

Establecimiento *in vitro* de *Abies guatemalensis* (Pinabete) a partir de embriones cigóticos

**José Manuel Pérez Gómez
Samuel Demetrio Ramos**

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Establecimiento *in vitro* de
Abies guatemalensis (Pinabete)
a partir de embriones cigóticos**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

**José Manuel Pérez Gómez
Samuel Demetrio Ramos**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

Establecimiento *in vitro* de *Abies guatemalensis* (Pinabete) a partir de embriones cigóticos

Presentado por:

José Manuel Pérez Gómez
Samuel Demetrio Ramos

Aprobado:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Pérez Gómez, J.M. y S.D. Ramos Martín. 2012. Establecimiento *in vitro* de *Abies guatemalensis* (Pinabete) a partir de embriones cigóticos. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 22 p.

El pinabete *Abies guatemalensis* es una especie endémica de Guatemala que está en peligro de extinción debido al bajo porcentaje de viabilidad de su semilla y a su valor comercial. El objetivo de este experimento fue establecer *in vitro* y formar de tejido callogénico en pinabete. Para el establecimiento *in vitro* del material se desarrollaron tres diferentes procedimientos de desinfección de la semilla utilizando hipoclorito de sodio (NaClO con 4.5% i.a.) con tres tiempos de exposición (10, 20 y 30 minutos) y agua oxigenada (H₂O₂ con 3.34% i.a.) durante 24 horas de inmersión. Para el desarrollo de embriones se evaluaron tres concentraciones de microelementos: 0x, 1x y 5x, tomando como base la formulación basal de Murashige y Skoog (MS) (1962), en la presencia y ausencia de carbón activado. Para la inducción de tejido callogénico se evaluó el efecto de las fitohormonas Kinetina y BAP, ambas a una concentración de 0.1mg/L, en explantes hipocotiledonares, cotiledonares y embrionarios, en los medios basales Woody Plant Medium (WPM) y MS. Para cada una de las pruebas se utilizó el Diseño Completo al Azar, con tres réplicas por tratamiento, realizando una separación de medias en cada uno utilizando la prueba Duncan con una $P \leq 0.05$. El método de desinfección basado en H₂O₂ al 10% durante 24 horas obtuvo los más bajos índices de contaminación (29% del total de los individuos evaluados). Los tratamientos en que se utilizó NaClO, no presentaron resultados favorables. En las pruebas de medios de cultivo con variación en la concentración de microelementos y la influencia del carbón activado en el medio, se observa que los microelementos son un factor influyente en el desarrollo de embriones, siendo las concentraciones 1x y 5x las que mejores resultados presentaron. El uso o no del carbón activado en la etapa de establecimiento no presentó diferencias. Los embriones fueron los explantes que mejor formaron tejido callogénico. El BAP presentó los mejores resultados en el porcentaje de formación de tejido callogénico.

Palabras clave: Callogénesis, cotiledones, desinfección, hipocotilos, reguladores, 2,4-D.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA.....	20
7. ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) para la germinación de semillas de <i>Abies guatemalensis</i> en la evaluación de procedimientos de desinfección de la semilla.	4
2. Composición del medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (1981) utilizado en la inducción <i>in vitro</i> de tejido callogénico de <i>Abies guatemalensis</i> (pinabete).	10
3. Categorización del tamaño y porcentaje de tejido callogénico del área total del explante.	11
4. Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en el porcentaje de contaminación del medio de cultivo.	12
5. Efecto de los microelementos y carbón activado en el crecimiento de embriones de <i>Abies guatemalensis</i>	13
6. Efecto de la concentración de microelementos en el crecimiento de embriones de <i>Abies guatemalensis</i>	13
7. Efecto del medio basal de cultivo, el tipo de regulador de crecimiento, el tipo de explante y sus interacciones en el porcentaje de formación de tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	14
8. Efecto de las hormonas en el porcentaje de formación de tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	14
9. Efecto de la relación entre el medio de cultivo y el explante utilizado en el porcentaje de formación de tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	15
10. Efecto del medio de cultivo, regulador de crecimiento, tipo de explante y sus relaciones en el tamaño de tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	15
11. Efecto de explantes en el porcentaje de formación y tamaño del tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	16
12. Efecto del medio de cultivo, reguladores de crecimiento y explante utilizados, en la interacción tamaño × porcentaje de formación de tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Proceso para la preparación de semilla de <i>Abies guatemalensis</i> previo a la desinfección.....	3
2. Procedimiento para la extracción de embriones cigóticos a partir de semillas de <i>Abies guatemalensis</i>	6
3. Procedimiento para la obtención de explantes a partir de <i>vitro</i> -plantas de <i>Abies guatemalensis</i>	8
4. Tamaño de tejido callogénico (cm) en explantes embrionarios con 100% de formación de callo.	8
5. Explantes utilizados para la inducción de tejido callogénico en <i>Abies guatemalensis</i>	9

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos	Página
1. Composición de los medios de cultivo: Murashige y Skoog (MS) (1962) y Woody Plant Medium (WPM) (1981) utilizados en la inducción <i>in vitro</i> de tejido callogénico de <i>Abies guatemalensis</i> (pinabete).	22

1. INTRODUCCIÓN

El pinabete (*Abies guatemalensis*) es una especie forestal perteneciente a la familia de las gimnospermas. Es una especie endémica de la región noroeste de Guatemala se desarrolla en bosques subtropicales húmedos, en altitudes que van desde los 2700 hasta 3600 metros sobre el nivel del mar. Esta especie requiere una precipitación anual de 1500 a 3000 mm y una temperatura de 9 a 10°C (Salazar y Soihet 2000).

El pinabete tiene una alta demanda por su forma y aroma es una especie muy comercializada en la época de navidad. Además debido a la calidad y suavidad de su madera es utilizado como combustible, esto aunado a la expansión de la frontera agrícola y la tala desmedida de los traficantes ha colocado a esta especie en la lista de protección de especies arbóreas y fauna. En 1979 se declaró especie en peligro de extinción por CITIES (Convención sobre Comercio de Especies en Peligro de Extinción) y por el Servicio de Pesca y Fauna Silvestre de Guatemala (López 1996).

En los últimos años la mayor amenaza es el corte de ramas y arboles jóvenes como árboles de navidad lo que supone un doble problema. El corte de ramas debilita, y muchas veces mata el árbol. Por otro lado, como la poda se realiza en la época de producción de semillas, se reduce la capacidad de regeneración natural. Esta explotación intensa, el aislamiento de los rodales, la producción escasa y poco frecuente de semilla, y una baja germinación en general dificultan la conservación y manejo sostenible de esta especie. (Cordero y Boshier 2003).

Es entonces debido a la alta demanda y a un bajo porcentaje de germinación y viabilidad presente en la semilla que puede oscilar entre un 10 y 20%, según el Consejo Nacional de Áreas Protegidas de Guatemala (CONAP 2010), que se hace necesaria la implementación de un método de multiplicación para obtener una mayor cantidad de plantas y así satisfacer parte de la demanda y contribuir con la disminución en la tala ilegal de la especie.

Los experimentos aquí descritos se realizaron con la finalidad de elaborar un procedimiento de desinfección y evaluar el efecto de la presencia o ausencia del carbón activado en la oxidación fenólica del explante para semilla de *Abies guatemalensis*, evaluar la concentración de microelementos del medio basal Murashige y Skoog y carbón activado en el desarrollo de embriones cigóticos de *A. guatemalensis*, e identificar la mejor hormona, tipo explante y medio basal para la producción de tejido callogénico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria, de la Escuela Agrícola Panamericana, Valle del Yegua, Honduras.

En el primer experimento se evaluó un procedimiento de desinfección efectivo para establecer explantes *in vitro* de *Abies guatemalensis*. En el segundo experimento se evaluó un medio de cultivo en el cual los embriones de *A. guatemalensis* se desarrollen favorablemente antes de proceder a realizar procesos de inducción o multiplicación. En el tercer experimento se utilizaron dos reguladores de crecimiento, dos medios de cultivo y tres explantes con el propósito de inducir a la formación de tejido callogénico.

Experimento 1 Evaluación de procedimientos de desinfección de semilla de *Abies guatemalensis* (Pinabete): Explante. Se utilizó semilla proveniente de bosques naturales maduros del municipio de Tacana, departamento de San Marcos, Guatemala. Esta semilla fue utilizada inmediatamente dos meses después de la recolección debido a que es una semilla que pierde fácilmente su viabilidad.

Preparación de la semilla. Antes de proceder a la desinfección de la semilla, se removió previamente la capa exterior que cubre la semilla, a la cual se le conoce como ala, la cual es parte de la testa. Después de remover el ala, la semilla se lavó con agua y jabón y se colocó en etanol al 70% durante 30 segundos (Figura 1).

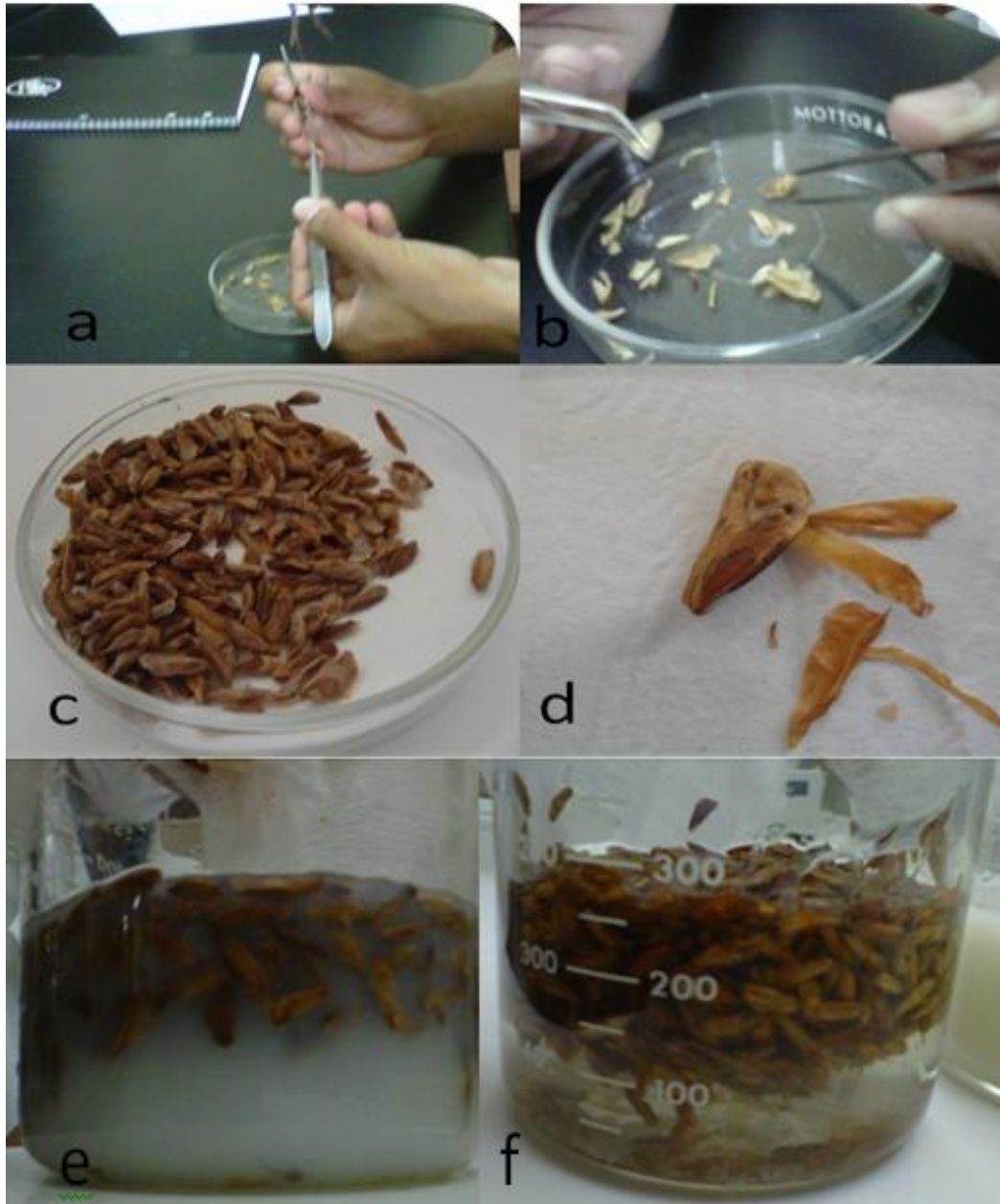


Figura 1. Proceso para la preparación de semilla de *Abies guatemalensis* previo a la desinfección. a) Eliminación de la testa de la semilla con pinzas; b) Semilla sin testa; c) Semillas sin testa lista para la desinfección; d) Semilla y testa separada; e) Lavado con jabón de semilla; f) Semilla en etanol al 70%.

Preparación del medio de cultivo. Se utilizó el medio basal Murashige y Skoog (MS) (Kyte y Kleyn 1996) (Cuadro 1), y se añadió carbón activado al 0.25% (P/v) para evitar la oxidación de la semilla. Según Abdelnour y Vincent (1994) el carbón activado se utiliza principalmente para evitar los problemas de oxidación asociados al cultivo de tejidos debido a la liberación de compuestos fenólicos que provocan la oxidación y muerte del

tejido. El carbón activado absorbe las sustancias químicas en general, limitando así su intervención con el tejido cultivado. El pH del medio de cultivo fue de 5.8 y se dispensó 10 ml de medio en cada tubo de ensayo.

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1996) para la germinación de semillas de *Abies guatemalensis* en la evaluación de procedimientos de desinfección de la semilla.

Compuesto	Cantidad (mg/L)	
MACROELEMENTOS		
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170.000
MICROELEMENTOS		
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	25.000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
KI	Ioduro de potasio	0.830
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato cúprico pentahidratado	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Na ₂ .EDTA	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético.	37.300
ORGÁNICOS		
Inositol		100.000
Tiamina		0.400
Acido Nicotínico		0.500
Piridoxina		0.500
Sacarosa		30000.000
Phytigel		1800.000
pH		5.800

Fuente: Kyte y Kleyn 1996.

Pruebas de desinfección. Para determinar el mejor procedimiento de desinfección se realizaron tres pruebas en las cuales se evaluaron concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (4.5% de concentración de ingrediente activo) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (3.34% de concentración ingrediente activo) a diferentes tiempos de exposición. En la primera prueba (1A) se utilizaron concentraciones bajas de NaClO; En la segunda prueba (1B) se incrementaron las concentraciones de NaClO. Para ambas pruebas se utilizaron

los mismos tiempos de exposición y se adicionaron tres gotas Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante. La tercera prueba (1C) se realizó utilizando solamente H₂O₂.

Las pruebas se realizaron individualmente y al finalizar cada experimento se dejó un lapso de siete días antes de iniciar el siguiente experimento.

Experimento 1A. En este experimento se utilizaron tres concentraciones de NaClO: 1, 3 y 5% (v/v) y tres períodos de exposición: 10, 20 y 30 minutos, esto en base a pruebas realizadas por Alvarez *et al.* (2008), en la producción *in vitro* de *Abies religiosa*. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento y 10 unidades experimentales (tubos de ensayo) por repetición, para un total de 270 unidades experimentales.

Experimento 1B. En este experimento se incrementaron las concentraciones de NaClO a 10, 20 y 30% (v/v), con el objetivo de reducir los porcentajes de contaminación. Las semillas fueron expuestas a la solución durante un período de 10, 20 y 30 minutos esto con la finalidad de incrementar las concentraciones utilizadas en los procesos de desinfección utilizados por Alvarez *et al.* (2008). Se utilizaron tres repeticiones y 10 unidades experimentales por repetición, para un total de 270 unidades experimentales.

Experimento 1C. Para este experimento se utilizaron concentraciones de 10, 20 y 30% (v/v) de H₂O₂, durante un período de inmersión de la semilla de 24 horas antes de la siembra. Este experimento se realizó como alternativa al uso de NaClO, debido a que el H₂O₂ funciona como uno de los mejores desinfectantes (Alvarez *et al.* 2008). Se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento y 7 unidades experimentales por repetición para un total de 63 unidades experimentales.

Siembra *in vitro* de la semilla y condiciones de incubación. Para los tres experimentos, posterior al proceso de desinfección se lavaron las semillas con alcohol al 95% por un minuto. En la cámara de flujo laminar se enjuagó la semilla con agua destilada estéril tres veces durante un minuto en cada enjuague. Se colocaron las semillas de cada tratamiento en platos petri con papel filtro. Se sembró una semilla en cada tubo de ensayo. En estos experimentos las semillas fueron incubadas a una temperatura promedio de 22°C con 60 a 70% de Humedad Relativa, con 16 horas luz (Silvanya Daylight Incandescent 75W) diarias con una intensidad de 1800 Lux.

Variables a evaluar y diseño experimental. En cada experimento se evaluó el porcentaje de contaminación del medio basal de cultivo *in vitro*, así como el tipo de contaminante. Semanalmente se contaron las semillas contaminadas. Estos experimentos tuvieron una duración de 25 días. Se utilizó el diseño estadístico completo al azar (DCA) con una P ≤ 0.05 y una diferencia de medias utilizando el método Duncan utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS® 2009)

Experimento 2 Evaluación de la concentración de microelementos y carbón activado en el medio basal Murashige y Skoog (MS) (Kyte y Kleyn 1996) para la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *Abies guatemalensis*: Desinfección. Para el procedimiento de desinfección se utilizó H₂O₂ al 10% durante 24 horas de inmersión y posterior agitación por un minuto con alcohol al 95% (Experimento 1). En la cámara de flujo laminar se realizó un triple lavado con agua destilada estéril inmediatamente antes de proceder a la disección de la semilla y la escisión de los embriones.

Explantos. Se utilizaron embriones cigóticos extraídos directamente de la semilla desinfectada. Cada embrión tenía una longitud promedio de 5 mm y una coloración amarillo cremoso (Figura 2).

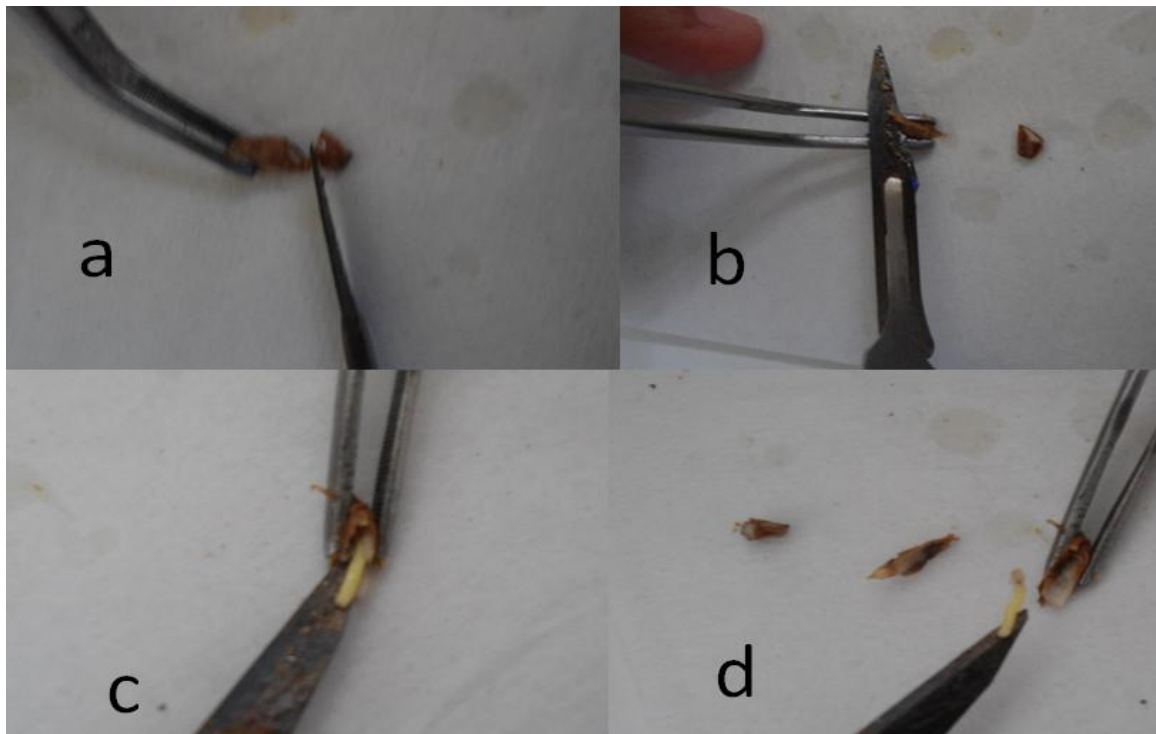


Figura 2. Procedimiento para la extracción de embriones cigóticos a partir de semillas de *Abies guatemalensis*. a) Corte transversal en la base de la semilla con bisturí y pinza; b) Corte longitudinal de la semilla para descubrir el embrión; c) Extracción del embrión cigótico con un bisturí; d) Embrión cigótico listo para sembrar en el medio de cultivo.

Preparación del medio de cultivo. Se utilizó el medio basal Murashige y Skoog (MS) (Kyte y Kleyn 1996). El pH del medio de cultivo fue de 5.8 (Cuadro 1) y se dispensó 10 ml de medio en cada tubo de ensayo.

Siembra. Se extrajeron los embriones en la cámara de flujo laminar utilizando bisturíes y pinzas, estereoscopios y platos petri con papel filtro estéril. Todos los materiales y equipo utilizados fueron debidamente desinfectados con alcohol al 70%, y esterilizados con calor a 250° C. Se colocó un embrión por tubo de ensayo ubicado de forma longitudinal en el medio de cultivo.

Diseño experimental. Se evaluaron tres concentraciones de microelementos en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Kyte y Kleyn 1996) en la presencia y ausencia de carbón activado. Para cada uno de los seis tratamientos se utilizaron tres repeticiones con 30 submuestras (tubos de ensayo) por cada repetición, colocando un embrión por tubo de ensayo, para un total de 180 unidades experimentales.

Se utilizó un Arreglo Factorial con un Diseño Completo al Azar (DCA) con un $P \leq 0.05$ realizado con el programa Minitab® y separación de medias con el método Duncan utilizando el Statistical Analysis System (SAS® 2009).

Toma de datos y variable evaluada. Una vez por semana durante cuatro semanas, se evaluó crecimiento midiendo desde la base, o sea el área en la que debería desarrollarse la radícula, hasta en la que debería presentarse la radícula, hasta el meristemo apical de los embriones.

Experimento 3. Efecto de la Kinetina y BAP en medios basales de Murashige y Skoog (MS) (Kyte y Kleyn 1996) y Woody Plant Medium (WPM) (Kyte y Kleyn 1996) para la inducción de calogénesis en *in vitro*-explantes cotiledonares, hipocotiledonares y embriones cigóticos: Extracción y Preparación de explantes. Para este tratamiento se utilizaron tres tipos de explantes: cotiledones, hipocotiledones y embriones cigóticos maduros. Estos explantes fueron extraídos de plántulas previamente establecidas *in vitro*, provenientes de los embriones cigóticos germinados del segundo experimento, los cuales fueron tratados con giberelinas a 1.58 mg/L y ácido indolebutírico a 0.81 mg/L para inducir la elongación de los embriones. Los explantes fueron disectados cada uno a una longitud de 5mm realizándoles un corte en cada uno de los extremos para proporcionar una mayor área de contacto entre el medio de cultivo y el explante.

Siembra de los explantes. Los explantes se cortaron todos a un tamaño de 0.5 ± 0.1 cm de largo (Figura 3); para ello se utilizaron bisturíes y pinzas previamente esterilizadas. Seguidamente, en cada frasco se colocó un explante en forma horizontal para que de esta forma los dos extremos entren en contacto con el medio de cultivo. Posteriormente los frascos se sellaron. Esto se realizó en la cámara de flujo laminar, una vez finalizado la siembra se llevo al cuarto de crecimiento, en donde estuvo bajo oscuridad por 30 días.

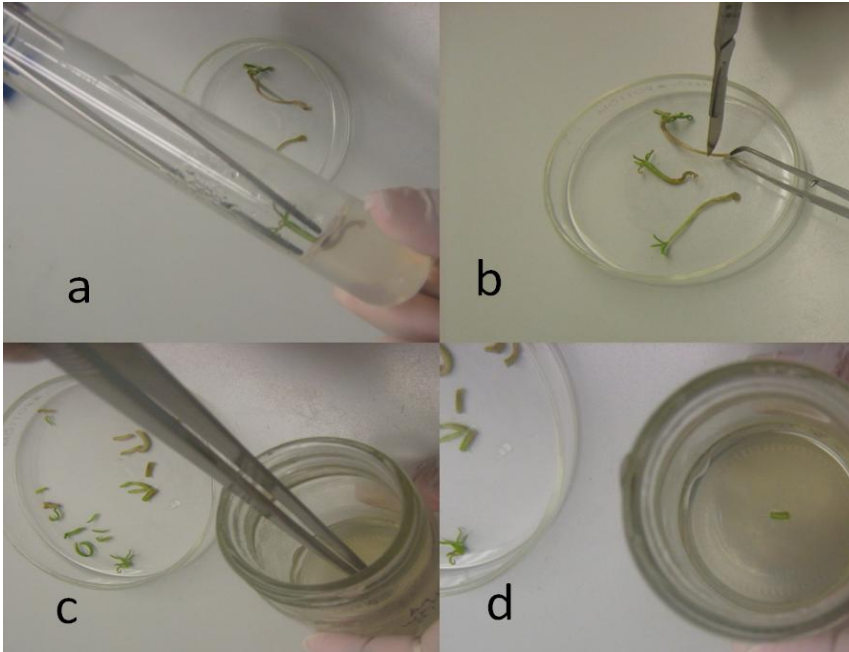


Figura 3. Procedimiento para la obtención de explantes a partir de *vitro*-plantas de *Abies guatemalensis*. a) Extracción de la vitroplanta; b) Corte transversal de la vitroplanta para proceder a la preparación de explantes; c) Siembra de los explantes en el medio de cultivo; d) Forma de colocación de los explantes en el medio de cultivo.

Se evaluó la formación de tejido calogénico (TC) en porcentaje, esto se refiere a que a partir del 100% del explante qué porcentaje es cubierto por TC. El tamaño del TC se refiere al tamaño en centímetros que alcanza el TC para la cual se estableció la siguiente categoría: Grande $\geq 1.5\text{cm}$, Mediano 1.0-1.5cm y Pequeño 0.5-1.0cm (Figura 4)

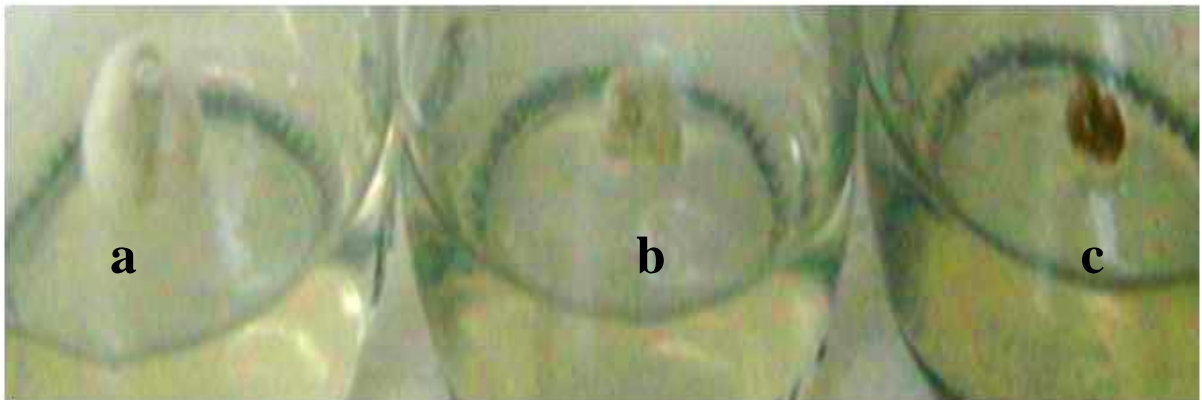


Figura 4. Tamaño de tejido calogénico (cm) en explantes embrionarios con 100% de formación de callo. a) Grande $\geq 1.5\text{cm}$; b) Mediano 1.0-1.5cm; c) Pequeño 0.5-1.0cm.

Las hormonas a evaluar fueron Bencil Aminopurina (BAP) y Kinetina (Furfurilamino purina), ambas a una concentración de 1mg/L. Los cotiledones e hipocotiledones utilizados en la siembra fueron extraídos de embriones maduros (Figura 5). Los embriones utilizados en la siembra se encontraban aún en desarrollo.

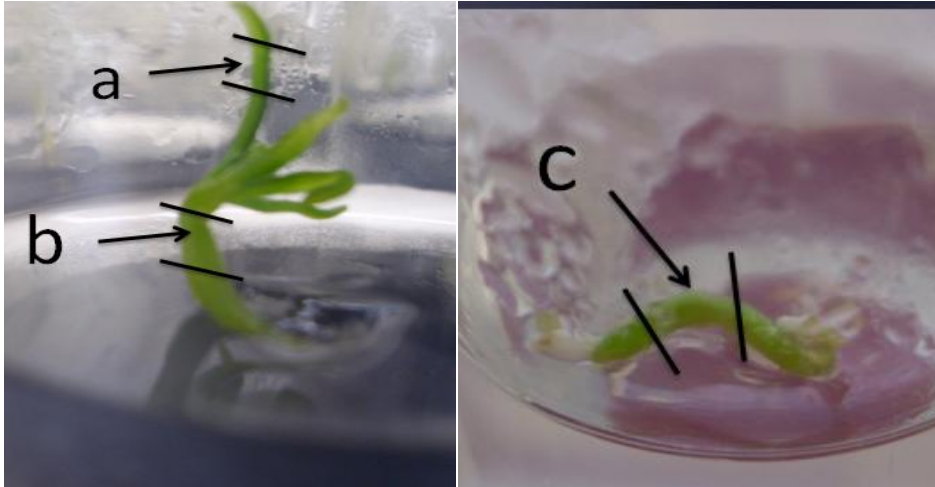


Figura 5. Explantes utilizados para la inducción de tejido calogénico en *Abies guatemalensis*. a) Explantes cotiledonares; b) Explante hipocotiledonar; c) Explante embrionario.

Diseño experimental y análisis estadístico. En este experimento se evaluó el efecto de la Kinetina y BAP ambos a una concentración de 0.1mg/L en *in vitro*-explantes hipocotiledonares, cotiledonares y embriones cigóticos maduros, en medios Murashige y Skoog con el 50% de Macroelementos (1/2 MS) y Woody Plant Medium (Cuadro 2). Haciendo un total de 12 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, y 10 unidades experimentales por repetición para un total de 360 unidades experimentales.

Para este estudio se utilizó un Arreglo Factorial con un Diseño Completo al Azar (DCA) realizado utilizando el programa Minitab[®] y una diferencia de medias utilizando el método Duncan realizado con el programa Statistical Analysis System (SAS[®] 2009). Utilizando doce tratamientos, tres repeticiones y diez unidades experimentales por repetición, para un total de 360 unidades experimentales.

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo Woody Plant Medium (1981) utilizado en la inducción *in vitro* de tejido callogénico de *Abies guatemalensis*.

	Compuesto	Medio de cultivo (mg/L)
MACROELEMENTOS		
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	96.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170.000
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado	556.000
K ₂ SO ₄	Sulfato potásico	990.000
MICROELEMENTOS		
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.2.00
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso monohidratado	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato cúprico pentahidratado	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Na ₂ .EDTA	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético	37.300
ORGÁNICOS		
Inositol		100.000
Tiamina		1.000
Acido Nicotínico		0.500
Piridoxina		0.500
Sacarosa		20000.000
Agar		6000.000

Fuente: Kyte y Kleyn 1996.

Toma de datos y variables evaluadas. En el proceso de formación de TC se midieron el porcentaje de formación de TC (≤ 25 , 50, ≥ 75 % del total de la superficie del explante cubierta por TC) y el tamaño en centímetros del TC (Pequeño 0.5-1.0, Mediano 1.0-1.5, Grande ≥ 1.5) (Figura 4). Los datos fueron tomados 30 días después de la siembra de explantes.

Categorización Tamaño y Porcentaje de formación de tejido callogénico (TC). Para facilitar el análisis del desarrollo del TC se agrupó de forma en la que se tomaron en cuenta las dos principales características deseadas. Se agruparon los TC en una categoría numérica en una escala de 1 al 9, en la cual 1 fue asignado a los explantes con menor tamaño y un bajo porcentaje de formación de TC y 9 fue asignado a los explantes con mayor tamaño y mayor porcentaje de formación de TC (Cuadro 3).

Cuadro 3. Categorización del tamaño y porcentaje de tejido callogénico del área total del explante.

Categoría	Tamaño	Formación de TC (%)
1		≤ 25
2	Pequeño (0.5 - 1 cm)	50
3		≥ 75
4		≤ 25
5	Mediano (1 - 1.5 cm)	50
6		≥ 75
7		≤ 25
8	Grande (> 1.5 cm)	50
9		≥ 75

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1 Evaluación de procedimientos de desinfección de semilla de *Abies guatemalensis* (Pinabete): Experimento 1A. En este experimento no se encontró un procedimiento de desinfección efectivo debido a que todas las unidades experimentales con bajas concentraciones de NaClO de los tres tratamientos presentaron contaminación bacteriana y fungosa, esto puede ser debido a la dureza que la testa presenta o debido a la presencia de estos microorganismos presentes en las bolsas de resina.

Experimento 1B. Debido a que no se obtuvieron respuestas positivas en el experimento 1A, se evaluó concentraciones más elevadas de NaClO en el experimento 1B, en el cuál tampoco se encontraron diferencias significativas debido a una contaminación similar a las presentadas en 1A en todas las unidades experimentales de los tres tratamientos.

Experimento 1C. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de 10% ($\% \text{ } ^v/v$) presentó los mejores resultados (Cuadro 4). El hecho de que a mayores concentraciones del agente desinfectante no cumple su función debido a que los microorganismos infecciosos colonizan el medio de cultivo poco después de la desinfección, no existe una diferencia significativa entre los tratamientos a 20 y 30% ($\% \text{ } ^v/v$), estos resultados difieren lo que Alvarez *et al.* (2008) encontró, sus resultados demuestran que el H_2O_2 a una concentración de 3% ($\% \text{ } ^v/v$) en agitación por 24 horas, fue el mejor tratamiento para desinfectar semilla de *Abies religiosa*. Los peróxidos ejercen su actividad antimicrobiana al oxidar los componentes celulares de los microbios tratados (Gerard *et al.* 2007).

Cuadro 4. Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el porcentaje de contaminación del medio de cultivo.

Concentración de H_2O_2 ($\% \text{ } ^v/v$)	Contaminación (%)
10	0.28 ^{aλ}
30	0.71 ^b
20	0.76 ^b

λ Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos, letras diferentes denotan diferencia significativa.

Experimento 2 Evaluación de la concentración de microelementos y carbón activado en el medio basal Murashige y Skoog (MS) (Kyte y Kleyn 1996) para la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *Abies guatemalensis*. El uso de carbón activado en el medio de cultivo no presenta ningún efecto en el crecimiento de los embriones independientemente de la concentración de microelementos en el medio de cultivo. Tampoco se observó oxidación en los embriones establecidos en los tratamientos sin la presencia de carbón activado. Únicamente se encuentra una diferencia en el crecimiento de los embriones cuando se modifica la concentración de microelementos presentes en el medio de cultivo. La interacción de microelementos y carbón activado tampoco presenta una diferencia significativa (Cuadro 5)

Cuadro 5. Efecto de los microelementos y carbón activado en el crecimiento de embriones de *Abies guatemalensis*.

Tratamiento evaluado	Probabilidad prueba F
Microelementos	0.0120
Carbón activado	0.7680
Microelementos × Carbón activado	0.1450

Según Razdan (2002) la técnica de cultivo de embriones cigóticos es también muy usada para la búsqueda de condiciones físicas y nutricionales requeridas para el desarrollo embrionario, contrarrestando la latencia de la semilla con la finalidad de acortar el ciclo de las plántulas, determinando la viabilidad de la semilla y obtener micro-clones del material fuente. Según Roca y Mroginski (1991) el cultivo de embriones cigóticos se ha usado para diferentes propósitos, como son estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el experimento evaluado debido a que se comprueba que los embriones reaccionan de forma adecuada al establecimiento *in vitro*.

Los microelementos en el medio basal cumplen un papel fundamental en el desarrollo embrionario pese a las reservas que los embriones contengan, por tal motivo la ausencia de microelementos en el medio se refleja en una reducción drástica del desarrollo de los embriones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la concentración de microelementos en el crecimiento de embriones de *Abies guatemalensis*.

Microelementos	Crecimiento (cm)
5x	0.96 ^{aλ}
1x	0.85 ^a
0x	0.55 ^b

λ Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos. $P \geq 0.05$

Experimento 3 Efecto de la Kinetina y BAP en medios basales de Murashige y Skoog (MS) (1962) y Woody Plant Medium (WPM) (1981) para la inducción de callogénesis en *in vitro*-explantes cotiledonares, hipocotiledonares y embriones cigóticos. El medio basal Murashige y Skoog (MS) posee una mayor cantidad de macroelementos con sales que poseen mayores concentraciones de nitrógeno en solución comparado con el medio basal Woody Plant Medium (WPM) según su formulación, esto debido a que WPM fue elaborado para plantas leñosas y MS para plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Los tratamientos hormona, explante y la interacción entre el medio de cultivo y la hormona fueron los únicos que presentaron diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de formación de tejido callogénico (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto del medio basal de cultivo, el tipo de regulador de crecimiento, el tipo de explante y sus interacciones en el porcentaje de formación de tejido callogénico en *Abies guatemalensis*.

Tratamiento evaluado	Probabilidad Prueba F
Medio	0.8410
Hormona	0.0190
Explante	0.0001
Medio × hormona	0.0770
Medio × explante	0.0430
Hormona × explante	0.8090
Medio × hormona x explante	0.1210

El BAP presentó los mejores resultados en cuanto a porcentaje de formación de TC al obtener una media del 63% estando por sobre la media de Kinetina la cual fue 56% (Cuadro 8). Estos resultados son similares a los encontrados por Ramírez (2003) quien encontró mejor respuesta en la formación de tejido callogénico con la utilización de 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de BAP. Según Roca y Mroginski (1991) se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un tejido callogénico embriogénico y se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el tejido callogénico.

Cuadro 8. Efecto de las hormonas en el porcentaje de formación de tejido callogénico en *Abies guatemalensis*.

Hormona	Formación (%)
BAP	63.19 ^{a λ}
Kinetina	56.85 ^b

λ Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos, letras diferentes denotan diferencia significativa, $P \geq 0.05$

La interacción que presentó diferencias fue el medio de cultivo con el explante. Aunque los resultados se ven más influenciados principalmente por el explante, presentando mejores resultados los explantes embrionarios. Y en el caso de los embriones cigóticos y los cotiledones el medio WPM presentó mejores resultados, pero en ambos casos no hay diferencia estadística con el MS. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de la relación entre el medio de cultivo y el explante utilizado en el porcentaje de formación de tejido callogénico en *Abies guatemalensis*.

Medio × Explante	Porcentaje de tejido callogénico
WPM × Embrión	89.47 ^{aλ}
MS × Embrión	86.86 ^a
MS × Hipocotiledón	69.49 ^b
WPM × Hipocotiledón	61.00 ^b
WPM × Cotiledón	31.25 ^c
MS × Cotiledón	23.95 ^c

λ Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos, letras diferentes denotan diferencia significativa, $P \geq 0.05$.

Evaluando el tamaño de tejido callogénico a través diferencias de medias entre las cuales se observa que únicamente el explante es el tratamiento que presenta diferencias significativas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del medio de cultivo, regulador de crecimiento, tipo de explante y sus relaciones en el tamaño de tejido callogénico en *Abies guatemalensis*.

Tratamiento evaluado	Probabilidad Prueba F
Medio	0.1130
Hormona	0.1860
Explante	0.0001
Medio × hormona	0.2240
Medio × explante	0.3670
Hormona × explante	0.2400
Medio × hormona x explante	0.5590

Los explantes son los únicos que afectan el tamaño del TC. Según Roca y Mroginski (1991) los explantes comúnmente usados para promover la regeneración de coníferas deberán ser ricos en almidón, como cotiledones, hipocotilos y embriones. Según Abdelnour y Vincent (1994) las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citocininas. Estas intervienen en la división celular, formación de brotes y raíces.

Roca y Mroginski (1991) reportan que los explantes más comunes en coníferas para la inducción de tejido callogénico han sido los embriones cigóticos, partes de plántulas, los cotiledones y los hipocotilos provenientes de semillas germinadas *in vitro* y que el regulador de crecimiento clave en la formación de brotes es la Kinetina.

Debido a que los explantes presentan diferencia significativa para el tamaño del TC y porcentaje de formación del TC, se analizan diferencias de medias entre las cuales se observa que el embrión es el mejor explante para el porcentaje de formación y tamaño del explante (Cuadro 11)

Cuadro 11. Efecto de explantes en el porcentaje de formación y tamaño del tejido callogénico en *Abies guatemalensis*.

Explante	Medias	
	Formación de callo (%)	Tamaño (cm)
Embrión	88.14 ^a	2.65 ^{aλ}
Hipocotilo	65.21 ^b	1.66 ^b
Cotiledón	27.60 ^c	1.14 ^c

λ Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos, letras diferentes denotan diferencia significativa, $P \geq 0.05$.

Los embriones cigóticos son los que mejor respuesta presentaron en cuanto a tamaño y porcentaje de formación de tejido callogénico obteniendo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de los explantes. Estos resultados difieren de Roca y Mroginski (1991) quienes encontraron que los explantes cotiledonares responden mejor que los explantes hipocotiledonares a la formación de TC, usando la interacción de hormonas 2,4-D, Kinetina y BAP.

Ramírez (2003) determinó en *Abies guatemalensis* que 2 mg/l de ácido 2,4-Diclorofonoxiacético más 1 mg/L de Bencil Aminopurina, es la mejor combinación hormonal para la proliferación de callo. Encontraron que las condiciones de obscuridad y semioscuridad, favorecen la formación de embriones somáticos, no se encontró diferencia en los tipos de azúcar evaluados pero sí encontró diferente respuesta en la formación de embriones somáticos en ácido abscísico.

Se observó que la interacción entre el medio basal de cultivo, el tipo de hormona y el tipo de explante presentan una diferencia significativa. En la cual se observa que los embriones y el uso de BAP siempre se encuentran con los mejores índices categóricos (7 y 8) lo que denota un mejor desempeño comparado con los otros tratamientos (Cuadro 12)

Cuadro 12. Efecto del medio de cultivo, reguladores de crecimiento y explante utilizados, en la interacción tamaño × porcentaje de formación de tejido calogénico en *Abies guatemalensis*.

Medio basal	Hormona	Explante	Categoría Tamaño x Formación de callo (%)
Murashige y Skoog	BAP	hipocotiledón	4.8 ^{cλ}
		cotiledón	1.6 ^e
		embrión	8.1 ^a
	Kinetina	hipocotiledón	5.3 ^c
		cotiledón	1.6 ^e
		embrión	7.0 ^b
Woody Plant Medium	BAP	hipocotiledón	3.0 ^d
		cotiledón	1.8 ^d
		embrión	8.1 ^a
	Kinetina	hipocotiledón	3.9 ^d
		cotiledón	2.0 ^e
		embrión	7.9 ^a

λ Letras iguales indican que no hay diferencia entre tratamientos, letras diferentes denotan diferencia significativa, $P \geq 0.05$.

4. CONCLUSIONES

- Para establecer el cultivo *in vitro* de semillas y embriones cigóticos de *Abies guatemalensis* el mejor tratamiento de desinfección utiliza el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10% (v/v) durante 24 horas de inmersión, reduciendo las cantidades de hongos y bacterias en el medio de cultivo. Los tratamientos a base de NaClO no presentaron resultados en la desinfección de la semilla que se utilizó. La presencia o ausencia de carbón activado en el medio de cultivo no presenta diferencia alguna ya que los explantes no presentaron oxidación por fenoles.
- El medio basal Murashige y Skoog con un incremento de cinco veces (5x) y la concentración total (1x) de la concentración total de microelementos presentes refleja los mejores desarrollos embrionarios.
- El regulador de crecimiento que presenta los mejores resultados en formación de tejido calogénico es el BAP.
- Los embriones son los mejores explantes a utilizar para la inducción de tejido calogénico puesto que gran cantidad del tejido del explante reacciona a la inducción, presentando un desarrollo de tejido calogénico favorable para la multiplicación o inducción a embriogénesis u organogénesis.
- Los medios de cultivo Murashige y Skoog y Woody Plant Medium utilizados para la etapa de inducción de tejido calogénico no presentan una diferencia estadísticamente significativa en los resultados de formación de tejido calogénico.

5. RECOMENDACIONES

- Para el establecimiento aséptico de embriones cigóticos se deberá utilizar el proceso de desinfección basado en la utilización de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puesto que presenta buenos resultados en la desinfección de semillas.
- Posterior a la desinfección con H_2O_2 al 10% (v/v) durante 24 horas de inmersión, se recomienda enjuagar con alcohol al 95% para diluir y eliminar la resina de la semilla la cual se considera es una fuente de contaminación.
- Realizar pruebas con explantes provenientes de plantas maduras, tales como meristemos apicales y segmentos nodales.
- Evaluar el efecto de la oscuridad, sobre la formación y crecimiento de tejido callogénico.
- Continuar con la siguiente etapa del experimento induciendo a embriogénesis somática u organogénesis.

6. LITERATURA CITADA

Abdelnour, A. y J. Vincent. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Costa Rica. 38 p.

Alvarez, J., J. Rodríguez y J. García. 2008. Desinfección y selección de inóculo *in vitro* de *Abies religiosa*. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, enero-junio, vol. 14, No 001, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. p. 11-14.

Conap. 2012. Estrategia para la conservación de pinabete *Abies guatemalensis* en Guatemala (en línea). Consultado el 8 julio 2012. Disponible en <http://www.conap.gob.gt/conap-central/direccion-tecnica/manejo-forestal/pinabete-1>

Cordero, J. y D.H. Boshier. 2003. Árboles de Centro América, un manual para extensionistas. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Costa Rica. 315 pp.

Gerard, J., R. Berdell y L. Crhistine. 2007. Introducción a la microbiología Médica Panamericana, 9^{na} ed. Buenos Aires: 205 pp

Kyte, L. y J. Kleyn. 1996. Plants from test tubes. Third Edition. Timber press. Portland, Oregon. 240 p.

Lopez, M. 1996. Zonificación geográfica y determinación de fuentes de semilleras de pinabete (*Abies guatemalensis*) en la Sierra de los cuchumatanes Huehuetenango. P. 18-23.

Minitab. 1979. Statistical and Process Management Software.

Ramírez, A. 2003. Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de pinabete (*Abies guatemalensis*) Redher. Laboratorio de biotecnología, ICTA. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Quetzaltenango, Guatemala. 30 p.

Roca, W. y L. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (eds.). Cali, Colombia. 969 p.

Razdan, M.K. 2002. Introduction to plan tissue culture. 2 ed. Enfield, New hampshire. Science Publishers (eds) 128 pp

SAS[®]. 2009. Statistical Analysis System version 9.1. The SAS Institute, Cary, USA.

Salazar, R. y C. Soihet. 2000. Manejo de semillas de 100 Especies forestales de América Latina. Danida Forest Seed Centre. Manual Técnico/CATIE. Ed. 41. 109 p.

7. ANEXOS

1. Composición de los medios de cultivo: Murashige y Skoog (1962) y Woody Plant Medium (1981) utilizados en la inducción *in vitro* de tejido callogénico de *Abies guatemalensis*.

Compuesto	Medio de cultivo (mg/L)		
	Murashige y Skoog	Woody Plant Medium	
KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000	
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000	400.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000	96.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000	370.000
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170.000	170.000
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado		556.000
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio		990.000
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200	6.200
MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	25.000	
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso Monohidratado		22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600	8.600
KI	Ioduro de potasio	0.830	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato cúprico pentahidratado	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025	
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27.800	27.800
Na ₂ .EDTA	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético.	37.300	37.300
Inositol		100.00	100.000
Tiamina		0.400	1.000
Acido Nicotínico		0.500	0.500
Piridoxina		0.500	0.500
Sacarosa		30000.000	20000.000
Phytigel		1800.000	
Agar			6000.000

Fuente: Kyte y Kleyn (1996).