

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



PRUEBA PRELIMINAR DE
PROPAGACION *IN VITRO* DE SHATE *Chamaedorea elegans* Martius MEDIANTE EMBRIONES CIGOTICOS



TESIS

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

POR

ERIC ABEL ORTEGA ORELLANA

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2001.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. EDGAR OSWALDO FRANCO RIVERA
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. WALTER ESTUARDO GARCIA TELLO
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MANUEL DE JESUS MARTINEZ OVALLE
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. ERBERTO RAUL ALFARO ORTIZ
VOCAL CUARTO	Prof. ABELARDO CAAL ICH
VOCAL QUINTO	Br. AXEL AURELIANO HERRERA PEREZ
SECRETARIO	Ing. Agr. EDIL RODRIGUEZ QUEZADA

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

De conformidad con las normas establecidas por la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de presentar a vuestra consideración el trabajo titulado:

**PRUEBA PRELIMINAR DE
PROPAGACION *IN VITRO* DE SHATE *Chamaedorea elegans* Martius MEDIANTE EMBRIONES CIGOTICOS.**

Como requisito, previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola en el Grado Académico de Licenciado.

Atentamente,



Eric Abel Ortega Orellana

ACTO QUE DEDICO

- DIOS Por dame la vida, sabiduría, y paciencia para alcanzar mis metas.
- MIS PADRES Daniel Ortega Morales
Olga Marina Orellana Sánchez
Como una muestra de agradecimiento por sus múltiples esfuerzos y sacrificios para mi formación profesional.
- MIS ABUELOS Abel Ortega Vela
Cristina Morales †
Natalia Sánchez
- MIS HERMANOS Anibal, Melvy, Klaudia, Adelzo, Olga, Ottoniel, Kenia, Priscila, Daniel.
- MIS TIOS Raquel, Miguel Angel †, Ignacio †, Lidia, Rodolfo †, Abel,
Ricardo, Ana, Marta, Lilo, Alicia, Delia, Hugo, Alberto, Toño.
- MIS CENTROS DE ESTUDIO Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
Escuela Nacional Central de Agricultura, Bárcena, Villa Nueva.
Instituto Experimental de Educación Básica con Orientación Ocupacional Guastatoya.
- LAS FAMILIAS Gónzales Castillo, Pensamiento Palomo, Cabrera Aldana.
- MIS AMIGOS: Carlos González, Marvin Salguero, Edy López, Alvaro Arana, Gilberto Cifuentes, Edgar Bámaca, Willian Arreaga, José Catalán, Fredy Orellana, Cristian Mora, Eduardo Moreira, Dorian Izaguirre, Francisco Cosme, Eric Arriaga, Larry Paul, Luis Orellana, Asdrúbal, Edwin Argueta, Estuardo Rodríguez, Nick Estrada, Rita Cabria, Erick Estacuy, Mario Gramajo, Mauricio Figueroa, Maximiliano López, Daniel Soto, Luis Ventura, Elmer Morales.

TESIS QUE DEDICO

MI PAIS GUATEMALA

A MI PUEBLO "EL RANCHO"

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

ESCUELA NACIONAL CENTRAL DE AGRICULTURA

INSTITUTO NACIONAL EXPERIMENTAL DE EDUCACIÓN BÁSICA CON ORIENTACIÓN
OCUPACIONAL GUASTATOYA.

AGRADECIMIENTOS

A:
Mis asesores Ing. Agr. M.C Víctor Manuel Alvarez C. e Ing. Agr. M.C. Domingo Amador por su acertada y oportuna asesoría para la realización del presente trabajo de tesis.

A los ingenieros agrónomos Marino Barrientos, Byron González, Alvaro Hernández, Mamerto Reyes, Amilcar Sánchez, Francisco Vásquez y Pedro Peláez por brindarme amistad y apoyo durante el desarrollo de mis actividades como auxiliar de cátedra en la Facultad de Agronomía.

A los ingenieros agrónomos Fernando Bracamonte y Vicente Martínez por contribuir en la mejora del documento final de tesis.

A Mak Milan Cruz responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía por su valiosa asesoría para la realización del trabajo de tesis.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron al desarrollo de mi vida profesional.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	III
INDICE DE FIGURAS.....	III
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCION.....	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA.....	2
3. MARCO TEORICO.....	3
3.1 MARCO CONCEPTUAL.....	3
3.1.1 Germinación.....	3
3.1.2 Latencia.....	3
3.1.2.1 Tipos de latencia de la semilla.....	3
3.1.3 Cultivo <i>in vitro</i>	4
3.1.4 Medio de cultivo.....	4
3.1.4.1 Minerales.....	5
3.1.4.2 Carbohidratos.....	6
3.1.4.3 Vitaminas.....	6
3.1.4.4 Reguladores del crecimiento.....	6
3.1.4.4.A Auxinas.....	6
i. Biosíntesis.....	6
ii. Efectos biológicos.....	7
iii. Mecanismo de acción.....	8
3.1.4.4.B Citocininas.....	9
i. Biosíntesis.....	9
ii. Efectos biológicos.....	9
iii. Mecanismo de acción.....	11
3.1.4.4.C Giberelinas.....	11
i. Biosíntesis.....	11
ii. Efectos Biológicos.....	12
iii. Mecanismos de acción.....	12
3.1.4.5 Complejos orgánicos.....	13
3.1.4.6 Materiales inertes de soporte.....	13
3.1.4.7 El pH de la solución de los medios de cultivo.....	13
3.1.5. Micropropagación.....	14
3.1.5.1 Cultivo de embriones cigóticos.....	14
3.2 MARCO REFERENCIAL.....	15

3.2.1 Descripción del área utilizada para realizar la investigación	15
3.2.2 Condiciones ambientales.....	15
3.2.3 Clasificación taxonómica de la especie en estudio.....	15
3.2.4 Descripción de <i>Chamaedorea elegans</i> Martius.....	15
3.2.4.1 Tallo.....	15
3.2.4.2 Hojas	15
3.2.4.3 Inflorescencias	15
3.2.5 Referencias en Chamaedoreas.....	16
4. OBJETIVOS.....	19
5. HIPOTESIS.....	20
6. METODOLOGIA.....	21
6.1 Inducción a la dediferenciación celular.....	21
6.1.1 Descripción de los tratamientos	21
6.1.2 Descripción de la unidad experimental	22
6.1.3 Variable respuesta	22
6.1.3.1 Formación de callo	22
6.1.3.2 Variables adicionales.....	22
6.1.4 Análisis de los datos.....	22
6.1.5 Manejo del experimento	22
6.1.5.1 Preparación de las soluciones patrón	22
6.1.5.1.A Solución patrón de macro nutrientes M&M	23
6.1.5.1.B Solución patrón de micro nutrientes M&M.....	23
6.1.5.1.C Solución patrón de hierro 100x.....	24
6.1.5.1.D Solución patrón de vitaminas 1000x.....	24
6.1.5.1.E Preparación de una solución patrón de Mio-inositol 100x.....	24
6.1.5.2 Reguladores del crecimiento.....	24
6.1.5.3 Preparación de 250 ml de medio de cultivo M&M.....	25
6.1.5.4 Colecta de los frutos en el campo	25
6.1.5.5 Desinfección de las semillas	26
6.1.5.6 Extracción de los embriones de las semillas.....	26
6.1.5.7 Siembra de los embriones en los medios de cultivo.....	26
6.1.5.8 Colocación de las unidades experimentales en el cuarto de incubación de cultivos.....	27
6.2 Inducción de brotes a partir de plántulas.....	27
6.2.1 Descripción de la Unidad experimental	27
6.2.2 Descripción de los tratamientos	27
6.2.3 Variable respuesta	28
6.2.4 Manejo del experimento	28
6.2.4.1 Preparación de las soluciones patrón y los medios de cultivo M&M.....	28
6.2.4.2 Siembra de los brotes en los medios de cultivo.....	28
6.2.4.3 Colocación de las unidades experimentales dentro de la cámara de cultivo.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	30

7.1 Desdiferenciación celular	30
7.1.1 Formación de callos	30
7.1.2 Variables respuesta adicionales	32
7.2 Inducción de brotes a partir de plántulas.....	34
8. CONCLUSIONES.....	35
9. RECOMENDACIONES.....	36
10. BIBLIOGRAFÍA	37
11. APENDICES	40

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Sustancias que pueden formar parte de los medios nutritivos para inducir el crecimiento y desarrollo vegetal	5
CUADRO 2. Factores y niveles a evaluar en el estudio.....	21
CUADRO 3. Descripción de los tratamientos utilizados en la desdiferenciación celular.....	21
CUADRO 4. Macro nutrientes necesarios para preparar una solución patrón.....	23
CUADRO 5. Micro nutrientes necesarios para preparar una solución patrón	23
CUADRO 6. Factores y niveles a evaluar en el estudio.....	27
CUADRO 7. Concentraciones de GA ₃ y BAP utilizadas en la inducción de brotes.....	28
CUADRO 8. Proporción de callo formado por tratamiento, considerando dos posibles respuestas (sí, no).....	31
CUADRO 9A. Concentraciones de sales M & M para preparar un litro de solución de medio nutritivo.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácido Naftalenacético	8
Figura 2. Ácido diclorofenoxiacético	8
Figura 3. Adenina.....	9
Figura 4. Bencil aminopurina	10
Figura 5. 2-isopentenil adenina.....	10
Figura 7. Efecto de la concentración de Auxinas y Citocininas en la producción de callos.....	31
Figura 8. Efecto de las concentraciones de Auxinas y Citocininas sobre el número de brotes deformados.....	32
Figura 9. Porcentaje de brotes vigorosos formados en la desdiferenciación celular.....	33

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenin-trifosfato
BAP	Bencil aminopurina
°C	Grados centígrados
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado
Cms	Centímetros
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Dicloruro de cobalto hexahidratado
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado
°F	Grados Fahrenheit
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de hierro heptahidratado
GA_3	ácido giberélico
HCl	ácido clorhídrico
H_3BO_3	ácido bórico
IBA	Ácido indolbutírico
IK	Yoduro de potasio
Mg/lit	Miligramos/litro
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnesio
M&M	Miller & Murashige
Mmol l^{-1}	Milimoles/litro
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Dihidrogenofosfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH_4NO_3	Nitrato de amonio
KH_2PO_4	Dihidrogenofosfato de potasio
KNO_3	Nitrato de potasio
2-ip	2-isopentenil adenina
2,4-D	2,4-diclorofenoacético

PRUEBA PRELIMINAR DE PROPAGACION *IN VITRO* DE *Chamaedorea elegans* Martius MEDIANTE EL CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS

PRELIMINARY *IN VITRO* PROPAGATION OF *Chamaedorea elegans* Martius BY MEANS OF ZIGOTIC EMBRYOS

RESUMEN

En Guatemala la planta de shate *Chamaedorea elegans* Martius tiene importancia debido a que la exportación de sus hojas representa al país ingreso de divisas, las que principalmente se extraen de los bosques de El Petén en donde se encuentran de manera natural, esta práctica es dañina desde varios puntos de vista ya que el hecho de que su recolección se haga en el campo donde se encuentran directamente repercute en el demérito de su valor, agregado a esto se daña a la flora circunvecina a las plantas de shate.

Esta especie por estas situaciones se a cultivado en condiciones bajo invernadero, pero se han encontrado ciertos problemas ya que su propagación por medios sexuales es una tarea difícil, porque sus semillas presentan una testa muy dura lo cuál provoca un tipo de latencia mecánica lo que dificulta seriamente su germinación llegándose a obtener normalmente hasta un 16%.

Considerando la problemática de la baja germinación y su largo periodo, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía se ha recurrido a hacer uso de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* para contribuir al desarrollo de una metodología o procedimiento de propagación; para ésto se usó como explante los embriones cigóticos los cuales se sembraron en el medio artificial de Miller & Murashige y se agregaron los reguladores del crecimiento 2,4-D y 2-ip ambos en 3 niveles resultando 9 tratamientos, más un tratamiento adicional en el que no se aplicó reguladores, con el objetivo de producir tejido calloso; la distribución de los tratamientos fue mediante el diseño experimental completamente al azar. Analizando los resultados de la formación de tejido calloso mediante una prueba no paramétrica para proporciones independientes se observó que entre los tratamientos no hubo diferencia significativa, notándose que la combinación de los dos reguladores no estimularon la respuesta deseada. Así mismo es importante mencionar que el tratamiento en el que no se aplicó reguladores del crecimiento formó brotes verdes y vigorosos en un porcentaje de 50%.

En otra fase de estudio se trabajó con plántulas de shate obtenidas a partir de la siembra de embriones cigóticos en el medio M&M, esto con el fin de inducir la formación de brotes para lo que se utilizó 3 concentraciones combinadas de los reguladores del crecimiento GA₃ y BAP. A los dos meses de haber implementado el experimento se observó que no se manifestó la respuesta deseada, por lo que se puede agregar de que las concentraciones evaluadas posiblemente no fueron las ideales para obtener el fin deseado.

1. INTRODUCCION

El shate *Chamaedorea elegans* Martius es una especie perteneciente a la familia Arecaceae cuya importancia radica en el aprovechamiento de sus hojas hacia el mercado de exportación. Según datos estadísticos del Banco de Guatemala (12), para 1,998 se exportaron follajes ornamentales (se incluye ésta planta) a los siguientes países: Estados Unidos, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Alemania, España, Francia, Mónaco, y Holanda; en una cantidad de 486,294 kilogramos, lo cual representó para Guatemala el ingreso de US\$462,010 en divisas, indicando que este rubro agrícola tiene importancia económica.

Según Sagastume Aldecoa (27), esta planta crece en forma natural en áreas boscosas de la región Norte del país que comprende los departamentos de Alta Verapaz y Petén. En Alta Verapaz, el shate natural se desarrolla mucho, característica que afecta su uso comercial dado que el material exportable debe tener algunas dimensiones particulares; en El Petén es donde más se recolecta ya que su desarrollo cumple con los estándares ideales para su exportación. Las hojas de esta planta son extraídas de los bosques naturales de El Petén lo que implica que se dañe tanto la misma planta como las plantas circunvecinas, aunado a esto los incendios forestales, el avance de la frontera agrícola, y la extracción de madera contribuyen a que un futuro no muy lejano desaparezcan algunas especies. Las hojas colectadas a grandes distancias son transportadas al centro de acopio lo que causa demérito de la calidad de las mismas, lo que repercute directamente en el precio de compra para su posterior exportación.

La propagación sexual del shate presenta dificultades, ya que las semillas presentan latencia, lo que genera que su periodo a la germinación sea largo, además los porcentajes de germinación son bajos(23). La germinación natural de las semillas de shate *C. elegans* es de 16% (34), y por medio de técnicas convencionales se incrementa considerablemente, habiéndose reportado en semillas de *C. radicalis* 55% de germinación (16) y para *C. elegans* 52% (34), esto es un avance significativo. Las diferentes técnicas permiten obtener una planta a partir de un embrión cigótico, pero el uso del cultivo de tejidos *in vitro* puede permitir que a partir de un solo embrión cigótico se obtengan varias plantas, pasando este explante según sea el objetivo, ya sea por la etapa de desdiferenciación celular o inducción de brotes a partir de una plántula. Las plántulas obtenidas por medio de propagación *in vitro* estarían libres de todo tipo de microorganismo que pueda inhibir su crecimiento y desarrollo. Además el material obtenido puede ser idéntico al material original debido a la propagación clonal efectuada, con lo cual se crearían plantaciones homogéneas en características de interés. También se evitaría la extracción desmedida de material de los bosques naturales ya que se usaría poco material original para la reproducción con lo que se protegería las especies de *Chamaedoreas*, por lo que es muy importante realizar ensayos a manera de contribuir al desarrollo de una metodología de propagación *in vitro*. Por la problemática planteada, en la Facultad de Agronomía se implementó líneas de investigación en propagación *in vitro* a manera de contribuir al desarrollo de una metodología de propagación de la especie mencionada, para esto se eligió como explante los embriones cigóticos usando como base el medio de Miller y Murashige combinando 3 concentraciones de 2,4-D y 3 concentraciones de 2-ip para obtener callos. Además se trabajó con plántulas obtenidas a partir de la siembra de embriones cigóticos en el medio M&M sin aplicación de reguladores del crecimiento, con el fin de generar brotes, para ello se usó la combinación de 3 concentraciones de GA₃ y 3 concentraciones de BAP.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

Por lo general las hojas de shate son extraídas de los bosques de El Petén, lo cuál implica que si no hay un plan de manejo adecuado se afecte la vegetación ya que se provocan daños a las plantas mencionadas y también a las plantas vecinas. Las hojas se colectan a grandes distancias del centro de acopio por lo que el transporte es causa del detrimento de la calidad, y por ende disminuye su precio para los mercados internacionales. Esta práctica de extracción de la planta aunado a los constantes incendios forestales, el avance de la frontera agrícola, habilitación de áreas para la ganadería y la extracción de madera es una grave amenaza que podría repercutir en la posible extinción de *Chamaedorea elegans*, y en el futuro pueda ser difícil encontrarla de manera natural.

Por estos motivos esta planta a sido propagada en viveros por medio de métodos convencionales, pero se han dado ciertos problemas, ya que en el caso de la reproducción sexual por medio de semillas, las *Chamaedoreas* son muy especiales, su propagación es una tarea difícil, ya que las semillas presentan latencia, lo que significa que naturalmente se mantienen en estado de reposo y que para que la germinación se cumpla debe transcurrir un lapso de tiempo considerable. Según Moreno (23), en *Chamaedorea elegans* se a detectado latencia lo que implica que éstas se lieven entre 3 a 9 meses para germinar. La latencia según Vásquez Yanez (33), es de tipo mecánico ya que las semillas presentan cubiertas duras lo cual no permite el intercambio gaseoso ni la absorción de agua por parte del embrión. Se a reportado que naturalmente las semillas presentan un 16% de germinación el cual se considera bajo (34).

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 Germinación

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

El proceso de germinación consiste en la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento. La semilla contiene un embrión; uno de cuyos extremos, la radícula, formará la raíz de la planta; el otro extremo, la plúmula, formará el tallo y las hojas (4).

3.1.2 Latencia

La latencia puede definirse como el estado de crecimiento y metabolismo suspendidos. Puede ser impuesto por las condiciones desfavorables, pero los tejidos en ese estado a menudo siguen sin crecer aunque se los ubique en condiciones ideales. Esto indica que la latencia puede ser impuesto desde dentro y controlado por mecanismos del tejido(4).

3.1.2.1 Tipos de latencia de la semilla.

Los principales mecanismos que causan latencia en la semilla o lo prolongan impidiendo la germinación son los siguientes (4):

- a) Factores ambientales:
 - i. Exigencia de luz para germinación: positiva o negativa.
 - ii. Altas temperaturas.
 - iii. Ausencia de agua.
- b) Factores internos:
 - i. Testa de la semilla: impide el intercambio gaseoso.
 - ii. Testa de la semilla: efectos mecánicos.
 - iii. Inmadurez del embrión.
 - iv.. Baja concentración de etileno.
 - v.. Presencia de inhibidores.
 - vi. Ausencia de promotores del crecimiento.
- c) Mecanismos de cronometraje:
 - i. Postmaduración
 - ii. Desaparición de los inhibidores.

iii. Síntesis de promotores del crecimiento.

Efectos de la testa de la semilla

En algunas semillas la latencia es impuesta por la presencia de la testa; si ésta se quita la semilla germina. Pueden estar presentes dos tipos de mecanismos: uno bioquímico o fisiológico y el otro puramente mecánico. La testa es casi impermeable a la difusión de los gases y el embrión puede mantenerse en condición de latencia por falta de oxígeno. Esto podría funcionar de diversos modos. El oxígeno es necesario para el metabolismo (4).

3.1.3 Cultivo *in vitro*

Según Pierik (25), define cultivo *in vitro* de plantas superiores como: El cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

El término cultivo *in vitro* es un término muy genérico que se refiere más bien a la metodología usada que al propio objetivo de ese método. En sentido estricto, *in vitro* quiere decir "dentro de vidrio", es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado.

El estudio de cualquier fenómeno biológico en condiciones de laboratorio exige reproducir de la forma más aproximada posible todos los factores que puedan incidir en el fenómeno estudiado cuando este sucede en la naturaleza. Este principio general se aplica también al cultivo *in vitro* de plantas.

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el biotopo de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados.

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino con sólo una parte de él (explante), a la dificultad de reproducir las condiciones naturales se debe añadir la dificultad de suministrar a la parte todo aquello que antes obtenía del sistema completo.

En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas superiores es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene, por tanto, conocer cuales son los principales factores que conforman el ambiente del explante y que deberán ser controlados.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro* como: ambiente químico (medio de cultivo, pH), ambiente físico (temperatura, luz, fotoperiodo, aireación).

3.1.4 Medio de cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*.

También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones(25).

CUADRO 1. Sustancias que pueden formar parte de los medios nutritivos para inducir el crecimiento y desarrollo vegetal

Agua		
Sustancias orgánicas	Macroelementos	Microelementos
		Fe
		Zn
Azúcares	N	B
Aminoácidos	P	Mn
Auxinas	K	Cu
Citoquininas	Ca	Ni
Giberelinas	Mg	Co
Ácido abscísico	S	Al
		Mo
		I

Fuente: Modificado de Pierik (25)

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo.

3.1.4.1 Minerales

Una provisión de elementos inorgánicos: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre, es esencial para el crecimiento de tejidos y órganos vegetales *in vitro* (13).

Según Closal y Cueva (5), los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Por ejemplo: el magnesio es parte de la molécula de clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el hierro, zinc y molibdeno son parte de ciertas enzimas. Además del C, H y O se conocen otros 12 elementos esenciales para el crecimiento de la planta: nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno. Los 6 primeros son requeridos en cantidades relativamente grandes y se los conoce como macroelementos, los 6 últimos son requeridos en cantidades pequeñas (<de 0,5 mmol l⁻¹) y se les denomina microelementos.

3.1.4.2 Carbohidratos

Se requiere en los tejidos y órganos vegetales (excepto en embriones maduros). De ordinario se emplea sucrosa del 2 al 4%, pero la glucosa es satisfactoria (13).

Según Closal y Cueva (5), normalmente para el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos es necesario adicionar una fuente de carbono en el medio, debido a que el crecimiento *in vitro* tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. La sacarosa es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1-6% de sacarosa en el medio, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa.

3.1.4.3 Vitaminas

La única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivos de células y órganos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos (21).

Según Closal y Cueva (5) la mayor parte de las plantas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente lo hacen en cantidades infraóptimas. Para lograr un buen crecimiento es necesario a menudo suplementar al medio con una o más vitaminas. La tiamina (B1) es la que más se utiliza y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro*, como son: piroxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico (B5).

3.1.4.4 Reguladores del crecimiento

3.1.4.4.A Auxinas

i. Biosíntesis

Barceló y Rodrigo (2) mencionan que el aumento de síntesis de AIA era consecuencia del enriquecimiento del medio en el aminoácido triptófano que se convertía en AIA. Desde entonces se ha demostrado claramente que el triptófano es el precursor del AIA. Las vías de síntesis del AIA se basan en la evidencia obtenida a partir de la presencia de intermediarios y su actividad biológica y el aislamiento de enzimas capaces de convertir *in vivo* a estos intermediarios. Así se han podido establecer cuatro vías de biosíntesis que son:

Vía del ácido indolpirúvico. La primera etapa del proceso, es la formación del ácido indolpirúvico a partir del triptófano es catalizada por una aminotransferasa inespecífica, que también puede utilizar ácidos glutámico y aspártico y aminoácidos aromáticos como donadores del grupo amino. La segunda enzima sería ácido indolpirúvico descarboxilasa, aislada y purificada de varios materiales. La última enzima en esta vía biosintética que catalizará el paso de indolacetaldehído a AIA no es siempre la misma, ya que hay diferentes enzimas según la especie (2).

Vía de la triptamina. La primera etapa en esta cadena de reacciones es la descarboxilación del triptófano a triptamina catalizada por la triptófano descarboxilasa, es una enzima muy específica que actúa sobre la forma L-triptófano y no sobre la D-triptófano (2).

Vía de la indolacetoxina. Esta vía es característica de la familia Brassicaceae. En el género Brassica se encuentra indolacetonitrilo, indolacetaldoxima y glucobrasicina. En todas las plantas ensayadas la indolacetaldoxima se convierte en AIA, mientras que en otros casos indolacetaldoxima puede convertirse en destioglucobrasicina y glucobrasicina (2).

Vía del triptofol. Es una modificación de la vía del indolpirúvico, y el triptofol aparece como una reacción lateral transitoria, es una vía poco importante, ya que aparece en muy pocas especies. Se ha demostrado la transformación de triptófano en triptofol y la conversión de éste en AIA (2).

ii. Efectos biológicos

Según Closal y Cueva (5), se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos.

Según weaver (35), las auxinas desempeñan una función importante en la expansión de las células de tallos y coleóptilos. Estimulan la división celular. Las auxinas estimulan la dominancia apical, actividades cambiales y pueden afectar los fenómenos de abscisión y la diferenciación de capas de abscisión; aunque con frecuencia retardan su desarrollo.

Según Devlin (7), las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, como es incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua, reduciendo la presión de la pared o aumentando la síntesis de ARN, proteínas específicas y aún de la misma pared, lo que provoca un aumento en la plasticidad de la pared celular, que trae como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento.

Según Bidwell (4), el balance auxina-citocinina es un factor muy importante en la regulación del crecimiento por alargamiento o por división celular.

Cuando la proporción auxina-citocinina es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales. Una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas causa la formación de brotes. Por lo tanto si se provocan pequeños cambios en la proporción de citocininas y auxinas puede obtenerse el inicio de meristemas, tanto radicales como apicales, pudiendo controlarse así la morfogénesis *in vitro* en gran variedad de tejidos (15).

Según Skoog y Miller (29), las citocininas interactúan con las auxinas para mostrar expresiones diferentes de crecimiento.

A continuación se presenta la estructura química de algunas auxinas que son utilizadas más frecuentemente en el cultivo de tejidos *in vitro* con el fin de la inducción de desdiferenciación celular.

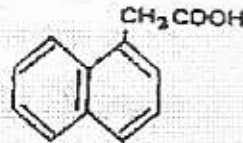


Figura 1. Ácido Naftalenacético

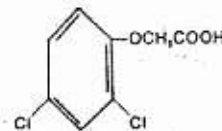


Figura 2. Ácido diclorofenoxiacético

iii. Mecanismo de acción

Según Weaver (35), la expansión celular se da debido a que cuando se incrementa la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de ésta alrededor de la célula y la presión de turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar, lo que hace que el agua entre a las células, provocando su expansión.

La plasticidad es una deformación irreversible de las paredes provocada probablemente por la ruptura de enlaces cruzados entre las microfibrillas de celulosa de las paredes celulares (9).

El aumento del tamaño de las células se produce en dos etapas:

Primeramente, ocurre un aflojamiento de las paredes celulares (proceso que requiere la presencia de auxinas y oxígenos), seguido de una absorción de agua y una expansión de las paredes.

La síntesis de proteínas: El ADN sirve de base a la síntesis de RNA mensajero, que se desplaza al interior del citoplasma y a los ribosomas, donde comunica su información y controla la síntesis proteínica. Las moléculas de ARN de transferencia reúnen los aminoácidos y los llevan a los ribosomas, donde se conjuntan para formar proteínas, de acuerdo con las indicaciones del ARN mensajero.

Para el caso específico del 2,4-D, éste ya dentro de las células provoca una saturación de auxinas y trastorna las fluctuaciones de auxinas que requieren el crecimiento normal y la diferenciación. Muchas funciones de los

vegetales, como el transporte del floema, la absorción y la fotosíntesis se trastornan debido a cambios morfológicos y bioquímicos que se producen al quebrantar el curso normal de desarrollo mediante la aplicación de 2,4-D. El compuesto impide que el citoplasma inmaduro se vuelva maduro. Incrementa el nivel del ARN y este proceso puede conducir al crecimiento adicional y anormal de los tejidos (32).

3.1.4.4.B Citocininas

i. Biosíntesis

Según Barceló y Rodrigo (2), se consideran tres posibilidades para la metabolización de las citoquininas:

- Que sean metabolizadas durante su utilización al ser unidas o incorporadas a otras moléculas.
- Que sean destruidas por procesos catalíticos
- Que sean convertidas a formas inactivas de almacenamiento de donde puede ser convertidas de nuevo en formas activas.

Las citocininas parecen ser sintetizadas por la incorporación de una cadena lateral, generalmente con cinco carbonos en la posición N6 de la base nitrogenada Adenina. Esta base nitrogenada tiene la estructura idéntica a la adenina que ocurre en los ácidos nucleicos (2).

Todos los datos que se poseen hoy día indican que las citoquininas se sintetizan en los ápices radicales. Los precursores en principio podrían ser adenina, adenosina y ácido mevalónico (3).

ii. Efectos biológicos

Según Hurtado y Merino(15), el nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina (Figura.3), en los cuales el grupo amino lleva determinados sustituyentes en la posición 6. Entre las citocininas sintéticas se puede mencionar el BAP y 2-ip (ver Figura 4 y 5).

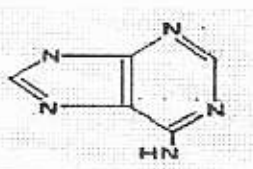


Figura 3. Adenina

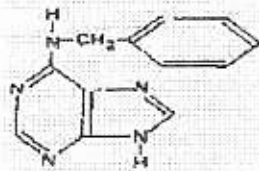


Figura 4. Bencil aminopurina

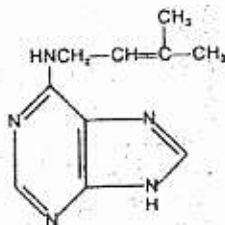


Figura 5. 2-isopentenil adenina

Están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical.

Las citocininas se concentran en tejidos con crecimiento activo, ya que los niveles citocinínicos son muy altos en frutos jóvenes en desarrollo, en semillas, embriones, hojas y predominantemente, en las raíces, que parecen ser la fuente principal de citocininas de las plantas, desde las cuales son enviadas hacia los brotes. Estas promueven la división celular y el efecto tiene lugar con concentraciones tan bajas como (5×10^{-11} M); inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento; actúan en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo. Para que pueda tener lugar la división celular deben de sucederse una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis), en los cuales la presencia de las citocininas es necesaria para la mitosis(15).

Según Miller (22), en ocasiones las citocininas afectan la germinación. Las semillas de ciertas variedades de lechuga, cuya germinación requiere luz, pueden germinar en la oscuridad, cuando primeramente se les trata con cinetina.

Según Rojas Garcidueñas (26), las citocininas inducen la iniciación del crecimiento en los tallos y ramas, en el rompimiento del letargo de las yemas y semillas en muchas especies, y efecto sobre el fenómeno de dominancia apical.

Según Córdova (6), no se conoce muy bien a qué nivel actúan las citocininas en el proceso de la germinación, aunque se ha indicado que el tratamiento hormonal puede revertir la acción de ciertos inhibidores naturales de germinación o iniciar proceso biosintéticos de proteínas.

iii. Mecanismo de acción

No se conoce bien la acción fundamental de las citocininas; fundamentalmente se supone que se adhiere al ARN de transferencia y, cuando esto sucede en determinados sitios, provoca el funcionamiento de ciertos codones, controlando así la síntesis de algunas proteínas o enzimas (26). Según Weaver (35), se sabe que las citocininas pueden incorporarse a ácidos nucleicos en las células.

Según Hurtado y Merino (15), para que pueda tener lugar la división celular deben de sucederse una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis), en los cuales la presencia de las citocininas es necesaria para la mitosis; además, si la citocinina está presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante, por lo menos en uno de los tres pasos necesarios para la división celular.

3.1.4.4.C Giberelinas

I. Biosíntesis

Son reguladores del crecimiento formados de diterpenos los que están conformados por cuatro unidades de isopreno, por lo común formando tres anillos, además de presentar un puente de lactona (Figura. 6).

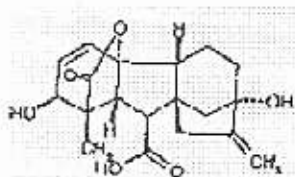


Figura 6. Ácido giberélico

Las giberelinas se pueden sintetizar a partir del ácido mevalónico en semillas inmaduras de *Cucúrbita máxima*, tal síntesis procede por la ruta biosintética general de isoprenoides de NADPH. Siendo el ácido mevalónico el primer eslabón exclusivo de la ruta biosintética general de isoprenoides. Este compuesto es ahora activado hasta

mevalónico pirofosfato por una mevalonato kinasa, que produce mevalonato-P estando envuelto en la reacción un mol de ATP, y después convertido en mevalonato-PP por una fosfomevalonato kinasa. Los isoprenoides que posteriormente van a ser sintetizados por esta vía son moléculas complejas de 10, 15 20 ó 40 átomos de carbono, formadas por adiciones sucesivas, hasta 20 C de una unidad básica de 5 C llamada isopentenil pirofosfato. Este compuesto deriva del mevalonato-PP por acción de un mevalonato-PP descarboxilasa que forma dióxido de carbono a expensas del grupo carboxilo libre, deshidratando al mismo tiempo en una reacción dependiente de ATP. Una vez conseguido el eslabón de 5 C, el intermediario 10 C se forma por condensación entre isopentenil pirofosfato y su isómero, fruto de la acción de una isopentenil pirofosfato isomeradimetilalilpirofosfato.

La adición de una nueva molécula de isopentenil pirofosfato al geraniol pirofosfato, producto de la primera condensación, daría farnesol pirofosfato, y una nueva condensación formaría geranylgeraniol pirofosfato, intermediario de 20 átomos de carbono. El geraniol pirofosfato es un punto de diversificación hacia diterpenos, carotenos etc., por una parte o giberelinas por otra (15).

ii. Efectos Biológicos

Las giberelinas tienen un amplio espectro de actividad biológica pero su papel principal es la regulación del crecimiento, además son las responsables de la hidrólisis de las reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de las semillas (15). Las giberelinas pueden terminar con el reposo de las semillas de muchas especies(35).

Según Bidwell (4), en resumen los efectos de las giberelinas son: alargamiento celular (no por el mecanismo de las auxinas), división celular, inducción de enzimas, contrarresta el letargo (antagoniza al ABA), inducción de brotes adventicios.

iii. Mecanismos de acción

Las giberelinas se a sugerido que actúan promoviendo la síntesis de auxinas a partir de su precursor triptófano o triptamina. Este hecho, por sí solo, no explica los diferentes efectos de las giberelinas, por lo que lo más probable es que éstas activen una multiplicidad de eventos bioquímicos, incluyendo la conversión de triptofano a auxinas (15).

Las giberelinas pueden provocar la expansión celular, mediante la inducción de enzimas que debiliten las paredes celulares. Otro mecanismo mediante el cual las giberelinas pueden estimular la expansión celular es la hidrólisis del almidón, resultante de la producción de α -amilasa generada por las giberelinas, pudiendo incrementar la concentración de azúcares y elevando así la presión osmótica en la savia celular, de modo que el agua entra a la célula, y tiende a expandirla (35).

3.1.4.5 Complejos orgánicos

El más útil de estos materiales es el agua de coco, en una concentración de 10 a 15% por volumen. A veces se han empleado extractos de levaduras o complejos de aminoácidos, por ejemplo, hidrolizado de caseína. En el cultivo de semillas de orquídeas ha resultado útil el puré de bananas (13).

3.1.4.6 Materiales inertes de soporte

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento (15).

Según Closal y Baldovino (5), medio sólido es todo aquel que contiene un agente gelificante, y entre los más utilizados en cultivo *in vitro* se pueden mencionar:

- a. Agar : Es una mezcla de polisacáridos extraídos de un alga marina. Tiene una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red. La planta no puede digerirlo ni adsorberlo, además no interactúa con los componentes nutritivos del medio. El agar se funde a altas temperaturas (100°C), solidifica alrededor de los 40°C y no se degrada con la luz. Generalmente se utiliza a una concentración de 0,6 - 1%. El principal problema con este gelificante es su elevado costo.
- b. Gerite : Es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar. Se puede usar a una concentración de 0.15-0.30%. Los geles de gelrita son notablemente más claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente. El costo del gerite es menor que el del agar.

3.1.4.7 El pH de la solución de los medios de cultivo

Según Martínez Arroyo (19), el pH influye en la permeabilidad de la membrana celular; por lo tanto, su ajuste tiene como objetivo mantener un alto índice de asimilación de nutrientes contenidos en el medio de cultivo. El ajuste del pH del medio es concomitante con las características físicas del mismo; por regla general, para las formulaciones líquidas el pH debe ajustarse de 4.8 a 5.5 y para las sólidas de 5.5 a 6.4. Sin embargo, el valor de pH y la forma de ajustarse puede afectar las propiedades físicas y nutritivas del medio, ya que a pH's bajos la solidificación del agar puede ser un problema y a pH's altos puede ocurrir precipitación de algunos nutrientes.

Según Hurtado y Merino (15), el ajuste del pH del medio al momento de su preparación se hace utilizando soluciones diluidas de HCl y NaOH 1.0 N para aumentarlo o reducirlo, respectivamente, y se hace el ajuste del pH antes de que el medio sea diluido a su volumen final y antes de agregar el agar. El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia en el desarrollo de cualquier proyecto de cultivo *in vitro*. A

pesar de su importancia, en muchos experimentos este control se limita a fijar su valor inicial sin reparar en los posibles efectos de su dinámica.

3.1.5. Micropropagación

La micropropagación es la técnica para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas, tales como embriones, semillas, tallos, puntas de ramas, puntas de raíces, callo, células individuales y granos de polen (13).

Según Closal y Baldovino (5), micropropagar es el proceso de multiplicar plantas *in vitro*. A través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia.

3.1.5.1 Cultivo de embriones cigóticos

El principio subyacente del método de embriones cigóticos *in vitro* es la excisión aséptica del embrión y la posterior siembra de éste en un medio conveniente para su desarrollo bajo condiciones óptimas de cultivo. En general este método es relativamente fácil para obtener embriones libres de patógenos. El aspecto más importante a tomar en cuenta en esta técnica es la selección del medio necesario en el cuál será colocado el embrión. Los nutrientes que se deben usar en el medio no están rigurosamente determinados, los embriones inmaduros necesitan combinaciones de nutrientes más complejos en comparación de embriones maduros.

Mientras relativamente embriones maduros pueden ser cultivados en sales inorgánicas, y sucrosa como fuente de energía, los embriones jóvenes requieren diferentes combinaciones de vitaminas, aminoácidos, hormonas y en algunos casos extractos naturales como leche de coco (30).

Entre las aplicaciones del cultivo de embriones se puede mencionar:

a. Vencimiento de la inviabilidad

Una de las mayores causas de que el embrión aborte es el incorrecto desarrollo del endospermo. El cultivo aséptico del embrión en medios nutritivos puede solucionar este problema.

b. Vencimiento de la latencia en las semillas y problemas relacionados.

Las causas de la latencia en las semillas son varias e incluye la presencia de inhibidores endógenos, luz, temperatura, requerimientos de almacenamiento, y embriones inmaduros.

Entre los problemas relacionados a la latencia está la presencia de parásitos obligados en las semillas, los cuáles pueden evitarse con la siembra de los embriones(30).

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 Descripción del área utilizada para realizar la investigación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la Subárea de Manejo y mejoramiento de Plantas, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, localizado en la Ciudad Universitaria zona 12.

3.2.2 Condiciones ambientales

Las unidades experimentales se colocaron en la cámara de cultivo, en la cual se contó con las siguientes condiciones ambientales:

- 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.
- Temperatura, 25 ° C, con una oscilación de 1 °C.
- Intensidad de luz de 2,000 Lux.

3.2.3 Clasificación taxonómica de la especie en estudio.

Reino : Plantae
 Filo : Magnoliophyta
 Clase: Liliopsida
 Subclase: Arecidae
 Orden: Arecales
 Familia: Arecaceae
 Género: Chamaedorea
 Especie: elegans (31)

3.2.4 Descripción de *Chamaedorea elegans* Martius

El shate es una planta muy delgada, cuando adultas tan altas como 2 metros o aún más altas, pero a menudo florecen cuando aún son tan pequeñas como de unos 30 cms de alto; en cuyo caso son esencialmente acaulescentes.

3.2.4.1 Tallo

Erecto o decumbente, con 8 a 16 mm de diámetro, verde densamente anillados con cortos entrenudos.

3.2.4.2 Hojas

Pocas y pequeñas, la vaina larga, delgada y abiertas cerca de la base. El peciolo delgado, 12-27 cm de largo. El raquis muy delgado y pálido detrás. De 11 a 20 pinnas u hojuelas a cada lado del raquis, lineares angostamente lanceoladas, largamente atenuadas en el ápice de 12 a 20 cms de largo y de 1-2 cms de ancho; el nervio central primario pálido, prominente y brevemente elevado en el haz; nervios secundarios generalmente menos prominentes, y 2 en cada lado igualmente espaciados; nervios terciarios numerosos y finos.

3.2.4.3 Inflorescencias

Erectas desde las vainas. El pedúnculo de 10-13 cm de largo o más, subtendidas por vainas tubulares partidas hacia el ápice; estas vainas en número de 4-7 en inflorescencias masculinas y de 6-9 en inflorescencias femeninas. Los espádices con pocos o numerosos raquis que pueden ser simples o ramificados con delgada parte dorsal. El raquis pistilado llega a ser anaranjado cuando maduran los frutos.

Flores Estaminadas: Sésiles, remotamente espiraladas, de 2 mm de largo, amarillo-pálido, prominentemente nervadas cuando secas, el caliz de 0.75 mm de largo, suavemente trilobulados; pétalos connados cerca de las puntas, el ápice de la corola con una abertura tri-angulada; con estambres con cortos filamentos y anteras, éstos escasamente visibles por debajo del ápice hexa-angulado del pistilo.

Flores pistiladas: Al igual que las estaminadas, sésiles y remotamente espiraladas. De 2.5 mm de largo, con nervaduras cuando secas. El cáliz 1 mm de largo y profundamente trilobulado; pétalos connados excepto cuando la apertura de las puntas es tri-angulada. Estaminodios ausentes. El ovario globoso deprimido, con estigmas sésiles; fruto globoso, negro en la madurez y alrededor de 6 mm de diámetro (20).

3.2.5 Referencias en Chamaedorea

Según Mendoza (21), las palmas constituyen un conjunto de recursos forestales no maderables de uso generalizado en el mundo. La importancia de la familia arecaceae en la composición y estructura de diversas comunidades biológicas tropicales es muy grande, esto la hace susceptible de aprovechamiento.

Según Aguilar (1), especies del género *Chamaedorea* han sido aprovechadas de las más diversas formas, la de mayor importancia económica es la de su comercialización en el mercado de la floricultura nacional e internacional. Usualmente las poblaciones naturales de este género son cada vez más escasas debido principalmente al aprovechamiento irracional de plantas, hojas y semillas, aunado a los incendios forestales, avance de la ganadería en su hábitat natural y la explotación de los bosques y selvas para extracción de maderas.

Según Saldivia y Cherbonier (28), las hojas o frondas de *Chamaedorea* spp. se obtienen de manera directa, de plantas que se desarrollan en su medio natural.

Según Moreno (23), con respecto a la reproducción de algunas especies del género *Chamaedorea*, se ha detectado latencia en sus semillas. *Chamaedorea elegans* Mart. tarda de 3 a 9 meses antes de llegar a su germinación.

Según Loomis (18), los factores más nocivos para las semillas de palma que inciden directamente en su viabilidad y germinación son: 1) Deshidratación extrema. 2) Formación de moho superficial 3) Edad excesiva. Sin embargo, bajo las mejores condiciones, las semillas de palma son de vida corta, algunos meses a lo mucho.

Según De León (17), se debe considerar que las semillas de palma deben sembrarse después de la colecta, tan pronto como sea posible, para obtener una rápida germinación. En semillas viejas el embrión se encoge, por lo que previo a la germinación se requiere de tiempo adicional para que éste pueda absorber agua y recuperar sus proporciones originales.

Según Ellis (8), muchas de las semillas de *Chamaedorea*s pueden germinar entre 30-120 días después de su siembra. El promedio de germinación depende de muchos factores, como la calidad y frescura de las semillas, temperaturas, variación. *C. elegans* y *C. Seifrizii* pueden germinar en un período de un año o más.

Las semillas de palma tienen dificultad para germinar, para el caso de *C. elegans* Martius, las primeras semillas empiezan a germinar a los cuatro meses en arena húmeda a 20 y 30°C. *C. oblongata* empieza a germinar a los 40 días en condiciones de invernadero (14).

Según Vásquez Yanez (33), el tipo de latencia que las semillas de palmas presentan es de tipo mecánico debido a las cubiertas duras y fibrosas que presentan.

Según Neugent K (24), las palmas desarrollan frutos carnosos, y para la siembra de la semilla se hace necesario quitarle la cubierta mencionada. Las semillas deben colectarse cuando esté madura la fruta. Las semillas de la palma tienen viabilidad corta después de su maduración, especialmente si cualquier tipo de sequedad está implicado. Debido a esto las semillas deben sumergirse en agua durante 24 horas después de ser recibidas. El endospermo es la porción principal de la semilla y es alimento para la planta joven en el semillero. Dentro del endospermo está el embrión que en sí es la misma planta. Si se permite que la semilla se seque el endospermo se puede marchitar y perder contacto con la capa de germen. Esto evita que el embrión absorba agua del suelo. Las semillas secas germinan erráticamente o nada en absoluto. Algunas llevan semanas para empezar a brotar, según la especie así será la respuesta. Para una adecuada germinación la semilla requiere temperaturas altas entre 70 a 100° F. La cantidad de luz no es un factor determinante en la germinación.

En la Universidad autónoma del estado de Tamaulipas, México hicieron un estudio sobre la inducción de germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart mediante tratamientos físicos y químicos, (editores Jorge Jiménez, Enrique Jurado).

En este estudio se evaluaron métodos físicos, y químicos; de los cuales el mejor método resultó ser la aplicación de ácido giberélico (GA_3) al 2% en el que se obtuvo 55% germinación a los 34 días de aplicado el tratamiento (16).

Vohman (34), trabajó como tesis de maestría en la palma *Chamaedorea elegans Martius* y su estudio se hizo con el fin de responder a la pregunta siguiente: ¿Cuál es el efecto de la escarificación de las semillas sobre la germinación? Para inducir la germinación de las semillas se usaron métodos de escarificación combinado con temperaturas ambientales controladas. En promedio se obtuvo un 16% de germinación para el caso de semillas sin escarificar y hasta un 52% con escarificación. La temperatura óptima para la buena germinación se alcanzó entre 27 y 28°C, a mayores o menores temperaturas decrece la germinación.

En la palma *Chamaedorea costaricana*, se obtuvieron callos usando como explantes los embriones en el medio de cultivo Miller & Murashige a un Ph de 5.8, agregando las hormonas 2,4D y 2-ip a concentraciones de 100 mg/lit y 1 mg/lit respectivamente, además como antioxidante el carbón activado (10).

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Contribuir al desarrollo de un procedimiento de propagación *in vitro* de shate *Chamaedorea elegans* Martius.

4.2. ESPECIFICOS

- 4.2.1. Establecer la respuesta de *Chamaedorea elegans* a la dediferenciación celular mediante la adición de los reguladores del crecimiento 2,4-D (auxinas) y 2-ip (citocininas) en tres concentraciones, utilizando embriones cigóticos como tejido inicial.
- 4.2.2. Establecer la respuesta de *Chamaedorea elegans* a la inducción de brotes mediante la adición de los reguladores del crecimiento BAP (citocininas) y GA₃ en 3 concentraciones, utilizando plántulas como tejido inicial.

5. HIPOTESIS

- 5.1. La siembra de embriones cigóticos de *Chamaedorea elegans* Martius en el medio M&M y la adición de los reguladores del crecimiento en tres concentraciones (2,4-D y 2-ip) inducirán la formación de tejido calloso.

- 5.2. La aplicación de los reguladores del crecimiento ácido gibérelico y bencilaminopurina a las plántulas de shate a tres niveles de concentración inducirán la formación de brotes.

6. METODOLOGIA

6.1 Inducción a la desdiferenciación celular

6.1.1 Descripción de los tratamientos

Los factores que se consideraron en el experimento fueron los reguladores del crecimiento 2,4-D y 2-ip con 3 niveles de concentración cada uno (Cuadro 2).

CUADRO 2. Factores y niveles a evaluar en el estudio.

FACTORES	NIVELES (mg/lt)		
	2,4-D	50	75
2-ip	1	2	3

Los 9 tratamientos del arreglo combinatorio más el testigo se muestran en el cuadro 3.

CUADRO 3. Descripción de los tratamientos utilizados en la desdiferenciación celular.

Tratamiento	Reguladores (mg/lt)	
	2,4-D	2-ip
1	50	1
2	50	2
3	50	3
4	75	1
5	75	2
6	75	3
7	100	1
8	100	2
9	100	3
10	0	0

La distribución de los tratamientos en las unidades experimentales se hizo en base a un diseño completamente al azar. En total se trabajó con nueve tratamientos obtenidos del arreglo combinatorio más un testigo absoluto al que no se le aplicó reguladores, estos tratamientos se repitieron 10 veces lo cuál hizo en total 100 unidades experimentales.

6.1.2 Descripción de la unidad experimental

Se usó como unidad experimental un recipiente de vidrio transparente de 4.3 cms de diámetro en la boca y de 5.5 cms de diámetro en el fondo y con capacidad de 100 ml, en donde se agregó 25 mililitros de medio Miller & Murashige (MM) y se colocó un embrión de semilla de la planta en estudio.

6.1.3 Variable respuesta

6.1.3.1 Formación de callo

La variable principal tomada en el estudio fue la formación o no formación de callo, considerándose un callo como una masa amorfa sin indicios de diferenciación celular.

6.1.3.2 Variables adicionales

Para verificar la calidad de los callos obtenidos se hicieron mediciones de variables como: consistencia, color, textura, y brillo. La consistencia se evaluó haciendo presión con pinzas sobre el callo y si éste se desintegraba se le clasificaba como friable y si no, como compacto. El color se midió visualmente según colores reportados en otros estudios, tales como verde, blanco y café. La textura también se midió de manera visual, pudiendo ser rugosa o lisa. El brillo se midió visualmente, pudiendo tener o no brillo.

Además de estas variables se tomó también el número de brotes deformados y el número de brotes vigorosos los que se consideraron de importancia para la discusión de resultados.

6.1.4 Análisis de los datos

La variable respuesta que se analizó fue la formación o no formación de callo la cual es una variable cualitativa dicotómica, por lo que su análisis fue específicamente no paramétrico, para este caso se usó una prueba para proporciones independientes. Esta variable fue codificada identificando la formación de callo con el número "1" y la no formación, con el "0".

6.1.5 Manejo del experimento

6.1.5.1 Preparación de las soluciones patrón

Las soluciones patrón se hicieron para cada uno de los grupos que conforman el medio MM, el fin de éstas es ahorrar pasos para la elaboración del medio mencionado, además para incrementar la precisión en el pesado de los diferentes componentes del medio.

A continuación se describen las soluciones patrón:

6.1.5.1.A Solución patrón de macro nutrientes M&M

Se preparó 500 ml de esta solución, para esto se llenó un beaker de 1 lt con 250 ml de agua destilada, luego se agregaron los componentes descritos en el cuadro 4.

CUADRO 4. Macro nutrientes necesarios para preparar una solución patrón.

Sustancia	Peso (grs.)	Concentración
NH ₄ NO ₃	8.25	Se agrega directamente
KNO ₃	9.50	Se agrega directamente
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.925	10X
KH ₂ PO ₄	0.425	10X

Ya agregados los componentes, el contenido se pasó a una probeta de 500 ml, luego se aforó con agua destilada hasta llegar a la medida, luego se agitó la solución y se guardó a una temperatura de 4 °C, previo a su identificación. Por separado se prepararon otras dos soluciones patrón 10X de macronutrientes consistentes en CaCl₂·2H₂O y NaH₂PO₄·H₂O. Para ambos se hicieron 500 ml de solución agregando 1.1 grs. de compuesto para el primero y para el segundo 0.425 grs.

6.1.5.1.B Solución patrón de micro nutrientes M&M

Se prepararon dos soluciones diferentes de 100 ml cada una, a las que se les nombró Micro A y Micro B, para esto se agregaron 50 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 250 ml. Luego, se agregaron los compuestos que se describen en el cuadro 5.

CUADRO 5. Micro nutrientes necesarios para preparar una solución patrón

Sustancia	Peso (grs.)	Concentración
Micro A		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.23	1000X
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86	1000X
H ₃ BO ₃	0.62	1000X
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025	1000X
Micro B		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0125	5000X
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0125	5000X

Ya agregados los componentes, el contenido se pasó a una probeta de 100 ml, luego se aforo con agua destilada hasta llegar a la medida mencionada, luego se agitó la solución y se guardó a una temperatura de 4 °C, previo a su identificación.

A parte de estas dos soluciones de micro nutrientes se hizo otra que se componía de KI a 1000X, para este caso se preparó 100 ml en donde se agregó 0.083 grs. del compuesto mencionado.

6.1.5.1.C Solución patrón de hierro 100x

Se preparó una solución de 200 ml de la siguiente manera:

- i. Se calentó 100 ml de agua destilada en un agitador magnético preparado para tal propósito.
- ii. Se agregó al agua 0.0557 grs. de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- iii.- Una vez disuelto el producto, se agregó 0.745 grs. de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- iv. A continuación, se agregó 1 lenteja de NaOH.
- v. Ya disueltos todos los elementos, el contenido se pasó a una probeta, para su posterior aforamiento, luego se trasladó la solución a su envase definitivo y se le colocó una etiqueta. Esta solución se almacenó a 4 °C.

6.1.5.1.D Solución patrón de vitaminas 1000x

Para este caso solamente se usó Thiamina-HCl, preparándose 100ml de esta solución, empleándose del compuesto 0.04 grs.

6.1.5.1.E Preparación de una solución patrón de Mio-inositol 100x

Se preparó una solución de 500 ml, para esto se llenó un beaker con 200 ml de agua destilada y se agregarán 0.5 grs. de mio-inositol. Ya disuelta la solución se pasó a una probeta para su aforamiento.

6.1.5.2 Reguladores del crecimiento

Los reguladores utilizados fueron: 2,4-D y el 2-ip. Previo a ser agregados en la solución estos fueron diluidos en pequeños volúmenes de solventes o bases, para el caso del 2,4-D fue disuelto en alcohol al 95% y el 2-ip en NaOH al 1N.

Para disminuir la cantidad de pasos necesarios para elaborar las diferentes concentraciones de reguladores, y para aumentar la precisión al momento de pesar, se usó una solución patrón, de la cuál se partió para aplicar las diferentes concentraciones (tratamientos) a utilizar para el caso de esta investigación.

6.1.5.3 Preparación de 250 ml de medio de cultivo M&M

En un beaker con capacidad de 500 ml, se agregaron 150 ml de agua destilada. Se agregó al recipiente una barra magnética, éste se colocó sobre el agitador – calentador magnético, el cuál se puso en marcha.

Luego se agregaron los componentes del medio en el orden siguiente:

- a. 25 ml de solución de macro elementos 10 X (NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- b. 2.5 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- c. 25 ml de $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- d. 0.25 ml de solución de micro elementos "A" 1000 X ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- e. 0.05 ml de solución de micro elementos "B" 5000X ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- f. 2.5 ml de solución de hierro 100 X (Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- g. 1 ml de solución de Tiamina-HCl 1000 X
- h. 10 ml de inositol
- i. Luego se agregaron los reguladores de crecimiento, en cantidad según las concentraciones evaluadas en el estudio.
- j. Se agregaron 2.5 ml de Inositol.
- k. Se agregó 7.5 grs. de sucrosa.
- l. Se aforó el recipiente a 250 ml, usando agua destilada.
- m. Se procedió a medir el pH de la solución y se hicieron las correcciones necesarias para llegarlo a 5.5
- n. Se agregó 1.25 grs de carbón activado. (0.5%)
- o. Luego se agregaron 2 grs de agar. (0.8 %)
- p. Luego se pasó la solución al horno de microondas hasta disolver el agar.
- q. La solución fué distribuida a los frascos de cultivo, los cuáles fueron debidamente rotulados.
- r. Los frascos de cultivo -se taparon con papel aluminio.
- s. Todos los frascos de cultivo se introdujeron al autoclave (para su esterilización) durante 20 minutos a una presión de 1.05 Kg/cm² a una temperatura de 120 °C.
- t. Los recipientes se colocaron en la cámara de cultivo, hasta que estos se solidificaron y se enfriaron.

6.1.5.4 Colecta de los frutos en el campo

Los frutos de *Chamaedoreas* que se trabajaron fueron colectados en la región de El Petén, los cuales se tuvo el cuidado de que estuvieran en estado inmaduro lo cuál garantizaba que estos al momento de ser colectados aún estuvieran adheridos a las plantas madres y por lo tanto estuvieran libre de todo microorganismo que en el proceso de propagación in vitro pueda afectar el buen desempeño del explante.

El fruto posee una cubierta carnosa que cubre la semilla la que dificulta la extracción de los embriones y además es fuente de contaminación por lo que se procedió a eliminársela por medios mecánicos, dejando libre la semilla.

6.1.5.5 Desinfección de las semillas

Las semillas se introdujeron en una mezcla desinfectante compuesta de Benomyl, Agrimicyn, cloranfenicol y ácido cítrico (antioxidante) durante 12 horas.

Se introdujeron por 1 minuto en alcohol al 70%, luego en hipoclorito de sodio al 1.5% durante 30 segundos, y por último se sumergieron en agua destilada a manera de eliminar el exceso de reactivos.

6.1.5.6 Extracción de los embriones de las semillas

La extracción de los embriones de las semillas se hizo de manera mecánica, tomando en cuenta que el embrión se encuentra inmerso en la base del pedúnculo por lo que se hizo presión de manera estratégica para no dañar el explante. Ya extraído, se tomaba con una aguja de disección (con la punta doblada para no dañar el embrión) la cuál previamente se sumergía en agar a manera de que fácilmente éste se adhiriera para luego poder ser transportado hasta el frasco de destino.

6.1.5.7 Siembra de los embriones en los medios de cultivo

La siembra de los embriones se hizo a los 8 días de haber sido colectada la semilla en el campo a manera de que esta fuera lo más viable posible y así tener éxito en la respuesta.

La siembra se hizo dentro de la cámara de flujo laminar (campana), para evitar la contaminación de los medios de cultivo, y para ello se procedió de la siguiente manera:

- La cámara de flujo laminar se encendió 30 minutos antes de empezar a trabajar en ella.
- Se desinfectó la cámara usando alcohol etílico al 70%, el cuál se aplicó por medio de atomizadores, también se agregó cloro a concentración comercial.
- Luego se encendió el mechero de bunsen, y se colocó en un lugar estratégico para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Se desinfectaron las pinzas y los frascos sumergiéndolos en alcohol al 70% y pasándolos por el mechero, éste paso se repitió dos veces.
- Se procedió a colocar un embrión en cada unidad experimental. Esto se hizo cerca del mechero de bunsen.
- Los frascos fueron nuevamente tapados con el papel aluminio, y fueron identificados respectivamente.

6.1.5.8 Colocación de las unidades experimentales en el cuarto de incubación de cultivos

Después de la siembra de los embriones dentro de los frascos, éstos se llevaron a la cámara de cultivo para su incubación. Las unidades experimentales fueron sometidas a condiciones ambientales propicias para la buena respuesta de los explantes, tratando de imitar en lo más cercano posible a las condiciones ambientales naturales a las que regularmente es sometida la especie en estudio. Las condiciones ambientales dentro de la cámara de cultivo, son descritas en el marco referencial de este documento.

6.2 Inducción de brotes a partir de plántulas

6.2.1 Descripción de la Unidad experimental

La unidad experimental fué un recipiente de vidrio con dimensiones, de 4.3 cms de diámetro en la boca y de 5.5 cms de diámetro en el fondo, en donde se agregaron 25 mililitros de medio Miller y Murashige (M&M) y se sembró una plántula de *Chamaedorea*. Estas unidades fueron debidamente identificadas por tratamiento y repetición, además con la fecha de la siembra.

6.2.2 Descripción de los tratamientos

Los factores a considerar en el estudio fueron los reguladores del crecimiento ácido giberélico (GA₃) y Bencil aminopurina (BAP), cada uno con tres niveles de concentración (Cuadro 6).

CUADRO 6. Factores y niveles a evaluar en el estudio

FACTORES	NIVELES (mg/lit)		
	GA ₃	0.5	1
BAP	3	5	7

Se utilizaron 3 concentraciones de ácido giberélico (GA₃) y 3 de citocininas (BAP), las cuales mediante un arreglo combinatorio generaron 9 tratamientos, más un testigo absoluto formó un total de 10 tratamientos, los que se repitieron 4 veces haciendo un total de 40 unidades experimentales. La distribución de los tratamientos se hizo mediante un diseño completamente al azar. A continuación se describen las concentraciones de citocininas y ácido giberélico que se usaron y que fueron evaluados en las unidades experimentales (Cuadro 7).

CUADRO 7. Concentraciones de GA₃ y BAP utilizadas en la inducción de brotes.

Tratamiento	Reguladores (mg/lt)	
	GA ₃	BAP
1	0.5	3
2	1	3
3	1.5	3
4	0.5	5
5	1	5
6	1.5	5
7	0.5	7
8	1	7
9	1.5	7
10	0	0

6.2.3 Variable respuesta

La variable respuesta que se tomó en consideración para medir el efecto de los tratamientos fue el número de brotes generados por cada plántula.

6.2.4 Manejo del experimento

6.2.4.1 Preparación de las soluciones patrón y los medios de cultivo M&M

Se utilizó el medio M&M, y la metodología de preparación de las soluciones patrón y de los medios de cultivo fue bastante parecida a la utilizada en la fase de desdiferenciación celular (formación de tejido caloso), lo que cambió son las concentraciones y tipos de reguladores del crecimiento utilizados. Además el carbón activado (0.25%) y el agar (0.7%).

6.2.4.2 Siembra de los brotes en los medios de cultivo

La siembra se hizo dentro de la cámara de flujo laminar, para trabajar en condiciones higiénicas y evitar que los medios y explantes sean contaminados por patógenos, esta fase se hizo de la siguiente manera:

- La cámara de flujo laminar se encendió 30 minutos antes de empezar a trabajar en ella, para contar con aire puro dentro de la misma.
- Se desinfectó la cámara y los frascos, usando alcohol etílico al 70%, el cuál se aplicó por medio de atomizadores.
- Luego se encendió el mechero de bunsen, y se colocó en un lugar estratégico para evitar cualquier tipo de

contaminación.

- d. Se desinfectaron las pinzas y bisturís, introduciéndolos en alcohol y luego fueron flameados en el mechero.
- e. Se procedió a colocar una plántula en cada uno de los frascos que contienen el medio M&M. Esto se hizo cerca del mechero de bunsen.
- f. Los frascos se taparon nuevamente con el papel aluminio y se identificaron respectivamente.

6.2.4.3 Colocación de las unidades experimentales dentro de la cámara de cultivo

Después de la siembra de las plántulas dentro de los frascos, éstos se llevaron a la cámara de cultivo para su incubación. Las unidades experimentales se sometieron a condiciones ambientales propicias para el desarrollo de los mismos, tratando de imitar en lo más cercano posible a las condiciones ambientales naturales a las que regularmente son sometidas las especies en estudio.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

En el estudio se trabajó con semillas obtenidas de frutos inmaduros lo que aseguraba su inocuidad y viabilidad. A estas semillas se les extrajo el embrión cigótico para usarlo como explante a manera de disminuir la contaminación y acelerar la respuesta.

Los embriones sembrados en el medio de Miller & Murashige manifestaron respuesta a los ocho días de haber aplicado los respectivos tratamientos, esta respuesta se manifestó a ver al principio como un abultamiento hasta que algunos presentaron desdiferenciación y luego formaron tejido calloso o solamente lo iniciaron, otros formaron brotes deformados, y otros brotes verdes y vigorosos.

Cabe mencionar que en la desdiferenciación celular se observó 4% de contaminación, porcentaje aceptable que incrementa la precisión de los resultados ya que se contó con mayor cantidad de material disponible para evaluar. La baja contaminación, se atribuye a que la semilla con la que se trabajó se encontraba en estado inmaduro lo que garantizaba mínima exposición a microorganismos patógenos y sumado a esto se puede decir que la solución desinfectante (Benomyl, cloranfenicol y agrimicyl) jugó un papel muy importante.

7.1 Desdiferenciación celular

7.1.1 Formación de callos

Observando la Figura 7, se nota que el tratamiento que incluye las concentraciones 50+1 mg/lit de 2,4-D y 2-ip fue el que produjo el mayor porcentaje de callos (40%). Se observa que los tratamientos en los que se usaron las concentraciones 50+2, 50+3, 75+1 mg/lit de 2,4-D y 2-ip .presentan 10% de formación de callos. Los tratamientos en los que se usaron 75+2, 75+3, 100+3, 0+0 mg/lit de 2,4-D y 2-ip respectivamente, no produjeron ningún tejido calloso y por último los tratamientos en los que se aplicó 100+1, 100+2 mg/lit de 2,4-D y 2-ip respectivamente, presentaron 20% de formación de callo.

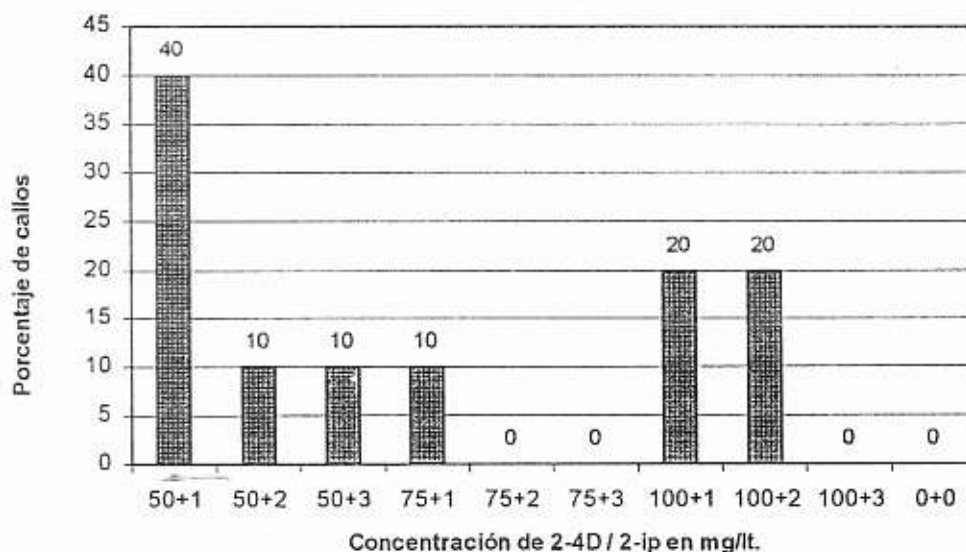


Figura 7. Efecto de la concentración de Auxinas y Citocininas en la producción de callos.

Según la Figura 7 existe diferencia entre tratamientos, pero para determinar si estas diferencias visuales son significativas se hizo uso de la Estadística.

En el Cuadro 8 se presentan los resultados obtenidos por tratamiento en un total de 10 unidades experimentales, considerándose dos respuestas si formó o no formó callo. Estos datos se analizaron mediante una prueba no paramétrica basada en la distribución ji cuadrado considerándose las proporciones independientes, el estadístico de prueba tuvo un valor de 15.21, el cual tiene asociado un P-value de 0.708.

Este valor permite decir que con un 95% de confiabilidad no existe evidencia suficiente para afirmar que los tratamientos difieren en cuanto a la magnitud de formación de callo. O sea que la aplicación de 2,4-D y 2-ip no inducen la formación de callo en una magnitud significativa con respecto a la no aplicación de estos reguladores.

CUADRO 8. Proporción de callo formado por tratamiento, considerando dos posibles respuestas (si, no).

RESPUESTA	Concentración de 2,4-D / 2-ip en mg/l										
Formó callo	50+1	50+2	50+3	75+1	75+2	75+3	100+1	100+2	100+3	0+0	Total
SI	4	1	1	1	0	0	2	2	0	0	11
NO	6	9	9	9	10	10	8	8	10	10	89

Esta no significancia entre tratamientos indica que la combinación de los dos reguladores del crecimiento no inducen en proporción significativa la respuesta deseada, y que el 2-ip disminuyó considerablemente la capacidad del 2,4-D en la manifestación de la respuesta, ya que el 2,4-D en sus efectos biológicos hacia las plantas incluye la elongación celular y en concentraciones altas tiende a provocar desdiferenciación celular.

La combinación de los dos reguladores se implementó en este estudio porque hay referencias de que se incrementa la formación de callo. Thorpe (30), menciona que el 2,4-D es el más efectivo para inducir callos, aplicándolo en concentraciones altas, y que para favorecer la formación de callos algunas veces se hace necesario agregar alguna citocinina en concentraciones bajas, en este caso se usó el 2-ip. También se reporta que en *Chamaedorea costaricana* se obtuvieron callos usando como explantes los embriones sembrados en el medio M&M agregándole los reguladores 2,4-D y 2-ip a concentraciones de 100 y 1 mg/lit respectivamente (11).

Esta respuesta sugiere que para la formación de callo solamente se debe agregar el regulador 2,4-D en concentraciones altas considerando como punto de partida las concentraciones evaluadas en el estudio. El 2,4-D a sido ampliamente recomendado como el más efectivo para la dediferenciación celular (5). En monocotiledóneas se a reportado haberse obtenido tejido calloso usando niveles altos de auxina, y que la adición de citocininas puede no ser importante (10).

7.1.2 Variables respuesta adicionales

En la Figura 8 se puede observar los porcentajes de brotes deformados en los tratamientos evaluados en el estudio. Entre lo más relevante se puede mencionar que los tratamientos en que se observó los mayores porcentajes fue en los que se usaron las concentraciones 50+2, 50+3, 75+3, 100+3 mg/lit de 2,4-D y 2-ip respectivamente, las cuales fueron las mayores concentraciones de 2-ip (citocininas), lo que sugiere que entre más se agregue este regulador en los medios de cultivo los embriones producirán mayor cantidad de brotes deformados en combinación con las auxinas. Según Hurtado y Merino (15), cuando la proporción de citocinina en relación a las auxinas es alta se induce la formación de brotes. Según Barceló (3), cuando se cultivan segmentos de tallo de tabaco y se agrega auxina y citocinina en concentraciones de 2 y 0.02 mg/lit respectivamente, se induce tejido no diferenciado, y que al aumentar la cantidad de citocinina con respecto a la de auxina se induce la formación de brotes.

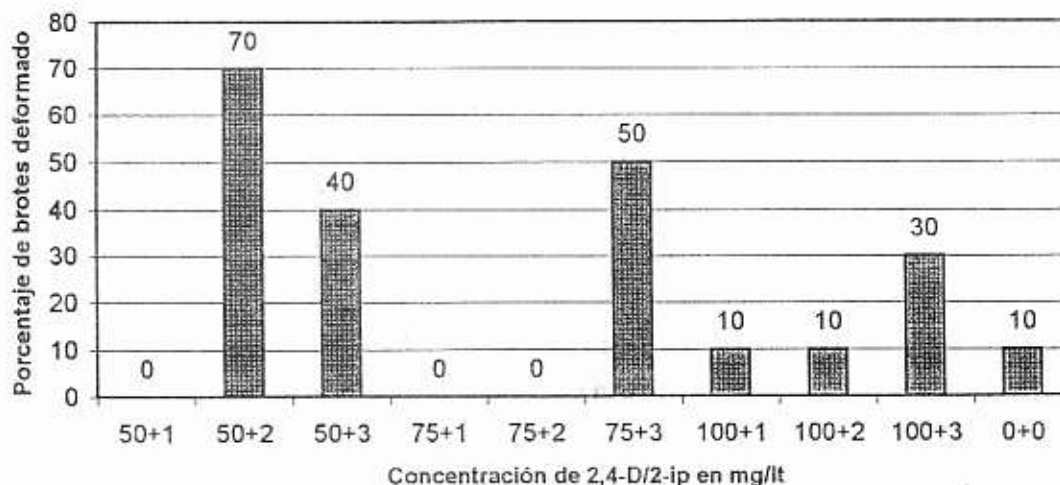


Figura 8. Efecto de las concentraciones de Auxinas y Citocininas sobre el número de brotes deformados.

En la Figura 9 se observa que el único tratamiento que produjo brotes verdes vigorosos con su respectiva raíz en un 50% fue al que no se le agregó reguladores del crecimiento (0+0), lo que sugiere que el embrión se adapta de buena manera al medio M&M y que además este posee reguladores del crecimiento endógenamente, ya que sin necesidad de agregarlos artificialmente se manifestó dicha respuesta. Según Hurtado y Merino (15), las citocininas se concentran en tejidos con crecimiento activo tales como frutos y semillas entre otros. Según Barcelo (3), las citocininas se encuentran en alto contenido en semillas en germinación, y parece que el eje embrionario es el responsable de la síntesis.

La hormona del crecimiento presente en los embriones, es la citoquinina, la que tiene un papel importante en la germinación ya que pueden romper la latencia en muchas especies (26). Córdova (6) menciona que las citocininas en el proceso de germinación pueden revertir la acción de ciertos inhibidores o iniciar procesos biosintéticos de productos.

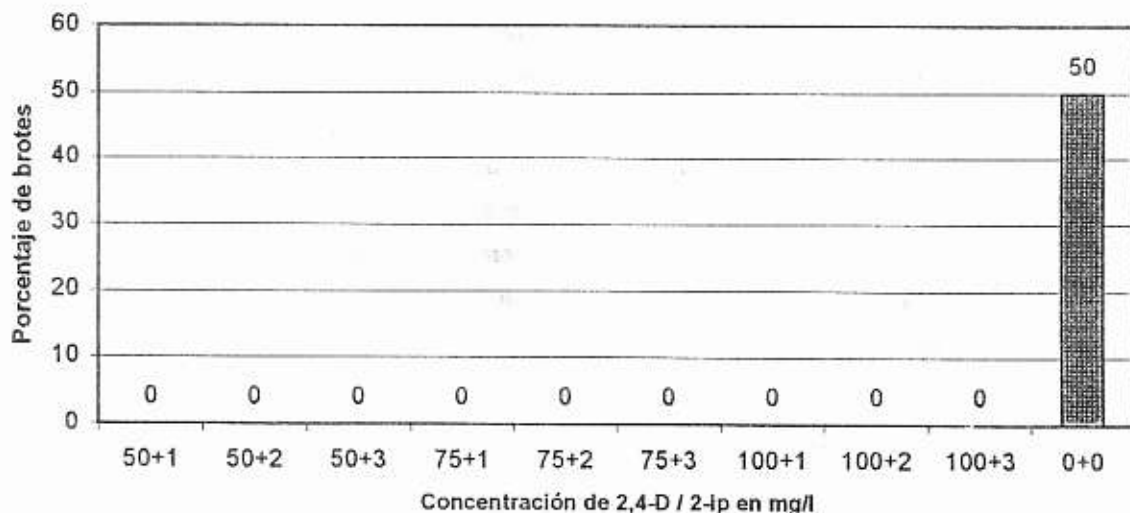


Figura 9. Porcentaje de brotes vigorosos formados en la dediferenciación celular.

Otras variables adicionales que se consideraron en el estudio son: consistencia, coloración, textura y brillo.

Los callos observados en los diferentes tratamientos presentaron una consistencia frías, ya que estos al ser presionados por una pinza se desintegraron. Estos callos según Thorpe (30) son adecuados para la producción de embriones somáticos en medios líquidos en agitación y no para la producción de brotes.

Los callos formados presentaron una coloración verde pálido, este color representa poca presencia de clorofila lo que sugiere pobre realización del proceso de fotosíntesis, considerándose algo normal debido a las condiciones artificiales en las que este tejido se desarrolló.

La textura de los callos fue rugosa, notándose que este tejido estaba formado por un grupo de aristas.

Se observó que los callos formados en los distintos tratamientos presentaron brillo, ya que fueron expuestos a la luz para verificar esta respuesta. La presencia de brillo de los callos indica el crecimiento mitótico del tejido, el cual se notó que en este caso era intenso.

7.2 Inducción de brotes a partir de plántulas

Las plántulas utilizadas como explantes se obtuvieron mediante la siembra de embriones cigóticos en el medio M&M. A estas plántulas se les agregó GA_3 y BAP en tres concentraciones con el fin de inducir brotes, pero no se obtuvo la respuesta deseada. Posiblemente fue por que las concentraciones evaluadas no fueron las idóneas para que dicha respuesta se manifestara en la especie en estudio. Las concentraciones evaluadas en el presente estudio se consideraron debido a algunas referencias bibliográficas en las que se a obtenido algún tipo de respuesta satisfactorio. Las citocininas en concentraciones de 1 a 5 mg/lit inducen brotes, pero agregando ácido giberélico en concentraciones de 0.3 a 1 mg/lit se puede incrementar considerablemente el número de brotes formados (15). Las citocininas agregadas a un medio de cultivo de brotes inhiben la dominancia apical y liberan las yemas laterales de la dormancia. Las citocininas estimulan el crecimiento de las yemas axilares y reducen la dominancia apical en cultivos de brote de plantas de hoja ancha. Las giberelinas rompen la latencia tanto de yemas vegetativas como de semillas (10). Martínez Arroyo (19) menciona que las concentraciones en las que el ácido giberélico y las citocininas manifiestan efectos sobre la organogénesis son de 0.03 a 30.0 y 0.1 a 10.0 mg/lit respectivamente, y que entre estos efectos se incluye para el caso del ácido giberélico estimulación de la división celular, inducción de la brotación axilar, y que las citocininas promueven la expansión de las células.

8. CONCLUSIONES

1. El cultivo de los embriones cigóticos en los medios nutritivos suplementados con las sales de Miller & Murashige y la adición de los reguladores del crecimiento 2,4-D y 2-ip en las tres concentraciones evaluadas en el estudio no producen tejido calloso en proporción significativa.
2. Las plántulas de shate *C. elegans* Martius no manifestaron respuesta a la aplicación de los reguladores del crecimiento GA₃ y BAP en tres concentraciones.

9. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que:

1. Para el desarrollo de una metodología de propagación *in vitro* de *Chamaedorea elegans* se sugiere usar como tejido inicial embriones cigóticos obtenidos de semillas inmaduras.
2. Revisar concentraciones del regulador 2,4-D, mayores a las utilizadas en el estudio, para evaluar el efecto sobre el tamaño y calidad de los callos ya que estos presentan la característica principal de que sus células tienen alta totipotencialidad lo que por lo general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales en subcultivos posteriores tienen la capacidad de desarrollar brotes.
3. Revisar otras concentraciones de citocininas y giberelinas mayores a 7 y 1.5 mg/lit respectivamente para la inducción de brotes en plántulas de *C. Elegans*.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. AGUILAR S., M.A. 1994. El cultivo de la palma comedor en Pajapan, Veracruz. Acayucan, Veracruz, México, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. Unidad Regional del Sur de Veracruz. 11 p.

Citado por: JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. por medios físicos y químicos. Revista BIOTAM (Mex.) 8(1):6. (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).
2. BARCELO, C.J.; RODRIGO, G.N. 1980. Fisiología vegetal. Madrid, España, Pirámide. 750 p.
3. ———. 1995. Fisiología vegetal. 7 ed. Madrid, España, Pirámide. p. 390-403.
4. BIDWELL, R.S. 1979. Fisiología vegetal. Trad. Cano y Cano, Rojas G. México, AGT. 784 p.
5. CLOSAL, L.M.; CUEVA BALDOVINO, R.M. 1998. Cultivo *in vitro*. España, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida, Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería, Unidad de Fisiología Vegetal. (www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm).
6. CORDOBA, C.V. 1976. Fisiología vegetal. Madrid, España, Blume. 439 p.
7. DEVLIN, R.M. 1980. Fisiología vegetal. Barcelona, España, Omega. 517 p.
8. ELLIS, R.H. 1995. Handbook of seed technology for genebanks. En: Compendium of specific germination information and test recommendations. Rome, Italia, University of Reading, Department of Agriculture and Horticulture. International Board for Plant Genetic Resource. International Board for Plant Genetic Resource. Department of Agriculture and Horticulture, University of Reading. 667 p.
9. GALSTON, A.W. ; DAVIES, P.J. 1969. Hormonal regulation in higher plants. Science. (USA.) 163:1288-1297.

Citado por: WEABER, R.J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Contín. México, Trillas. 622 p.
10. GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture; part one, the technology II. 2 ed. Great Britain. EXEGETICE. 574 p.
11. GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.; GEORGE, H.J. 1987. Plant culture media; formulations and uses. Great Britain, Eastern Press, Reading Books. v.1. 567 p.
12. GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. 1998. Exportaciones realizadas por partida país; departamento de estadísticas enero a diciembre de 1998. Guatemala. p. 13.
13. HARTMANT, H.; KESTER, D.E. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. 2 ed. México, CECSA. 814 p.
14. HODEL, D.R. 1992. *Chamaedorea* palms the species and their cultivation. California, USA, University of California. 338 p.
15. HURTADO M., D.V.; MERINO M., M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. p. 45-85.
16. JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. por medios físicos y químicos. Revista BIOTAM (Mex.) 8(1):6. (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).

17. LEON, J.N. DE. 1958. Viability of palm seeds. *Principes* 2 (3): 96-98.
- Citado por: JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. Promedios físicos y químicos. *RevistaBIOTAM (Mex.)* 8(1):6 (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).
18. LOOMIS, H.F. 1958. The preparation and germination of palm seeds. *Principes* 2 (3):98-102
- Citado por: JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. por medios físicos y químicos. *Revista Biotam (Mex.)* 8(1):6. (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).
19. MARTINEZ ARROYO, F.J. 1992. Regeneración *in vitro* de cuatro genotipos de frijol *Phaseolus vulgaris* L. a partir de brotes apicales. Tesis Ing. Agr. Nuevo León, México, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. p. 3-30.
20. MAS ESCALERA, C.E. 1993. Caracterización de los factores ecológicos relevantes en las comunidades donde el shate *Chamaedorea* sp es componente, en San Miguel La Palotada, Petén. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 108 p.
21. MENDOZA, A.S. 1996. Evaluación de la palma camedor como recurso forestal en la región de Chinantla (Oaxaca), México. Tesis Ing. Agr. México, Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias. 95 p.
- Citado por: JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. por medios físicos y químicos. *Revista Biotam (Mex.)* 8(1):6. (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).
22. MILLER, C.O. 1956. Similarity of some kinetin and red light effects. *Plant Physiol.* 31:318-319.
- Citado por: WEABER, R.J. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Contín. México, Trillas. 622 p.
23. MORENO H., M.G. 1991. Pruebas de escarificación en semillas de palma camedor *Chamaedorea elegans* Mart. Tesis Ing. Agr. Veracruz, México, Universidad Veracruzana Córdoba. 41 p.
- Citado por: JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. por medios físicos y químicos. *Revista Biotam (Mex.)* 8(1):6. (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).
24. NEUGENT, K. 1997. Palm seed germination. Miami, USA., Fairchild Tropical Garden. (www.ftg.org/horticulture/palmseed.htm).
25. PIERIK R., L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Ed. Martinus Nijhoff Publishers.
- Citado por: CLOSAL, L.M.; CUEVA BALDOVINO, R.M. 1998. Cultivo *in vitro*. España, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida, Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería, Unidad de Fisiología Vegetal. (www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm).
26. ROJAS GARCIDUEÑAS, M. 1979. Fisiología vegetal aplicada. 2 ed. México, McGraw-Hill. 262 p.
27. SAGASTUME ALDECOA, F. 1987. Diagnóstico de la comercialización del shate en los municipios de Flores, Santa Elena y San Benito, departamento de el Petén. Investigación EPSA. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 64 p.

28. SALDIVIA, G.T.; CHERBONIER, C. 1982. De la recolección silvestre al cultivo de la palma camedor; perspectivas de su aprovechamiento. México, *Recurso Forestal Tropical: México-Alemania*. tomo 5, 30:49-73.

Citado por: JIMENEZ PEREZ, J.; JURADO YBARRA, E. 1996. Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. por medios físicos y químicos. *Revista BIOTAM (Mex.)* 8(1):6. (www.ecologia.uat.mx/biotam/v8n1/art6.html).

29. SKOOG, F.; MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Exptl. Biol.* 11:118-131.

Citado por: WEABER, R.J. 1976. *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Trad. Agustín Contín. México, Trillas. 622 p.

30. THORPE, T.A. 1981. *Plant tissue culture, methods and applications in agriculture*. Calgary, Alberta, Canada, University of Calgary, Dpto. Biology. 379 p.

31. TORMO, R. 1999. Lecciones hipertextuales de botánica, familia Arecaceae. España, Instituto de Ciencias de la Educación de la Universidad de Extremadura. (www.unex.es/botanica/arecacea.htm).

32. VAN OBERBEEK, J. 1961. Applications of auxins in agriculture and their physiological bases. En la obra de Ruhland, 1961, p. 113-115.

Citado por: HURTADO M., D.V.; MERINO M., M.E. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. México, Trillas. p. 45-85.

33. VASQUEZ YANEZ, C.; OROZCO SEGOVIA, A. 1984. Ecophysiology of seed germination in the tropical humid forests of the world. *In: Physiological Ecology of Plants in the West Tropics*. Ed. by E. Medina, H.A. Mooney, and C. Vásquez-Yanez. Junk, The Hague. p. 37-50

Citado por: VOHMAN, C.E. 1995. *Chamaedorea palm agroforestry a sustainable system for the buffer zone of the maya biosphere reserv.* Thesis M.sc International Agricultural Development. USA, University of California, Davis. 102 p.

34. VOHMAN, C.E. 1995. *Chamaedorea palm agroforestry a sustainable system for the buffer zone of the maya biosphere reserv.* Thesis M.sc International Agricultural Development. USA, University of California, Davis. 102 p.

35. WEABER, R.J. 1976. *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Trad. Agustín Contín. México, Trillas. 622 p.

Vc. Bc. Rolando Barrios.



11. APENDICES

CUADRO 9A. Concentraciones de sales M & M para preparar un litro de solución de medio nutritivo.

MACRONUTRIENTES	(mg/lt)	(Microgramos/lt)
KNO ₃	1900	-
NH ₄ NO ₃	1650	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	-
KH ₂ PO ₄	85	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	85	-
	-	-
MICRONUTRIENTES		
(microgramos/lt)		
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	22300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	8600
H ₃ BO ₃	-	6200
KI	-	830
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	250
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	25
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27850
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	37250
	-	-
Vitaminas	-	-
Inositol	100	-
Tiamina-HCl	-	400



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "PRUEBA PRELIMINAR DE PROPAGACION IN VITRO DE SHATE
Chamaedorea elegans Martius MEDIANTE EMBRIONES CI-
GOTICOS".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: ERIC ABEL ORTEGA ORELLANA

CARNET No: 9517275

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. José Vicente Martínez Arévalo
Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes
Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que
ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de
Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. M.Sc. Víctor Manuel Álvarez Cajas
A S E S O R

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez
A S E S O R



Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
DIRECCION DEL IIA.

I M P R I M A S E

Ing. Agr. M.Sc. Edgar Oswaldo Franco Rivera
D E C A N O



cc:Control Académico
IIA.
Archivo
AO/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TEL/FAX (502) 476-9794

e-mail: llusac.edu.gt § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>