

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Estudio de inducción de embriogénesis somática y
organogénesis en embriones cigóticos de xate,
Chamaedorea elegans Mart.”

INFORME FINAL DE TESIS

Presentado por

Ana Silvia Martínez Rodas

Para optar al título de

Bióloga

Guatemala, septiembre de 2007

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios Padre, Corazón del Cielo y Fuente de Toda Energía, Luz, Amor, Vida e Inspiración.

A la Madre Tierra, Corazón de la Tierra, a Sus Bosques y Océanos con sus Seres y Elementos, por dar sus maravillas, misterios y sabiduría.

A los Ángeles y Elementales, por llenar de amor y magia la Tierra.

A Jofiel, por su iluminación e inspiración para este trabajo y en todo momento.

A mis Padres Rodolfo y Amanda, por su amor y dedicación, por ser refugio y consuelo en mis emociones y pensamientos, por sus palabras de motivación firmes y amorosas. Por su guía, ejemplo y enseñanzas. Por su trabajo constante e incansable.

A mi abuelito Oscar, por inspirarme en el amor y pasión por las orquídeas y la naturaleza.

A mis hermanos Oscar y Rodolfo, por su amor, ayuda y protección constantes. Por su ejemplo de fe, lucha y perseverancia en la vida.

A mi prima Luz Mariela por su alegría, amor, apoyo y amistad. Por su cariño tan especial y por estar tan cerca en el corazón.

A mis sobrinos y sobrinas Alejandra, Rodolfo José, Ximena y Andrés, por sus corazones llenos de amor y pureza. Por dar alegría, ilusión y brillo a mi vida.

A Christian Nottbhom, por enseñarme y compartir el Universo, la Luz y sus Seres, la Conciencia y sus Dimensiones, la Naturaleza y sus Elementos. Gracias por las aventuras y las experiencias más extremas, intensas e inimaginables. Por guiarme a la Luz y a la Unidad.

A mis amigas y amigos de toda mi vida, por las experiencias, vivencias y aprendizaje juntos.

A todas las personas de mente y corazón abiertos que aman la Naturaleza y que creen en la Magia.

A mis Maestros Ing. Agr. RNR. Mario Véliz, Antonieta Alfaro Ph.D., Licda. Carolina Zea, M.Sc., M.S.D.T. Guillermo Escamilla y M.S.D.T. Rodolfo García por su guía, dedicación y ejemplo. Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias en la especialidad de cada uno.

A ANACAFE, por la oportunidad de trabajo e investigación y el regalo de conocer profesionales, compañeros y amigos con quienes compartir cada día. Agradezco y dedico este trabajo especial y profundamente a Antonieta Alfaro Ph.D. por el tiempo dedicado, su guía, sus ideas y apoyo constante. Asimismo, agradezco y dedico al Ing. Qu. Humberto Jiménez M.Sc. por el tiempo y apoyo brindado para hacer posible este trabajo. A mis amigos de Analab: Ing. Ind. Astrid Aguirre, Licda. Lucrecia de Palacios, Ing. Agr. Patricia Morales, Eunice Corzo, Ing. Agr. Claudia Oliva, Mildred Estrada, Licda. Hort. Anika Heimink, Ing. Agr. Pablo Figueroa, Héctor Chávez, Ing. Amb. Héctor Samayoa, Luis Mus, Milito De León, Agr. Marcos Oxom, Víctor Galicia, Ing. Agr. Luis Fernando Recinos e Ing. Agr. Alvaro Hernández M. Sc., por su cariño, amistad, ayuda y apoyo; en especial a Roy Linares por su mente y corazón abiertos a aprender y escuchar; por su gran apoyo para hacer este trabajo. Una especial dedicatoria para Francisco Anzueto, Ph.D. quien ha brindado grandes oportunidades en mi vida profesional. Un especial agradecimiento a José Francisco Portales por su apoyo e ideas en la impresión y la reproducción de mi documento.

*There 's no teacher
who can teach anything new,
he can just help us to remember
the things we always knew.*

ENIGMA

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Proyecto AGROCYT-ANACAFE 058-2004, "Inducción de la micorrización en cultivos de importancia económica desarrollados mediante técnicas de propagación in vitro".

INDICE

	PAGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Palmas camedoreas	4
3.1.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica	4
3.1.2. Características botánicas y morfológicas de <i>Chamaedorea elegans</i> Mart.	5
3.1.3. Origen y distribución	5
3.1.4. Requerimientos de habitat	6
3.1.5. Uso ornamental	7
3.2. Producción de xate en vivero	7
3.2.1. Propagación	7
3.2.2. Clima y suelo	8
3.2.3. Manejo de la plantación	8
3.2.4. Ciclo del cultivo	9
3.2.5. Manejo postcosecha	9
3.2.6. Zonas de producción en Guatemala	10
3.3. Importancia socioeconómica y ambiental del xate	11
3.3.1. La extracción de xate en Guatemala	11
3.3.2. Implicaciones de la cosecha silvestre	12
3.3.3. Creación de empresas y manejo sostenible	14
3.3.4. Servicios ambientales	15
3.4. Generalidades y aplicaciones de biotecnología y cultivo de tejidos vegetales	16
3.4.1. Reguladores del crecimiento vegetal	16
3.4.2. Metodologías en cultivo de tejidos vegetales	17
3.4.3. Biotecnología aplicada en Arecaceae (Palmae)	18
3.4.4. Cultivo de tejidos en camedoreas	20
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. General	23
5.2. Específicos	23

6. HIPOTESIS	24
7. MATERIALES Y METODOS	25
7.1. Universo de trabajo	25
7.1.1. Investigadoras	25
7.1.2. Lugar de trabajo	25
7.1.3. Material vegetal	25
7.1.4. Explantes	25
7.2. Procedimientos	25
7.2.1. Medios de cultivo	25
7.2.2. Preparación de medios de cultivo modificados	26
7.2.3. Preparación de materiales para desinfección y siembras	26
7.2.4. Tratamiento de escarificación de semillas	27
7.2.5. Desinfección de semillas	27
7.2.6. Extracción y siembra de embriones cigóticos	27
7.2.7. Condiciones de cultivo	28
7.2.8. Monitoreo del experimento	28
7.3. Diseño de la Investigación	28
7.3.1. Experimento 1: Inducción a la embriogénesis somática	28
7.3.1.1. Tratamientos y diseño del experimento	28
7.3.1.2. Variables	29
7.3.1.3. Análisis de resultados	29
7.3.2. Experimento 2: Inducción a la organogénesis	29
7.3.2.1. Tratamientos y diseño del experimento	29
7.3.2.2. Variables	31
7.3.2.3. Análisis de resultados	31
7.3.3. Unidad experimental	31
8. RESULTADOS	32
8.1. Experimento 1: Inducción a la embriogénesis somática	32
8.2. Experimento 2: Inducción a la organogénesis	35

9. DISCUSION DE RESULTADOS	42
9.1. Experimento 1: Inducción a la embriogénesis somática	42
9.2. Experimento 2: Inducción a la organogénesis	43
9.3. Técnica de siembra de embriones cigóticos	45
10. CONCLUSIONES	48
11. RECOMENDACIONES	49
12. BIBLIOGRAFIA	50
13. ANEXOS	55
ANEXO 1: Composición del medio de cultivo de Murashige & Skoog 1962 (MS)	55
ANEXO 2: Requerimientos de soluciones madres de MS	56
ANEXO 3: Preparación de soluciones de madres de MS	57
ANEXO 4: Experimento 1: Test de Kruskal Wallis para embriogénesis somática	59
ANEXO 5: Experimento 2: Análisis de varianza para inducción a la organogénesis	60
ANEXO 6: Informe de análisis de microbiología	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos y concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo, evaluados en el experimento 1.	28
Cuadro 2. Concentraciones de BAP y ANA en el medio de cultivo, evaluadas en el experimento 2.	30
Cuadro 3. Tratamientos y combinaciones de BAP y ANA evaluados en el experimento 2.	30
Cuadro 4. Necrosamiento de embriones en tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.	32
Cuadro 5. Resultados promedio de formación de callo a partir de embriones cigóticos de xate, tratados con diferentes concentraciones de 2,4 D en el medio de cultivo.	33
Cuadro 6. Respuesta de los embriones de xate a los tratamientos de 2,4-D en el medio de cultivo.	34
Cuadro 7. Necrosamiento y cambios morfológicos en embriones en los tratamientos evaluados.	36
Cuadro 8. Calogénesis, organogénesis y germinación de embriones de xate en el experimento 2.	37
Cuadro 9. Relación de respuestas de los embriones de experimento 2.	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de necrosamiento en embriones de xate en tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.	32
Figura 2. Porcentaje de inducción a la callogénesis en respuesta a diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.	33
Figura 3. Porcentaje de necrosamiento y de cambios morfológicos en embriones tratados con diferentes concentraciones de BAP/ANA.	36
Figura 4. Porcentaje de callogénesis en embriones de xate cultivados con diferentes concentraciones de BAP/ANA	38
Figura 5. Porcentaje de organogénesis (formación de brotes) a partir de callos de xate en el experimento 2.	39
Figura 6. Porcentaje de germinación en embriones de xate con diferentes concentraciones de BAP/ANA en el medio de cultivo.	40

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Planta de xate, <i>Chamaedorea elegans</i> .	5
Foto 2. Selección de xate en Santa Elena, Petén.	9
Foto 3. Bunches de tres especies de xate: cola de pescado, xate hembra y xate jade, en Santa Elena, Petén.	9
Foto 4. Xate empacado en Uaxactún, Petén.	10
Foto 5. Campamento “El Arroyón” de chicleros y xateros camino a Mirador, Petén.	11
Foto 6. Transporte de xate en mulas, Carmelitas, Petén.	12
Fotos 7 a 9. Características físicas de callos provenientes de la inducción a la embriogénesis somática.	34
Foto 10. Embrión con gotas de agua.	35
Foto 11. Callogénesis en embrión de experimento 2.	38
Foto 12. Callo con inicio de brotes en experimento 2.	38
Foto 13. Organogénesis indirecta en experimento 2.	39
Foto 14. Inicio de brotes verdes en experimento 2.	39
Foto 15. Múltiple brotación en experimento 2.	39
Foto 16. Embrión germinado en experimento 2.	40
Foto 17. Planta obtenida de organogénesis indirecta.	45
Foto 18. Planta obtenida de germinación.	45
Foto 19. Semilla de xate antes de escarificar y desinfectar.	45
Foto 20. Semilla de xate con embrión expuesto antes de sembrar.	46
Foto 21. Embrión con exudado.	46

1. RESUMEN

La palma xate, *Chamaedorea elegans* Mart., es una hierba perenne altamente cotizada en el mercado de ornamentales con antecedentes de dificultades en su propagación artificial en vivero y en laboratorio. El estudio consistió en determinar su respuesta a la inducción de embriogénesis somática y de organogénesis, a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos utilizando medio basal de Murashige & Skoog, 1962 (MS) modificado con la adición de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal en diferentes tratamientos.

Para inducir a la embriogénesis somática se evaluaron tres concentraciones (10, 20 y 50 mg·L⁻¹) de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) y un control (0 mg·L⁻¹ de 2,4-D), en un experimento completamente al azar con 4 tratamientos y 5 repeticiones. Se evaluó el porcentaje de inducción de callo (PIC), porcentaje de formación de estructuras embriogénicas (PFEE) y porcentaje de germinación (PG). Se obtuvo formación de callo a las 22 semanas. La variable PIC fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y el test de comparaciones pareadas. Los resultados indicaron que los tratamientos con las diferentes concentraciones de 2,4-D no presentaron diferencia significativa entre sí, mientras que el tratamiento control fue diferente de los demás (no se desarrolló callo). No se desarrollaron estructuras embriogénicas a partir de los callos formados y tampoco ocurrió germinación en ninguno de los tratamientos evaluados. Se concluyó que esta técnica no es efectiva para inducir a la embriogénesis somática con las concentraciones de 2,4-D utilizadas y que esta respuesta puede estar asociada a la baja germinación de los embriones a causa de la latencia de la semilla. Se recomendó diseñar otros experimentos con rangos más amplios de concentraciones de 2,4-D, identificar y definir las características del callo embriogénico y experimentar con otros tejidos como fuente de explante para inducir a la embriogénesis somática.

Para inducir a la formación de brotes, se evaluaron combinaciones de cuatro concentraciones de Benzilaminopurina (BAP): 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹; y cuatro concentraciones de Acido Naftalenacético (ANA): 0, 0.05, 0.1 y 0.2 mg·L⁻¹. Se evaluó el porcentaje de inducción de callo (PIC), porcentaje de inducción a organogénesis (PO) y porcentaje de germinación (PG), los cuales fueron analizadas mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y el test de Tukey. Se observó que los embriones presentaron necrosamiento y cambios en su forma como engrosamiento, crecimiento del hipocótilo y presencia de gotas de agua. La callogénesis se observó a las 8 semanas y para PIC no se determinó diferencia significativa entre los tratamientos. La organogénesis indirecta inició a las 12 semanas y para PO existió diferencia significativa, donde el mejor tratamiento fue el 8 (BAP/ANA 1.0/0.1 mg·L⁻¹). Los embriones germinaron de 10 a 13 semanas y para PG hubo diferencia significativa, donde el mejor tratamiento fue el control sin adición de reguladores. Se concluyó que la combinación BAP/ANA

1.0/0.1 mg·L⁻¹ fue la mejor para la organogénesis indirecta y el medio sin adición de reguladores fue mejor para la germinación, pero ninguno de los tratamientos alcanzó un porcentaje mayor del 26% de embriones con respuesta, lo cual no se considera aceptable. También se concluyó que la relación de cambios morfológicos con la callogénesis es alta, pero en la mayoría de los casos el callo no fue organogénico. Se recomendó diseñar más experimentos en un rango reducido de BAP/ANA cercano a 1.0/0.1 mg·L⁻¹ para verificar la repetitividad del experimento y también experimentar con otros tejidos como fuente de explante.

Acerca de la técnica utilizada, se llegó a la conclusión de que es muy laboriosa y con resultados limitados debido a la poca respuesta de los embriones, ya que el procedimiento resulta en un gran porcentaje en contaminación y en necrosamiento. El comportamiento de las semillas es el mayor limitante pues los resultados son muy diferentes de un lote a otro. Se recomendó por lo tanto, utilizar esta técnica para fines de evaluación de viabilidad de los lotes de semillas y diseñar experimentos con otros reguladores y otros tejidos para la micropropagación de xate.

2. INTRODUCCION

El nombre "xate" incluye una variedad de especies de palmas del género *Chamaedorea*, siendo *C. elegans* la más popular. El xate es un producto forestal no maderable altamente cotizado en la industria de ornamentales el cual se usa como follaje, como planta de interior y en jardines. En Guatemala, la cosecha de hojas de xate es una industria importante que se viene realizando en Petén desde principios del siglo veinte. Por mucho tiempo, esta actividad ha representado una fuente de ingresos para las familias involucradas y ha sido una razón de conservación de los bosques que son su habitat. Pero la creciente demanda por el xate y la falta de prácticas sostenibles de manejo han puesto en peligro este recurso.

Actualmente, la práctica de extracción de hojas de xate de las selvas peteneras se ha transformado de una cosecha silvestre a una cosecha basada en la producción en viveros, gracias al apoyo de organizaciones que ayudan a las comunidades campesinas a capacitarse y buscar mercados directos con mejores precios. Adicionalmente, debido a que los ingresos por la exportación de xate han ido en aumento en los últimos años, este recurso es alternativo para la agroindustria de productos tradicionales. De esta manera, se ha aumentado la creación de viveros y se ha incluido el cultivo de xate en programas de cambio de uso de tierra en sistemas agroforestales de varias zonas húmedas y templadas del país. Aun así, existen ciertas limitantes para su producción, entre ellas, el tiempo de latencia, la corta viabilidad, el número limitado de plantas que se produce y la alta variabilidad genética en la producción por semilla.

Una alternativa de propagación artificial es el sistema *in vitro*, el cual utiliza secciones de tejido de la planta para su micropropagación en laboratorio. Ortega (2001) y Chang (2003) realizaron pruebas preliminares para la micropropagación de dos especies de xate, *C. elegans* y *C. oblongata* respectivamente, a partir de embriones cigóticos usando 2,4-D y 2-ip. En ambos estudios se obtuvo callo y germinación de embriones, pero en ninguno de los dos se obtuvo embriones somáticos o se regeneró plantas a partir de callo.

El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta de los embriones cigóticos de xate *C. elegans* Mart. a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento en dos experimentos, uno con 2,4-D para inducir la formación de embriones somáticos, y el segundo con combinaciones de BAP y ANA para inducir a la formación de brotes. De tal manera que se pretende comprobar la eficiencia de estas metodologías para resolver las limitaciones que se presentan en la producción por semilla en vivero y ofrecer a los productores una nueva tecnología que permita una mayor producción en menor tiempo, y que permita también aplicar técnicas de mejoramiento genético para la especie.

3. ANTECEDENTES

3.1. Palmas camedoreas

3.1.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica

“Palma camedorea” es el término utilizado como nombre común para las especies que pertenecen al género *Chamaedorea*, sin embargo sólo las especies *C. oblongata*, *C. elegans*, y *C. ernesti-augustii* son llamadas “xate” (Meerman, 2004). La etimología de *Chamaedorea*, es de origen griego que significa “árbol de caña enana” y “regalo del suelo” (*chamai*: enana, sobre el suelo; y *dorea* o *dory*: regalo); *elegans* significa “elegante” (Agraria, 2007; Árboles Ornamentales, 2006).

Las camedoreas son palmas perennes, enanas, desarmadas, erectas o procumbentes, de tallos solitarios o cespitosos muy delgados, verdes y anulados. Las hojas son simples pinnadas, con folíolos lineares o linear-lanceolados, el pecíolo es usualmente delgado y cilíndrico. Las inflorescencias son erectas, ramificadas, de color naranja, los espádices nacen entre o por debajo de las hojas, simples o paniculadamente ramificados, los pedúnculos son cortos o elongados, de ramas escasas o densamente floreadas. Las flores son dioicas, sésiles o subinmersas en el espádice, y son muy pequeñas. Los frutos son globosos de 4 a 7 mm de diámetro, negruzcos, de 1, 2 ó 3 carpelos, el pericarpio es coriáceo o carnoso, fibroso. Las semillas son erectas, globosas o elipsoides, de endospermo cartilaginoso, uniforme y el embrión es basal o dorsal (Standley & Steyermark, 1959).

Reino:	Plantae
Subreino:	Embriobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Arecidae
Orden:	Arecales
Familia:	Arecaceae (alt. Palmae)
Subfamilia:	Ceroxyloideae
Tribu	Hyophorbeae
Género:	<i>Chamaedorea</i>
Especies:	<i>C. oblongata</i> Mart., <i>C. elegans</i> Mart., <i>C. ernesti-augustii</i> H. Wendl.

Nombres comunes para las especies de xate:

C. oblongata: xate, palma chamadorea o camedor, xate macho, xate jade, cauqui.

C. elegans: xate, palma chamadorea o camedor, chico, xate hembra, parlour palm, palma parlor, good luck palm, pacaya, pacaina.

C. ernesti-augustii: xate, guayita, pata de vaca, fishtail, cola de pescado

(Cronquist, 1981; GRIN Taxonomy for Plants, 2006; Meerman, 2004; Standley y Steyermark, 1959)

3.1.2. Características botánicas y morfológicas de *Chamaedorea elegans* Mart.



Foto 1.
Planta de xate, *Chamaedorea elegans*.
<http://www.apopkafoliage.com/Plants/Palms.htm>

Chamaedorea elegans Mart. (ver foto 1) se diferencia de las demás especies por sus tallos delgados que pueden alcanzar los 2 m o más con la edad, florecen muy pequeñas de no más de 30 cm de alto. El tallo es de 8 a 16 mm de diámetro, densamente anulado con entrenudos cortos. Las hojas son pocas y pequeñas, de pecíolo delgado de 12 a 27 cm de largo, el raquis es muy delgado; son pinnadas de 11 a 20 folíolos de cada lado del raquis, lineares a lanceoladas estrechas, de 12 a 20 cm de largo y 1 a 2 cm de ancho; el nervio central es pálido, prominente pero no saltado, los nervios secundarios son menos prominentes, 2 de cada lado, igualmente separados, los nervios terciarios son numerosos

y muy finos. Las inflorescencias son erectas, con flores sésiles remotamente espiraladas, las flores estaminadas son de color amarillo pálido, los estambres tienen filamentos cortos y anteras enteras; las flores pistiladas son profundamente trilobadas, sin estaminodios, de ovario globoso con estigmas sésiles. El fruto es globoso, negro en maduración, de cerca de 6 mm de diámetro (Standley & Steyermark, 1959). El período de floración es de mayo a octubre y los frutos se producen de julio a agosto, y de agosto a septiembre dependiendo de las temperaturas (SIRE Paquetes Tecnológicos, 2005).

Según la Flora de Guatemala, las plantas de *C. elegans* en general, son más delicadas que los especímenes de la parte norte de la cordillera y raramente presentan más que ramas simples en la inflorescencia de ambos sexos. (Standley & Steyermark, 1959).

3.1.3. Origen y distribución

Son conocidas cerca de 100 especies de palmas camedoreas distribuidas desde el centro de México hasta Brasil y Bolivia. Una gran cantidad de estas especies se distribuye en el sur de Centro América, especialmente en Costa Rica (16 especies) y Panamá (19 especies) (Agexpront, 2000, 2002). Los patrones de distribución son ligeramente diferentes aunque las tres especies se encuentran distribuidas desde el sureste de México hasta el noroeste de Nicaragua.

C. elegans se distribuye limitadamente en un área entre Veracruz, México, a través de Petén, Guatemala, hasta la meseta Vaca de Belice donde es una especie considerada rara (Meerman, 2004). Según la Flora de Guatemala, esta especie se distribuye en los bosques densos, mixtos de montaña en Petén y Alta Verapaz hasta los 1,400 msnm (Standley & Steyermark, 1959).

C. ernesti-augustii tiene un rango similar de distribución pero llega hasta el centro de Honduras. En Belice, la especie es encontrada por toda la Reserva Forestal Rio Columbia y en la Reserva Forestal Chiquibul en densidades variadas (Meerman, 2004). Según la Flora de Guatemala, en el país esta especie se encuentra en tierras bajas (no mayor de 1,100 msnm) de Petén, Alta Verapaz, Huehuetenango e Izabal, (Standley & Steyermark, 1959).

C. oblongata tiene el rango más amplio de distribución de las tres especies y se distribuye desde el Sur de México hasta Nicaragua, es probablemente la más común y mejor distribuida (Meerman, 2004). En Guatemala, esta especie se encuentra a menores elevaciones, generalmente 350 msnm o menos en Alta Verapaz, Izabal y Petén (Standley & Steyermark, 1959).

3.1.4. Requerimientos de habitat

El desarrollo de las palmas camedoreas se observa en el estrato de sotobosque, en bosques primarios y secundarios maduros húmedos tropicales y subtropicales, por lo que el arreglo de la sombra es un factor que determina la calidad de la hoja y el desarrollo general de la planta (Econegocios Forestales, 2007; Agexpront, 2000, 2002). En el estudio ecológico sobre la composición y estructura de las comunidades vegetales donde crece el xate, Orellana *et al* (2001) reporta que las especies de xate son indiferentes a la vegetación acompañante, pueden crecer en bosques conformados por muchas especies o en bosques donde la dominancia ecológica esta concentrada en pocas especies.

Para el caso específico de la selva Maya, el xate se desarrolla sobre suelos de origen cárstico, moderadamente drenados, con porcentajes altos de limo, textura arcillosa y franco arcillosa con alto contenido de materia orgánica en los horizontes superficiales y pH arriba de 8. Tiene contenidos aceptables de magnesio, pero con bajos contenidos de potasio y sodio, estos cationes presentan un fuerte desbalance que puede estar bloqueando la disponibilidad de otros nutrimentos. El fósforo se encuentra muy bajo al igual que los microelementos. La disponibilidad de nitrógeno puede considerarse aceptable si se toma en cuenta que los contenidos de materia orgánica están altos (Orellana *et al*, 2001; Econegocios Forestales, 2007)

Las preferencias ecológicas de las especies de xate no son claramente comprendidas aún, pero por lo menos *C. ernesti-augustii* parece preferir los suelos calizos ya que es usualmente encontrada en afloramientos de piedra caliza (Meerman, 2004). Los factores microclimáticos requeridos para su adecuado desarrollo son: luminosidad entre 15% al 20% de luz directa, temperatura de 24 a 27 grados centígrados, precipitación pluvial de 1,200 a 3,000 mm anuales y humedad del 85% (Econegocios Forestales, 2007).

3.1.5. Uso ornamental

Las palmas, en general, son plantas muy adaptables y crean un ambiente húmedo y tropical, por esta razón es que son utilizadas como ornamentales en interiores y exteriores. Las palmas más utilizadas para este propósito son las camedoreas y las especies más populares son *C. seifrizii* y *C. elegans*. Las especies del género *Chamaedorea* de mayor producción comercial como plantas de interior son *C. cataractum*, *C. costarricana* (pacaína), *C. erumpens* (planta bambú), *C. radicali*, *C. seifrizii* y *C. elegans* (xate). Las plantas producidas en Florida, llamadas "Chamaedorea Florida Hybrids", provienen de hibridación entre *C. seifrizii* y *C. erumpens*, y son también muy populares en el mercado (Agexpront, 2002).

Según la Agexpront (2000, 2002) los principales mercados para exportación de camedoreas como follaje o como planta en maceta son los Estados Unidos, Canadá, la Unión Europea, Asia, el Medio Oriente y Australia.

3.2. Producción de xate en vivero

3.2.1. Propagación

Las camedoreas se propagan de forma sexual por semilla en plantaciones comerciales. Una vez seleccionadas las semillas, se recomienda ponerlas en camas a nivel del suelo o en bandejas con celdas para su germinación donde se coloca más de una semilla por celda y se cubre con uno o dos cm de sustrato húmedo y liviano (Agexpront, 2000, 2002).

Según varios autores (en Ortega, 2001 y Chang, 2003), las semillas de las especies de *Chamaedorea* presentan una viabilidad muy breve después del corte, por lo que deben sembrarse tan pronto como sea posible después de la colecta. Las semillas de las palmas camedoreas pasan por un período de latencia y pueden tardar de 30 días a 4, 6 ó 9 meses y hasta 1 año para su germinación (Agexpront, 2000, 2002). Estos autores refieren que el letargo de las semillas de xate puede ser causado por la cubierta o testa de la semilla que es muy dura,

pero también puede estar causado por la presencia de inhibidores del desarrollo o carencia de estimulantes. Ortega (2001), reporta varios tratamientos de tipo mecánico recomendados para romper la latencia de semillas de xate, como sumergir las semillas en agua a 30 ó 40°C durante un período de 24 a 48 horas, en ácido sulfúrico durante 3 a 15 minutos, y en ácido giberélico al 2%, obteniéndose resultados de 52 a 55% en la germinación.

3.2.2. Clima y suelo

La recomendación de la Agexpront (2000, 2002) para un óptimo resultado en los cultivos comerciales de xate es imitar las condiciones ambientales de su hábitat, así como también recomienda utilizar mezclas livianas y porosas de suelo que permitan una buena aireación, buen drenaje y buena capacidad de intercambio catiónico. Los sustratos de perlita, arena y turba son los más indicados, el uso de pedazos o chips de madera o de humus es aceptable en cantidades moderadas. El pH requerido es ligeramente ácido de 5.5 a 7 y la profundidad efectiva del suelo es recomendada a 40 cm.

3.2.3. Manejo de la plantación

La Agexpront (2000, 2002) recomienda que las palmas se trasplanten del semillero más o menos al año de haberse sembrado las semillas, cuando tienen una altura de 25 a 30 cm, y pueden trasladarse al campo para la producción de follaje una vez que han desarrollado su tercera hoja. Para las especies enanas como la *C. elegans*, la recomendación es de una densidad alta de siembra, hasta 50,000 plantas por hectárea. En el caso de producción en macetas, la Agexpront (2000, 2002) recomienda sembrar de 2 a 3 plantas por maceta de 10 a 15 cm de diámetro y se deben colocar en mesas de crecimiento, una junto a la otra hasta el momento de la cosecha evitando que se rocen excesivamente.

La producción de follaje o de plantas debe contar con programas adecuados de fertilización, control fitopatológico y de malezas. La Agexpront (2000, 2002) indica que la cantidad y frecuencia de aplicación de los fertilizantes se determina basándose en los análisis de suelo, foliar y edad de la planta. Las condiciones de sombra artificial pueden causar problemas de enfermedades y plagas, para lo cual debe llevarse un control muy cercano de la plantación. La iluminación aconsejada por Agexpront (2002) es del 20 al 30% y puede utilizarse sombra provisional, temporal o permanente. La sombra debe estar en balance con otros factores, como nutrición, viento, riego o lluvia y tipo de suelo.

3.2.4. Ciclo del cultivo

Según los manuales de Agexpront (2002), el ciclo de producción de xate es de 7 años desde la primera siembra de semilla hasta el establecimiento de una producción de plantas adultas productivas. Las primeras cosechas de frondes se pueden obtener a los 4 años con periodos de formación de hojas de 60 a 70 días con riego todo el año. El rendimiento de hojas de xate 3 a 7 hojas por planta al año, o sea, que se puede obtener una producción promedio de 225,000 hojas en un año con una hectárea de producción (9,000 manojos de 25 unidades).

3.2.5. Manejo postcosecha

Después de su cosecha, las operaciones de manipulación son determinantes para la calidad del producto y su precio en el mercado. Las recomendaciones de la Agexpront (2000, 2002) son:

Tratamiento: Para el follaje de corte, se seleccionan las hojas con potencial comercial, se lavan en una solución de regulador del crecimiento o antitranspirante floral para prevenir la pérdida de agua en el transporte y se dejan secar con aire antes de ser empacadas. Para plantas terminadas o en maceta, no necesitan ningún tratamiento más que limpieza y revisión general.

Clasificación: No existen criterios específicos de calidad, sin embargo, los compradores esperan hojas erectas de 22" a 27" (premium), uniformes, de color firme, sin daños o quemaduras (ver fotos 2 y 3). Para las plantas en maceta, la clasificación se hace de acuerdo a la especie y otros criterios como el grado de desarrollo de la planta y el diámetro de las macetas.



Foto 2.
Selección de xate en Santa Elena,
Petén.
<http://cecoeco.catie.ac.cr>



Foto 3.
Manojos de tres especies de xate:
cola de pescado, xate hembra y xate
jade, en Santa Elena, Petén.
<http://cecoeco.catie.ac.cr>

Empaque y embalaje: El follaje de corte se empaqueta en manojos de 25 hojas (bunch) o según las instrucciones del comprador (ver foto 4). Los manojos se colocan en cajas enceradas de cartón y se recubren con fibra, al llenar la caja se cierra con su tapa y cinta adhesiva y se rotula con los datos requeridos para el producto. Las plantas en maceta se colocan en cajas de cartón corrugado, en números variables según la especie, altura de la planta y diámetro de las macetas.



Foto 4.
Xate empacado en Uaxactún, Petén.
<http://cecoeco.catie.ac.cr>

Almacenamiento: El follaje cortado se debe almacenar en temperaturas entre 3 y 6°C con niveles de humedad relativa entre 80 y 90%. Debe evitarse los excesos de agua libre para evitar daños durante el tránsito. Para plantas en maceta, se recomienda una aclimatación antes del embarque a temperaturas de 10 a 16°C. Si el transporte dura menos de 7 días, las plantas pueden almacenarse a 16°C en oscuridad y niveles de humedad del sustrato cerca del 50%. Si el transporte dura más de 7 días, se recomienda mantener las plantas con niveles de luz de 150 pies-candela, temperaturas cercanas a los 10°C y humedad relativa de 80 a 90% para evitar la deshidratación. En estas condiciones, las camedoreas mantienen una calidad aceptable hasta por 4 semanas.

3.2.6. Zonas de producción en Guatemala

Según la Agexpront (2000, 2002) los departamentos del Norte y Sur-Oeste del país presentan condiciones similares a los bosques húmedos tropicales de Petén, los cuales corresponden a los requerimientos agroclimáticos de esta palma por lo que se les reconoce como zonas potenciales de producción de xate en Guatemala. La zona Norte comprende Petén, Huehuetenango, Quiché, Alta Verapaz e Izabal; y la zona Sur-Oeste incluye los departamentos de San Marcos, Quetzaltenango, Retalhuleu, Suchitepéquez y Escuintla.

3.3. Importancia socioeconómica y ambiental del xate

3.3.1. La extracción de xate en Guatemala

La historia de extracción del xate en Guatemala comienza poco después de la historia del chicle, alrededor de la década de 1890. Carmelita y Uaxactún, las comunidades más antiguas y más norteñas de El Petén, comenzaron como campamentos chicleros y xateros que gradualmente se transformaron en aldeas debido a estas actividades comerciales. Sus patrones de asentamiento seguían la orientación de las pistas de aterrizaje que se construyeron alrededor de 1930 para facilitar el transporte del chicle y de otros productos debido a la falta de caminos. Actualmente, tanto Carmelita como Uaxactún, se encuentran ubicadas en la Zona de Usos Múltiples (ZUM) de la Reserva de la Biósfera Maya (RBM), son centros de acopio y clasificación de xate, se han convertido en grandes exportadores de xate y sus pobladores se dedican sobre todo a la extracción de productos forestales no maderables (PFNM) (Paredes, 2006). A partir de entonces, la extracción de xate en Guatemala se transforma en una industria de gran valor de exportación y fuente de trabajo. Según la Agexpront (2000, 2002), en la década de 1970 se introdujo la idea de utilizar el xate como planta ornamental de interior y se conoce además, que existen colecciones desde 1940 en donde la Palma de Salo o Palma Mexicana de Montaña tenía ya un alto valor decorativo como planta de follaje.

La extracción del xate es realizada por los habitantes de la Reserva y por gente que vive fuera. Algunos xateros se dedican a esta actividad de tiempo completo mientras que otros colectan xate como una actividad económica alternativa y distribuyen su tiempo entre la extracción de otros PFNM. Los xateros pueden vivir en una aldea permanente y hacer viajes cortos a la selva, o quedarse y utilizar los campamentos chicleros. Actualmente existen cerca de 800 campamentos chicleros y xateros en Petén, siendo los más importantes El Tintal y El Arroyón, ubicados camino al sitio arqueológico El Mirador (Ramírez *et al*, 2007; Paredes, 2006) (ver foto 5).



Foto 5.
Campamento "El Arroyón", de chicleros y xateros
camino a Mirador, Petén.
Foto: Martínez, A.S. 2005.



Foto 6.
Transporte de xate en mulas,
Carmelitas, Petén.
Fotos: Martínez, A.S., 2005.

La cosecha de hojas de xate se trabaja durante todo el año con una cosecha pico en abril y una demanda menor de junio a septiembre; no depende de una estación en particular, aunque su transporte y almacenamiento se ve afectado en la época lluviosa (ver foto 6). Las palmas de xate son relativamente fáciles de encontrar, crecen muy próximas las unas a las otras y se regeneran con facilidad, por lo que una misma planta puede ser usada varias veces (Paredes, 2006). La cosecha consiste en cortar todas las hojas buenas de la planta, consideradas éstas como las que no presentan

herbivoría, patógenos o manchas (López *et al*, 2005). Los xateros con experiencia realizan el corte a modo de dejar el nuevo brote foliar intacto para la próxima cosecha y no interfieren en la producción de semilla. Sin embargo, los xateros sin experiencia o sin cuidado causan daños irreparables a la planta o cosechan hasta el 100% de los frondes y ésta no puede regenerarse.¹

3.3.2. Implicaciones de la cosecha silvestre

El Plan Maestro de la RBM reconoce la importancia del aprovechamiento de los PFSM y en éste se especifica que el aprovechamiento del xate y los otros productos será permitido bajo uso sostenible y exclusivamente en el área ZUM de la Biósfera mediante derechos otorgados por concesión u otra modalidad. Sin embargo, en el caso específico del xate, la extracción se hace de forma desordenada principalmente dentro de la Zona Núcleo, sin los controles adecuados y muchas áreas están siendo sobreexplotadas. Además, hasta la fecha no existe un plan de manejo que regule la extracción de xate, lo cual ha provocado la disminución sensible de este recurso (Ramírez, F. *et al*, 2007).

La Agexpront (2000), también señala esta actividad como una extracción indiscriminada de productos recolectados rudimentariamente del bosque natural de Petén y de otros departamentos del país. López *et al* (2005), en su estudio indican que después de tres años de tratamiento y un año de descanso, aún se hacen evidentes los efectos de la cosecha en la mortalidad, fecundidad y proporción de individuos reproductivos, siendo los tratamientos de 66 y 100% de cosecha de hojas los más agresivos.

¹ López, A. Com. Pers. Guía de Turismo, Tucán Tours, Flores Petén. Abril 2005. Conversación sobre la extracción de xate.

Acerca de los beneficios directos a los xateros, según los datos de CONAMA (Estrategia Nacional de Biodiversidad [EBN], 1999), citados por Chang (2003), el ingreso anual por extracción de xate a una comunidad dueña de una concesión forestal comunitaria dentro de la RBM, representa únicamente el 7.9% de la canasta básica, a pesar de que las exportaciones de hojas, ramas y demás partes de plantas, rubro dentro del cual se ubica el xate, han ido en aumento de 1998 al 2001 de acuerdo con las estadísticas del Banco de Guatemala. Otro reporte sobre beneficios directos a los xateros es el del Proyecto Sierra de Santa Marta, A.C. (2006) que indica que un campesino productor o recolector de palma sólo obtiene como ganancia el 0.08% del valor de cada hoja pagada en el mercado internacional. Sin embargo, según Ramírez *et al* (2007), la extracción de xate es considerada altamente rentable ya que según sus estimados, un xatero de tiempo completo podría obtener Q27,720.00 al año. Este estudio reporta además, que la extracción de PFNM da trabajo a más de 7,000 personas con rendimientos estimados en 15 millones de quetzales al año, siendo el xate la actividad que más ingresos aporta.

Debido a que el xate puede ser cosechado durante todo el año, constituye la mayor fuente de trabajo para los habitantes de Petén. Ésta es la única fuente de ingresos para algunas familias durante todo el año, y para otras, es un suplemento de ingresos cuando lo necesitan. La extracción del xate es realizada exclusivamente por los hombres, el proceso de selección es hecho casi sólo por mujeres, lo cual no altera la estructura familiar (Rainforest Alliance, 2006a; Monterroso, 2006).

López-Feldman (2004), señala que los individuos con bajos niveles de capital humano son los más probables de invertir más días de trabajo a la extracción silvestre del xate que otros individuos, lo mismo se aplica para individuos de familias pobres (basado en el índice de riqueza, capital y animales domésticos de su estudio), y con bajos niveles de habilidades físicas. Aunque la extracción del xate puede estar jugando un rol importante para prevenir la pobreza extrema así como para reducirla, el autor hace énfasis en que para comprender completamente las implicaciones de la extracción de productos no maderables se debe analizar las condiciones biológicas y económicas bajo las cuales la extracción toma lugar. Si no se hace esto, se comprometen los objetivos de desarrollo y de conservación.

El Belize Botanic Gardens (2006) denuncia que los xateros guatemaltecos han sobrecolectado las hojas del xate cola de pescado en Guatemala y ahora se arriesgan a cruzar la frontera con Belice para cortarlo. Esta institución señala también que los xateros guatemaltecos son responsables del saqueo de piezas mayas, de la caza de pichones de guacamaya escarlata y de la colecta de otras plantas y semillas de la selva beliceña. Además, mientras “trabajan”, cazan para comer, matando tepezcuintle, venado, pavón o guan cornudo y tapir.

3.3.3. Creación de empresas y manejo sostenible

Para lograr los objetivos de desarrollo comunitario y de manejo sostenible de los recursos naturales de la selva maya, las comunidades que se dedican a la extracción de xate principalmente de Petén, se han organizado con el apoyo de diferentes organizaciones nacionales e internacionales. Actualmente existen varios ejemplos, tales como los casos de las comunidades de Uaxactún y Carmelita de la RBM donde la Alianza para Bosques (Rainforest Alliance) en conjunto con la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), trabajan para hacer un aprovechamiento racional del xate y para mejorar sus ganancias a través de la exportación directa a los EEUU (Rainforest Alliance, 2005b). Este proyecto reportó un significativo incremento en la exportación de xate hacia los Estados Unidos a la floristería Continental Floral Greens, de San Antonio, Texas, en las primeras semanas de diciembre del 2005. Se estaban exportando semanalmente 280 paquetes, cada uno con 300 ramas de xate, pero en diciembre de ese año subió a 400, por lo que los envíos de la temporada navideña sumaron trescientos noventa mil quetzales (Escobar, 2005).

También está el ejemplo de La comunidad de Paso Caballos del Parque Nacional Laguna del Tigre (PNLT) en coordinación con Fundación ProPetén, quienes diseñaron y gestionaron el Proyecto de Manejo de Xate el cual consiste en transferir la tecnología de producción sostenible del xate a la comunidad y contribuir con la estabilización de la frontera agrícola (ProPetén, 2006).

La Cooperativa Unión Maya Itzá, de La Libertad, Petén, es una pequeña empresa organizada y capacitada para el manejo y comercialización de xate y ahulados operando como un modelo de Pymes (Pequeña y Mediana Empresa) Comunitaria. Esta empresa ha registrado sus actividades comerciales de exportación de xate, de donde se conoce que en el 2000, la gruesa (manejo de 100 hojas) de xate hembra y jade se compró en Q2.50 y la gruesa de cola de pescado en Q3.00. Las comercializaron con una diferencia de Q0.50, vendiendo un total de 28,691.50 gruesas de xate, de donde el 49.5% fue de xate hembra, el 31.8% de xate macho y 18.2% de cola de pescado, beneficiando alrededor de 60 familias (ACICAFOC, 2006; Ramírez *et al*, 2007).

En otras concesiones comunitarias de la RBM, también han surgido cambios en torno al aprovechamiento de xate con intentos en varias comunidades de domesticar la planta para crear fuentes de trabajo y mejorar los ingresos económicos a través de su comercialización (Monterroso, 2006).

Según el directorio de la Agexpront para plantas ornamentales, follajes y flores, en Guatemala existen veinte empresas registradas se dedican a la propagación y exportación de xate en follaje y en maceta, así como también de otras palmas (Agexpront, 2004).

En México también están organizadas las comunidades para la capacitación y promoción en el cultivo de los productos forestales no maderables como el xate. El Proyecto Sierra de Santa Marta apoya a los productores de palma camedor de la comunidad de San Fernando, Yucatán, con capacitación para su cultivo y para que se organicen en asociaciones que les permitan comercializar su producción de manera directa y con mejores condiciones económicas (Proyecto Sierra Santa Marta, A.C., 2006). En Belice, el Jardín Botánico de Belice está trabajando con otras organizaciones para ayudar a crear una industria justa y ambientalmente segura del xate a través de proveer información, semillas y plantas a los productores beliceños (Belize Botanic Gardens, 2006).

Las certificaciones de las hojas procesadas de xate es una forma de incrementar los beneficios a las comunidades. La Alianza para Bosques está actualmente trabajando en la Selva Maya de México, Guatemala y Belice con la selección de procesamientos para desarrollar las mejores prácticas de manejo como una vía para crear una oferta de calidad. La producción de xate certificado bajo los estándares del sistema FSC (Forest Stewardship Council) está disponible desde el 2004. Estos estándares aseguran buenas prácticas de manejo que conservan la biodiversidad y ayudan a las comunidades involucradas. Otras certificaciones como las orgánicas, MPS o FLP pueden ser también aplicadas a este producto forestal (Rainforest Alliance, 2006a). Según Wilsey (2006), el cambio de cantidad a calidad de producción de xate en la selva petenera puede afectar las dinámicas del sistema de producción, pero es una estrategia para mejorar aún más los ingresos en las comunidades xateras y asegura la continua viabilidad de este producto forestal no maderable.

3.3.4. Servicios ambientales

Los bosques, sistemas agroforestales y plantaciones forestales, brindan una serie de beneficios al ambiente tales como la protección de cuencas hidrográficas, conservación de suelo, refugio y conservación de biodiversidad, entre otros, los cuales pueden ser cuantificados y valorados (Medina & Aguilar, 2006). A pesar de que no existen estudios específicos que cuantifiquen estos beneficios en los sistemas de aprovechamiento y producción de xate, existe un caso de valoración económica de los productos y servicios derivados del bosque latifoliado subtropical húmedo realizado por el Plan de Acción Forestal para Guatemala (PAFG) en 1998, donde estima un valor de trece mil quinientos veinte quetzales por hectárea a los recursos no maderables que incluye al xate (CONAMA, 1999, citado por Chang, 2003).

Medina & Muñoz (2005) reportan un cambio de uso de la tierra en un área cafetalera de la cuenca Ocosito, Guatemala, del 2000 al 2004, en donde un área mínima (<100 mz) se diversificó

a la siembra de xate. En este estudio, las parcelas con xate revelaron los mayores índices de servicios ambientales en suelo, carbono y biodiversidad a comparación de sistemas cafetales y agropecuarios. El índice de biodiversidad fue sobresaliente en comparación a los demás cultivos únicamente superado por el bosque primario y secundario, lo cual se debe a que es un cultivo bajo bosque con alto número de especies nativas y de estratos, y a que no utiliza agroquímicos. Las parcelas con xate reportaron un valor de carbono fijado de aproximadamente 25 toneladas de carbono por hectárea, lo cual supera a sistemas con hule y macadamia. En cuanto a la cobertura de suelo, el xate supera a los sistemas con macadamia y es muy parecido a los índices de sistemas de bosque natural.

3.4. Generalidades y aplicaciones de la biotecnología y el cultivo de tejidos vegetales

3.4.1. Reguladores del crecimiento vegetal

Las hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias químicas orgánicas que ocurren naturalmente, de relativamente bajo peso molecular y activas en pequeñas concentraciones. Son moléculas específicas involucradas en la inducción y regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estas sustancias son sintetizadas en un lugar específico y traslocadas al lugar de acción (Hartmann *et al*, 2002).

En la propagación de plantas, las hormonas vegetales tienen gran importancia ya que no sólo son parte del mecanismo interno que regula la función vegetal, sino que ellas pueden inducir una respuesta específica en cultivo. También existen ciertas sustancias químicas, algunas naturales y otras sintéticas, que muestran efectos hormonales en plantas, éstos son clasificados como reguladores del crecimiento vegetal (Hartmann *et al*, 2002). Los grupos importantes de fitohormonas y reguladores son:

Auxinas: Las auxinas más utilizadas en cultivo de tejidos son el Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), el Ácido Naftalenacético (ANA), el Ácido Indolacético (AIA), y el Ácido Indolbutírico (AIB), siendo el AIB y el ANA auxinas sintéticas. Las auxinas son sintetizadas a partir de L-triptófano en primordios de hoja, hojas jóvenes y semillas en desarrollo. Sus funciones incluyen dominancia apical, estimulación del alargamiento celular, desdiferenciación celular, acción sobre tropismos, formación de capas de abscisión en frutos y hojas, y activación del crecimiento del cambium (Hartmann *et al*, 2002).

Citoquininas: Las sustancias naturales incluyen kinetina, zeatina, e Isopentiladenina (2ip). La benciladenina (BA o BAP) es una sustancia sintética. Otras sustancias con actividad de

citoquinina son thiourea, difenilurea, TDZ (thidiazuron) y CPPU (N-(2-cloro-4-piridul)n-fenilurea). Estas sustancias son esenciales para la división celular y su interacción con las auxinas es una de las relaciones primordiales en la propagación *in vitro* de plantas. Las citoquininas también actúan en plantas intactas para retrasar o reducir la senescencia, retardar el rompimiento de la clorofila y las proteínas celulares (Hartmann *et al*, 2002).

Giberelinas: Promueven la elongación de los brotes a través de la división y la elongación celular en tallos de plantas en roseta o de formas enanas. Ocurren en altas concentraciones en semillas en desarrollo y tienen función en el desarrollo del embrión, la germinación y control de la dormancia. El compuesto comercial más importante es el ácido giberélico (Hartmann *et al*, 2002; Rojas & Ramírez, 1993).

Acido Abscísico (ABA): Es sintetizado del ácido mevalónico directamente o del rompimiento de carotenoides, su biosíntesis ocurre en los cloroplastos. El ABA está presente en todos los órganos de las plantas superiores pero su función depende de su concentración. Tiene su principal función en el control de las relaciones hídricas de los estomas, juega un papel en las reservas alimenticias, tiene función en la dormancia de yemas y semillas, la abscisión y la respuesta de las plantas al estrés, particularmente de humedad ya que controla el cierre de los estomas y controla la toma de agua y de iones por las raíces, también induce al letargo, afecta la senescencia y abscisión de las hojas. En la propagación de plantas está involucrado en la germinación y dormancia de las semillas, y juega un papel en la embriogénesis y la producción de semillas (Hartmann *et al*, 2002; Rojas & Ramírez, 1993).

Etileno: Es un gas de estructura muy simple, sintetizado de la metionina. Los carbohidratos externos, la luz, las citoquininas, las auxinas y el dióxido de carbono estimulan la producción del etileno, así como el ACC (un ácido involucrado en su síntesis). En altas concentraciones tiene efecto en la epinastia, senescencia y abscisión de hojas y frutos. Interacciona en otros procesos como en formación de raíces adventicias, estimula la floración y las yemas laterales, la producción de látex, diferenciación del tallo, estimula la germinación y sobrepone la planta a la dormancia (Hartmann *et al*, 2002; Rojas & Ramírez, 1993).

3.4.2. Metodologías en cultivo de tejidos vegetales

Según Roca & Mroginski (1991), existen varias vías generales para realizar la propagación vegetal *in vitro* o micropropagación, lo cual depende directamente del material vegetal que se desee propagar en laboratorio, su estado fisiológico, y su producción de meristemas y yemas apicales o axilares. Si no existe una metodología ya desarrollada, se debe experimentar para encontrar una vía para la micropropagación de una planta y los pasos fundamentales son: el

establecimiento aséptico del cultivo, su multiplicación a través de una vía de micropropagación y por último, el enraizamiento y aclimatación de los materiales producidos. Las metodologías más utilizadas para la micropropagación según estos editores son:

Organogénesis directa: Sistema para formar brotes directamente de una parte de la planta sin formación de callo.

Organogénesis indirecta: Método de estimulación del desarrollo de brotes a partir de callos.

Embriogénesis somática: La mayoría de sistemas que forman embriones somáticos lo hacen mediante una ruta indirecta donde las células dan origen a proembriones los cuales a su vez dan origen a las etapas sucesivas similares a la embriogénesis cigótica.

Órganos de perennidad formados en cultivos asépticos: Algunas plantas producen estos órganos *in vitro* como minitubérculos en papa, tallos bulbosos en lirios, cebollas, etc., y los protocormos en orquídeas, por medio de los cuales es posible realizar siembras directas o almacenamiento de germoplasma.

Cultivo de embriones: El cultivo de embriones es usado para estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, para rescatar embriones híbridos de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, producir monoploides, y para superar la latencia de las semillas causada por inhibidores o por factores mecánicos. Así mismo, el cultivo de óvulos intactos se ha empleado para el rescate de embriones (polinizados y fertilizados *in vitro*), para inducir callogénesis y embriogénesis somática, y se aplica en casos donde los embriones dependen de fuentes externas de nutrientes como en las orquídeas.

Los embriones que se obtienen de las semillas, son aislados individualmente y germinados *in vitro* para obtener una planta por explante. Aunque el cultivo de embriones no es una técnica de micropropagación o clonación *in vitro* en un sentido estricto, es una técnica donde se cultiva el germoplasma para su multiplicación, el cual de otra manera se perdería (Roca & Mroginski, 1991).

3.4.3. Biotecnología aplicada en *Arecaceae* (*Palmae*)

Los alcances de la biotecnología aplicada juegan un papel cada vez más importante para desarrollar las estrategias de mejoramiento genético en plantas de la familia de las palmas. Existen algunos reportes de trabajos de propagación *in vitro* de palmas de importancia económica en la agricultura como palma aceitera, coco, palma datilera y pejibaye.

La propagación clonal de la palma aceitera o palma africana *Elaeis guineensis* Jacq a través de embriogénesis somática ha sido practicada por más de 20 años por el grupo francés de ORSTOM-CIRAD. Desde mediados de los años setenta con el surgimiento de métodos de clonación por cultivos *in vitro*, Rival (2002) y Rival *et al* (2003) desarrollaron una técnica de micropropagación de palma aceitera a través de embriogénesis somática para la producción de clones altamente productivos y han logrado integrar progresos genéticos para difundir materiales mejorados a los cultivadores principalmente de Costa de Marfil, Malasia e Indonesia. Estos trabajos además, presentan los resultados de un estudio de caso que muestra la importancia de un paso de escala piloto previa a la estrategia de escala masiva en la clonación de esta palma. El protocolo estándar de Rival (1997 y 2002), Rival *et al* (2003) y Duval *et al* (1997) para la micropropagación de palma aceitera por embriogénesis somática utiliza hojas inmaduras de plantas adultas como explantes primarios.

Rival *et al* (2003), Duval *et al* (1995) y De Touchet *et al* (1990) desarrollaron un protocolo de regeneración de plántulas de palma aceitera basado en el uso de suspensiones embriogénicas para mejorar la eficiencia del proceso a partir de callo embriogénico producido en explantes de hoja de palma adulta. Este proceso ha permitido una producción a gran escala de embriones somáticos individuales que muestran similitudes estructurales con los embriones cigóticos de semilla. Rival *et al* (2003) realizaron estudios de las fases finales de la embriogénesis a través del análisis comparativo del desarrollo y maduración de embriones cigóticos y somáticos. El trabajo de estas investigaciones resultó en una mejor comprensión de la fisiología del embrión somático durante su desarrollo, la acumulación de varios tipos de moléculas de reserva y de los mecanismos de adquisición de tolerancia a la desecación.

En la fase de micropropagación clonal de la palma aceitera, Rival *et al* (2003) y Duval *et al* (1997) resaltaron las dificultades relacionadas al incrementar la propagación como la producción masiva requerida para llenar las necesidades de los cultivadores y por otro lado, la fidelidad genética del material vegetal regenerado. Encontraron varios factores que limitan el proceso de micropropagación de palma aceitera, siendo la malformación floral la más importante.

En el campo de genética estructural y funcional, el laboratorio CIRAD/IRD está actualmente estableciendo una colección de clones cDNA sistemáticamente secuenciados los cuales representan a los genes expresados en tejidos específicos, estados de desarrollo o condiciones ambientales de interés en un proyecto llamado EST (Expressed Sequence Tag, por sus siglas en inglés). El proyecto EST tiene como propósito ensamblar un catálogo extensivo de genes de palma aceitera para un mejoramiento asistido a través de marcadores moleculares, así como para determinar anomalías en etapas tempranas de desarrollo (Rival *et al*, 2003). Rival *et al*

(2003) tienen en proceso otros proyectos en el campo de la ingeniería genética con el propósito de introducir genes diferentes en palma aceitera para modificar la producción de aceite, calidad y resistencia a enfermedades y plagas.

Fernando *et al* (2003) lograron la regeneración de plantas de cocotero a partir de plúmulas de embriones cigóticos maduros del cultivar Sri Lanka Tall.

Verdeil *et al* (1989) y Pannetier & Morel (1982) del equipo ORSTOM-IRHO, desarrollaron la embriogénesis somática indirecta del cocotero a partir de explantes de hoja de individuos jóvenes y de árboles adultos, y más tarde a partir de inflorescencias.

Pimchai (1977), estudió las condiciones de inducción de callos a partir de tejidos de tallo de cocoteritos adultos. Las divisiones celulares han dado nacimiento a células de tipo embriode, restando por estudiar las condiciones de cultivo de estos callos para regenerar a plántulas.

En los estudios de Infoagro (2005) y Tisserat (1981) se utilizan las yemas axilares, puntas de raíz y el meristemo terminal de la palma datilera, los cuales contienen el potencial meristemático y son empleados para organogénesis *in vitro*.

Para desarrollar un método eficaz de multiplicación clonal de pejibaye o pijuayo, Valverde *et al* (1987) estudiaron el efecto de diferentes sustancias de crecimiento sobre la inducción de embriogénesis somática y concluyeron que el piclorame asemeja la sustancia de mayor eficacia para la inducción de callo y para el desarrollo del embrión. Pinedo & Díaz (2006) lograron la inducción de brotes basales con la combinación de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA más $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, después de siete meses de cultivo en ápices caulinares, habiendo controlado la oxidación con $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de caseína hidrolizada más $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CA en el medio de cultivo.

3.4.4. Cultivo de tejidos en camedoreas

Ortega (2001), en el estudio preliminar sobre la micropropagación de xate *Chamaedorea elegans* Mart., evaluó la producción de callo y brotes a partir de embriones cigóticos utilizando diferentes concentraciones de 2,4-D ($50, 75$ y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y 2-ip ($1, 2$ y $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La mejor formación de callo se obtuvo en las concentraciones 50/1 de 2,4-D y 2-ip con medio basal MS. Sin embargo, este resultado no fue significativo comparado con los tratamientos sin estimulación de los reguladores y argumenta que el 2-ip disminuyó la capacidad del 2,4-D en la desdiferenciación celular por lo que el autor recomienda agregar únicamente 2, 4-D en concentraciones altas basándose en las que él utilizó para la formación de callo. Los callos formados eran de color

verde pálido, de textura rugosa, brillosos y de consistencia friable, adecuados para embriogénesis somática según el autor.

En su experimento, Ortega (2003) reporta que las mayores concentraciones de 2-ip en combinación con 2,4-D resultaron en una mayor cantidad de brotes deformados, en contraste con el tratamiento que produjo brotes verdes y vigorosos que fue el que no contenía reguladores de crecimiento. El autor también evaluó la formación de brotes a partir de plántulas en tratamientos con ácido Giberélico (GA₃) y BAP pero no obtuvo resultados positivos.

Chang (2003) estudió el efecto de 2,4-D en varias concentraciones (25 – 200 mg·L⁻¹) sobre la formación de callo y germinación *in vitro* de xate jade *Chamaedorea oblongata* Cronquist, a partir de embriones cigóticos utilizando 1 mg·L⁻¹ de 2-ip y carbón activado para todos los tratamientos. En este estudio se obtuvo callo y germinación de embriones con formación directa de plántulas en casi todos los tratamientos. Sin embargo, el porcentaje de inducción de callo (PIC) no fue mayor de 3.6% en promedio y el mejor tratamiento fue el de 100 mg·L⁻¹ de 2,4-D con un 6.1% de PIC. Los callos obtenidos se trasladaron a un medio libre de reguladores para inducir a la regeneración de plantas pero no se obtuvo ninguna respuesta.

En su experimento, Chang (2003) reporta que todas las plantas se obtuvieron a partir de la germinación de los embriones en varios tratamientos con y sin 2,4-D, siendo las mejores plantas las que se desarrollaron en medio sin esta auxina. Las plantas obtenidas fueron trasladadas a medios sin reguladores para continuar su crecimiento pero por el contrario, finalmente murieron. Las dosis altas de auxina que utilizó el autor en su estudio son potencialmente tóxicas para los embriones y para las plantas, pero debido a que utilizó carbón activado en los medios de cultivo, el 2,4-D no afectó letalmente a los embriones.

Chang (2003) y Ortega (2001) recomiendan utilizar embriones cigóticos y otras fuentes de explantes para la micropropagación de especies de *Chamaedorea*. También recomiendan experimentar con otras concentraciones de 2,4-D, así como también con diferentes citoquininas en combinación con diferentes auxinas o distintos niveles, para inducción de brotes o regeneración de plantas a partir de callo.

4. JUSTIFICACIÓN

El xate se ha posicionado entre los productos ornamentales no tradicionales de mayor exportación en el país a través de los años, de donde su obtención se ha basado en la extracción directa del bosque, y más recientemente en el establecimiento de viveros comerciales. En el primero de los casos, se causa daños al ecosistema y a las poblaciones silvestres de la especie por falta de medidas estrictas para controlar y mitigar los mismos. En el segundo, según la experiencia y los reportes de la literatura, la propagación de xate por semilla en viveros es lenta y de bajo rendimiento incluso bajo óptimas condiciones artificiales.

Debido a que el interés económico por este producto sigue vigente y en crecimiento, y a que las limitaciones para su obtención a gran escala no han sido resueltas, se plantea el presente estudio para la propagación *in vitro* de xate como parte del proyecto AGROCYT-ANACAFE “Desarrollo *in vitro* de productos de importancia económica y evaluación de la inoculación con micorrizas arbusculares”.

Dentro de los objetivos del proyecto AGROCYT-ANACAFE está el desarrollar el protocolo de micropropagación para el xate con el propósito de crear una alternativa de producción artificial que cubra las demandas del mercado internacional. Para lograrlo, se realiza el presente estudio en donde se plantean dos metodologías *in vitro*, una para obtener embriones somáticos y otra para obtener brotes, utilizando diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento. Los estudios realizados hasta la fecha, recomiendan reevaluar las concentraciones de 2,4-D sin combinación de citoquininas y sin adición de carbón activado. Por otro lado, no existe ningún estudio donde se hayan aplicado combinaciones de diferentes concentraciones de BAP y ANA para la inducción de brotes, a pesar de que esta combinación hormonal es ampliamente conocida para este efecto en varias especies. Como fuente de explante, se utilizan embriones cigóticos ya que está demostrado en el cultivo de tejidos que los órganos o tejidos inmaduros o juveniles presentan una mayor respuesta a los reguladores de crecimiento por sus ejes meristemáticos y son más manejables por su morfología.

Las plántulas de xate que se obtengan, serán utilizadas para la segunda parte del proyecto AGROCYT-ANACAFE, donde se llevarán a aclimatar para su adaptación al ambiente externo en condiciones controladas y serán inoculadas con diferentes tratamientos y combinaciones de micorrizas arbusculares. El objetivo final del proyecto es poder ofrecer a los productores plantas de xate de líneas genéticas seleccionadas propagadas *in vitro* y micorrizadas en su aclimatación, para una mejor adaptación y desempeño en el campo definitivo.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Conocer la respuesta de los embriones cigóticos de xate *Chamaedorea elegans* Mart., a diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento en dos experimentos, uno con Acido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), para inducir la formación de embriones somáticos, y el segundo con combinaciones de Acido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) para inducir a la formación de brotes

5.2. Específicos

- 5.2.1. Evaluar el efecto de 4 niveles de concentraciones de 2,4-D en embriones cigóticos de xate *C. elegans*.
- 5.2.2. Determinar la efectividad de los tratamientos con 2,4-D en embriones cigóticos de xate *C. elegans* para la formación de estructuras embriogénicas.
- 5.2.3. Evaluar el efecto de la combinación de 4 concentraciones de BAP con 4 concentraciones de ANA en diferentes tratamientos en embriones cigóticos de xate *C. elegans*.
- 5.2.4. Determinar la efectividad de los tratamientos de combinaciones de BAP y ANA para la formación de brotes.
- 5.2.5. Determinar la efectividad de las dos técnicas de propagación de xate *C. elegans* evaluadas.

6. HIPOTESIS

El uso de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas inducirá a la formación de estructuras embriogénicas y a la organogénesis en embriones cigóticos de xate, *Chamaedorea elegans* Mart.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo

7.1.1. Investigadoras

- Ana Silvia Martínez, autora.
- Antonieta Alfaro, Ph.D., asesora.

7.1.2. Lugar de trabajo

El estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Asociación Nacional del Café (ANACAFE).

7.1.3. Material vegetal

El material vegetal fuente de los explantes consistió en frutos de xate, *Chamaedorea elegans* Mart., los cuales se obtuvieron del vivero comercial Finca El Cangrejo, ubicado en Santa Cruz, Alta Verapaz.

7.1.4. Explantes

Los explantes consistieron en los embriones cigóticos de xate, *C. elegans*.

7.2. Procedimientos

7.2.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados con las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog, 1962 (ver anexo 1, página 55), suplido con sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, solidificado con phytigel $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y ajustado a pH 5.6. Para inducir a la formación de estructuras embriogénicas el medio fue modificado con 10, 20 y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, y para inducir a la organogénesis el medio de cultivo fue modificado con 0.5, 1.0 y $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en combinación con 0.05, 0.1 y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA.

7.2.2. Preparación de medios de cultivo modificados

Se prepararon las soluciones madres de MS según los requerimientos de cada una, y luego se prepararon los medios de cultivo modificados. En un balón aforado de 250 ml se midieron y agregaron las alícuotas de cada solución madre y de los reguladores del crecimiento según cada tratamiento, (ver anexos 2 y 3, páginas 56 y 58) en el siguiente orden:

- 7.5 g de azúcar refinada
- 12.5 ml de solución madre de macronutrientes 20X
- 2.5 ml de solución madre de micronutrientes 100X
- 1.25 ml de solución madre de hierro 200X
- 0.5 ml de solución madre de vitaminas 500X
- agregar la cantidad de reguladores del crecimiento según el tratamiento
- aforar la solución y agitar en agitador magnético para homogeneizar
- verter en beaker de 250 ml y poner en agitación
- medir y ajustar pH a 5.6
- agregar 0.63 g de phytigel
- verter en botella de 250 ml
- esterilizar a 15 lb in^{-3} y 250° F por 20 minutos

Al terminar el tiempo de esterilización, se vertió en caliente 25 ml del medio nutritivo en cajas de petri estériles y desechables dentro de la cámara de flujo laminar. Las cajas con el medio nutritivo se dejaron enfriar y gelificar, luego se rotularon según el tratamiento y se pusieron en refrigeración a 4° C hasta que se utilizaron para las siembras.

7.2.3. Preparación de materiales para desinfección y siembras

Se esterilizaron los siguientes materiales en el autoclave: una botella con agua destilada, una caja de petri con papel absorbente cortado en cuadros, 1 beaker de 250 ml tapado con papel aluminio, y los instrumentos a utilizar envueltos en papel aluminio. Luego se preparó una solución de etanol al 70%.

La cámara de flujo laminar se encendió y se dejó funcionando por 1 hora previo a iniciar los procedimientos. Luego se desinfectó con etanol al 70% y una hoja de papel toalla, se colocaron los materiales e instrumentos esterilizados y el estereoscopio desinfectado con etanol al 70%.

7.2.4. Tratamiento de escarificación de semillas

Se procedió a someter las semillas a un tratamiento de escarificación para facilitar la disección del embrión, de la siguiente manera:

- los frutos de xate se colocaron en un beaker de 1 litro con agua destilada
- se incubaron durante 24 horas a 40° C
- fueron lavados con agua y jabón desinfectante
- se removió la cascarilla negra y la pulpa remanente

7.2.5. Desinfección de semillas

Después del tratamiento de escarificación se siguieron los siguientes pasos para su desinfección:

- se hizo un lavado superficial de las semillas con agua corriente y jabón líquido desinfectante
- se desinfectaron en una solución de benomil al 3% por 1 hora
- se lavaron con agua corriente
- se desinfectaron en una solución de cloro comercial al 50% y 2 gotas de tween por 20 minutos, y fueron llevadas a la cámara de flujo laminar
- se lavaron 2 veces con agua destilada estéril con duración de 1 minuto cada lavado
- se colocaron en el beaker esterilizado
- se desinfectaron en una solución de cloro comercial al 30% por 15 minutos
- se lavaron 3 veces con agua destilada estéril con duración de 1 minuto cada lavado
- se dejaron las semillas en el beaker con agua estéril hasta su siembra
- se repitió este procedimiento para cada tratamiento

7.2.6. Extracción y siembra de embriones cigóticos

Se colocaron las semillas desinfectadas en grupos de 10 unidades en el papel absorbente estéril. Con un alicate pequeño y estéril se procedió a hacer presión por el centro de la semilla a modo de ubicar el segmento donde se encuentra el poro germinativo con ayuda del estereoscopio, se procedió a extraer el embrión con pinzas y se colocó en una caja de petri con el medio nutritivo de cultivo del tratamiento que correspondía. Este procedimiento se continuó hasta sembrar el número de embriones necesarios en cada unidad experimental de los tratamientos.

7.2.7. Condiciones de cultivo

Los embriones cigóticos en medios de inducción de estructuras embriogénicas fueron cultivados en una cámara oscura, y los embriones en medios de inducción para organogénesis fueron cultivados con un fotoperíodo de 16 horas, ambos a una temperatura $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.2.8. Monitoreo del experimento

Se realizaron observaciones de los cultivos cada semana después de la siembra durante 20 semanas para cada uno de los tratamientos tomando en cuenta varias características además de las variables a evaluar, las cuales son: cambio de forma, tamaño y color del explante; formación de callo (tipo, color y abundancia), formación de embriones somáticos y formación de brotes, así como también para control de la contaminación.

7.3. Diseño de la investigación

7.3.1. Experimento 1: Inducción a embriogénesis somática

7.3.1.1. Tratamientos y diseño del experimento

En un experimento completamente al azar se evaluó el medio MS modificado con 3 concentraciones de 2,4-D más un tratamiento control sin regulador (4 tratamientos en total), en 5 repeticiones cada uno. Cada repetición consistió en una caja petri con 10 explantes (total de 50 explantes por tratamiento). Las concentraciones de los reguladores del crecimiento evaluados y los tratamientos del experimento se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1: Tratamientos y concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo, evaluados en el experimento 1.

MEDIO BASAL	TRATAMIENTOS	CONCENTRACIONES 2,4-D mg-L ⁻¹
MS	1	0
	2	10
	3	20
	4	50

7.3.1.2. Variables

Porcentaje de inducción de callo: PIC

$$\text{PIC} = \frac{\text{No. de embriones con callo}}{\text{No. total de embriones}} \times 100$$

Porcentaje de Formación de Estructuras Embriogénicas: PFEE

$$\text{PFEE} = \frac{\text{No. de embriones con estructuras embriogénicas}}{\text{No. total de embriones}} \times 100$$

Porcentaje de Germinación: PG

$$\text{PG} = \frac{\text{No. de embriones germinados}}{\text{No. total de embriones}} \times 100$$

Tipo de callo formado: Textura, consistencia, color, tamaño.

7.3.1.3. Análisis de resultados

Se aplicó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar de los tratamientos. Se analizaron las variables con la prueba de Kruskal-Wallis y también se aplicó la prueba de comparaciones pareadas para separación de medias.

7.3.2. Experimento 2: Inducción a la organogénesis

7.3.2.1. Tratamientos y diseño del experimento

En un experimento completamente al azar en arreglo factorial se evaluaron 2 factores que fueron los reguladores BAP y ANA, y 4 niveles que fueron las concentraciones de cada regulador, cada uno con 5 repeticiones. Cada repetición consistió en una caja petri con 10 explantes cada una (total de 50 explantes por tratamiento). Las concentraciones de los reguladores del crecimiento evaluados se muestran en el cuadro 2 y los tratamientos del experimento se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 2: Concentraciones de BAP y ANA en el medio de cultivo, evaluadas en el experimento 2.

CONCENTRACIONES (mg-L ⁻¹)		
MEDIO BASAL	BAP	ANA
	0	0
MS	0.5	0.05
	1.0	0.1
	1.0	0.2

Cuadro 3: Tratamientos y combinaciones de BAP y ANA evaluados en el experimento 2.

MEDIO BASAL	BAP	ANA	TRATAMIENTOS
	0	0	1
	0	0.05	2
	0.5	0.05	3
	1.0	0.05	4
	2.0	0.05	5
	0	0.1	6
	0.5	0.1	7
MS	1.0	0.1	8
	2.0	0.1	9
	0	0.2	10
	0.5	0.2	11
	1.0	0.2	12
	2.0	0.2	13
	0.5	0	14
	1.0	0	15
	2.0	0	16

7.3.2.2. Variables

Porcentaje de inducción de callo: PIC

$$\text{PIC} = \frac{\text{No. de embriones con callo}}{\text{No. total de embriones}} \times 100$$

Porcentaje de Organogénesis: PFO

$$\text{PFO} = \frac{\text{No. de embriones con organogénesis}}{\text{No. total de embriones}} \times 100$$

Porcentaje de Germinación: PG

$$\text{PG} = \frac{\text{No. de embriones germinados}}{\text{No. total de embriones}} \times 100$$

Tipo de callo formado: Textura, consistencia, color, tamaño.

7.3.2.3. Análisis de resultados

Se aplicó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar en arreglo factorial utilizando los resultados previamente transformados que se obtuvieron en este experimento. En los casos en donde se encontró significancia en los resultados se aplicó la prueba de Tukey para separación de medias.

7.3.3. Unidad Experimental

Fue definida como unidad experimental una caja de petri con el medio de cultivo modificado de cada tratamiento a evaluar, donde se sembraron 10 embriones.

8. RESULTADOS

8.1. Experimento 1: Inducción a la embriogénesis somática

Cambios en los embriones

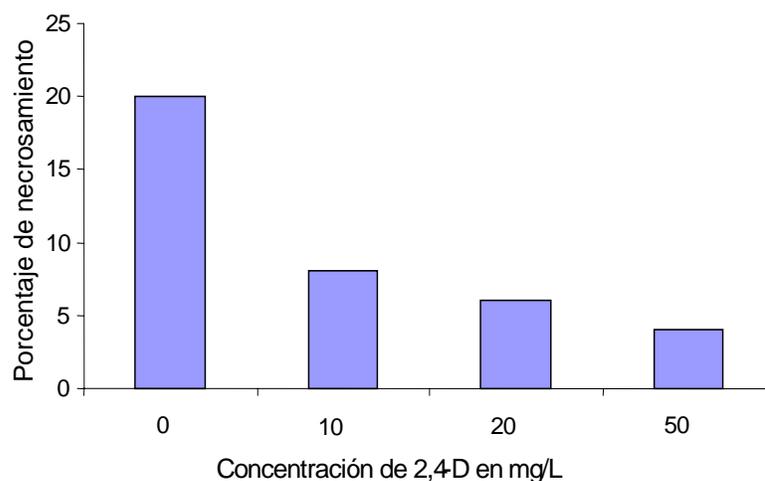
Los embriones presentaron necrosamiento a una semana de iniciado el cultivo, siendo el tratamiento control (0 mg·L⁻¹ 2,4-D) el que presentó mayor porcentaje de embriones necrosados con 20%, seguido por el tratamiento 1 (10 mg·L⁻¹ de 2,4-D) con 8%, y el tratamiento con el menor porcentaje fue el 4 (50 mg·L⁻¹ de 2,4-D) con 4% (ver cuadro 5 y figura 2). Ninguno de los embriones necrosados presentó callogénesis.

Cuadro 4. Necrosamiento de embriones en tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.

TRATAMIENTOS	2,4-D mg·L ⁻¹	NECROSAMIENTO	
		En	% N
T1	0	10	20
T2	10	4	8
T3	20	3	6
T4	50	2	4

En: número de embriones necrosados; % N: porcentaje de necrosamiento.
Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Figura 1: Porcentaje de necrosamiento en embriones de xate en tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.



Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Inducción a la formación de callo (PIC)

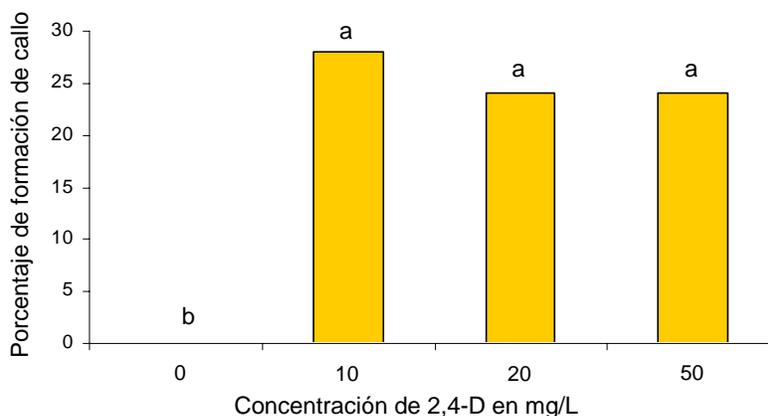
Los embriones cigóticos de xate presentaron callogénesis a las 22 semanas de cultivo en los tratamientos con las tres concentraciones de 2,4-D en diferentes frecuencias, no siendo el caso del tratamiento control. El tratamiento 2 (10 mg·L⁻¹ 2,4-D) fue el que presentó el porcentaje más alto de inducción a callogénesis (PIC) con 28% (14 embriones con callo), seguido por los tratamientos 3 y 4 (20 y 50 mg·L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente) ambos con un PIC de 24% (12 embriones con callo) (ver cuadro 4 y figura 1).

Cuadro 5: Resultados promedio de formación de callo a partir de embriones cigóticos de xate, tratados con diferentes concentraciones de 2,4 D en el medio de cultivo

T	[2,4-D] mg·L ⁻¹	FORMACION DE CALLO	
		E	PIC
T1	0	0	0
T2	10	14	28
T3	20	12	24
T4	50	12	24

T: tratamientos; E: número de embriones; PIC: porcentaje de inducción a la formación de callo. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Figura 2: Porcentaje de inducción a la callogénesis en respuesta a diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.



Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba de comparaciones pareadas. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

El test de Bartlett para varianzas aplicado al análisis de varianza de este experimento indica que las mismas no son homogéneas ($p=0.036$), por lo que se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (ver anexo 4, página 59). Los resultados obtenidos con esta prueba para la

variable PIC indican que hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($Pr=0.0318<0.05$). Al aplicar el test de comparaciones pareadas, éste indica que los tratamientos con 10, 20 y 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D no presentaron diferencia significativa entre sí y que la diferencia en el experimento radicó en el tratamiento control sin adición de 2,4-D.

El tipo de callo formado fue pequeño, compacto, seco y de color blanco brillante (ver fotos 7 a 9).



Fotos 7 a 9. Características físicas de callos provenientes de la inducción a la embriogénesis somática (Fotos: Martínez, A. S., 2006)

No se identificó ninguna estructura embriogénica en el callo formado en los embriones cigóticos al final del experimento, por lo que para la variable de porcentaje de formación de estructuras embriogénicas (PFEE) no hubo valores para medir. De igual manera, para la variable de porcentaje de germinación (PG) no hubo valores a medir ya que los embriones cigóticos no presentaron germinación.

El número de embriones que presentó respuesta de formación de callo a los tratamientos con 2,4-D, es muy bajo en relación con el número de embriones que no respondieron. El tratamiento 2 ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D) presentó el mayor porcentaje (28%) de embriones con respuesta, seguido por los tratamientos 3 ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D) y 4 ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D) con 24%. En el tratamiento control ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D) no se obtuvo respuesta de los embriones debido a la ausencia de regulador (ver cuadro 6).

Cuadro 6: Respuesta de los embriones de xate a los tratamientos de 2,4-D en el medio de cultivo.

TRATAMIENTOS	2,4-D $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	En	EC	ESR	% R
1	0	10	0	40	0
2	10	4	14	32	28
3	20	3	12	35	24
4	50	2	12	36	24

En: número de embriones necrosados; EC: número de embriones con callo; ESR: número de embriones sin respuesta, %R: porcentaje de respuesta. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

8.2. Experimento 2: Inducción a la organogénesis

Cambios morfológicos y necrosamiento de embriones

Los embriones de este experimento presentaron cambios en su forma a una semana de iniciado su cultivo en el 87.5% de los tratamientos. Los cambios morfológicos consistieron en hinchamiento, crecimiento del hipocótilo y presencia de gotas de agua en su superficie (ver foto 10). Algunos embriones se necrosaron luego de su siembra.



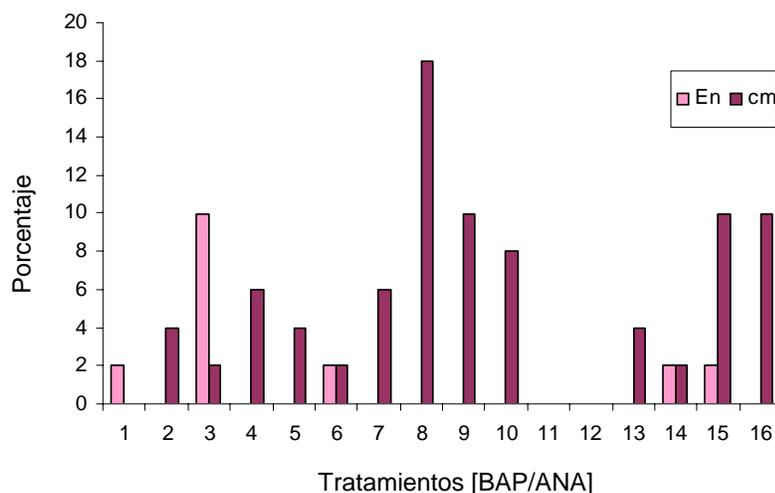
Foto 10.
Embrión con gotas de agua.
(Foto: Martínez, A. S. 2006)

El tratamiento 8 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) presentó el mayor porcentaje de estos cambios con 18% (9 embriones), seguido por los tratamientos 1 ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 9 ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 15 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) y 16 ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) todos ellos con 10% (5 embriones con cambios). Con respecto al necrosamiento, el tratamiento 3 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) fue el que mayor porcentaje presentó con 10% (5 embriones necrosados), mientras que los demás tratamientos presentaron de 2 a 0% (1 o ningún embrión necrosado). Los embriones necrosados no desarrollaron su potencial organogénico o germinativo (ver cuadro 7 y figura 3).

Cuadro 7: Necrosamiento y cambios morfológicos en embriones en los tratamientos evaluados.

TRATAMIENTOS	[BAP/ANA]	NECROSAMIENTO		CAMBIOS MORFOLOGICOS	
		E	N	E	% CM
T1	0/0	1	2	5	10
T2	0/0.05	0	0	2	4
T3	0.5/0.05	5	10	1	2
T4	1.0/0.05	0	0	3	6
T5	2.0/0.05	0	0	2	4
T6	0/0.1	1	2	1	2
T7	0.5/0.1	0	0	3	6
T8	1.0/0.1	0	0	9	18
T9	2.0/0.1	0	0	5	10
T10	0/0.2	0	0	4	8
T11	0.5/0.2	0	0	0	0
T12	1.0/0.2	0	0	0	0
T13	2.0/0.2	0	0	2	4
T14	0.5/0	1	2	1	2
T15	1.0/0	1	2	5	10
T16	2.0/0	0	0	5	10

[BAP/ANA]: concentraciones de BAP en combinación con concentraciones de ANA en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en los tratamientos; E: número de embriones; %N: porcentaje de necrosamiento; %CM: porcentaje de cambios morfológicos. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Figura 3: Porcentaje de necrosamiento y de cambios morfológicos en embriones tratados con diferentes concentraciones de BAP/ANA.

En: porcentaje de embriones necrosados; cm: porcentaje de cambios morfológicos; Tratamientos [BAP/ANA]: concentraciones de BAP y ANA en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ empleados en los tratamientos (ver cuadro 3). Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Porcentaje de inducción de callogénesis (PIC)

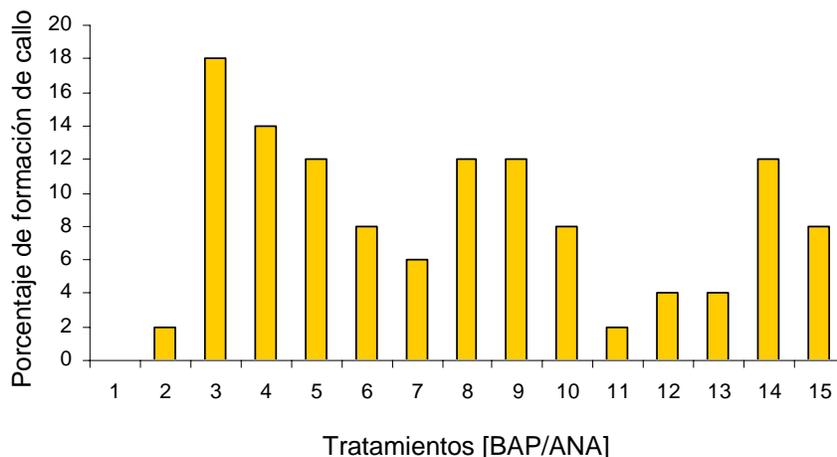
Los embriones presentaron callogénesis a las 8 semanas de cultivo en diferentes frecuencias en todos los tratamientos. De acuerdo al análisis de varianza para la variable PIC no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($Pr=0.7807>0.01$) es decir, que no se identificó un tratamiento mejor que los demás para inducción a callogénesis. Adicionalmente, el test de Tukey tampoco demostró diferencia entre las medias de los tratamientos (ver anexo 5, página 60). Sin embargo, se observó que el tratamiento 4 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) presentó el porcentaje más alto de inducción de callogénesis (PIC) con 18% (9 embriones con callo), y luego el tratamiento 5 ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) con 14% (7 embriones con callo). Les siguen los tratamientos 6 ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 9 ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 10 ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) y 15 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) todos ellos con 12% (6 embriones con callo) (ver cuadro 8 y figura 4). En el tratamiento control no se detectó la formación de callo.

Cuadro 8: Callogénesis, organogénesis y germinación de embriones de xate en el experimento 2.

TRATAMIENTOS	[BAP/ANA]	CALLOGENESIS		ORGANOGENESIS		GERMINACIÓN	
		E	PIC	E	PO	E	PG
T1	0/0	0	0	0	0	8	16
T2	0/0.05	5	10	0	0	0	0
T3	0.5/0.05	1	2	0	0	0	0
T4	1.0/0.05	9	18	0	0	0	0
T5	2.0/0.05	7	14	0	0	0	0
T6	0/0.1	6	12	0	0	0	0
T7	0.5/0.1	4	8	3	6	0	0
T8	1.0/0.1	3	6	7	14	0	0
T9	2.0/0.1	6	12	2	4	0	0
T10	0/0.2	6	12	0	0	0	0
T11	0.5/0.2	4	8	0	0	0	0
T12	1.0/0.2	1	2	0	0	0	0
T13	2.0/0.2	2	4	0	0	0	0
T14	0.5/0	2	4	0	0	6	12
T15	1.0/0	6	12	0	0	2	4
T16	2.0/0	4	8	0	0	2	4

[BAP/ANA]: concentraciones de BAP en combinación con concentraciones de ANA en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en los tratamientos; E: número de embriones; PIC: porcentaje de inducción a callogénesis; PO: porcentaje de inducción a organogénesis; PG: porcentaje de germinación. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Figura 4: Porcentaje de calogénesis en embriones de xate cultivados con diferentes concentraciones de BAP/ANA.



[BAP/ANA]: Combinación de concentraciones de BAP y ANA $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en los tratamientos (ver cuadro 3). Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafe, 2007.

Los callos formados se caracterizaron por presentar forma irregular con glóbulos grandes, de textura seca, y de colores marfil y blanco (ver fotos 11 y 12).



Foto 11.
Calogénesis en embrión de experimento 2.
Foto: Martínez, A. S. 2006.



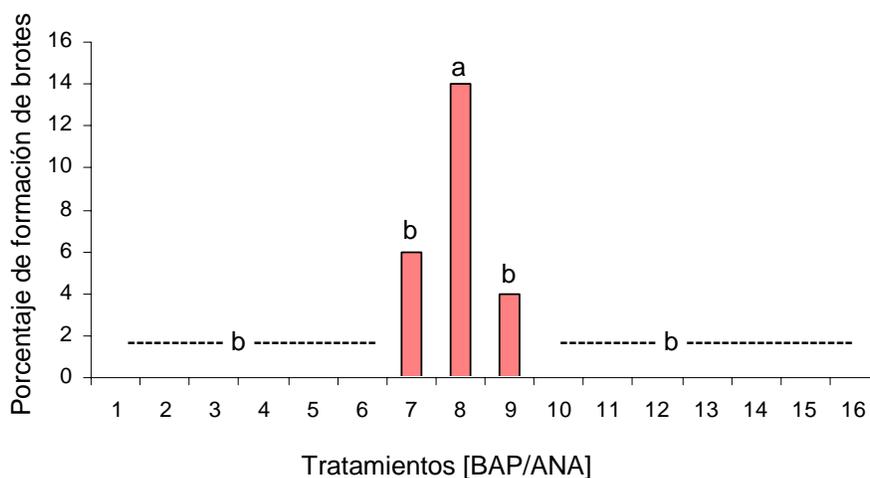
Foto 12.
Callo con inicio de brotes en experimento 2.
Foto: Martínez, A. S. 2006.

Porcentaje de inducción de organogénesis (PO)

El inicio de formación de brotes fue observado a las 12 semanas en los tratamientos 7 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 8 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) y 9 ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA). El análisis de varianza demostró diferencias altamente significativas entre tratamientos para la variable PO ($Pr=0.0000<0.01$). La prueba de Tukey demostró que el tratamiento 8 fue diferente a los demás ya que presentó el porcentaje más alto de organogénesis con 14% (7 embriones con brotes). De los tratamientos restantes, el tratamiento 7 presentó 6% de

organogénesis (3 embriones con brotes), seguido del tratamiento 9, con apenas 4% (2 embriones con brotes), y éstos fueron diferentes al control, en el cual no se observó formación de brotes (ver anexo 5, página 60). En el cuadro 8 y figura 5 se observa el comportamiento de esta variable.

Figura 5: Porcentaje de organogénesis (formación de brotes) a partir de callo de xate en el experimento 2.



[BAP/ANA]: combinación de concentraciones de BAP y ANA en los tratamientos (ver cuadro 3). Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Los brotes se observaron primero blancos y luego verdes con una morfología similar a la de embriones en germinación (ver fotos 13, 14 y 15).



Foto 13.
Organogénesis indirecta
en experimento 2.



Foto 14.
Inicio de brotes verdes en
experimento 2.



Foto 15.
Brotación múltiple en
experimento 2.

Fotos: Martínez, A.S., 2006.

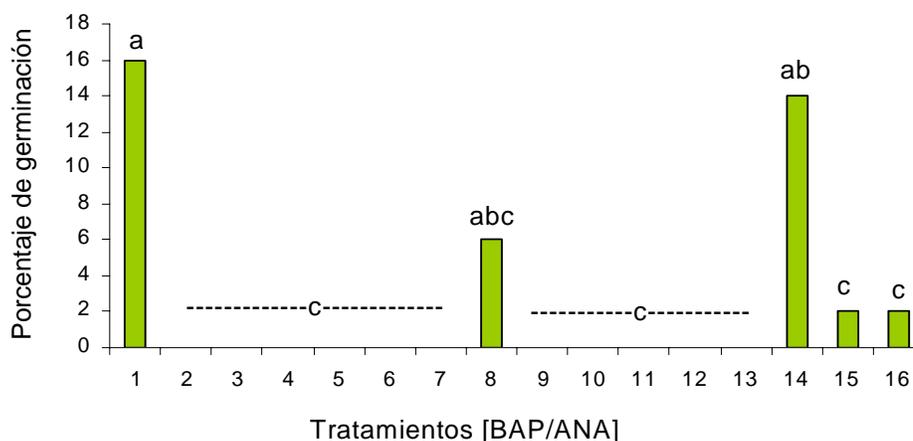
Porcentaje de germinación (PG)



Foto 16.
Embrión germinado en
experimento 2.
Foto: Martínez, A.S. 2006

Los embriones de los tratamientos 1 o control ($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 8 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 14 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), 15 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA) y 16 ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP + $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA), comenzaron a germinar entre las 10 y 12 semanas de iniciado el cultivo (ver foto 16). El tratamiento 1 (control) presentó el porcentaje más alto de germinación con 16% (8 embriones germinados), le siguen los tratamientos 14 con 14% (7 embriones germinados), 8 con 6% (3 embriones germinados), y por último los tratamientos 15 y 16 con 4% (2 embriones germinados) (ver cuadro 8 y figura 6). El porcentaje de germinación en todo el experimento fue de 2.75%. La variable de porcentaje de germinación (PG) fue altamente significativa ($Pr=0.0000<0.01$), de donde el tratamiento 1 (control) fue el mejor tratamiento para la germinación de los embriones (ver anexo 5, página 60).

Figura 6. Porcentaje de germinación en embriones de xate con diferentes concentraciones de BAP/ANA en el medio de cultivo.



[BAP/ANA]: combinación de concentraciones de BAP y ANA en los tratamientos (ver cuadro 3).
Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey.
Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

Relación de cambios morfológicos con la respuesta de los embriones

En el 87.5% de los tratamientos, la relación de los cambios morfológicos que fueron observados en los embriones fue mayor que su respuesta a formación de callo, brotes o germinación. Solamente en dos casos la relación fue igual, siendo éstos, los tratamientos 3 (0.5 mg·L⁻¹ BAP + 0.05 mg·L⁻¹ ANA) y 13 (2.0 mg·L⁻¹ BAP + 0.2 mg·L⁻¹ ANA). Como se observa en el cuadro 9, la formación de callo fue efectiva para la formación de brotes solamente en un 18.75% de los casos, lo cual ocurrió en los tratamientos 7 (0.5 mg·L⁻¹ BAP + 0.1 mg·L⁻¹ ANA), 8 (1.0 mg·L⁻¹ BAP + 0.1 mg·L⁻¹ ANA) y 9 (2.0 mg·L⁻¹ BAP + 0.1 mg·L⁻¹ ANA). El mejor tratamiento en donde se obtuvo el mayor porcentaje de respuesta fue en el tratamiento 8 (1.0 mg·L⁻¹ BAP + 0.1 mg·L⁻¹ ANA) con 26%; le siguen el 4 (1.0 mg·L⁻¹ BAP + 0.05 mg·L⁻¹ ANA) y el 14 (0.5 mg·L⁻¹ BAP + 0 mg·L⁻¹ ANA) con 18%. Sin embargo, ninguno de los tratamientos alcanzó un porcentaje aceptable de embriones con respuesta.

Cuadro 9: Relación de respuestas de los embriones de xate del experimento 2.

T	[BAP/ANA]	En	ECM	EC	EB	EG	ER	ESR	% R	CM-ER	EC-EB
T1	0/0	1	5	0	0	8	8	41	16	5-8	0-0
T2	0/0.05	0	2	5	0	0	5	45	10	2-5	5-0
T3	0.5/0.05	5	1	1	0	0	1	44	2	1-1	1-0
T4	1.0/0.05	0	3	9	0	0	9	41	18	3-9	9-0
T5	2.0/0.05	0	2	7	0	0	7	43	14	2-7	7-0
T6	0/0.1	1	1	6	0	0	6	43	12	1-6	6-0
T7	0.5/0.1	0	3	4	3	0	7	43	6	3-7	4-3
T8	1.0/0.1	0	9	3	7	3	13	37	26	9-13	3-7
T9	2.0/0.1	0	5	6	2	0	8	42	16	5-8	6-2
T10	0/0.2	0	4	6	0	0	6	44	12	4-6	6-0
T11	0.5/0.2	0	0	4	0	0	4	46	8	0-4	4-0
T12	1.0/0.2	0	0	1	0	0	1	49	2	0-1	1-0
T13	2.0/0.2	0	2	2	0	0	2	48	4	2-2	2-0
T14	0.5/0	1	1	2	0	7	9	40	18	1-9	2-0
T15	1.0/0	1	5	6	0	2	8	41	16	5-8	4-0
T16	2.0/0	0	5	4	0	2	6	44	12	5-6	6-0

T: tratamientos; [BAP/ANA]: combinación de concentraciones de BAP y ANA en los tratamientos; En: número de embriones necrosados; ECM: número de embriones con cambios morfológicos; EC: número de embriones con callo; EB: número de embriones con brotes; EG: número de embriones que germinó; ER: número de embriones con respuesta a los tratamientos; ESR: número de embriones sin respuesta a los tratamientos; % R: porcentaje de respuesta de los embriones. Fuente: datos experimentales. Guatemala, Anacafé, 2007.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Experimento 1: Inducción a la embriogénesis somática

La extracción de los embriones para su cultivo *in vitro* es un proceso que requiere de manipulación cuidadosa debido a la sensibilidad de los tejidos. Los embriones pueden sufrir daño mecánico por desecación y quemadura al utilizar pinzas calientes o por aplicación de fuerza al momento de extraerlos. El necrosamiento de los embriones podría estar asociado a algunas de estas causas, sin embargo, no se descarta que ocurran procesos bioquímicos que aceleren esta condición ya que fue observado que el necrosamiento disminuyó proporcionalmente con el aumento de la concentración de 2,4-D en los tratamientos y fue máximo en el tratamiento control (20%). El tejido dañado perdió su capacidad embriogénica y por esta razón, los embriones que presentaron necrosamiento no desarrollaron callo. Chang (2003), también observó necrosamiento de los embriones luego de cuatro semanas de cambiarlos a medio libre de reguladores. En este caso, los embriones ya habían formado callo pero éste no continuó su desarrollo, lo que ocasionó pérdida de los cultivos. No se observaron otros cambios en forma o color en los embriones de este experimento, a diferencia del trabajo de Ortega (2001), quien reporta un “abultamiento” de los embriones sembrados en medios con 2,4-D y 2-ip, seguido por desdiferenciación a los 8 días de haber iniciado los cultivos.

Las 22 semanas en que se desarrolló el callo de este experimento, difiere mucho de los reportes de Ortega (2001) y Chang (2003) en sus trabajos de inducción a embriogénesis somática con embriones de *C. elegans* y *C. oblongata* con una y seis semanas respectivamente. Esta diferencia se atribuye a la latencia que presentan las semillas de xate y a las diferencias en el comportamiento de la especie ya que no ha sido completamente domesticada (Agexpront, 2000, 2002).

El porcentaje de inducción de callogénesis (PIC) obtenido en este experimento no fue significativo y no se obtuvieron estructuras embriogénicas a partir del callo formado. Esto se atribuye a que las concentraciones de 2,4-D utilizadas en el experimento no fueron efectivas, además de la baja respuesta de los embriones debido a la latencia y al comportamiento impredecible en la germinación de la semilla. Ortega (2001), obtuvo callo (con 50+1 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 2-ip), pero no estructuras embriogénicas y su resultado no fue significativo, lo cual lo atribuye a que la acción del 2-ip disminuyó la respuesta al 2,4-D de los embriones. Chang (2003) obtuvo dos picos con el mejor porcentaje de inducción de callo (con 100 mg·L⁻¹ y 175 mg·L⁻¹), pero tampoco obtuvo estructuras embriogénicas, y sus resultados fueron significativos únicamente para 100 mg·L⁻¹ de 2,4-D (6.1% de inducción de callo); atribuyendo sus resultados a

que el uso de carbón activado disminuyó la acción del 2,4-D y a la poca susceptibilidad de las palmas para la formación de callos.

El tipo de callo observado en este experimento, compacto y seco, es diferente al observado por Chang (2003) quien menciona la formación de callo en *C. oblongata* como una “masa celular” de hasta 5 mm, color crema. También es diferente del callo observado por Ortega (2001) quien describe el callo formado como friable, verde pálido, y rugoso con aristas en *C. elegans*.

El tratamiento 1 o control, no presentó ninguna respuesta de los embriones como era esperado ya que únicamente la presencia del regulador puede inducir al desarrollo de callo o embriones somáticos. De igual manera, no se esperaba germinación en los tratamientos con 2,4-D pues este regulador no es promotor de la germinación; y en el caso del tratamiento control, a pesar de la ausencia de 2,4-D, los embriones necesitan luz para germinar como se comprobó en el tratamiento control del experimento de organogénesis, según se indica en Bidwell (1990).

En este experimento en general, los embriones presentaron un porcentaje de respuesta muy bajo para cada tratamiento lo cual se atribuye a la latencia de los embriones de xate o a que el tejido de los embriones cigóticos no es el ideal para inducir a la embriogénesis somática, y por último, a que las concentraciones de 2,4-D utilizadas en el experimento no fueron las adecuadas para el propósito.

9.2. Experimento 2: Inducción a la organogénesis

Los cambios morfológicos que presentaron los embriones se atribuyen al efecto de la combinación de los reguladores que desencadenaron la desdiferenciación celular para la formación de callo. Las causas del necrosamiento se atribuyen a las mismas razones discutidas en el experimento anterior, y de igual forma, el tejido dañado perdió su capacidad de respuesta.

En este experimento se observó diferente tipo de callo el cual dio lugar a la organogénesis. Se obtuvo la misma respuesta para inducción a callogénesis en todos los tratamientos ya que las combinaciones de BAP y ANA en todos sus niveles de concentraciones causaron el mismo efecto de desdiferenciación celular en los embriones, a excepción del tratamiento control por ausencia de reguladores. A pesar de que se obtuvo un porcentaje alto de inducción a la callogénesis, el callo no fue organogénico en la mayoría de los casos lo cual se atribuye a las concentraciones de citocinina y auxina utilizadas. En Bidwell (1990), se indica que Skoog y sus colaboradores demostraron que existe una diferencia cualitativa en el callo según las concentraciones de reguladores: en presencia de bajas concentraciones de cinetina el callo es “aguado” compuesto por grandes células que han crecido por expansión; mientras que en

presencia de 1 mg/l de cinetina, el callo es denso y compuesto de un gran número de células meristemáticas. Es posible que en los tratamientos con 1 mg·L⁻¹ de BAP que desarrollaron callo existan células meristemáticas que den lugar a la formación eventual de brotes. En los casos donde se formaron brotes a partir de callo, se debió a que la relación de las concentraciones de citocinina/auxina fue ideal para este efecto.

Los mejores tratamientos para la inducción a la organogénesis tenían una relación alta de BAP/ANA, en donde se desarrollaron brotes con las tres concentraciones experimentadas de BAP (0.5, 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹), pero solamente con la concentración media de ANA (0.1 mg·L⁻¹), sin tomar en cuenta las concentraciones control. En el estudio de Bhattacharya *et al* (2003/4), también obtuvieron brotes a partir de embriones cigóticos de papaya con la relación de concentraciones de BAP/ANA de 1.0/0.1 mg·L⁻¹, al igual que el mejor tratamiento de este experimento. En Bidwell (1990), se explica esta relación y se indica que se necesita mayor cantidad de cinetina con relación a auxina para el desarrollo de tallos a partir de callo de tabaco en cultivos *in vitro*; y la mejor proporción para este efecto es 1 mg·L⁻¹ de cinetina y de 0.01 a 0.1 mg·L⁻¹ de auxina, según el trabajo de Skoog y sus colaboradores. Ortega (2001) menciona que obtuvo brotes deformados con la relación alta de citocininas/auxinas, y concluye que mientras mayor sea esta relación, mayor cantidad de brotes deformados se producirá. Es posible que este autor haya obtenido estos resultados en su experimento porque utilizó 2-ip como citocinina y 2,4-D como auxina, las cuales no son comúnmente usadas para formación de brotes.

Los embriones germinaron en mayor cantidad en el tratamiento control (sin adición de reguladores), ya que los embriones no necesitan el efecto de reguladores externos para germinar. También germinaron los embriones de los tratamientos con presencia de BAP lo cual se explica porque las citocininas son promotoras de la germinación como se indica en Bidwell (1990). Chang (2003) y Ortega (2001) también obtuvieron el mayor porcentaje de germinación de los embriones de xate en los tratamientos sin adición de reguladores del crecimiento.

Existen diferencias en el desarrollo de las plantas obtenidas de brotes y de las plantas germinadas (ver fotos 17 y 18). En el primer caso, las plantas tardan aproximadamente 3 meses en tomar su forma y en dejar de formar brotes por el efecto acumulativo del BAP. Por el contrario, en el segundo caso, las plantas tienen una forma muy bien definida desde la formación de las primeras hojas. Pero para fines de micropropagación, es más ventajoso obtener mayor número de brotes aunque en un tiempo relativamente mayor.



Foto 17.
Planta obtenida de
organogénesis indirecta.
Foto: Martínez, A.S., 2006.



Foto 18.
Planta obtenida de
germinación.
Foto: Martínez, A.S., 2006.

La respuesta en general de los embriones a los tratamientos de este experimento es muy pobre, lo cual se refleja en los resultados obtenidos en la callogénesis (porcentajes bajos y no-significancia), en la organogénesis (bajo porcentaje de formación de brotes), y germinación (bajo porcentaje de germinación). Estos resultados se atribuyen principalmente al comportamiento de las semillas de xate que deben romper la latencia para germinar, o en este caso, dar una respuesta *in vitro*.

9.3. Técnica de siembra de embriones cigóticos

La técnica de siembra de embriones cigóticos de xate que se aplicó para este estudio fue una adaptación de la técnica que se utiliza para siembra de embriones cigóticos de papaya y también se tomó como referencia las técnicas utilizadas por Chang (2003) y Ortega (2001). Las semillas presentaron dificultades para la extracción del embrión no así para su desinfección, ya que los procesos de escarificación y desinfección fueron relativamente sencillos y efectivos. Se probaron 2 formas de escarificación: con ácido sulfúrico y con agua caliente. Las dos técnicas daban el mismo resultado y se prefirió utilizar el agua caliente por el riesgo de utilizar un ácido fuerte. Durante el primer lavado de la desinfección se pudieron descartar las semillas vanas ya que éstas flotaron. Para la desinfección, se pudo utilizar concentraciones altas de fungicida y cloro, ya que el embrión está muy bien protegido por la testa y sólo se debieron hacer varios lavados con agua destilada estéril al final para evitar que el embrión tuviera contacto con los desinfectantes y lo dañaran (ver foto 19).



Foto 19.
Semilla de xate antes de
escarificar y desinfectar.
Foto: Martínez, A.S., 2006.



Foto 20.
Semilla de xate con embrión
expuesto antes de sembrar.
Foto: Martínez, A.S., 2006.

Lo más difícil y delicado fue la extracción y siembra del embrión. Debido a que la semilla es una pequeña esfera de consistencia muy dura, ésta debió ser partida con ayuda de un alicate esterilizado (ver foto 20). No siempre fue posible distinguir el sitio donde se encontraba el poro germinativo por lo que al aplicar la fuerza, aproximadamente el 50% de los embriones se perdieron porque fueron lastimados, aplastados, o disparados. Además, los embriones fueron sembrados inmediatamente después de su extracción, tomando en cuenta que las condiciones de luz y aire en el área de la cámara de flujo laminar podrían ocasionarles deshidratación. A pesar de

los cuidados durante el proceso de extracción y traslado de los embriones al medio de cultivo, no se descarta que haya ocurrido pérdida por alguna de las causas mencionadas.

Luego de haber sido sembrados los embriones, se esperó un tiempo prudencial (4 a 5 días máximo) para observar si se presentaba contaminación. Los embriones que se contaminaron con bacterias fueron reemplazados sin tocarlos entre sí con los contaminados dentro de una caja de petri, pero no fue posible salvar los embriones cuando ocurrió contaminación por hongos. La contaminación más frecuente que se presentó de cualquier manera, fue la causada por bacterias.

En muchos embriones se observó un exudado acuoso transparente, en algunos casos lechoso (ver foto 21). Según Orozco, E. (comunicación personal), los embriones presentan exudados al entrar en contacto con el medio de cultivo debido la presencia de algún microorganismo asociado, como levaduras, que no necesariamente es contaminante. Sin embargo, se hizo un ²análisis microbiológico de este exudado y los resultados fueron negativos para presencia de microorganismos y levaduras (ver anexo 6, página 63). Al ser cambiados estos embriones a medios nuevos, perdían este exudado y no lo



Foto 21.
Embrión con exudado.
Foto: Martínez, A.S., 2006.

formaban de nuevo comprobándose así también que no se trataba de contaminación, pero se desconoce si estos embriones en particular respondieron a alguna de las variables medidas.

Las semillas de xate se mostraron muy variables en su respuesta a los medios de cultivo de un lote de cosecha a otro e incluso dentro de un mismo lote, y se observaron resultados muy

diferentes a los obtenidos en los trabajos de Chang (2003) y Ortega (2001). Asimismo, la técnica se apreció muy laboriosa en todo su proceso y poco efectiva para obtener embriones que presenten una respuesta específica (callogénesis, embriogénesis, organogénesis o germinación). Esto se atribuye a que la especie no ha sido domesticada o seleccionada para usos agrícolas bajo control, la única referencia es su cultivo en vivero y existe muy poca experiencia (Agexpront, 200, 2002; Monterroso, 2006). Sin embargo, las ventajas que se pueden mencionar de la técnica *in vitro* en comparación con la técnica convencional de producción por semilla en vivero, fueron acortar el tiempo de germinación en un 50% aproximadamente, según los datos de los reportes de la literatura, y obtener plantas estériles que pueden utilizarse para ensayos futuros de micropropagación por otros explantes.

² Informe de Análisis de Microbiología, SERPROLAB No. de Orden 2488-m, Fecha: 1407-06.

10. CONCLUSIONES

- Existe un alto riesgo de necrosamiento de los embriones de *C. elegans* durante su siembra causado principalmente por daños mecánicos, lo cual afecta directamente el potencial embriogénico, organogénico y germinativo de los mismos.
- Las concentraciones de 2,4-D que fueron experimentadas no fueron efectivas para la formación de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos de *C. elegans*.
- La formación de callo no es indicadora de la formación de embriones somáticos o de brotes en embriones de *C. elegans*. Es solamente una reacción al efecto de los reguladores que causa la desdiferenciación celular.
- Los cambios morfológicos que presentan los embriones de *C. elegans* después de la siembra tuvieron una alta relación con la callogénesis, pero muy baja para la organogénesis.
- La organogénesis indirecta en embriones cigóticos de *C. elegans* se caracteriza por la formación de callo con glóbulos grandes, seco, de colores marfil y blanco, seguido de la formación de pequeños brotes primero blancos y luego verdes con una morfología similar a la de embriones en germinación.
- La relación de BAP/ANA que fue efectiva para la organogénesis en embriones de *C. elegans* se encuentra en un rango de concentraciones de 0.5 a 1.0 mg·L⁻¹ de BAP y no menos de 0.1 mg·L⁻¹ de ANA en donde la relación siempre debe ser mayor de citocinina/auxina.
- La germinación de embriones de *C. elegans* es más efectiva en medios sin adición de reguladores. Sin embargo, la adición de BAP en bajas concentraciones (0.5 mg·L⁻¹) puede promover la germinación.
- La técnica de siembra de embriones cigóticos de *C. elegans* evaluada en este experimento es muy laboriosa en relación con el número de embriones que presentan respuesta debido a la latencia de los mismos.
- *C. elegans* presenta un comportamiento en cultivos *in vitro* muy variable lo que indica que se trata de una especie aún no domesticada para usos agrícolas bajo control.
- La falta de investigación para conocer el comportamiento de *C. elegans* en condiciones artificiales de cultivo dificulta el proceso de micropropagación de la especie.

11. RECOMENDACIONES

- Diseñar otros experimentos utilizando embriones cigóticos y otros tejidos como fuente de explante para inducir a la embriogénesis somática y a la organogénesis en *C. elegans*.
- Identificar y definir las características del callo embriogénico y organogénico en embriones cigóticos de xate *C. elegans*, por medio de observaciones a escala celular.
- Diseñar otros experimentos utilizando concentraciones de BAP y ANA en rangos más reducidos y cercanos a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA para el desarrollo de brotes a partir de embriones cigóticos de *C. elegans*, y de este manera verificar la repetitividad del experimento.
- Diseñar experimentos con otros tipos de citocininas como el Thidiazuron (TDZ), en combinación con ANA u otras auxinas para el desarrollo de brotes a partir de embriones cigóticos de *C. elegans*.
- Experimentar la efectividad de otros medios basales sin presencia de reguladores para la germinación de embriones cigóticos de *C. elegans*.
- Investigar acerca del origen y causas del exudado que se observó durante la siembra de embriones de *C. elegans* y sus afecciones.
- Hacer experimentos para mejorar ciertos elementos de la técnica de siembra de embriones de *C. elegans* evaluada en este experimento, especialmente para la extracción del embrión.
- Utilizar la técnica de siembra de embriones para fines de evaluar la viabilidad de semillas de *C. elegans* de diferentes lotes, así como también de otras especies. También para evaluar la viabilidad de un lote almacenado a través del tiempo.
- Hacer una evaluación de rendimiento de la técnica de siembra de embriones cigóticos de *C. elegans* para conocer si la inversión de tiempo y esfuerzo es recompensada por la producción masiva de plantas. Comparar estos resultados con otras técnicas que se hayan evaluado.

12. BIBLIOGRAFIA

ACICAFOC (2006). El xate (*Chamaedorea spp.* Arecaceae). Disponible en: <http://www.acicafoc.net/pymescomunitarias/mayaitza.php#arriba>

AGEXPRONT (2004). Directorio de Plantas Ornamentales, Follajes y Flores. Guatemala. Disponible en: www.agexpront.org.gt

AGEXPRONT (2002). Primer Encuentro Nacional de Diversificación Agrícola. Agexpront. Guatemala. 324 p.

AGEXPRONT (2000). Manual del Cultivo de Chamaedorreas. Géomar MI Internacional-UPA Developpement International. 52 p.

Agraria.org (2007). Chamaedorea – *Chamaedorea spp.*, Classificazione, provenienza e descrizione. Rivista online di agragia.org. Disponible en: <http://www.agraria.org/piantedavaso/chamaedorea.htm>

Arboles Ornamentales (2006). Chamaedorea elegans Mart. Familia Arecaceae (Palmae). Disponible en: <http://arbolesornamentales.com/familias.htm>

Bhattacharya, J. *et al* (2003/4). Multiple shoot regeneration from immature embryo explants of papaya. BIOLOGIA PLANTARUM 47 (3): 327-331.

Belize Botanic Gardens (2006). The Trouble with Xate. Disponible en: <http://www.belizebotanic.org/xate.html>

Bidwell, R.G.S. (1990). Fisiología Vegetal. A.G.T. Editor, S.A. México. 784 p.

Chang, C. (2003). Efecto del ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre la formación de callo y germinación *in vitro* del xate macho o jade *Chamaedorea oblongata* (Cronquist), a partir de embriones cigóticos. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Ambientales y Agronómicas, URL). Guatemala. 34 p.

Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, The New York Botanical Gardens. Columbia University Press. 1262 pp.

De Touchet, B. *et al* (1990). Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regeneration from embryogenic suspension culture. Abstracts VIIth Internatinal Congress on Plant and Cell Culture/IAPTC. 1p.

Duval, Y. *et al* (1997). Progress in oil palm tissue culture and clonal performance in Indonesia and the Cote d'Ivoire. Plantation management for the 21st century. (Volume 1. Technical Papers/Pushparajah E. (ed.) Kuala Lumpur: Vol.1. p. 291-307.

Duval, Y. *et al* (1995). Use of embryogenic suspensions for oil palm micropropagation. Recent developments in oil palm tissue culture and biotechnology/Rao V. (ed.), Henson I.E. (ed.), Rajanaidu N. (ed.). Kuala Lumpur: PORIM, 1995. p. 38-47.

Econegocios Forestales (2007). Xate. Disponible en: <http://cecoeco.catie.ac.cr>

Escobar, R. (2005). Sube Exportación de Xate. Disponible en: <http://prensalibre.com/pl/2005/diciembre/15/130111.html>

Fernando, S.C. *et al* (2003). Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. Plant cell, tissue and organ culture: Vol. 72: n°3. 281-284 p.

GRIN Taxonomy for Plants (2006). Data from GRIN Taxonomy for plants. Taxon Chamaedorea. Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/econ.pl>

Hartmann, H.T. *et al* (2002). Plant Propagation, Principles and Practices. 7^a. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 880 p.

Infoagro (2005). El Cultivo de la Palmera Datilera. Disponible en: <http://www.infoagro.com/flores/plantas-ornamentales/palmeradatilera.htm>

Lopez-Feldman, A. (2004). Resource Extraction and Poverty: The Case of Xate in Frontera Corozal, Mexico. Disponible en : http://wwwtest.aup.edu/lacea2005/systems/step2_php/papers/lopez_feldman_feld.pdf

López, L. *et al* (2005). Análisis preliminar de la recuperación de poblaciones de *Chamaedorea elegans* y *Chamaedorea oblongata* sometidas a tratamientos experimentales de cosecha de hojas en la selva húmeda de Chajul, Chiapas, México. Congreso Mexicano de Botánica, Tema Cartel. Disponible en: <http://www.socbot.org.mx/disco/resume/re175.htm>

Medina, B. & Aguilar, R. (2006). Metodología para la Evaluación de Servicios Ambientales. ANACAFE-Embajada Británica. Guatemala. 37 pp.

Medina, B. & Muñoz, C. (2005). Proyecto Evaluación de Servicios Ambientales en el Agroecosistema Café en Guatemala, Cuenca Ocosito. ANACAFE-Embajada Británica. Guatemala. 66 pp.

Meerman, J. (2004). Xate in the Columbia River Forest Reserve. Disponible en: <http://www.biologicaldiversity.info/Downloads/xate%20in%20the%20Columbia%20River%20Forest%20Reserve%20.pdf>

Monterroso, I. (2006). Relaciones de género y dinámicas sociales en torno al manejo de xate en la Selva Maya. Disponible en: http://www.flacso.edu.gt/foresteria/publicaciones.htm#_ftnref1

Orellana *et al* (2001). Estudio Ecológico de las Comunidades Vegetales de Xate (*Chamaedorea* spp) en la comunidad Unión Maya Itzá, La Libertad, Petén. Disponible en: <http://www.icta.gob.gt/pfpdf/recom/reccnat/ESTUDIO%20ECOLOGICO%20DEL%20XATE%20301204.pdf>

Ortega, E. (2001). Prueba preliminar de propagación *in vitro* de shate *Chamaedorea elegans* Martius, mediante embriones cigóticos. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas). 36 p.

Pannetier, C. & J. B. Morel (1982). Premiers resultats concernant la production d'embryons somatiques a partir de tissus foliaires de cocotier, *Cocos nucifera* L.. Oleagineux: Vol. 37 n°7. p. 349-354.

Paredes, S. (2006). Las realidades del saqueo en las aldeas rurales de El Petén, Guatemala, Productos de la selva y lugares para acampar durante la temporada. Informe presentado a FAMSI. Disponible en: <http://www.famsi.org./reports/95096es/section05.htm>

Pimchai, J. (1977). La culture de tissus d'explantats de stipe de cocotier (*Cocos nucifera* L.). Oleagineux: Vol.32: N°6. p. 267-271.

Pinedo, M. & F. Díaz. (2005). Posibilidades de la propagación vegetativa del pijuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K.) por cultivos de tejidos. Disponible en: www.pejibaye.ucr.ac.cr/lquitos/iqitos3.htm

ProPetén (2006). Uso y Manejo Sustentable del Recurso Xate en la Comunidad de Paso Caballos. Disponible en: <http://www.propeten.org/proyectos.htm>

Proyecto Sierra Santa Marta, A.C. (2006). Organización y comercialización campesina. Disponible en: http://mxgeocities.com/pssm_ac/comercializacionhtm

Rainforest Alliance (2006a). Reliable Sources: Environmentally Sound and Socially Just Harvesting of Non-Timber Forest Products: Certified Chico Initiative at the Rainforest Alliance. Disponible en: <http://www.rainforest-alliance.org/programs/profiles/forestry-chico-initiative.html>

Rainforest Alliance (2006b). Exportación Directa de Xate Fortalece Conservación y Desarrollo en Biosfera Maya. Disponible en: http://www.rainforest-alliance.org/news/2005/jade_leaf_span.html

Ramírez, F. *et al* (2007). Extracción de hojas de xate en la selva de Petén en Guatemala. Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo. Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARN) de Guatemala. Disponible en: http://www.ccad.ws/documentos/els/els_pps_mara.doc

Rival, A. *et al* (2003). Biotechnology of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Plant genetic engineering. Vol. 4: Improvement of commercial plants-II / Eds. Pawan K. Jaiwal and Rana P. Singh. Houston: Sci Tech Publishing. p. 261-318.

Rival A. (2002). Large scale micropropagation of tropical tree crops: oil palm as a case study. 4th International Scientific Congress Biofor'02-Sustainable Forestry, Wood products and Biotechnology, Vitoria-Gasteiz, November 11-14, 2002 / ARD-BIOFOR Consortium. 1 p.

Rival, A. (1997). Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Plant Tissue Culture and Biotechnology. Vol. 3: n°2. P. 74-82.

Roca, W. & L. Mroginski, ed. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia, 969 p.

Rojas, M. & H. Ramírez (1993). Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. 2ª ed. Limusa. México. 263 p.

SIRE Paquetes Tecnológicos (2006). *Chamaedorea elegans* Mart. Disponible en: http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/Fichas%20Técnicas%20/C%20hamaedorea%20Elegans.pdf

Standley, P. & J. Steyermark (1959). Flora of Guatemala. Vol.24 Part I. Chicago Natural History Museum. 477 p.

Tisserat, B. (1981). Date palm tissue culture. Oakland: USDA. 50 p.

Valverde, R. *et al* (1987). Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Vol.10: N°2. p. 149-156.

Verdeil, J. *et al* (1989). Embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) a partir de tissus foliaires et inflorescenciels. Bilan des recherches et perspectives. Oleagineux: Vol. 44: N° 8-9. p. 403-411.

Wilsey, D. (2006). Can NTFP certification help to ensure the viability of natural production in community-managed extractive reserves? Poster Session 3: Production Systems. International Conference, Merida, Mexico. Disponible en: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/esai2006/document/?ID=59051>

13. ANEXOS

ANEXO 1

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE
MURASHIGE & SKOOG 1962 (MS)

REACTIVO	REQUERIMIENTOS mg·L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370
KI	0.83
Na ₂ MoO ₂ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6
H ₃ Bo ₃	6.2
MnSO ₄ x H ₂ O	15.1691
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.25
NaEDTA x 2 H ₂ O	37.2
Myoinositol	100
Acido Nicotínico	0.5
Tiamina	0.1
Piridoxina	0.5
Glicina	2
Sacarosa	3%
Fitagel	5 g/L
Ph	5.7

ANEXO 2

REQUERIMIENTOS DE SOLUCIONES MADRES DE MS

Solución Madre de Macronutrientes

MACRONUTRIENTES MS	
REACTIVO	20X* (1 L)
NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	8.8 g
KH ₂ PO ₄	3.4 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	7.4 g

* Agregar 50 ml/L

Solución Madre de Micronutrientes

MICRONUTRIENTES MS	
REACTIVO	100 X* (1 L)
KI	0.083 g
Na ₂ MoO ₂ x 2H ₂ O	0.025 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.0025 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.0025 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.86 g
H ₃ Bo ₃	0.62 g
MnSO ₄ x H ₂ O	1.52 g

* Agregar 10 ml/L

Solución Madre de Hierro

SOLUCION DE HIERRO MS	
REACTIVO	200 X* (500 ml)
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2.73 g
NaEDTA x 2 H ₂ O	3.72 g

* Agregar 5 ml/L

Solución Madre de Vitaminas

VITAMINAS MS 500X	
REACTIVO	500 X* (250 ml)
Myoinositol	12.5 g
Acido Nicotínico	0.0625 g
Tiamina	0.0125 g
Piridoxina	0.0625 g
Glicina	0.25 g

* Agregar 2 ml/L

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRES DE MS*

Preparación de Solución Madre de Macronutrientes

Para preparar 1 litro de esta solución se siguen los siguientes pasos:

- agregar 800 ml de agua destilada en un beaker de 1 litro
- colocar el beaker sobre el agitador magnético con un frijol magnético dentro
- poner en agitación
- pesar y agregar cada uno de los reactivos
- esperar a agregar el siguiente reactivo hasta que el primero esté disuelto
- verter la solución en un balón aforado de 1 L con un embudo
- aforar la solución
- poner en agitación la solución hasta homogeneizar

Preparación de Solución Madre de Micronutrientes

Para preparar 1 litro de esta solución se siguen los siguientes pasos:

- agregar 800 ml de agua destilada en un beaker de 1 L
- colocar el beaker sobre el agitador magnético con un frijol magnético dentro
- poner en agitación
- pesar y agregar cada uno de los reactivos
- esperar a agregar el siguiente reactivo hasta que el primero esté disuelto
- verter la solución en un balón aforado de 1 L con un embudo
- aforar la solución
- poner en agitación la solución hasta homogeneizar

Preparación de Solución Madre de Hierro

Para preparar 500 ml de esta solución se seguirán los siguientes pasos:

- calentar en microondas 2 beakers con 200 ml de agua destilada cada uno
- pesar cada uno de los reactivos
- disolver un reactivo en cada beaker en el agitador magnético por separado
- verter las dos soluciones de cada beaker en un balón aforado de 500 ml
- esperar a que la solución llegue a temperatura ambiente
- aforar la solución
- poner en agitación la solución hasta homogeneizar

***Nota:** Todas las soluciones madres de MS y de reguladores del crecimiento, se guardan en un recipiente adecuado, se rotula con nombre de la solución, concentración y fecha de preparación y se guarda en refrigeración a 4°C.

Preparación de Solución Madre de Vitaminas

Para preparar 250 ml de esta solución se siguen los siguientes pasos:

- agregar 200 ml de agua destilada en un beaker de 300 ml
- colocar el beaker sobre el agitador magnético con un frijol magnético dentro
- poner en agitación
- pesar y agregar cada uno de los reactivos
- agregar el siguiente reactivo hasta que el primero esté disuelto
- verter la solución en un balón aforado de 250 ml con un embudo
- aforar la solución
- poner en agitación la solución hasta homogeneizar

Soluciones Madres de Reguladores del Crecimiento

Solución Madre de 2,4-D

Para preparar 100 ml de 2,4-D a una concentración de $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, se siguen los siguientes pasos:

- agregar 50 ml de agua destilada en un beaker de 100 ml
- colocar el beaker sobre el agitador magnético con un frijol magnético
- poner en agitación con calor
- pesar 0.02 g de 2,4-D
- agregar al beaker en agitación y esperar hasta que se disuelva la hormona
- verter la solución en un balón aforado de 100 ml y aforar
- agitar la solución hasta homogeneizar

Solución Madre de BAP

Para preparar 100 ml de BAP a una concentración 0.5:1, se siguen los siguientes pasos:

- pesar 50 mg de BAP
- disolver con NaOH 1 N en un beaker de 20 ml
- agregar agua destilada
- verter en un balón aforado de 100 ml y aforar la solución
- agitar la solución hasta homogeneizar

Solución Madre de ANA

Para preparar 100 ml de ANA a una concentración 0.25:1, se siguen los siguientes pasos:

- pesar 25 mg de ANA
- disolver con NaOH 1 N en un beaker de 20 ml
- agregar agua destilada
- verter en un balón aforado de 100 ml y aforar la solución
- agitar la solución hasta homogeneizar

ANEXO 4

EXPERIMENTO 1: TEST DE KRUSKAL WALLIS

PARA INDUCCION A EMBRIOGENESIS SOMATICA

Tratamientos	Callo	PIC
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
2	7	70
2	5	50
2	0	0
2	2	20
2	0	0
3	2	20
3	2	20
3	2	20
3	4	4
3	2	20
4	2	20
4	4	40
4	1	10
4	4	40
4	1	10

. kwallis callo, by(tratamie) NUMERO DE EMBRIONES

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis Test)

Tratamie	_Obs	_RankSum
1	5	20.00
2	5	59.50
3	5	67.00
4	5	63.50

chi-squared = 8.209 with 3 d.f.
Probability = 0.0419

chi-squared with ties = 8.847 with 3 d.f.
Probability = 0.0314

. kwallis pic, by(tratamie) PORCENTAJE

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis Test)

Tratamie	_Obs	_RankSum
1	5	20.00
2	5	60.50
3	5	62.00
4	5	67.50

chi-squared = 8.203 with 3 d.f.
Probability = 0.0420

chi-squared with ties = 8.820 with 3 d.f.
Probability = 0.0318

ANEXO 5

EXPERIMENTO 2: ANALISIS DE VARIANZA PARA INDUCCIÓN A LA ORGANOGENESIS

Variável analisada: PIC

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	15	1492.000000	99.466667	0.585	0.8755
erro	64	10875.200000	169.925000		
Total corrigido	79	12367.200000			
CV (%) =	146.47				
Média geral:	8.9000000	Número de observações:	80		

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 29.3995673203104 NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 5.82966551356079

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3	2.000000	a1
12	2.400000	a1
14	4.000000	a1
13	4.000000	a1
8	6.000000	a1
11	8.000000	a1
16	8.000000	a1
7	8.000000	a1
2	10.000000	a1
1	10.000000	a1
15	12.000000	a1
6	12.000000	a1
9	12.000000	a1
10	12.000000	a1
5	14.000000	a1
4	18.000000	a1

Variável analisada: PFO

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	15	1060.000000	70.666667	8.076	0.0000
erro	64	560.000000	8.750000		
Total corrigido	79	1620.000000			
CV (%) =	197.20				
Média geral:	1.5000000	Número de observações:		80	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 6.67138994522965 NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 1.3228756555323

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
11	0.000000	a1
10	0.000000	a1
16	0.000000	a1
12	0.000000	a1
15	0.000000	a1
14	0.000000	a1
13	0.000000	a1
3	0.000000	a1
4	0.000000	a1
1	0.000000	a1
2	0.000000	a1
6	0.000000	a1
5	0.000000	a1
9	4.000000	a1
7	6.000000	a1
8	14.000000	a2

Variável analisada: PG

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	15	1995.000000	133.000000	5.320	0.0000
erro	64	1600.000000	25.000000		
Total corrigido	79	3595.000000			
CV (%) =	181.82				
Média geral:	2.7500000	Número de observações:		80	

Teste Tukey para a FV TRAT

DMS: 11.2767071943278 NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 5
 Erro padrão: 2.23606797749979

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	0.000000	a1
9	0.000000	a1
7	0.000000	a1
13	0.000000	a1
12	0.000000	a1
11	0.000000	a1
4	0.000000	a1
3	0.000000	a1
2	0.000000	a1
6	0.000000	a1
5	0.000000	a1
16	4.000000	a1 a2
15	4.000000	a1 a2
8	6.000000	a1 a2 a3
14	14.000000	a2 a3
1	16.000000	a3

ANEXO 6

Servicios Profesionales de Laboratorio

SERPROLAB

Bldv. principal 16-74 zona 8 Mixco, Guatemala

Tel. 502-2479-5749/ 502-5704-6874 serprolab@hotmail.com

INFORME DE ANÁLISIS DE MICROBIOLOGIA

Número de Orden

2488-m

Persona Responsable

Ana Silvia Martínez

Fecha de Ingreso

1407-06

Referencia Cliente

XeMSBAPNAAAC

Fecha de Informe

1907-06

DATOS DE LA MUESTRA

Tipo de Muestra	Cultivo en agar	Temperatura	Ambiente
Apariencia	Húmeda	Fecha de muestreo	1407-06

RESULTADOS

MUESTRA	Observación en fresco y Coloración de Gram	Crecimiento en 72 horas (Micosel / Chromocult)
Xe MSBAPNAAAC 1-25	No se observaron microorganismos	Negativo
Xe MSBAPNAAAC 1-26	No se observaron microorganismos	Negativo
Ie MSBAPNAAAC 51-68	Bacilos Gram Positivo y levaduras	Contaminado (más de 3 diferentes colonias de moho)
Xe MSBAPNAAAC 26-55	No se observaron microorganismos	Negativo
Xe MSBAPNAAAC 26-51	No se observaron microorganismos	Negativo
Xe MSBAPNAAAC 55-79/100	No se observaron microorganismos	Negativo
Xe MS (MS 20/6)	Negativo	Negativo

Las muestras fueron tomadas a partir de los exudados claros de los embriones sembrados en los agares proporcionados por la Lic. Martínez. Y la última muestra se tomó del sobrenadante de color negro del agar.

Revisado: -----

Licda. Maureen Cruz Chang
Servicios Profesionales de Laboratorio
SERPROLAB