub> y 0.10μM de NAA.

De acuerdo al Cuadro 7, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos para la desinfección de tejido, al obtener un valor de F (1.37) menor al valor crítico (3.10) para una muestra de este tamaño. En general se pudo observar una alta tasa de contaminación para todos los tratamientos. Los tratamientos que presentaron los valores más altos de contaminación fueron aquellos en los que se utilizó hipoclorito de sodio como agente desinfectante al 0.5% y al 1%.

Cuadro No. 7. Resumen del análisis de varianza relativo a los métodos de desinfección del explante.

Fuente	SC	gl	s <sup>2</sup>	Fobt	F crit <sub>0.05</sub>
Entre grupos	8.84	3	2.95	1.37	3.10
Dentro de los grupos	42.99	20	2.15		
Total	51.83	23			

En el Cuadro No. 8 se presenta un resumen del porcentaje de contaminación de los meristemas sembrados por tratamiento de desinfección. De los 54 meristemas sembrados por tratamiento de desinfección, se observó que para aquellos tejidos tratados con hipoclorito de sodio al 1% y al 0.5%, un total de 30 (55.56%) y 35 meristemas (64.81%) contaminados, respectivamente. Para los tratamientos en los que se utilizaron las soluciones de ácido peracético, al 1% y al 5%, se observó un número menor de tejidos contaminados, 28 (51.85%) y 25 meristemas (46.30%), respectivamente.

Se notó una tendencia de los meristemos tratados con ácido peracético a presentar un menor porcentaje de contaminación. Este porcentaje es menor cuando la concentración de la solución es más alta.

Cuadro No 8. Resumen de la contaminación de meristemos según el tratamiento de desinfección utilizado.

Tratamiento de desinfección	Número de meristemos sembrados	Meristemos contaminados	
		Número	Porcentaje (%)
Hipoclorito de Sodio al 0.5 %	54	35	64.81
Hipoclorito de Sodio al 1.0 %	54	30	55.56
Ácido peracético al 1.0 %	54	28	51.85
Ácido peracético al 5.0 %	54	25	46.30

En el Cuadro No. 9 se observa el número de meristemos y porcentaje de crecimiento total de meristemos por método de desinfección de tejido y tratamiento con hormonas de crecimiento, evaluados a las cuatro semanas de sembrado el explante. Se puede observar también el porcentaje de crecimiento total y el porcentaje de mortandad por tratamiento de hormonas de crecimiento.

Cuadro No. 9. Número de meristemos y porcentaje de crecimiento total de meristemos por método de desinfección de tejido y tratamiento con hormonas de crecimiento.

Tratamiento		Total de meristemos	Meristemos Desarrollados		Meristemos muertos	
Desinfección	Hormonas utilizadas en la fase de crecimiento		Número	Porcentaje (%)	Número	Porcentaje (%)
Hipoclorito de sodio a 0.5%	Tratamiento 1 <sup>1</sup>	27	1	3.70	26	96.30
Hipoclorito de sodio al 0.5%	Tratamiento 2 <sup>2</sup>	27	1	3.70	26	96.30
Hipoclorito de sodio al 1%	Tratamiento 1 <sup>1</sup>	27	2	7.41	25	92.59
Hipoclorito de sodio al 1%	Tratamiento 2 <sup>2</sup>	27	1	3.70	26	96.30
Ácido peracético al 1%	Tratamiento 1 <sup>1</sup>	27	3	11.11	24	88.89
Ácido peracético al 1%	Tratamiento 2 <sup>2</sup>	27	3	11.11	24	88.89
Ácido peracético al 5%	Tratamiento 1 <sup>1</sup>	27	4	14.81	23	85.19
Ácido peracético al 5%	Tratamiento 2 <sup>2</sup>	27	3	11.11	24	88.89

<sup>1</sup>MS con 0.22 $\mu$ M de BAP, 0.14 $\mu$ M de GA<sub>3</sub> y 0.11 $\mu$ M de NAA.

<sup>2</sup>MS con 0.80 $\mu$ M de BAP, 10 $\mu$ M de GA<sub>3</sub> y 0.10 $\mu$ M de NAA.

El tratamiento que presentó los mejores resultados en cuanto a crecimiento fue el Tratamiento 1 (MS con 0.22  $\mu\text{M}$  de BAP, 0.14  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  y 0.11  $\mu\text{M}$  de NAA) con un total de 10 meristemos crecidos, en comparación con el Tratamiento 2 (MS con 0.80  $\mu\text{M}$  de BAP, 10.0  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  y 0.10  $\mu\text{M}$  de NAA) que presentó únicamente 8 meristemos crecidos.

El análisis estadístico consistió en una prueba de la diferencia entre dos porcentajes para datos no correlacionados, en este caso, los porcentajes de crecimiento para cada tratamiento. De acuerdo a los valores de  $z$  crítico y  $z$  obtenido para el tamaño de la muestra, 1.96 y 0.49, respectivamente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos hormonales utilizados.

Del total de explantes sembrados en esta etapa, se obtuvo un 9.26% de crecimiento de explante libre de contaminación para el Tratamiento 1 y un 7.41% de crecimiento para el Tratamiento 2. Estos meristemos crecidos fueron llevados a la etapa de enraizamiento.

El Cuadro No. 10 presenta el número de meristemos que desarrollaron raíces expresados como un porcentaje del total de meristemos que entraron a la etapa de enraizamiento. Se puede observar que el Tratamiento 2 (MS + 2.5  $\mu\text{M}$  IBA) presentó los valores más altos de meristemos que desarrollaron raíces, un total de 4 meristemos. Los otros tratamientos, Tratamiento 1 (MS + 1.25  $\mu\text{M}$  IBA) y Tratamiento 3 (MS + 5.0  $\mu\text{M}$  IBA), a la mitad y al doble de la concentración de hormona de enraizamiento, respectivamente, presentaron valores menores en cuanto al número de meristemos con desarrollo de raíces. Para el tratamiento 1, el total de meristemos con desarrollo de raíces fue de 2 meristemos y para el Tratamiento 3 fue de 1 meristemo.

Cuadro No. 10 Número de meristemos que desarrollaron raíces y porcentaje de desarrollo de raíces por tratamiento de hormonas de enraizamiento.

Tratamiento hormonal	Número de meristemos	Meristemos con desarrollo radicular		Meristemos muertos	
		Número	Porcentaje (%)	Número	Porcentaje (%)
$\frac{1}{2}$ MS con 1.25 $\mu\text{M}$ IBA	6	2	33.33	4	66.67
$\frac{1}{2}$ MS con 2.5 $\mu\text{M}$ IBA	6	4	66.67	2	33.33
$\frac{1}{2}$ MS con 5.0 $\mu\text{M}$ IBA	6	1	16.67	5	83.33

De acuerdo al Cuadro No. 11, el valor de la F obtenida (0.13) es menor que el valor de la F crítica (3.68) para este tamaño de muestra, por lo que no existe diferencia significativa entre tratamientos.

Cuadro No. 11 Resumen del análisis de varianza relativo a las concentraciones de hormonas de enraizamiento.

Fuente	SC	gl	$s^2$	Fobt	F crit $_{0.05}$
Entre grupos	0.79	2	0.395	0.13	3.68
Dentro de los grupos	45.49	15	3.033		
Total	46.78	17			

## VI. DISCUSIÓN

Se tomaron principalmente los rebrotes vigorosos y jóvenes como fuente primaria de explante para no afectar la forma y el crecimiento de la planta madre y para que el meristemo que fuera extraído presentara mejores condiciones para su cultivo *in vitro*. Se dio prioridad, al escoger las plantas madres, a aquellas con un alto número de rebrotes ya que se necesitaban bastantes meristemos para cada tratamiento a utilizar.

Previo a la etapa de desinfección, se cortaron los rebrotes a un tamaño adecuado (2-3 cm.) para facilitar el trabajo de extracción de los meristemos. Estos rebrotes fueron después sometidos a los tratamientos desinfectantes. Los meristemos expuestos no se pudieron someter al tratamiento de desinfección ya que por la delicadeza del tejido y la toxicidad de las sustancias desinfectantes, podría verse afectada su fisiología.

A pesar de que los tratamientos desinfectantes no presentan diferencias estadísticamente significativas (Cuadro No. 10), se pudo observar tanto para hipoclorito de sodio como para ácido peracético que en aquellas soluciones con concentraciones más altas (1% y 5%, respectivamente), el índice de contaminación fue menor que para aquellas soluciones con concentraciones más bajas (0.5% y 1%, respectivamente). Se podría decir que el porcentaje de contaminación estuvo relacionado con la concentración de agente desinfectante utilizada, aunque se tendrían que hacer pruebas para comprobarlo.

Se pudo observar el efecto positivo predominante de la desinfección del ácido peracético sobre el hipoclorito de sodio pero, en general, ambos agentes desinfectantes pueden ser utilizados para esta etapa.

Se atribuyen los altos porcentajes de contaminación obtenidos a alguna falla en el proceso de desinfección de los tejidos, esterilización de la campana de flujo laminar, errores al momento de extracción (e.j. un largo tiempo de exposición del tejido al ambiente) y problemas al momento de la siembra del tejido (e.j. mala esterilización de los instrumentos utilizados para la siembra). Cabe mencionar que uno de los principales problemas de la siembra por cultivo de tejidos es la contaminación. Por ser un tema sumamente delicado, se recomienda tenerlo como una de las prioridades, junto con la calidad del tejido inicial.

Se tuvo especial cuidado en la etapa de siembra para que el medio de cultivo y los meristemos no tuvieran mucho tiempo de exposición al ambiente, por lo que fue necesario trabajar de manera rápida y precisa para poder introducir el meristemo de manera adecuada, sembrarlo y sellar la caja.

El medio utilizado fue el de Murashige & Skoog (1962), sugerido por la literatura. El medio fue preparado dos días antes de la siembra de los meristemos, con el objetivo de obtener un número adecuado y suficiente de cajas con medio de cultivo antes de comenzar a sembrar. Debido a que la esterilización del medio se hace utilizando un autoclave (vapor de agua a 121° C durante 15 minutos), el medio estéril tenía una temperatura demasiado alta como para proceder a sembrar inmediatamente los meristemos. Se tuvo que esperar a que el medio se enfriara para poder introducir las hormonas de crecimiento, ya que de lo contrario se pueden degradar por altas temperaturas, y luego gelificar para poder proceder con la siembra de los meristemos.

A pesar de que los tratamientos con hormonas de crecimiento no presentaron diferencias estadísticamente significativas, el Tratamiento I (MS con  $0.22\mu\text{M}$  BAP,  $0.14\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> y  $0.11\mu\text{M}$  NAA) sugerido por el Ing. Calderón fue el que presentó respuestas más favorables, con un total de 10 meristemos crecidos. Los tratamientos en la etapa de crecimiento no presentaron diferencias posiblemente porque las concentraciones utilizadas son bajas y variaron poco. La única concentración de hormona que variaba considerablemente fue la de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) ( $0.14\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$  para los dos tratamientos, respectivamente) pero como se pudo observar, esta diferencia no alteró significativamente en el resultado final.

En esta etapa de crecimiento, se presentó un porcentaje de mortandad alto atribuido a una mala extracción del meristemo. Ya que debía de extraerse únicamente el meristemo, se debía eliminar cualquier otro tejido alrededor del meristemo que pudiera servir como punto de crecimiento de un nuevo tejido no deseado por las características fisiológicas de éste. En varias ocasiones, se pudo observar la formación de tejido calloso en la parte basal del cultivo sembrado. Este tejido calloso impedía que el meristemo lograra extraer los nutrientes del medio de cultivo, retrasando su crecimiento y promoviendo la muerte de éste.

Los tiempos de evaluación de cada etapa se establecieron tomando como base los resultados obtenidos en el Laboratorio de Cultivos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala en trabajos anteriormente realizados cultivando meristemos. Estos tiempos se pensaron eran adecuados para el desarrollo de cada factor a evaluar en cada etapa (desarrollo de hongos y bacterias para la etapa de desinfección, desarrollo del meristemo para la etapa de crecimiento y desarrollo de raíces para la etapa de enraizamiento).

## VII. CONCLUSIONES

- A. Al tratar el material vegetativo utilizado en la propagación *in vitro* del *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) con soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio y de ácido peracético , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su poder de desinfección.
- B. Los tratamientos utilizados para la etapa de crecimiento, medio MS con diferentes concentraciones de hormonas de crecimiento, no presentan diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento del material.
- C. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tres concentraciones de ácido indol butírico evaluadas en la etapa de enraizamiento de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.).
- D. En general, los métodos de desinfección, las concentraciones de hormonas de crecimiento y las concentraciones de hormona de enraizamiento tuvieron un efecto similar en la propagación de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) en cada etapa de la propagación por cultivo de meristemas.

## VIII. RECOMENDACIONES

- A. Para la etapa de desinfección, se recomienda utilizar ácido peracético al 5% como agente desinfectante por ser una sustancia menos tóxica que el hipoclorito de sodio, biodegradable y de menor costo, a la vez que se fomenta la bioseguridad.
- B. Para la etapa de crecimiento, se recomienda utilizar el medio MS complementado con 0.22  $\mu\text{M}$  de BAP, 0.14  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  y 0.11  $\mu\text{M}$  de NAA, o bien con 0.80  $\mu\text{M}$  de BAP, 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  y 0.10  $\mu\text{M}$  de NAA.
- C. Para la etapa de enraizamiento, se recomienda utilizar el medio  $\frac{1}{2}$  MS complementado con 2.5  $\mu\text{M}$  de IBA ya que, por ser la concentración recomendada por la literatura, presentó los mejores resultados en cuanto a desarrollo radicular del tejido.
- D. Continuar con estudios de este tipo para llegar a desarrollar un protocolo completo para la reproducción del *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.) mediante el cultivo de meristemos.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Arditti, J. 1977. *Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: A manual*. En: Arditti, J. (ed.). *Orchid biology; 1: Reviews and perspectives*. Cornell University Press, Nueva York. p. 203-293.
- Ball, E. 1946. *Development in sterile culture of stem tips and subadjacent regions of Tropaeolum majus L. and of Lupinus albus L.* Am. J. Bot. 33: 301-318.
- Bending, H. 1974. *Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von Petunia hybrida L.* Z. Pflanzenphysiol. 74: 327-356.
- Bingham, E.T.; Hurley, L.V.; Kaatz, D.M. y Saunders, J.W. 1975. *Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in cultura*. Crop Sci. 15: 719-721.
- Biondi, S. y Torpe, T.A. 1981. *Requirements for a tissue cultura facility*. En: Thorpe, T.A. (ed.) *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 1-20.
- Bonga, J.M. 1982. *Tissue culture techniques*. En: Bonga, J.M. y Durzan, D.J. (eds.). *Tissue cultura in forestry*. Martines Nijhoff and W. Junk Publishers, Boston. p. 4-35.
- Bovo, O. A. y Quarín, C. L. 1983. *Obtención de plantas de Paspalum alnum (Gramíneae) a partir del cultivo in vitro de ovarios jóvenes*. Pitón 43: 29-34.
- Boxus, P.; Damiano, C. y brasser, E. 1984. *Strawberry*. En: Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. y Yaada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture; 3: Crop species*. MacMillan Publishing. Nueva York. p. 453-486.
- Browse, P.M. 1979. *Plant propagation: Seeds, roots, bulbs and corma, layering, stem cuttings, leaf cuttings, budding and grafting*. Mitchell Beazley Pub. (Simon and Schuster), Nueva York.
- Butler, E.B. y Johnston, W.H. 1954. *Retention of chromium by glass following treatment with cleaning solution*. Science 120: 543-544.
- CATIE-ESPREDÉ y MAGA-BID. 2001. *Base de Datos Digital de la República de Guatemala a escala 1: 250,000*. Guatemala. 109 pp.
- Chu, C. C.; Wang, C. c.; sun, C. S.; Hsu, c.; Yin, K. C. y Chu, C. Y. 1975. *Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources*. Sci. Sinica 18: 659-668.
- Clapham, D.H. 1977. *Haploid induction in cereals*. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ cultura*. Springer – Verlag. Berlín, Alemania. p. 279-298.
- Cook, A.D. (ed.). 1984. *Propagation for the home gardener*. Plants and Gardens 40(1):1-76.

- Cronquist, A. 1984. *Introducción a la botánica. Trad. por Antonio Marino Ambrosio*. CECSA, México. p. 848.
- Cruz, J. R. de la. 1981. *Clasificación de Zonas de Vida de Guatemala a Nivel de Reconocimiento Sistema Holdridge*. Guatemala. Instituto Nacional Forestal. 24 pp.
- Debergh, P. 1982. *Physical properties of culture media*. En: Fujiwara, A. (ed). Plant tissue culture 1982. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 135-135.
- Dodds, J.H. y Roberts, L. W. 1982. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Cambridge. 178 p.
- Dougall, D.K. 1972. *Cultivation of plant cells*. En: Rothblat, G.H. y Cristofalo, J. (eds.). Growth, nutrition and metabolism of cells in cultura. Academia Press, Nueva Cork. p. 371-406.
- Dougall, D.K. 1980. *Nutrition and metabolism*. En: Staba, E.J. (ed.). Plant tissue cultura as a source of biochemical. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.
- Downie, N.M. y Heath, R.W. 1986. *Métodos Estadísticos Aplicados*. Quinta edición. Harla, S.A. de C.V. México D.F., México.
- Earle, E.D. y Demarly, Y. (eds.). 1983. *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Praeger Publisher, Nueva York.
- Eskew, D.L.; Welch, R.M. y Cary, E.E. 1984. *Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants*. Science 222: 621-623.
- Especialidades Tropicales, S.A. y Asociación Share de Guatemala. 2001. *Estudio de Mercado: Identificación de Opciones de Mercado en Comunidades del Proyecto Share Match*. El Progreso, Guatemala.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R. y Flick, C.E. 1981. *Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis*. En: Thorpe, T.A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York. p. 45-113.
- Frankenberger, E.A.; Hasegawa, P.M. y Tigchelaar, E.C. 1981. *Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes*. Z. Pflanzanphysiol. 102: 221-232.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A. y Ojima, K. 1968. *Nutrient requirements of suspensión cultures of soybean root cells*. Exp. Cell res. 50: 151-158.
- Gautheret, R.J. 1959. *La culture tissues végétaux: Techniques et realizations*. Masson, París. Pp 863.
- George, E.F. y Sherrington, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial operations*. Exegetisa, Eversley, Inglaterra.
- *Glossary: Bean Program introductory course to RFLPs isoxymes and transformation*. Compilado y adaptado por A. Calderón, D. I. Arias y J. Tohme, Documento Interno. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Cali, Colombia. (Multicopiado.)

- Goda, G. 1970. *A new glass-cleaning solution*. American Laboratory (agosto 1970), p. 69.
- Guatemala. Dirección General de Servicios Agrícolas, Departamento de Cuarentena Vegetal. 1990. *Boletín del programa de exportación e importación de productos agrícolas del comercio exterior*. Guatemala. p. 230.
- Hardy, F. y Bazán, R. 1966. *The maize microplot method of soil testing*. Turrialba 16(3): 267 – 270.
- Hartmann, H.T. y Kester, D.E. 1984. *Plant propagation: Principles and practices*. Englewood Cliffs, Nueva Jersey, E.U.
- Henry, R.J. y Smith, E.C. 1946. *Use of sulfuric acid-dichromate mixture in cleaning glassware*. Science 104: 426-427.
- Hewitt, E.J. 1966. *Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition*. 2 ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, Inglaterra.
- Hu, C. Y. y Wang, P.J. 1983. *Meristem, shoot tip, and bud cultures*. En: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. y Yamada, R. (eds.). Handbook of plant cell cultura. MacMillan Publishing. Nueva York. v. 1, p. 177-227.
- Hughes, K.W. 1981. *In vitro ecology; exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems*. Env. Exp. Bot. 21: 281-288.
- Institute of Genetics – Academia Sinica e IRRI (International Rice Research Institute). *Cell and tissue culture techniques for cereal crops improvement*. 1983. Memorias de un taller. IRRI, Manila, Filipinas.
- Jensen, C.J. 1977. *Monoploid production by chromosome elimination*. En: Reinert, J. y Bajaj, Y.P.S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag. Berlín. p. 299-330.
- Jones, O.P; Hopgood, M.E. y O'Farrell, D. 1977. *Propagation in vitro of M.26 apple rootstocks*. J.Hort. Sci. 52:235-238.
- Kao, K. N. y Michayluk, M.R. 1980. *Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa*. Z. Pflanzenphysiol. 96: 135-141.
- Kartha, K.K; Gamburg, O.L.; Shyluk, J.P. y Constable, F. 1976. *Morphogenetic investigations on in vitro leaf culture of tomato (Lycopersicon esculentum Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration*. Z. Pflanzenphysiol. 77:292-301.
- Kohlembach, H.W. y Wernicke, W. 1978. *Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture*. Z. Pflanzenphysiol. 86:463-472.
- Kruse, P.F. y Patterson, M.K. (eds.). 1973. *Tissue culture: Methods and applications*. Academic Press, Nueva York.
- Lauchli, A. y Bielecki, R.L. (eds.). 1983. *Inorganic plant nutrition*. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlag. Nueva York. v. 15, A y B.

- Linsmaier, E.M. y Skoog, F. 1965. *Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
- Litz, R.E. y Conover, R.A. 1979. *Development of systems for obtaining paraxial Carica hybrids*. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 92: 281-283.
- Lorz, H., Larking, P.J. y Scowcroft, W.R. 1983. *Improved protoplast culture and agarose media*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2:217-226.
- Maas Ibarra, R. E. 1992. *Inducción de Enraizamiento en Izote Pony (Beaucarnea guatemalensis Rose) con dos reguladores de crecimiento y dos colores de lienzo de polietileno*. USAC. Facultad de Agronomía. Tesis de Ingeniería Agronómica. Guatemala. p. 56.
- Martin, S.M. 1980. *Environmental factors; B: Temperature, aeration, and pH*. En: Staba, J.E. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 143-148.
- Martini, J.A. 1969. *La microparcela de campo como un método biológico rápido para evaluar la fertilidad del suelo*. *Turrialba* 19(2): 261 – 266.
- McDonald, E. 1976. *The world book of house plants*. Popular Library. New York, E. U. p. 320.
- McGraw – Hill dictionary of scientific and technical terms. 1989. Parker, S. (ed.). McGraw – Hill, Nueva York. 2088 p.
- Miller, C. 1967. *Cytokinins in Zea mays*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 144: 250-257.
- *Moneda, El Periódico Financiero*. [Guatemala]. Junio de 2004, página 16.
- Monnier, M. 1976. *Culture in vitro de lémbryon immature de Capsella bursapastoris Moench*. *Rev. Cyt. Biol. Végét.* 39: 1-120.
- Morel, G. y Wetmore, R. 1951. *Tissue culture of monocotyledons*. *Amer. J. Bot.* 38: 138-140.
- Mosella, L. 1979. *L'utilisation de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux typea de virions chez le pécher (Prunus persica Batsch)*. Tesis (Doct.). USTL, Montpellier, Francia. 215 p.
- Mroginski, L.A. 1975. *Plantas haploides de Nicotiana spp. Obtenidas por cultivo in vitro de anteras*. En: *Memorias de la Segunda Reunión Nacional Técnica del Tabaco*. Corrientes, Argentina. v. 1, p. 97-111.
- Müller, L. 1986. *Glosario de cultivo de tejidos*. CATIE, Turrialba, Costa Rica (Mecanografiado.)
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. *A revised médium for rapi growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Narayanaswamy, S. y Norstog, K. 1964. *Plant embryo cultura*. *Botan. Rev.* 30:587-628.
- Nitsch, J.P. 1969. *Experimental androgenesis in Nicotiana*. *Phytomorphology* 19:389-404.
- Oono, K. 1981. *In vitro methods applied to rice*. En: Thorpe, T.A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 273-298.
- Pagano, R.R. 1998. *Estadística para las Ciencias del Comportamiento*. Quinta edición. International Thomson Editores, S.A. de C.V. Mexico. Pp. 354-360

- Pittman, R.N.; Banks, D.J.; Kirby, J.S.; Mitchell, E.D. y Richardson, P.E. 1983. *In vitro culture of immature peanut (Arachis spp.) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration*. Peanut Sci. 10:21-25.
- Raghavan, V. 1966. *Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos*. Biol. Rev. 41:1-58.
- Raghavan, V. 1976. *Experimental embryogenesis in vascular plants*. Academic Press, Nueva York.
- Rechcigl, M. (ed.). 1977. *CRC handbook series in nutrition and food; G: Diets, culture media, food supplements; 4: Culture media for cells, organs and embryos*. CRC Press, Cleveland, Ohio, E.U.
- Reinert, J. y Yeoman, M.M. 1982. *Plant cell and tissue culture: A laboratory manual*. Springer-Verlag. Berlín. 83 p.
- Rey, H. Y. y Mroginski, L.A. 1978. *Cultivo in vitro de ápices caulinares de mandioca (Manihot esculenta Crantz)*. Pitón 36:171-176.
- Richards, O.W. 1936. *Killing organisms with chromium as from incompletely washed bichromate-sulfuric acid-cleaned glassware*. Physiological Zoology 9: 246-253.
- Rieger, R.; Michaelis, A. y Green, M.M. 1982. *Diccionario de genética y citogenética*. Alhambra, Madrid. 530 p.
- Romberger, J.A. y Tabor, C.A. 1971. *The Picea abis shoot apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects*. Amer. J. Bot. 58: 131-140.
- Rubluo, A.; Mroginski, L.A. y Kartha, K. 1982. *Morphogenetic responses of pea leaflets cultured in vitro*. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue culture 1982*. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 151-152.
- Rupela, D.P.; Dart, P.J.; Toomsan, B.; Singh, D.V.; Subramaniam, D. y Sharma, B.K. 1984. *Facility for growing plants in tubes at ICRISAT (International Crops research Institute for the Seme-Arid Tropics)*. Information bulletin no. 18. ICRISAT, Patancheru, India.
- Sandstedt, R. y Skoog, F. 1960. *Effects of amino acid components of yeast extract on the growth of tobacco tissues in vitro*. Physiol. Plant. 13: 250-256.
- Saric, M.R. y Loughman, B.C. (eds.). 1983. *Genetic aspects of plant nutrition*. Martinus Nijhoff/ W. Junk, La Haya, Holanda.
- Seibert, M. y Kadkade, P.G. 1980. *Environmental factors; A: Light*. En: Staba, E.J. (ed.). *Plant tissue cultura as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.
- Shantz, E.M. 1964. *Chemistry of naturally-occurring growth-regulatory substances*. Ann. Rev. Pl. Physiol. 17:409-438.
- Singh, M. y Krikorian, A.D. 1980. *Related iron in culture media*. Ann. Bot. 46: 807-809.
- Singha, S.; Townsend, E.C. y Oberly, G.H. 1985. *Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured in vitro on varying concentration of three commercial agars*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:407-411.
- Standley, P. C. y Stermark, J.A. 1952. *Flora of Guatemala*. Chicago, Chicago Natural History Museum: Fieldana Botany. V. 24. pt. 3. p. 70-71.

- Steward, F.C. y Caplin, S.M. 1951. *A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut milk*. Science 113:518-520.
- Steward, F.C. y Caplin, S.M. 1952. *Investigations on growth and metabolism of plant cells; 4: Evidence on the role of the coconut-milk factor in development*. Ann. Bot. 16:491-504.
- Steward, F.C. y Shantz, E.M. 1959. *The chemical regulation of growth: Some substances and extracts which induce growth and morphogenesis*. Ann. Rev. Pl. Physiol. 10:379-404.
- Street, H. E. 1977. *Introduction*. En: Street, H.E. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 1-10.
- Styer, D.J. y Chin, C.K. 1983. *Meristem and shoot tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation*. Horticultural Reviews 5:221-227.
- Sunderland, N. 1974. *Anther culture as a means of haploid induction*. En: Kasha, K.J. (ed.). *Haploids in higher plants: Advances and potential*. The University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 91-122.
- Thorpe, T.A. (ed.). 1981. *Plant tissue culture, methods and application in agriculture: Proceedings of a symposium based on the UNESCO training course on plant tissue cultures, Sao Paulo, Brasil, 1978*. Memorias. Academic Press, Nueva York.
- Van Overbeek, J. 1942. *Hormonal control of embryo and seedling growth*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 10:126-134.
- Van Overbeek, J; Conklin, M.E. y Blakeslee, A.F. 1942. *Cultivation in vitro of small Datura embryos*. Amer. J. Bot. 29: 472-477.
- Van Uyen, N. y Van der Zaag, P. 1983. *Vietnamese farmers use tissue cultura for comercial potato production*. Am. Potato. J. 66: 873-879.
- Wilson, J.K. 1915. *Calcium hypochlorite as a seed sterilizer*. Amer. J. Bot. 2: 420-427.
- Xu, Z. y Sunderland, N. 1982. *Inoculation density in the culture of barley anthers*. Scientia Sinica (ser. B) 25: 961-969.
- Yao, D. y Krikorian, A.D. 1981. *Multiplication of rice (Oryza sativa L.) from aseptically cultured nodes*. Ann. Bot. 48: 255-259.

## X. APÉNDICES

### A. Apéndice A

#### 1. Abreviaturas y acrónimos

ABA	ácido abscísico
AC	agua de coco
AcPh	(= AcP) fosfatasa ácida
AG	ácido giberélico
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
5-AU	5-aminouracil
AVF	<i>antiviral factor</i> (factor antiviral)
BA	benciladenina
BAP	bencil amino purina
B <sub>MS</sub>	sales minerales de Murashige – Skoog
B <sub>MS ½</sub>	ídem, a la mitad de su concentración
B <sub>MS X 2</sub>	ídem, al doble de su concentración
B <sub>SH</sub>	sales minerales de Schenck y Hildebrandt
BTOA	ácido benzotiazol-2-oxiacético
BUdR	bromodesoxiuridina
B <sub>w</sub>	sales minerales de White
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CEM	células embriogénicas madre
CH	caseína hidrolizada
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etiléndiamino-tetraacético
l, lt	litro
MB	medio basal
M.O.	materia orgánica
MS	Murashige y Skoog (medio de cultivo)

M.S.	materia seca
msnm	metros sobre el nivel del mar (altitud)
NAA	naphtalenacetic acid (ver ANA)
ng	nanogramo
p.e., p.ej., v.gr.	por ejemplo
PM	peso molecular
p / v	peso respecto a volumen
rpm, RPM	revoluciones por minuto
s, sg	segundo
sig.	siguiente(s)
v / v	volumen respecto a volumen
ZEA	zeatina

## B. Apéndice B

### 1. Unidades de medida y notación decimal

Símbolo	Unidad
bp	pares de bases ("base pairs")
BTU	British Thermal Unit (calor)
cc, cm <sup>3</sup>	centímetro cúbico
cm	centímetro
<i>dalton</i>	unidad de masa atómica
g	gramo
<i>g</i>	gravedad de la Tierra
h	hora
kg	kilogramo
klx	(flux) kilolux (= mil lux)
kr	kilorad (radiación)
l, lt	litro
lx	lux (intensidad de iluminación, lm / m <sup>2</sup> )
M	molar, molaridad (concentración)
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
μ	micra, micrón (= 10 <sup>-6</sup> m)
μM	micromolar (concentración)
N	normal, normalidad (concentración)
nm	nanómetro
plg	pulgada
psi	libras por pulgada cuadrada
r	rad (radiación)
s, sg	segundo

## C. Apéndice C

### 1. Terminología técnica más usada en el cultivo de tejidos

- Aberración cromosómica: en el sentido más amplio, es un cambio ya sea en la estructura de un cromosoma o en el número de cromosomas.

- ADN complementario (cADN): es el ADN que complementa una secuencia de ARN. El ADN complementario es sintetizado por la transcriptasa inversa, o retrotranscriptasa (“reverse transcriptase”), enzima que es una polimerasa de ADN y utiliza ARN como cebador. La molécula de ADN de cadena simple, producida por esa enzima, se convierte en una doble cadena por medio de la polimerasa de ADN normal (que utiliza ARN como cebador). La doble cadena de ADN producida de esta manera puede insertarse dentro de un vector de clonamiento para producir un clon de ADN complementario. El ADN complementario es una copia de una molécula de ARN procesado y no lleva, por tanto, ningún intrón que actúe como barrera para la expresión del código contenido en ese cADN.

- ADN recombinante (rADN): molécula de ADN en la cual ciertas secuencias, que no se presentan ordinariamente en la naturaleza, se colocan una al lado de la otra mediante manipulaciones hechas in vitro. Estas secuencias heterólogas en una molécula de ADN recombinante provienen, generalmente, de organismos totalmente diferentes.

- Aloploide: planta o individuo obtenido por cruzamiento de dos o más especies o géneros; si hay un solo juego de cromosomas (genoma) el individuo será alodiploide, y si hay varios juegos, será aloploiploide.

- Alosima: diferentes formas de una enzima que resultan de diferentes alelos de un mismo locus.

- Androgénesis: partenogénesis masculina, es decir, desarrollo haploide de una plántula o de sus partes a partir de un núcleo masculino (gameto). La androgénesis anteral ocurre a partir de un grano de polen, ya sea en la antera completa o en un grano aislado de ella.

- Androhaploide: célula u organismo haploide que se formó a partir de un núcleo masculino sin que hubiera fertilización.

- Antisentido (ARN): molécula ARN de cadena simple que se hibrida con otro ácido nucleico (ARN o ADN) inhibiendo la función o culminación de la síntesis de éste. Ej: el ARN antisentido se llama micARN si el ARN hibridado (el “blanco”) es un mRNA.

- ARN mensajero (mRNA): ARN transcrito a partir de un gen que codifica para una proteína. La información codificada en la molécula del ARN mensajero es traducida en los ribosomas hasta polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos específica. En organismos eucarióticos, los ARN mensajeros transfieren la información genética desde los genes, que están en el núcleo, hasta los ribosomas, en el citoplasma.

- Autopoliploide: células (individuos) con juegos homólogos de cromosomas de los padres, que forman parejas perfectas durante la meiosis; la célula será, p.e., autodiploide, autotriploide o autotetraploide si

posee dos, tres o cuatro juegos completos de cromosomas homólogos, respectivamente. En general, los autopoliploides difieren fenotípicamente apenas en algunos aspectos cuantitativos de sus padres diploides.

- Autótrofo: planta (u otro organismo) que puede sintetizar su propia sustancia orgánica, a partir de componentes químicos inorgánicos simples, mediante fotosíntesis o quimiosíntesis.

- Auxótrofo: célula (u organismo) cuyo crecimiento y desarrollo dependen de la presencia, en el medio de cultivo, de suplementos al medio mínimo, porque no pueden sintetizar ciertos metabolitos necesarios para su crecimiento normal. El auxótrofo se origina por mutación, con bloqueo genético, de ciertos procesos metabólicos que se hallan intactos en el tipo primitivo o silvestre (protótrofo).

- Banco genético: colección de moléculas de ADN recombinante en las cuales hay inserciones que representan el genoma completo de un organismo.

- Callo clon: plántulas (variantes clonales) derivadas en forma clonal a partir de un callo. También, plantas derivadas del cultivo de un callo mutado.

- Callo nodriza: callo con crecimiento activo que se coloca sobre una placa de agar para estimular el desarrollo de un cultivo de células de baja densidad (o sea, por debajo de la densidad crítica) o de un explante muy pequeño.

- Célula competente: aquella célula capaz de tomar moléculas de ácido nucleico. Estas células se presentan en forma natural cuando se hallan en ciertos estados de desarrollo, o pueden ser inducidas mediante iones calcio a 0° C o por medio de iones litio. Las células competentes pueden congelarse a - 80° C sumergiéndolas en glicerol, para mantener su viabilidad durante muchos años.

- Célula nodriza: células que por causa de un tratamiento no pueden dividirse más. Estas células se adicionan a un medio en que prospera un cultivo de otras células de baja densidad para que produzcan, durante su metabolismo, sustancias nodrizas que permitan el desarrollo del cultivo de baja densidad.

- Clon: población de moléculas de ADN recombinante que presentan la misma secuencia. También, población de células u organismos de genotipo idéntico. El sentido más usado, sin embargo, es el de colonia de microorganismos que hospedan fragmentos de ADN específico insertos en una molécula vectora.

- Clonar: se refiere al uso de técnicas de recombinación in vitro con las cuales se inserta un gen específico o una secuencia de ADN en una molécula vectora.

- Codón: conjunto de tres bases seguidas en la molécula de mRNA que corresponden a determinado aminoácido; el aminoácido se incorpora a la macromolécula que se está formando gracias al reconocimiento del codón por el anticodón correspondiente colocado en el extremo del tARN que transporta el aminoácido específico. El término codón puede también especificar la terminación de la cadena molecular.

- Conjugación: transferencia de un plásmido bacteriano de una célula a otra; el plásmido codifica las funciones necesarias para lograr esa transferencia.

- Cultivo en gota: cultivo de protoplastos, células y cuerpos semejantes en una o varias gotas del medio nutritivo. que se mantienen en neucueñas cámaras de vidrio o de plástico transparente.

- Cultivo en suspensión: cultivo de células individuales, agregados o tejidos en medio líquido y sin adición de agar; normalmente requiere agitación para gozar de aireación adecuada.
- Cultivo primario: cultivo obtenido directamente de parte de tejidos o de órganos de la planta donadora; debe considerarse como tal hasta el primer subcultivo, después del cual da lugar a un linaje.
- Densidad de cultivo: en una suspensión es el número de unidades por mililitro de medio.
- Embriogénesis: proceso de iniciación y desarrollo de un embrión. Puede ser sexual, por fusión de dos gametos (embrión cigótico), o asexual, formado a partir de células de tejido adulto (embrión somático); este último da lugar a un embrión en una serie de pasos que semejan la formación de un embrión cigótico.
- Gametoclonal: relativo a la propagación clonal de gametos, a diferencia de la somaclonal.
- Gemación: forma de reproducción asexual en que se produce un individuo joven como excrecencia de otro más viejo. Liberación de un virus de la célula en que ocurrió su replicación.
- Gen estructural: gen que, a diferencia de uno regulador, tiene la codificación para la molécula de ARN que dará un producto proteico.
- Gen marcador: gen que expresa ciertas características o diferencias fenotípicas muy notorias, lo que permite establecer su presencia en el genoma y facilita la detección de eventos de recombinación.
- Gen regulador: gen que controla la tasa de síntesis de los productos de otros genes distantes de él.
- Gen supresor: gen que codifica para un ARN de transcripción (tARN) y que lee el codón mutado en el mismo sentido del codón original, o como un sustituto aceptable para el significado original.
- Hibridación: formación de duplex estables entre dos cadenas de nucleótidos complementarias, según el apareamiento propuesto por Watson – Crick; la eficiencia de la hibridación es una prueba de la homología que existe entre secuencias.
- Hibridación celular somática: acción de fusionar protoplastos derivados de células somáticas que difieren genéticamente, o sea, que provienen de dos linajes (especies) sin parentesco, para producir células híbridas que contienen uno o más cromosomas de cada especie y que son capaces de desarrollarse en un cultivo.
- Hibridación distante: hibridación entre plantas de poco o ningún parentesco, como la que arroja híbridos interespecíficos o intergenéricos; frecuentemente, estos híbridos sólo son posibles mediante fusión somática.
- Isoenzima: cualquiera de las formas electroforéticamente distintas que toma una enzima dentro de una célula; representan diferentes estados poliméricos que tienen la misma función, y se detectan mediante tinción.
- Locus (plural: loci): posición específica en un cromosoma en la cual está ubicado el gen que controla una determinada característica; el locus puede estar ocupado por cualquiera de los alelomorfos del gen.
- Lux (lx): unidad de medición de la luz incidente que, irradiada por un ángulo sólido de una bujía patrón, ilumina una superficie de 1 m<sup>2</sup> situada a una distancia de 1 m.
- Marcador: mutación ocurrida en un gen que facilita el estudio de su herencia.

## D. Apéndice D

### 1. Medios de cultivo más usados

#### a. Medio de Knop (Gautheret, 1959)

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	500 mg / litro
K NO <sub>3</sub>	125 mg / litro
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	125 mg / litro
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125 mg / litro

#### b. Medio de Heller (Gautheret, 1959)

ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.00 mg / litro
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.00 mg / litro
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.10 mg / litro
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.03 mg / litro
AlCl <sub>3</sub>	0.03 mg / litro
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.03 mg / litro
KI	0.01 mg / litro

#### c. Vitaminas de Miller (1976)

Mionositol	100 mg / litro
Tiamina - HCl	0.10 mg / litro
Acido nicotínico	0.50 mg / litro
Piridoxina - HCl	0.50 mg / litro

#### d. Medio nutritivo MI116 (Mosella, 1979)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1500.0 mg / litro	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	500.0 mg / litro
KNO <sub>3</sub>	1050.0 mg / litro	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300.0 mg / litro
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	71.5 mg / litro	KCl	35.0 mg / litro
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14.0 mg / litro	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.8 mg / litro
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.6 mg / litro	KI	0.8 mg / litro
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.35 mg / litro		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.2 mg / litro	Na <sub>2</sub> EDTA2	14.0 mg / litro
FeSO <sub>4</sub>	26.0 mg / litro	Mioinositol	100.0 mg / litro
Acido nicotínico	0.5 mg / litro	Piridoxina	0.3 mg / litro
Tiamina	0.1 mg / litro	Acido ascórbico	10.0 mg / litro
Glicina	0.2 mg / litro	pH del medio: 5.7	

## e. Medio MS – A

Sales MS

Vitaminas B5:	tiamina – HCl	1 mg / litro
	Mioinositol	100 mg / litro

(Gamborg et al., 1968)

Sacarosa

2%

ANA

0.5 mg / litro

BAP

0.5 mg / litro

Agar

0.8 %

## f. Medio MS – B

Sales MS

Vitaminas B5:	tiamina – HCl	1 mg / litro
	Mioinositol	100 mg / litro

Sacarosa

2%

BAP

1 mg / litro

Agar Difco

0.7 % (para solidificar)

## g. Medio MD – A

Sales MS

Vitaminas B5:	tiamina – HCl	1 mg / litro
	Mioinositol	100 mg / litro

Sacarosa

2%

ANA

1.0 mg / litro

BAP

1.0 mg / litro

Agar Difco

0.7 % (para solidificar)

## h. Medio D2a

Medio VK – M

1 mg / litro

ANA

1 mg / litro

2,4 – D

0.2 mg / litro

ZEA

0.5 mg / litro

## E. Apéndice E

Cuadro 12. Características de reguladores de crecimiento y hormonas importantes

Nombre	Nombre Químico	PM*	Uso <sup>1</sup>	Solvente	Esterilizar <sup>2</sup>	Almacenar	
						Polvo	Líquido
A. Auxinas							
IAA	Ácido indol-3-acético	175.2	MC;R	EtOH; 1N NaOH	CA/F	- 0° C	- 0° C
IBA	Ácido indol-3-butírico	203.2	MC;R	EtOH; 1N NaOH	CA/F	0-5° C	- 0° C
KIBA	Sal ácida de potasio indol-3-butírico	241.3	MC;R	Agua	CA/F	0-5° C	- 0° C
NAA	Ácido naftalenacético	186.2	MC;R	1N NaOH	CA	RT	0-5° C
2,4D	Ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético	221.0	MC;Ap	EtOH; 1N NaOH	CA	RT	0-5° C
2,4,5T	Ácido 2,4,5-tri-cloro-fenoxi-acético	255.5	Ap	EtOH	CA	RT	0-5° C
B. Citocininas							
BA	6-bencil-amino-purina	225.3	MC	1N NaOH	CA/F	RT	0-5° C
4CPPU	N-(2-cloro-4-piridil) n-fenil-urea	247.7	MC	DMSO	F	0-5° C	0-5° C
DPU	1,3-difenil-urea	212.3	MC	DMSO	F	RT	0-5° C
2iP	6(di-metil-alil-amino)purina	203.2	MC	1N NaOH	CA/F	- 0° C	- 0° C
Kinetina		215.2	MC; R	1N NaOH	CA/F	- 0° C	- 0° C
TDZ	Thidiazuron	220.2	MC	DMSO; EthOH	CA	RT	0-5° C
Zeatina		219.2	MC	1N NaOH	CA/F		
C. Giberelinas							
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico	346.4	MC;R;Ap	EtOH	CA/F	RT	0-5° C
KGA <sub>3</sub>	Sal ácida de potasio giberélico	384.5	MC;R;Ap	Agua	CA/F	0-5° C	- 0° C
D. Inhibidores							
ABA	Ácido absícico	264.3	MC;R;Ap	1N NaOH	CA/F	- 0° C	- 0° C

Adaptado del catálogo *Plant Cell Culture* 1993. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

\* PM = Peso Molecular<sup>1</sup> MC = Medio de cultura (culture medium) ; R = remojar (soak,dip) ;

Ap =Aplicar a la planta <sup>2</sup> CA = Coautoclavable con otros medios; F = Esterilización filtrada; CA/F = autoclavable con otros compuestos pero puede haber pérdida en actividad

## F. Apéndice F

1. Medio MS y Soluciones Stock utilizadas en la propagación por cultivo de meristemos apicales de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

a. Cuadro 13. Medio MSO Salts: Murashinge & Skoog, 1962m (Physiol. Plant 15:473-497)  
Vitamins: Gamborg *et al*, 1968 (Expl. Cell Res. 50:150-158)

STOCK	Para 1 litro de MSO
MS Macro	100 ml
MS Micro	1 ml
Ca	10 ml
Fe	10 ml
B5 Vitamina	2 ml
Sucrosa	30 gr
Agua destilada y desmineralizada	Ajustar volumen
Ajuste de pH	5.8
Geltrite (agar)	2 gr

b. Cuadro 14. Solución Stock de Macronutrientes utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

## MS Macro Stock

## MS Macro Salts (10X)

Compuesto	Para 1 litro de solución
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5 gr
$\text{K NO}_3$	19.0 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.70 gr
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.70 gr

c. Cuadro 15. Solución Stock de Micronutrientes utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

MS Micro Stock  
MS Micro Salts (1000X)

Compuesto	Para 1 litro de solución
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2000 gr
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16.900 gr
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6000 gr
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2500 gr
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0250 gr
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0250 gr
KI	0.8300 gr

d. Cuadro 16. Solución Stock de Calcio utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

Stock de Calcio  
(100X relativo a MS)

Compuesto	Para 1 litro de solución
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44.00 gr

e. Cuadro 17. Solución Stock de Hierro utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemos apicales de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

Stock de Hierro  
(100X relativo a MS)

Compuesto	Para 1 litro de solución
Na <sub>2</sub> EDTA	3.7300 gr
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.7800 gr

f. Cuadro 18. Solución Stock de Vitamina B5 utilizada en la preparación del medio MS para la propagación por cultivo de meristemas apicales de *pony tail* (*Beaucarnea guatemalensis* R.)

Stock de Vitamina B5  
(500X)

Compuesto	Para 1 litro de solución
Tiamina. HCl	2.500 gr
Ácido nicotínico	0.250 gr
Piridoxina. HCl	0.250 gr
Mioinositol	25.00 gr

## G. Apéndice G

Ilustración 2. Cronograma de actividades.

Actividad ha realizar	Semana																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Preparación de medios de cultivo		■	■															
Selección de planta madre	■	■																
Desinfección y establecimiento del cultivo inicial				■	■	■	■	■	■									
Enraizamiento o trasplante										■	■	■	■	■	■			
Análisis y toma de datos							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Informe																■	■	■

## H. Apéndice H

### 1. Para la etapa de desinfección:

#### a. Cálculo de la suma de cuadrados entre los grupos ( $SC_B$ )

$$SC_B = \left[ \frac{(\sum T_{X_1})^2}{n_1} + \frac{(\sum T_{X_2})^2}{n_2} + \frac{(\sum T_{X_3})^2}{n_3} + \frac{(\sum T_{X_4})^2}{n_4} \right] - \frac{(\sum T_X)^2}{N}$$

todos los datos

$$SC_B = \left[ \frac{(30)^2}{6} + \frac{(35)^2}{6} + \frac{(28)^2}{6} + \frac{(25)^2}{6} \right] - \frac{(118)^2}{24}$$

$$SC_B = \left[ \frac{900}{6} + \frac{1225}{6} + \frac{784}{6} + \frac{625}{6} \right] - \frac{13924}{24}$$

$$SC_B = [150 + 204.17 + 130.67 + 104.17] - 580.17$$

$$SC_B = [589.01] - 580.17$$

$$SC_B = 8.84$$

#### b. Cálculo de la suma de cuadrados dentro de los grupos ( $SC_B$ )

$$SC_W = (\sum T_x)^2 - \left[ \frac{(\sum T_{X_1})^2}{n_1} + \frac{(\sum T_{X_2})^2}{n_2} + \frac{(\sum T_{X_3})^2}{n_3} + \frac{(\sum T_{X_4})^2}{n_4} \right]$$

$$SC_W = (632)^2 - \left[ \frac{(30)^2}{6} + \frac{(35)^2}{6} + \frac{(28)^2}{6} + \frac{(25)^2}{6} \right]$$

$$SC_W = 632 - [150 + 204.17 + 130.67 + 104.17]$$

$$SC_W = 632 - 589.01$$

$$SC_W = 42.99$$

c. Cálculo de la suma total de cuadrados ( $SC_T$ )

$$SC_T = (SC_W) + (SC_B)$$

$$SC_T = (42.99) + (8.84)$$

$$SC_T = 51.83$$

## d. Cálculo de grados de libertad

$$gl_B = k - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$gl_W = N - k = 24 - 4 = 20$$

$$gl_T = N - 1 = 24 - 1 = 23$$

## e. Cálculo de la estimación de la varianza entre los grupos

$$S_B^2 = \frac{SC_B}{gl_B} = \frac{8.84}{3} = 2.95$$

$$gl_B = 3$$

## f. Cálculo de la estimación de la varianza de los grupos

$$S_W^2 = \frac{SC_W}{gl_W} = \frac{42.99}{20} = 2.15$$

$$gl_W = 20$$

g. Cálculo de  $F_{obt}$ 

$$F_{obt} = \frac{S_B^2}{S_W^2} = \frac{2.95}{2.15} = 1.37$$

$$S_W^2 = 2.15$$

$$F_{crit} = 3.10$$

## 2. Para la etapa de crecimiento:

## a. Prueba de la diferencia entre dos fracciones o dos porcentajes para datos no correlacionados (porcentaje de crecimiento).

## 1) Cálculo para determinar el error estándar

$$S_{Dp} = \sqrt{\frac{p_1 q_1}{N_1} + \frac{p_2 q_2}{N_2}}$$

En donde  $p_1$  = porcentaje de meristemos crecidos para el Tratamiento I,  $q_1 = 1 - p_1$ ,  $N_1$  = numero de meristemos sembrados para el Tratamiento I,  $p_2$  = porcentaje de meristemos crecidos para el Tratamiento II,  $q_2 = 1 - p_2$  y  $N_2$  = numero de meristemos sembrados para el Tratamiento II.

$$S_{Dp} = \sqrt{\frac{(10/108)(1 - 10/108)}{108} + \frac{(8/108)(1 - 8/108)}{108}}$$

$$S_{Dp} = \sqrt{\frac{(0.0926)(0.9074)}{108} + \frac{(0.0741)(0.9259)}{108}}$$

$$S_{Dp} = \sqrt{\frac{(0.0926)(0.9074)}{108} + \frac{(0.0741)(0.9259)}{108}}$$

$$S_{Dp} = \sqrt{\frac{(0.0840)}{108} + \frac{(0.0686)}{108}}$$

$$S_{Dp} = \sqrt{(0.00078) + (0.00064)}$$

$$S_{Dp} = \sqrt{0.00142}$$

$$S_{Dp} = 0.0377$$

2) Cálculo para determinar la prueba de significancia (z)

$$z_{obt} = \frac{p_1 - p_2}{S_{Dp}}$$

$$z_{obt} = \frac{(0.0926) - (0.0741)}{0.0377}$$

$$z_{obt} = \frac{(0.0185)}{0.0377}$$

$$z_{obt} = 0.4907$$

$$z_{crit.} = 1.96$$

El valor de z obtenido es menor que el valor de z crítico ( $z_{obt} < z_{crit.}$ ), por lo tanto se acepta la  $H_0$  y se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

3. Para la etapa de enraizamiento:

a. Cálculo de la suma de cuadrados entre los grupos ( $SC_B$ )

$$SC_B = \left[ \frac{(\sum T_{X_1})^2}{n_1} + \frac{(\sum T_{X_2})^2}{n_2} + \frac{(\sum T_{X_3})^2}{n_3} \right] - \frac{(\sum T_X)^2}{N}$$

$$SC_B = \left[ \frac{(2)^2}{6} + \frac{(4)^2}{6} + \frac{(1)^2}{6} \right] - \frac{(7)^2}{18}$$

$$SC_B = \left[ \frac{4}{6} + \frac{16}{6} + \frac{1}{6} \right] - \frac{49}{18}$$

$$SC_B = [0.67 + 2.67 + 0.17] - 2.72$$

$$SC_B = [3.51] - 2.72$$

$$SC_B = 0.79$$

b. Cálculo de la suma de cuadrados dentro de los grupos ( $SC_W$ )

$$SC_W = (\sum T_X)^2 - \left[ \frac{(\sum T_{X_1})^2}{n_1} + \frac{(\sum T_{X_2})^2}{n_2} + \frac{(\sum T_{X_3})^2}{n_3} + \frac{(\sum T_{X_4})^2}{n_4} \right]$$

$$SC_W = (49) - \left[ \frac{(2)^2}{6} + \frac{(4)^2}{6} + \frac{(1)^2}{6} \right]$$

$$SC_W = 49 - [0.67 + 2.67 + 0.17]$$

$$SC_W = 49 - [3.51]$$

$$SC_W = 45.49$$

c. Cálculo de la suma total de cuadrados ( $SC_T$ )

$$SC_T = (SC_W) + (SC_B)$$

$$SC_T = (45.99) + (0.79)$$

$$SC_T = 46.78$$

d. Cálculo de grados de libertad

$$gl_B = k - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$gl_W = N - k = 18 - 3 = 15$$

$$gl_T = N - 1 = 18 - 1 = 17$$

e. Cálculo de la estimación de la varianza entre los grupos

$$S_B^2 = \frac{SC_B}{gl_B} = \frac{0.79}{2} = 0.395$$

$$gl_B \quad 2$$

f. Cálculo de la estimación de la varianza de los grupos

$$S_W^2 = \frac{SC_W}{gl_W} = \frac{45.49}{15} = 3.03$$

$$gl_W \quad 15$$

g. Cálculo de  $F_{obt}$

$$F_{obt} = \frac{S_B^2}{S_W^2} = \frac{0.395}{3.03} = 0.13$$

$$S_W^2 \quad 3.03$$

$$F_{crit} = 3.68$$