

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Selección y optimización del proceso del cultivo *in vitro* para desarrollo de embriones (callo) de la planta ornamental *Primula* sp.L.

Trabajo de graduación presentado

por María de los Angeles España Peña

para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2015

Selección y optimización del proceso del cultivo *in vitro* para desarrollo de embriones (callo) de la planta ornamental *Primula* sp.L.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Selección y optimización del proceso del cultivo *in vitro* para desarrollo de embriones (callo) de la planta ornamental *Primula* sp.L.

Trabajo de graduación presentado

por María de los Angeles España Peña

para optar al grado académico de Licenciada en Biología


Guatemala

2015

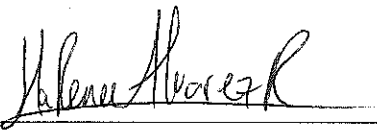
Vo. Bo.

(f) 
Lic. Margarita Palmieri

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc. Claire Dallies

(f) 
Lic. Margarita Palmieri

(f) 
Lic. María Renée Álvarez

Fecha de aprobación: Guatemala 26 de febrero de 2015.

PREFACIO

Habiendo finalizado mis prácticas profesionales en el año 2013, el proyecto inició como una forma de contribuir al trabajo que se realiza en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos. La labor de mis prácticas profesionales me enseñó muchas de las destrezas necesarias para trabajar en el área de cultivo de tejidos y a la vez me llenó de curiosidad por el campo de la propagación *in vitro*.

A principios del año 2014 se hizo tangible este proyecto, que inició como una idea de contribuir al desarrollo de pequeñas plántulas que fuese posible llevar desde el laboratorio al invernadero y así proveer una nueva fuente de ingresos para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, por medio de su venta. Se esperaba también poder incrementar la posibilidad de trabajar con *Primula* sp. en Guatemala, debido a su alta demanda en Europa y su potencial dentro de la industria farmacéutica. Sin embargo, por motivos de tiempo, llevar el cultivo de *Primula* sp. hasta plántulas crecidas y listas para su venta, no fue posible.

Por tanto, se decidió encontrar un protocolo de cultivo y desinfección que pudiese ser replicado y utilizado dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, para futuros investigadores y potenciales trabajos de tesis que continúen con la línea de trabajo establecida con el presente proyecto.

Así, quiero agradecer a todas aquellas personas que significativamente contribuyeron con el desarrollo de esta investigación:

A mi familia y compañero, por su apoyo y constantes ánimos durante mi desarrollo profesional. Sin ustedes nada de esto sería posible.

A mis compañeros de estudio, por su amistad y acompañamiento durante este viaje.

A la licenciada Margarita Palmieri, por su inmenso apoyo, paciencia y contribución a mi conocimiento hasta la última fase de mi carrera profesional.

A la licenciada María Renée Álvarez, por su extraordinario apoyo y guía. Mi más sincero agradecimiento.

A MSc. Claire Dailles, por su apoyo y ayuda en la conclusión del presente trabajo de graduación.

A las licenciadas Gabriela Palomo y Annelisse Balsells de Martini, por su cooperación y guía en el proceso de análisis de datos.

A Miguel Morales y Regina Zaghi, por su amistad. Por compartir sonrisas y lágrimas, por su paciencia, ayuda, guía e incontables muestras de aprecio.

A la Dirección de Protección Vegetal del Centro de Estudios Agrícolas y Forestales de la Universidad del Valle de Guatemala y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO.....	v
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. ANTECEDENTES.....	2
1.DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y PROPIEDADES	
AGRONÓMICAS DE <i>PRIMULA</i> SP.....	2
2. TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS: CULTIVO <i>IN VITRO</i>	4
a. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN.....	4
b. ANTIBIÓTICOS.....	5

c. MEDIOS DE CULTIVO Y REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	6
d. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	7
e. FORMACIÓN DE CALLO.....	9
3. ESTUDIOS PREVIOS.....	10
4. COSTOS DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Primula</i> sp.....	11
II. JUSTIFICACIÓN.....	13
III. OBJETIVOS.....	15
A. GENERAL.....	15
B. ESPECÍFICOS.....	15
IV. HIPÓTESIS.....	16
V. MÉTODOS.....	17
A. PROCEDIMIENTOS.....	17
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
a. PRUEBA PRELIMINAR.....	18
b. ESTABLECIMIENTO DE TRATAMIENTOS.....	18
2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y <i>STOCKS</i>	19

3. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN.....	20
4. MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	21
VI. RESULTADOS.....	22
A. PRUEBAS PRELIMINARES.....	22
B. CONTAMINACIÓN.....	23
C. FORMACIÓN DE CALLOS.....	27
VII. DISCUSIÓN.....	34
A. PRUEBAS PRELIMINARES.....	34
B. CONTAMINACIÓN.....	35
C. FORMACIÓN DE CALLOS.....	36
VIII. CONCLUSIONES.....	39
IX. RECOMENDACIONES.....	40
X. LITERATURA CITADA	41
XI. ANEXOS.....	45
XII. GLOSARIO	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tratamientos finales, realizados con el medio de cultivo elegido (MS)	19
2. Número de explantes de hojas y raíces sembrados.....	21
3. Observación de explantes contaminados en los tratamientos en un período de ocho semanas.....	23
4. Análisis Kruskal-Wallis para contaminación de hojas y raíces. Chi cuadrado (X^2), valores P y estimación del tamaño de efecto por tratamiento(s).....	24
5. Análisis Chi cuadrado (X^2) para contaminación de hojas y raíces entre tres factores: antibiótico (presencia – ausencia), estructura vegetal (hojas y raíces) y concentración de hormonas (alta o baja). Valores P por tratamiento(s).....	27
6. Observación de obtención de callos en los tratamientos en un período de ocho semanas.....	30
7. Análisis Kruskal-Wallis para formación de callo en hojas y raíces. Chi cuadrado (X^2), valores P y estimación del tamaño de efecto por tratamiento(s).....	31
8. Análisis Chi cuadrado (X^2) para contaminación de hojas y raíces entre tres factores: antibiótico (presencia – ausencia), estructura vegetal (hojas y raíces) y concentración de hormonas (alta o baja). Valores P por tratamiento(s).....	33
9. Preparación de medios de cultivo Murashige y Skoog (1962).....	47

10. Presupuesto estimado para cultivo <i>in vitro</i> de <i>Primula</i> sp. en un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala.....	48
11. Estimación de gastos de compra de <i>Primula</i> sp. en Guatemala y el extranjero.....	49
12. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T1BH+ y T1BR+.....	50
13. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T2BH- y T2BR-.....	54
14. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T3AH+ y T3AR+.....	58
15. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T4AH- y T4AR-.....	62
16. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T1BH+ y T1BR+.....	66
17. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T2BH- y T2BR-.....	69
18. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T3AH+ y T3AR+.....	72
19. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T4AH- y T4AR-.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ejemplares del género <i>Primula</i>	1
2. Tallo engrosado subterráneo o cormo, presente en el género <i>Primula</i>	2
3. Distribución poblacional del género <i>Primula</i>	3
4. Embriogénesis somática para el cultivo de zanahoria (Zimmerman 1993).....	7
5. Etapas de la embriogénesis somática (Dodds y Roberts 1985).....	8
6. Respuesta de crecimiento de un callo típico (Dodds y Roberts 1985).....	10
7. Esquema de metodología completa a utilizar en el proceso de formación de callos a partir de explantes de <i>Primula</i> sp	17
8. Rotulación de caja Petri, previo a su almacenamiento	21
9. Contaminación observada en hojas y raíces.....	22
10. Contaminación por bacteria, observada en explantes de hoja.....	23
11. Histograma de cantidad de explantes de hoja contaminados, en cuatro tratamientos. N=48.....	25
12. Histograma de cantidad de explantes de raíz contaminados, en cuatro tratamientos. N=48.....	26
13. Observaciones de formación de callo en explantes de hoja.....	28

14. Observaciones de formación de callo en explantes de raíz.....	29
15. Histograma de cantidad de explantes de hoja contaminados, en cuatro tratamientos. N=48.....	31
16. Histograma de cantidad de explantes de raíz contaminados, en cuatro tratamientos. N=48.....	32

RESUMEN

Alrededor del mundo, el uso de diversas plantas con fines ornamentales y medicinales, como *Primula* sp., es alto. Sin embargo, sus poblaciones disminuyen y cada día sus componentes químicos son más valorados comercialmente y por la industria farmacéutica, dada la eficacia de los medicamentos que se llevan a cabo con ellos. Dicho declive poblacional determina cultivo *in vitro* de *Primula* sp. más necesario y urgente. Por ello, se llevó a cabo un estudio preliminar que contempló seis medios de cultivo MS (Murashige y Skoog) con cinco hormonas de crecimiento (BA, 2,4-D, kinetina, IAA y ANA) durante ocho semanas. La etapa preliminar concluyó que las hormonas 6-benzil amino purina (BA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) son las que muestran mejores resultados en desarrollo de callos de *Primula* sp. en explantes de hojas y raíces. El estudio también reveló altas frecuencias de contaminación por una bacteria endófito (gram positiva). Con base en el estudio preliminar, se decidió trabajar con dos concentraciones de las hormonas (1 ppm BA + 0.25 ppm 2,4-D y 2 ppm BA + 1 ppm 2,4-D), y con la presencia o ausencia del antibiótico gentamicina. Los resultados mostraron que el protocolo de desinfección sugerido es efectivo para el desarrollo de callo de *Primula* sp. en hojas, más no en raíces. Los tratamientos con concentraciones bajas, 1 ppm (BA) + 0.25 ppm (2,4-D) sin antibiótico, y altas, 2 ppm (BA) + 1 ppm (2,4-D) con antibiótico, mostraron las mejores respuestas para el desarrollo de callo de *Primula* sp., resultando en un total de 24 explantes de hoja con formación de callo (n=192) y 5 en explantes de raíz (n=192), en un período de ocho semanas. De acuerdo a los resultados, el antibiótico gentamicina contribuye al desarrollo de callo en explantes de hoja (18 contaminados, n=192) más no en raíces, con total de 117 explantes de raíz contaminados (n=192), en un período de ocho semanas.

ABSTRACT

Around the world, the use of various plants for ornamental and medicinal purposes, such as *Primula* sp., is high. However, their populations are declining and every day their chemical components are valued commercially and by the pharmaceutical industry, give the efficacy of drugs that are created with them. This population decline determined *in vitro* culture of *Primula* sp. necessary and urgent. Therefore, I carried out a preliminary study which included six medium of MS (Murashige and Skoog) with five growth regulators or hormones (BA, 2,4-D, kinetin, IAA and NAA) for eight weeks. The preliminary stage concluded that hormones with 6-benzyl amino purine (BA) and 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) show better results in the development of callus in *Primula* sp. explants of leaves and roots. The study also revealed high frequencies of contamination by endophytic bacteria (gram positive). Based on the preliminary study, it was decided to work with two concentrations of hormones (1 ppm BA + 0.25 ppm 2,4-D and 2 ppm BA + 1 ppm 2,4-D), and in the presence or absence of the antibiotic gentamicin. Results showed that the disinfection protocol is effective in leaves, but not in roots. Treatments with low concentrations of hormones, (BA) + 0.25 ppm (2,4-D) without antibiotic, and high, 2 ppm (BA) + 1 ppm (2,4-D) with antibiotic, showed the best results for callus formation in *Primula* sp., resulting in a total of 24 leaf explants with callus formation (n=192) and 5 in root explants (n=192), over a period of eight weeks. According to the results, the antibiotic gentamicin helps develop callus from leaf explants (18 contaminated, n=192) but not in roots with 117 total contaminated root explants (n=192), over a period of eight weeks.

I. INTRODUCCIÓN

La planta ornamental *Primula* sp. ha sido ampliamente utilizada alrededor del mundo, tanto por sus cualidades decorativas, como curativas. Durante la última década se ha reportado gran decrecimiento poblacional en especies del género *Primula*, como *P. cuneifolia* var. *hakusanensis*, *P. veris* y *P. scotica*, oficialmente reportadas (Benson *et al.* 2000 y Glover *et al.* 1995). Si bien sus cualidades ornamentales pueden ser reemplazadas, el valor medicinal de las saponinas, glucósidos y flavonoides que poseen no lo es. De acuerdo con la industria farmacéutica, las raíces y flores pueden contener hasta 2% de los compuestos más utilizados en el desarrollo de expectorantes y diuréticos (Hamidoghli *et al.* 2011 y Naroozi *et al.* 2011); tales cantidades son difícilmente extraídas de otras estructuras vegetales. Además, se debe tomar en cuenta que por la disminución de poblaciones silvestres del género, se han reducido también las investigaciones que revelarían el valor neto de todas las estructuras vegetales de plantas *Primula* sp.

Como país en desarrollo, Guatemala no ha sobresalido en el estudio de plantas exóticas y sus propiedades, dejando un nicho de investigación sin explotar. Los resultados del trabajo con *Primula* sp. podrían dar paso a nuevos descubrimientos que contribuyan al crecimiento de la industria farmacéutica, así como de la agricultura. Nuevas técnicas en cultivo de tejidos podrían brindar a Guatemala un futuro en ciencias que van más allá del desarrollo de callos *in vitro*, pero este es en definitiva el primer paso.

FIGURA 1. Ejemplares del género *Primula*.



(Fuente: Peterson 2014)

A. Antecedentes

1. Descripción botánica y propiedades agronómicas de *Primula* sp.

Primulaceae constituye una familia de plantas angiospermas, con 102 géneros, formalmente aceptados. El número de especies es discutido, ya que la taxonomía botánica aún se debate en la temática. Los informes muestran hasta 8,136 plantas registradas dentro de la familia Primulaceae, sin embargo, únicamente 2,788 son especies formalmente aceptadas (The Plant List 2014). Se distribuyen ampliamente en regiones templadas, en su mayoría, en el hemisferio norte aunque una minoría de especies se localiza en climas cálidos (ej. *Primula veris* L.) (The Plant List 2014).

Primulaceae se caracteriza por poseer órganos de almacenaje, permitiéndoles soportar temperaturas muy bajas. Ejemplos de ello se muestran en el cormo (tallo engrosado subterráneo) del género *Cyclamen* sp.o en las raíces, con pelos absorbentes y engrosadas de *Primula* sp.en donde se localiza una yema latente. En su mayoría, Primulaceae posee hojas opuestas con tricomas, que cubren de igual forma los tallos. Las flores, generalmente, poseen cinco pétalos y se ubican en forma de racimos (Watson y Dallwitz 1992).

FIGURA 2. Tallo engrosado subterráneo o cormo, presente en el género *Primula*.

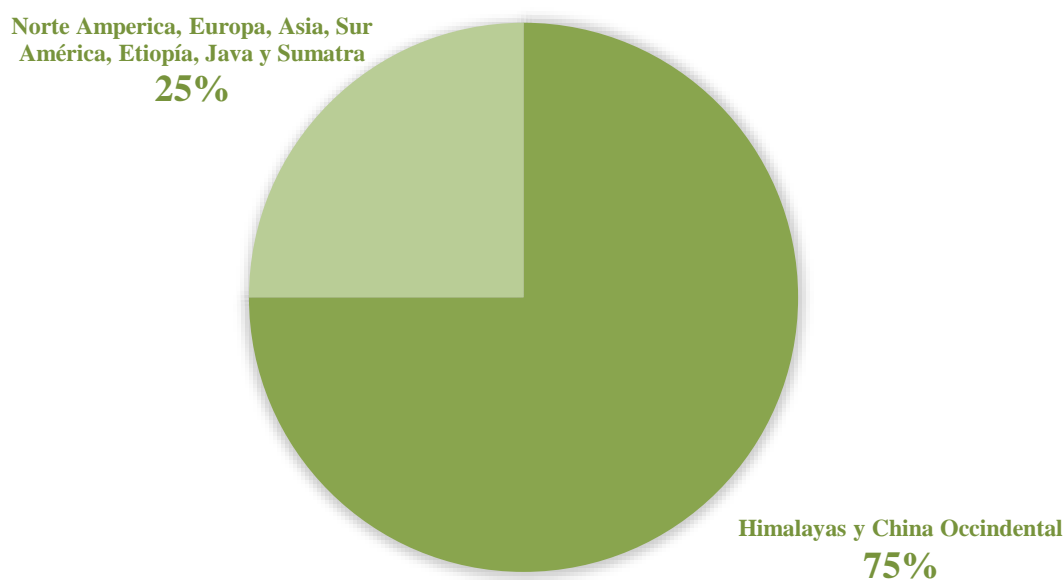


(Fuente: Peterson 2014)

El género *Primula* sp.contiene cerca de 425 especies, la mayoría, comúnmente conocidas como “prímula” o “primavera” en idioma español y “primrose”, en idioma

inglés. De éstas, 75% se localiza en la cadena de montañas del Himalaya y China occidental. El 25% restante puede encontrarse en Norte América, Europa, Asia, Sur América, Etiopía, Java y Sumatra (Figura 3). Sin embargo, mucho de las especies del género *Primula* sp. aún no es comprendido, por ello, diversos métodos de conservación han sido de gran utilidad para obtener muestras de los especímenes y estudiarlos (Mast *et. al* 2001).

FIGURA 3. Distribución poblacional del género *Primula*.



(Fuente: Mast *et. al* 2001)

Alrededor del mundo, *Primula* sp. es cultivada con usos mayormente ornamentales y decorativos (plantas de jardín, arreglos florales y como relleno para ropa de cama). Con dichos fines, se le cultiva en sombra, con suelos de 18 centímetros, a temperaturas de entre 10 – 15°C. El tiempo estimado de cosecha es de siete a nueve meses. Las semillas se colocan en suelos con pH de entre 5.8 y 6.2, fertilizante (100 – 150 ppm de nitrógeno nítrico), arcilla (15-30%), hierro-quelato y micronutrientes (Anónimo 2014). Muchas especies de *Primula* sp. son cultivadas en regiones como las Islas Británicas (Islas del Canal, Islas Sorlingas Islas Órcadas, Islas Shetland e Islas Hébridas), Escocia (Glover y Abbott 1995), Serbia (Macukanovic *et al.* 2010) y China (reportado en las provincias de Jilin, Liaoning, Hebei, Shandong y Jianguo) (Deng *et al.* 2001).

El cultivo de *Primula* sp. supone ciertos problemas dada su naturaleza silvestre. En el campo, *Primula* sp. crece como colonizador primario y explota rápidamente parches de suelo (pequeños céspedes). Ello ha generado mecanismos evolutivos que colocan a las semillas en estado de dormancia si las condiciones de crecimiento no son óptimas. Debido a esto se dificulta la habilidad para controlar la densidad de determinado cultivo, ya que sin importar el número de semillas que se planten, no se garantiza la germinación de todas. Así, se genera un segundo problema en el cultivo de *Primula* sp. dado que al no germinar todas las semillas, se corre el riesgo del establecimiento de malezas, al combinarse los individuos que no germinaron con aquellos de nuevos cultivos luego de las cosechas. Un tercer problema se desencadena debido a que *Primula* sp. es una planta bianual, por lo que su cultivo requiere altos cuidados y la aplicación de tratamientos constantes que agilicen su crecimiento, causando altos costos en fertilizantes, estimulantes químicos y mano de obra (Lapinskas 1982).

2. Técnicas de cultivo de tejidos: cultivo *in vitro*. El cultivo de tejidos vegetales es una ciencia en desarrollo, que constituye el crecimiento de células vegetales u órganos, asiladas de una planta madre y posteriormente desarrolladas en un medio artificial. Para poder propagar determinada planta, pueden utilizarse diversos tejidos de la misma: brotes o yemas, raíces, nódulos, meristemos, hojas, semillas, flores, regeneración por embriogénesis, organogénesis, entre otros (George *et al.* 2007).

Con dichos fines, un laboratorio de cultivo de tejidos debe tener espacio para las diversas funciones que dentro del mismo se llevan a cabo. El laboratorio debe cumplir con funciones asépticas (lavado y esterilización de cristalería), preparación de medios, incubación de los cultivos y cualquier otra área especializada para el cultivo de determinada especie vegetal (Dodds y Roberts 1985).

a. Métodos de desinfección y esterilización. En cuanto a técnicas asépticas, un ambiente correctamente desinfectado y/o estéril es quizás el factor más importante en cultivo de tejidos. Para ello, el uso de campanas de flujo (laminar), autoclaves, instrumentos de flameo, lámparas UV, lámparas germicidas, el uso de antibióticos y un correcto y adecuado lavado de manos son esenciales. A ello, se añaden los protocolos de desinfección y esterilización que se aplican a los cultivos vegetales antes de o durante su cultivo *in vitro* (Benson *et al.* 2000; Bressani 1994; Cerabolini *et al.* 2004; Naroozi *et al.* 2011; Dodds y Roberts 1981; George *et al.* 2007; Hamidoghli *et al.* 2011; Morozowska y Wesolowska 2004; Shimada *et al.* 1997).

Para *Primula* sp. Hamidoghli (2011) sugiere un protocolo para la esterilización de semillas, a base de etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sodio (NaOCl) concentrado al 2% con dos gotas de Tween 20 por 20 minutos y tres lavados con agua estéril (sin tiempos específicos). En el mismo año, Naroozi (2011) propone el mismo protocolo de esterilización para semillas, aunque éste no establece claramente la concentración del NaOCl.

Shimada (1997) también utilizó un protocolo de esterilización de semillas de *Primula* sp. utilizando una solución de NaOCl 3% por 15 minutos y tres lavados de agua estéril (tiempos no definidos). Benson (2000) propuso una esterilización de semillas a base de una solución de hipoclorito Domestos® 10% por cinco minutos y tres lavados de agua estéril (sin tiempos definidos). A su vez, Cerabolini *et al.* (2004) sugieren un protocolo similar, aunque utilizando únicamente hipoclorito de sodio 4% con Tween (no especificado) por 10 minutos y tres lavados con agua estéril (sin tiempos definidos). Morozowska (2004) propone dos protocolos para esterilización de semillas: (1) etanol 70% por 30 segundos, cloro comercial 30% con tres gotas de Tween 80 por 25-30 minutos y lavados con agua estéril; (2) etanol 70% por 30 segundos, cloruro de mercurio (HgCl₂) 0.1% por siete minutos y lavados con agua estéril. El protocolo no es recomendado pues el cloruro de mercurio es altamente volátil a temperatura ambiente y se han registrado casos de envenenamiento en trabajadores de laboratorio (Dodds y Roberts 1985).

Por su parte, Schween (2003) propuso un protocolo de esterilización para pétalos de flores *Primula* sp. que incluye etanol 70% por 30 segundos, nitrato de plata con Tween 20 por tres minutos y tres lavados de agua estéril (sin tiempos definidos).

Debido a la escasez en investigación sobre *Primula* sp. no fue posible encontrar registros de protocolos específicos de desinfección para hojas o raíces.

b. Antibióticos. A pesar de la actual abundancia en métodos de desinfección y esterilización, ciertos cultivos vegetales presentan más retos que otros. Uno de ellos es la contaminación por agentes patógenos como bacterias u hongos. Uno de los métodos utilizados para contrarrestar dicho problema es el uso de agentes antibióticos. En el cultivo de tejidos animales, su uso es amplio y variado. Sin embargo, en el mundo vegetal, a pesar de ser usuales, los antibióticos no son recomendables, pues suponen resultados impredecibles, como posibles mutaciones genéticas en los cultivos *in vitro* (los antibióticos y sus productos luego de su degradación pueden ser metabolizados por tejidos vegetales) y su uso no garantiza la eliminación de todos los agentes patógenos que puedan afectar determinado cultivo (Dodds y Roberts 1985).

Uno de los antibióticos mayormente utilizados es el sulfato de gentamicina por su eficacia en eliminar ciertos agentes patógenos en diversos cultivos animales y vegetales (Rudin *et al.* 1970). Sin embargo, ha mostrado la capacidad de inhibir procesos de xilogénesis (desarrollo de médula o corteza) en lechugay tubérculos de alcachofa en concentraciones de entre 50-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, mismas que son altamente recomendadas por los fabricantes del antibiótico (Dodds y Roberts 1981). La gentamicina también ha probado inhibir la capacidad de desarrollo de callo en tabaco e iniciación de brotes en el mismo (Dodds y Roberts 1985).

La concentración adecuada de gentamicina para su uso en cultivo de tejidos vegetales no ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, se ha comprobado que un medio de cultivo con una concentración 3ppm de sulfato de gentamicina bloquea completamente la replicación del virus del mosaico de tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) en protoplastos.

c. Medios de cultivo y reguladores de crecimiento. La elección de cualquier medio de cultivo depende casi exclusivamente del tejido u órgano que desea cultivarse. El punto inicial en la mayoría de casos es un medio MS (Murashige y Skoog 1962), altamente utilizado en el cultivo de diversos tejidos, pues posee relativamente una alta concentración de nitrato, potasio e iones de amonio, en comparación con otros medios de cultivo; todos favorables para técnicas de cultivo de tejidos como embriogénesis. Su uso junto con la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 – D) es efectivo en la formación de callo para gran cantidad de tejidos (Dodds y Roberts 1985).

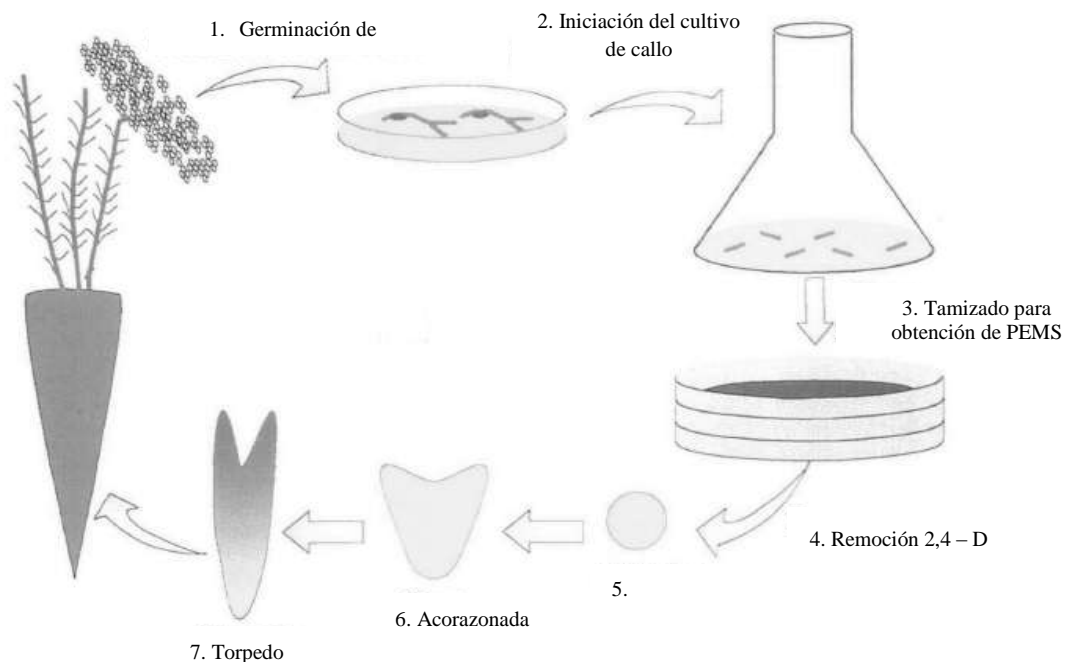
Para el cultivo de tejidos *in vitro* y el establecimiento de callos, auxinas y citoquininas son los reguladores de crecimiento mayormente necesarios. Las auxinas son compuestos que estimulan la elongación de brotes celulares, como el ácido indol acético (IAA), el 2,4 – D o el ácido naftaleneacético (ANA), auxinas altamente utilizadas. La auxina que ha mostrado mejores resultados para desarrollo de callo es el 2,4 – D, un herbicida con capacidad de inhibir la organogénesis (diferenciación celular y generación de órganos), por lo que su uso no es recomendable en experimentos que involucren iniciación de raíces ni brotes. Su uso ha sido ampliamente estudiado, con concentraciones ideales de 1 ppm para el cultivo de tejidos de zanahoria (Dodds y Roberts 1985).

Las citoquininas promueven división celular en tejidos vegetales, algunos ejemplos son la 6-benzil amino purina (BA) y la quinetina. Una combinación de suplementos auxina-citoquinina son favorables para la regulación de división celular, elongación y diferenciación celular, así como formación de órganos. Las giberlinas,

por ejemplo, contribuyen al crecimiento de cultivo de meristemos apicales (Dodds y Roberts 1985).

d. Embriogénesis somática. En 1958 Frederick Steward y colaboradores dieron a conocer una nueva técnica de cultivo de tejidos que revolucionaría todo preconcepto sobre células somáticas y su potencial como elementos no diferenciados en el mundo científico. Steward describió cómo sus estudios con zanahoria habían mostrado la posibilidad de desarrollar nuevas plántulas a partir de células somáticas (toda célula en un organismo que no incluye las germinales o embrionarias) de una planta madre. Los embriones somáticos pueden ser inducidos a través de la manipulación de las condiciones de cultivo, como se muestra en la Figura 1 (Zimmerman 1993).

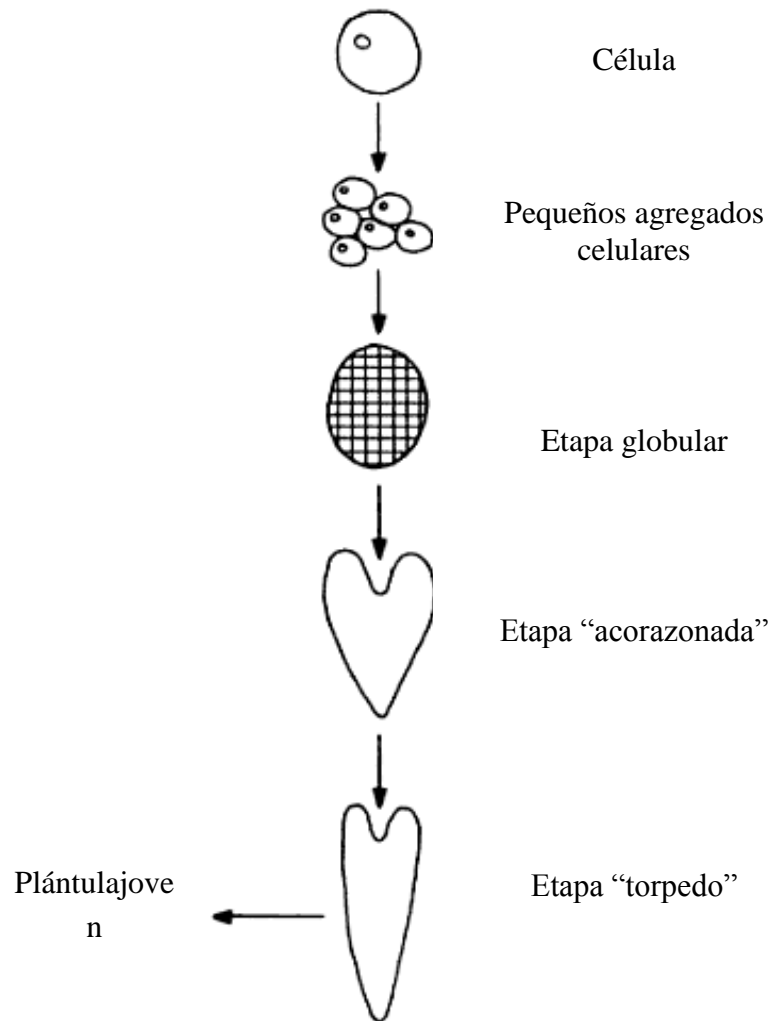
FIGURA 4. Embriogénesis somática para el cultivo de zanahoria.



(Fuente: Zimmerman 1993)

Debe controlarse la germinación de semillas, seguida por la iniciación de cultivo de callo, un tamizado para obtención de masas pro-embriogénicas (PEMs), se remueve la hormona en cuestión, 2,4 - D en este caso y prosiguen las etapas subsiguientes de formación del embrión (etapas 5 -7) (Zimmerman 1993).

FIGURA 5. Etapas de la embriogénesis somática.



(Fuente: Dodds y Roberts 1985)

La primera etapa de la embriogénesis somática constituye la inducción de una sola célula (embriode), que posee gran cantidad de contenido citoplasmático y un núcleo relativamente grande, además de una alta concentración de proteínas y ácido ribonucleico (ARN). Cada embriode atraviesa cuatro etapas para la formación del embrión, detalladas en la Figura 2. Luego de varias divisiones celulares, los agregados

celulares progresan hasta pasar por las etapas globular, acorazonada y de torpedo, hasta convertirse en plántulas (Dodds y Roberts 1985).

Las etapas de embriogénesis somática usualmente requieren diversos medios de cultivo para prosperar. Durante la primera etapa (inducción) se requiere un medio con auxinas y altas cantidades de nitrógeno reducido. Para la segunda etapa requiere de un medio con una mezcla de la misma auxina en menor concentración o con niveles reducidos de una combinación de diferentes auxinas. Sin embargo, para algunas especies vegetales las condiciones de las etapas de inducción y subsecuentes pueden ocurrir en un mismo medio, utilizando un segundo medio únicamente para el desarrollo de la plántula (Dodds y Roberts 1985).

El rol de las citoquininas en embriogénesis somática ha sido ampliamente debatido y es aún un rincón oscuro en el estudio embriogénesis. La zeatina (citoquinina exógena), por ejemplo, es capaz de estimular el crecimiento celular en zanahoria, sin embargo, al añadirse quinolina o benzilaminopurina (auxinas), esta capacidad se ve altamente inhibida. Dicho efecto inhibitorio de las citoquininas exógenas puede ser resultado de un incremento de citoquininas endógenas durante el desarrollo del embrión (Dodds y Roberts 1985).

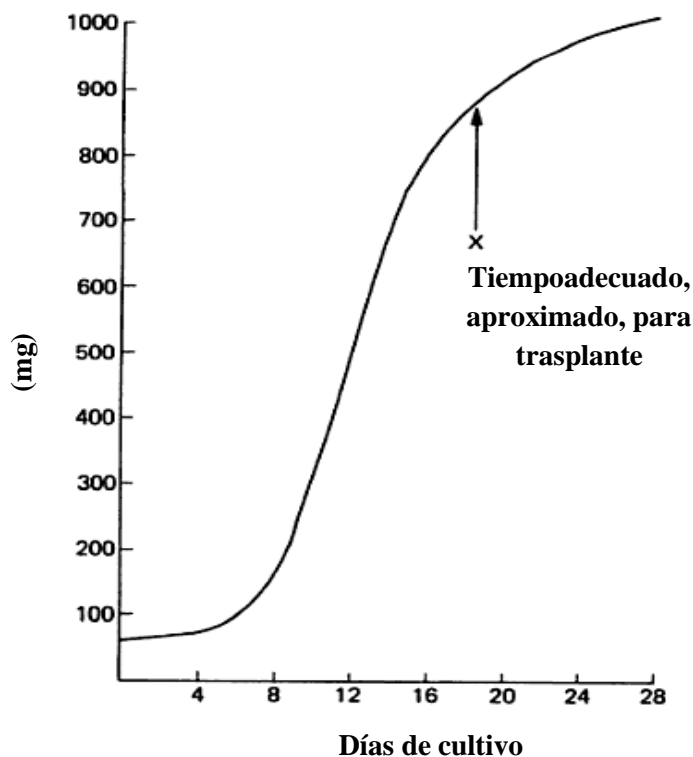
La embriogénesis somática es, en general, una técnica relativamente rápida, pues la mayoría de los cultivos estudiados se han desarrollado en períodos cortos de tiempo. En zanahoria, la formación de embriones inicia a las cuatro o seis semanas desde el aislamiento de tejido y se consigue un crecimiento óptimo tras 15 semanas. Sin embargo, se han registrado cultivos con tiempos de formación de callo o crecimiento óptimo de hasta años tras el aislamiento del tejido (Dodds y Roberts 1985).

e. Formación de callo. Un callo consiste en células de parénquima que surgen del tejido “madre” y se localizan dentro de una masa amorfa. Dichas células tienen la capacidad de formar tejidos normales que derivan de la planta madre, desde raíces, brotes y embrioides que pueden formar una nueva plántula completa. El establecimiento de un callo, con en el proceso de embriogénesis, se basa en tres etapas: inducción, división celular y diferenciación. La primera fase es quizás la más larga, en comparación con la división celular y la diferenciación, pues depende de la especie utilizada, el explante y el medio de cultivo. A su vez, la diferenciación celular puede ocurrir en forma de elementos cribosos (componentes del floema), células suberizadas (con apariencia de corcho), células secretoras y tricomas. Un callo establecido puede poseer coloración amarillenta, blanca o verde (Dodds y Roberts 1985).

Luego de su establecimiento, el callo debe pasar a un nuevo medio de cultivo, fresco, de manera que pueda proliferar. Para ello, es necesario transferir el callo con un tamaño adecuado, pues una sección del mismo demasiado pequeña proliferará de manera lenta o no lo hará en absoluto. El tamaño recomendado es entre 5 – 10 mm de diámetro, con un peso de entre 20 y 100 mg (Dodds y Roberts 1985).

El momento en el que el callo debe trasplantarse a un nuevo medio puede variar de acuerdo al cultivo específico. La respuesta de un callo cultivado se observa como una curva de crecimiento exponencial y ésta misma puede contribuir al reconocimiento del tiempo indicado para el trasplante, como se observa en la Figura 3 (Dodds y Roberts 1985).

FIGURA 6. Respuesta de crecimiento de un callo típico.



(Fuente: Dodds y Roberts 1985)

3. Estudios previos. El tejido de cultivos ha sido una herramienta con diversas aplicaciones como: uso de productos naturales para la industria farmacéutica y su desarrollo, programas de conservación (germoplasma, clones, entre otros), mejoramiento genético de cultivos y su micropropagación. Estudios han sido llevados a cabo en Guatemala, como el realizado por Bressani (1994), en donde se utilizó la

técnica de cultivo de tejidos para la micropropagación de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana*.

Se han observado diversas estructuras modelo para *Primula* sp. y su micropropagación, dentro de éstas: semillas (Naroozi *et. al* 2011; Rosselló y Mayol 2002; Benson *et. al* 2000), brotes y yemas (Morozowska y Wesolowska 2004), pétalos y botones de flor (Schween y Schwenkel 2003), hojas (Shimada *et. al* 1997). Además, se ha encontrado un incremento en la calidad fenotípica de plantas desarrolladas bajo la influencia de hormonas de crecimiento. Benson *et. al* (2000) realizó experimentos con *P. scotica* en donde se aplicaron medios MS (Murashige y Skoog 1962) suplementados con 6-benzil amino purina (BAP o BA, por sus siglas en inglés) y ácido indol acético (IAA, por sus siglas en inglés). También se han utilizado hormonas como: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 – D, por sus siglas en inglés), ácido 1 – naftaleneacético (NAA, por sus siglas en inglés) y kinetina (KIN, por sus siglas en inglés). También, se ha encontrado que el uso de diversos agentes gelificantes (Gelrite, Agar, entre otros) pueden influenciar la calidad de las plantas.

Una problemática frecuente en los experimentos realizados es la contaminación que surge dentro de los cultivos, muchas veces ocasionado por bacterias u hongos con cepas dentro del tejido vascular (xilema y floema) de la planta misma (Agrios 2012). Diversos agentes antibióticos pueden ser utilizados, de acuerdo a la naturaleza de la fuente de infección. De acuerdo con Rudinet. *al* (1970), la gentamicina es uno de los antibióticos mayormente utilizados, dada su eficacia contra bacterias gram positivas, gram negativas y agentes fúngicos.

4. Costos del cultivo *in vitro* de *Primula* sp. Los estimados para el costo del establecimiento y mantenimiento de un Laboratorio de Cultivo de Tejidos se muestran en el Anexo 3. De acuerdo a los precios obtenidos para 2014, cualquier investigación que esté dirigida a la producción de cultivos *in vitro* de *Primula* sp. requerirá de un presupuesto aproximado de Q278, 086.49 (Anexo3).

La cantidad monetaria del establecimiento y mantenimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos enfocado en el cultivo *in vitro* de *Primula* sp. es alta, sin embargo, los costos estimados para la obtención de una plántula crecida de *Primula* sp. en otro laboratorio es aún mayor. De acuerdo con los precios estimados que se observan en el Anexo 4, la obtención de un solo paquete de semillas de *Primula* sp. tiene un costo aproximado de entre Q14.16 y Q69.75, de acuerdo con la especie y al centro de compra (datos recabados tras consultas en sitios de internet diversos y llamadas telefónicas a proveedores de viveros en Guatemala). Los costos de una plántula desarrollada *in vitro* no son abiertamente publicados, por lo que se presumen altos; las

plántulas son obtenidas únicamente tras su pedido especial, que debe ser respaldado por una institución formal, dentro del país que lo requiera.

En Guatemala, existen dos únicas formas para adquirir *Primula* sp., la primera y más común es su compra en viveros (plántulas en tierra), aunque, su venta no es alta por lo que los viveros que la ofrecen son escasos. Las plántulas se cotizan entre Q25.00 y Q30.00. La segunda opción es la compra de semillas. Ello es menos factible, ya que son escasos los centros de venta y aun localizándolos, las semillas se venden únicamente al por mayor.

II. JUSTIFICACIÓN

Durante las últimas décadas se ha registrado un decrecimiento en poblaciones silvestres y/o endémicas de *Primula* sp. arriesgando diversas especies. El pastoreo e inviernos severos han causado que especies como *Primula heterocroma* no alcancen madurez vegetativa ni su período reproductivo, con altas tasas de mortalidad (Naroozi *et. al* 2011; Hamidoghli *et. al* 2011). Especies como *P. cuneifolia* var. *hakusanensis*, *P. veris* y *P. scotica* han mostrado los mismos patrones de decrecimiento poblacional (Shimada *et. al* 1997; Morozowska y Wesolowska 2004; Benson *et. al* 2000), por lo que el actual estado del género *Primula* sp. es considerado de riesgo alto para la supervivencia de gran cantidad de sus especies, por lo que es importante su conservación.

En Centro América, la biotecnología de cultivo de tejidos ha tenido gran avance en el área agrícola, con la aplicación de técnicas *in vitro* para cultivos como café (*Coffea arabica*) o conservación de germoplasma (Dufour 1996). Sin embargo, las técnicas de cultivo de tejidos no han rebasado los límites de la agricultura, sin posibilidades de utilizar plantas ornamentales, como *Primula* sp., para su producción en masa. Su uso podría beneficiar a diversos sectores poblacionales con ingresos monetarios que aumenten sus ganancias, así como la manutención de muestras para estudios farmacológicos en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Se ha observado que diversas especies de *Primula* sp. poseen saponinas, glucósidos y flavonoides con valor medicinal. *Primula veris* es una especie actualmente protegida por leyes de Polonia, donde se distribuye como planta silvestre y para la cual la industria farmacéutica debe obtener permisos legales previos a su uso.

Las raíces y rizomas son de gran interés, dado su contenido (10%) de saponinas de triterpeno: primulasaponina A y primulasaponina B, así como primulaverosida y primverosida; ambos glucósidos fenólicos. Las raíces se utilizan como expectorante en infecciones de garganta, faringe y bronquios. De igual manera, las flores pueden contener hasta 2% saponinas de triterpeno, glucósidos fenolíticos y flavonoddes (3',4', 5'-trimetoxiflavona, quercetin y sus derivados). Dichos compuestos son utilizados como expectorante y diurético. Una combinación de dichas estructuras vegetales y sus compuestos químicos ha logrado la creación de medicamentos como “Bronchicum”, “Pectosol”, “Tussipect” y “Sinupret” (Morozowska y Wesolowska 2004). Dichos medicamentos son altamente cotizados, por lo que el valor del género *Primula* sp. con sus diversas especies aumenta drásticamente, al evaluar lo que tienen que ofrecer para la industria farmacéutica.

En Guatemala no existe un método de desarrollo de callo establecido, o incluso de propagación de *Primula* sp. Considerando su alto potencial medicinal, industrial y de conservación es imperativa la creación de una técnica que provea embriones de *Primula* sp. como base para un posible y futuro desarrollo de plántulas en masa para su venta local (como planta ornamental o para uso medicinal) y posible exportación con fines de conservación.

III. OBJETIVOS

I. General

Evaluar medios de cultivo para el desarrollo de callo para *Primula* sp. a partir de explantes de raíces y hojas.

II. Específicos

1. Sugerir un protocolo de desinfección efectivo para la formación de callo de *Primula* sp.
2. Establecer callos *in vitro* a partir de explantes de hojas y raíces de *Primula* sp.
3. Comparar dos concentraciones de hormonas BA y 2,4-D en medio MS, concentración baja (1 ppm BA + 0.25 ppm 2,4 – D) y concentración alta (2 ppm BA + 1 ppm 2,4 – D).
4. Evaluar el efecto del antibiótico gentamicina en la prevención de contaminación en explantes de hojas y raíces de *Primula* sp. para formar callo.

IV. HIPÓTESIS

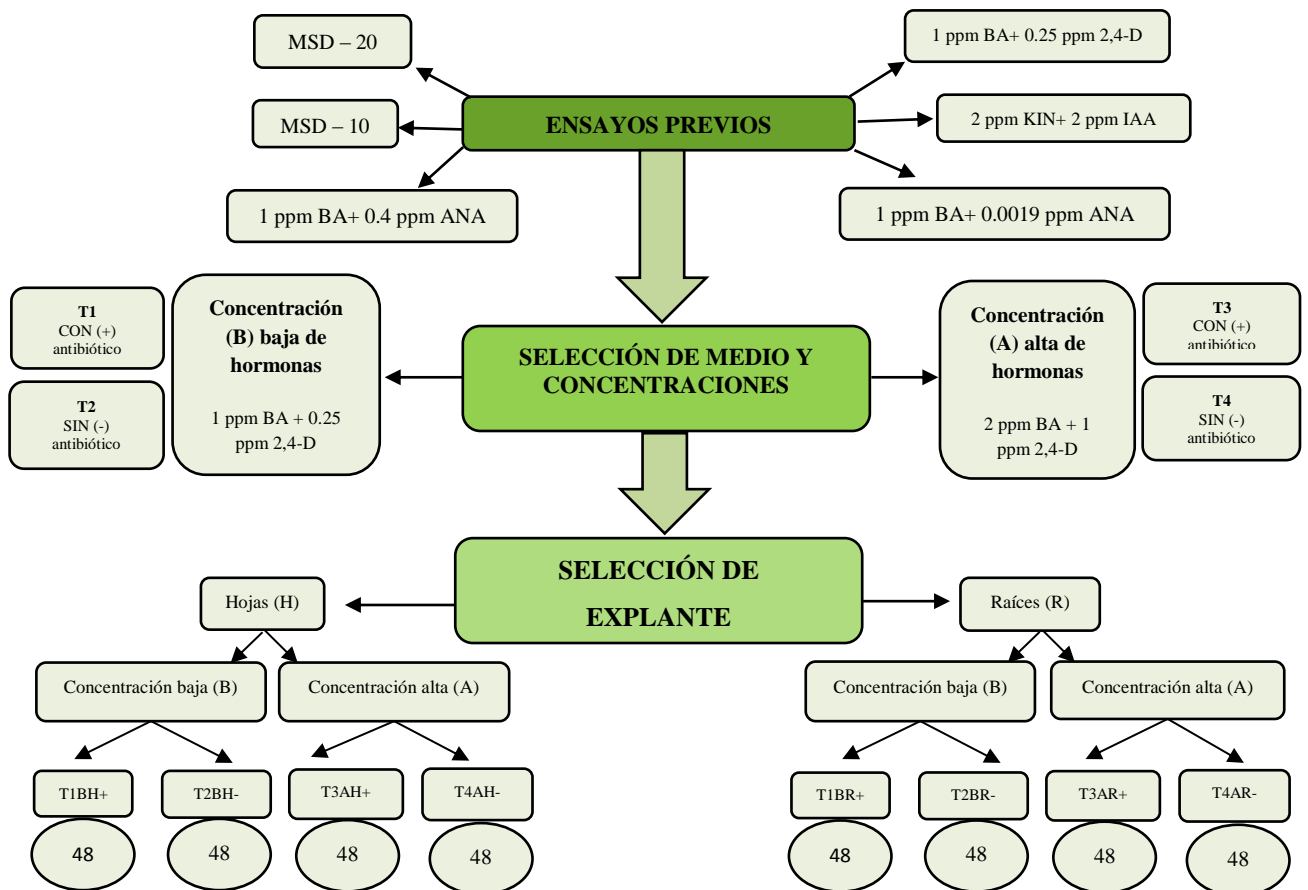
1. El medio de cultivo MS con concentración BA [2 ppm] + 2,4 – D [1 ppm] y antibiótico (gentamicina) producirá mayor número de callos.
2. El medio de cultivo MS a concentraciones altas, producirá mayor número de callos.
3. El medio de cultivo con antibiótico producirá mayor número de callos y menor cantidad de explantes de hojas y raíces contaminados.
4. Los explantes de hojas producirán mayor número de callos que los de raíces.

V. MÉTODOS

A. Procedimientos

1. Diseño experimental. Para la obtención de callos a partir de explantes de *Primula* sp. el proceso consistió en tres etapas: ensayos previos, la selección del medio y sus concentraciones, así como la selección de explante a utilizar.

FIGURA 7. Esquema de metodología completa a utilizar en el proceso de formación de callos a partir de explantes de *Primula* sp.



*[+] = con antibiótico.

*[-] = sin antibiótico.

*N=48 (explantes de hojas y raíces), por tratamiento.

La Figura 4 muestra la etapa de “ensayos previos”, con seis medios de cultivo diferentes, que contribuyeron a la elección de los tratamientos finales, detallados en la etapa de “selección de medio y concentraciones.”

Los tratamientos con las concentraciones elegidas durante dicha etapa se denominaron “baja” o “alta”, con sus respectivas abreviaturas T1 (tratamiento con concentración baja con antibiótico), T2 (tratamiento con concentración baja sin antibiótico), T3 (tratamiento con concentración alta con antibiótico) y T4 (tratamiento con concentración baja sin antibiótico) (cuadro 1 en Establecimiento de tratamientos).

Finalmente, la etapa de “selección de explante” condujo al uso de hojas y raíces, a concentraciones de hormonas, altas y bajas. Así mismo, dichas concentraciones se evaluaron ante la presencia (símbolo [+]) en figura 4) y ausencia (símbolo [-]) en figura 4) del antibiótico gentamicina. Se muestran los 48 explantes, por tratamiento (N=48), evaluados ante la formación de callo, durante un período de ocho semanas.

a. Prueba preliminar. Para lograr alcanzar los objetivos propuestos, se llevó a cabo una prueba preliminar de seis tratamientos iniciales con sus respectivas hormonas, detallados en la Figura 4. Por medio de observaciones cualitativas (se produjo callo/no se produjo callo), se eligió el medio que mostró capacidad de formación de callo en un período de ocho semanas. Así mismo, se eligieron dos estructuras vegetales para los explantes: hoja y raíz.

Durante la prueba preliminar también se evaluaron, cualitativamente, dos protocolos de desinfección. El primero inició con un baño de agua corriente por una hora. En campana de flujo, cada tejido fue trasladado a un vaso de precipitado de 250 ml, con alcohol etílico al 70% por un minuto, luego, se trasladaron a un segundo vaso de precipitado de 250 ml con cloro comercial (NaOCl 5-6%) concentrado al 30% y cuatro gotas de Tween 20, agitando manualmente por 30 minutos. Finalmente, se llevaron a cabo tres lavados con agua estéril, por 15 minutos, cada uno.

El segundo protocolo de desinfección inició con un baño de agua corriente por una hora y media. En campana de flujo, cada tejido fue trasladado a un vaso de precipitado de 250 ml, con alcohol etílico al 70% por dos minutos, luego, se trasladaron a un segundo vaso de precipitado de 250 ml con cloro comercial (NaOCl 5-6%) concentrado al 30% y cuatro gotas de Tween 20, agitando manualmente por 40 minutos. Finalmente, se llevaron a cabo tres lavados con agua estéril, por 10 minutos, cada uno.

A partir de observaciones cualitativas sobre el tejido luego del proceso de desinfección (tejido vivo/tejido muerto), se eligió un solo protocolo de desinfección.

b. Establecimiento de tratamientos. El medio de cultivo elegido a partir de la fase de prueba preliminar (MS + 1 ppm BA + 0.25 ppm 2,4 – D) fue analizado ante la concentración de hormonas, establecida durante dicha fase, y se añadió otro

medio de cultivo, con una concentración ligeramente más alta de las mismas hormonas (MS + 2 ppm BA + 1 ppm 2,4 - D). Ambas concentraciones fueron evaluadas ante la presencia o ausencia del antibiótico Gentamicina (50 ppm), proporcionando las cuatro combinaciones de tratamientos finales (cuadro 1), que fueron utilizadas para evaluar el desarrollo de callo en hojas y raíces. Los tratamientos resultantes fueron cuatro para explantes hojas, y los mismos cuatro se aplicaron a explantes de raíces. Los tratamientos se detallan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Tratamientos finales, realizados con el medio de cultivo elegido (MS).

TRATAMIENTO		ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA VEGETAL	CÓDIGO
T1	Medio MS con concentración de hormonas baja*	Presente (+)	Hoja	T1BH+
			Raíz	T1BR+
T2	Medio MS con concentración de hormonas baja*	Ausente (-)	Hoja	T2BH-
			Raíz	T2BR-
T3	Medio MS con concentración de hormonas alta**	Presente (+)	Hoja	T3AH+
			Raíz	T3AR+
T4	Medio MS con concentración de hormonas alta**	Ausente (-)	Hoja	T4AH-
			Raíz	T4AR-

*Concentración baja = 1 ppm BA + 0.25 ppm 2,4-D

**Concentración alta = 2 ppm BA y 1 ppm 2,4-D

(+) = Tratamiento CON antibiótico

(-) = Tratamiento SIN antibiótico

Los cuatro tratamientos fueron replicados en las estructuras elegidas (hojas y raíces). Se registraron 96 cajas Petri (48 con explantes de hojas y 48 con explantes de raíces) y 384 explantes totales (192 hojas y 192 raíces).

2. Obtención de muestra y stocks. Se obtuvieron plantas madre procedentes de un vivero local en la ciudad de Guatemala. De éstas se extrajeron raíces y hojas. Las plantas fueron elegidas, en base ados criterios de descarte. El primero, aplicaba a hojas, que debían tener una edad aparente específica, utilizándose únicamente las más jóvenes. El segundo criterio aplicó a raíces, ya que únicamente se cortaron entre 2-3 centímetros, desde la punta de las raíces centrales. Las raíces debían ser centrales, con al menos 1.5-2 mm de grosor.

En el momento de corte, se tomaron en cuenta todas las plantas madre y si la estructura vegetal cumplía con el criterio de descarte, se procedía a cortar, sin importar la planta madre de la que se tratara. Las plántulas fueron almacenadas en el

invernadero de la Universidad del Valle de Guatemala a una temperatura entre 20 – 23°C.

El equipo, material y reactivos utilizados se encontraron dentro del inventario del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Protección Vegetal, del Centro de Estudios Agrícolas y de Alimentos (CEAA) de la Universidad del Valle de Guatemala. El material utilizado incluyó cajas de Petri plásticas desechables, su preparación se detalla en el Anexo 1. Se utilizaron soluciones madre de medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) y soluciones *stock* de las hormonas (descritas en la figura 4, en Diseño experimental) y antibiótico utilizados. La preparación de los medios de cultivo se detalla en el Anexo 2.

3. Protocolo de desinfección. Se extrajeron los tejidos de interés de las plantas madre en el invernadero de la Universidad del Valle de Guatemala. Para ello, se utilizaron guantes de nitrilo, cajas de Petri estériles y hojas de Gillette. Cuidadosamente, se utilizó una hoja de Gillette por tejido, por planta madre, para evitar contaminación cruzada.

Luego de extraer los tejidos, cada uno fue introducido en cajas de Petri estériles, mismas que fueron selladas, para luego trasladar los tejidos al Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Dentro del mismo, se inició la desinfección con un lavado de agua corriente, jabón y cepillo. Posteriormente, se eliminaron rastros de tierra o de tejido muerto que fuese visible.

Las plantas continuaron el proceso de baño de agua corriente por una hora. Los pasos siguientes se llevaron a cabo dentro de una campana de flujo laminar, para trabajar bajo un ambiente con menor riesgo de contaminación. En campana, cada tejido fue trasladado a un vaso de precipitado de 250 ml, con alcohol etílico al 70% por un minuto, luego, se trasladaron a un segundo vaso de precipitado de 250 ml con cloro comercial (NaOCl 5-6%) concentrado al 30% y cuatro gotas de Tween 20, agitando manualmente por 30 minutos. Finalmente, se llevaron a cabo tres lavados con agua estéril, por 15 minutos, cada uno.

Continuando en campana de flujo laminar, bajo un ambiente aséptico, se utilizaron servilletas de papel, previamente esterilizadas (autoclave), para colocar los tejidos y eliminar el exceso de agua. Con la ayuda de cajas de Petri de vidrio, pinzas, bisturí y un estereoscopio se disectaron los tejidos, hasta obtener porciones de hojas de ~0.5 cm x 0.5 cm y porciones de raíces de ~0.3 cm, que se sembraron inmediatamente en los medios de cultivo. Las cantidades totales de explantes se detallan en el Cuadro 2.

CUADRO 2. Número de explantes de hojas y raíces sembrados.

	HOJAS					RAÍCES				
	T1	T2	T3	T4	Total	T1	T2	T3	T4	Total
Número de cajas Petri	12	12	12	12	48	12	12	12	12	48
Número de explantes	48	48	48	48	192	48	48	48	48	192

T1 = Tratamiento con concentración de hormonas baja, con antibiótico.

T2 = Tratamiento con concentración de hormonas baja, sin antibiótico.

T3 = Tratamiento con concentración de hormonas alta, con antibiótico.

T4 = Tratamiento con concentración de hormonas alta, sin antibiótico.

Como se observa en el Cuadro 2, se obtuvieron 192 explantes de hojas y 192 explantes de raíces, con los que se obtuvieron los resultados del estudio. El detalle de los tratamientos se muestra en el Cuadro 1.

4. Medio y condiciones de cultivo. Seis medios de cultivo fueron realizados inicialmente. Cada medio se ajustó a un pH de 5.7 – 5.8 previo a ser esterilizado en autoclave a 121°C, durante 25 minutos.

Cada tejido fue introducido a cajas de Petri con medio sólido, inmediatamente luego de su desinfección. Los cultivos de hojas y raíces fueron almacenados en un cuarto de cultivo, a una temperatura media de ~20°C. Con el fin de almacenar los cultivos en cero luz, se colocaron bolsas de basura limpias alrededor de los estantes más bajos que contenía el laboratorio de cultivo de tejidos.

Las cajas Petri utilizadas fueron rotuladas de acuerdo a su contenido. En la parte superior se indicó la fecha de siembra, tratamiento utilizado, estructura vegetativa utilizada, nombre del investigador y número de caja Petri. En la parte inferior, se indicó una letra (A – D) que identificaba cada explante (Figura 8).

FIGURA 8. Rotulación de caja Petri, previo a su almacenamiento.

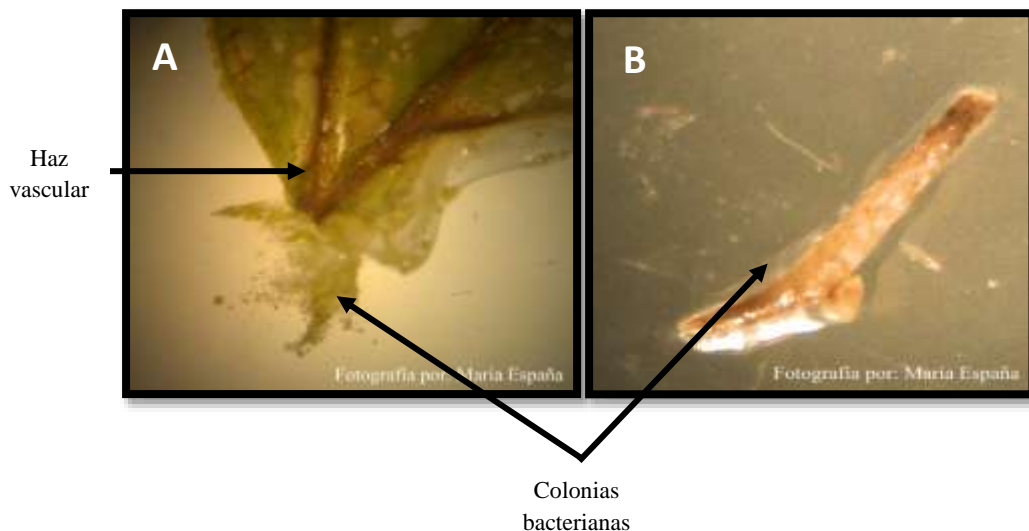
VI. RESULTADOS

A. Pruebas preliminares

Las observaciones de pruebas preliminares mostraron que el medio con hormonas BA y 2,4-D produjo crecimiento de callo exitosamente en ambas estructuras, hoja y raíz. Las cinco pruebas restantes no mostraron crecimiento alguno, además de presentar mayor cantidad de contaminación en las estructuras evaluadas. Así mismo, las raíces se observaron más propensas a contaminación que las hojas.

El contaminante mayormente observado en hojas y raíces fue bacteriano, descrito como cocos gram positivos, luego de su análisis (según pruebas llevadas a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de los laboratorios de Protección Vegetal). La figura cinco muestra los inicios de contaminación en hojas, como se observó en la mayoría de casos, incluyendo raíces. La bacteria gram positiva inicia sus colonias desde el haz vascular y se expande (Figura 9).

FIGURA 9. Contaminación observada en hojas y raíces.



La Figura 9 muestra dos fotografías de la contaminación observada en hojas y raíces. La fotografía A indica los inicios una colonización bacteriana desde la vena central del explante de hoja. La fotografía B muestra una colonia bacteriana establecida alrededor de todo el explante de raíz; se observa tejido muerto en los extremos del explante.

B. Contaminación observada en explantes de hojas y raíces de *Primula sp.*

Los resultados de contaminación para hojas y raíces se muestran en el Cuadro 3. Un ejemplo de las observaciones realizadas por contaminación en hoja se muestra en la Figura 10.

FIGURA 10. Contaminación por bacteria, observada en explantes de hoja.



La Figura 10 muestra un explante de hoja, con una colonia bacteriana establecida en su periferia. La bacteria tiene una coloración blanca y emerge desde la vena central del explante.

CUADRO 3. Observación de explantes contaminados en los tratamientos en un período de ocho semanas.

SEMANA	HOJAS				RAÍCES			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	2	0	14	8	21
3	0	1	2	4	0	15	8	23
4	0	2	2	5	1	17	10	27
5	0	2	3	6	4	19	13	29
6	0	2	3	12	6	21	15	37
7	0	3	3	12	10	26	28	39
8	0	3	3	12	14	29	33	41

T1 = Tratamiento con concentración de hormonas baja, con antibiótico.

T2 = Tratamiento con concentración de hormonas baja, sin antibiótico.

T3 = Tratamiento con concentración de hormonas alta, con antibiótico.

T4 = Tratamiento con concentración de hormonas alta, sin antibiótico.

*N=48

En cuanto a hojas, los resultados de explantes contaminados totales (remarcados en gris, Cuadro 3) mostraron un mejor resultado para los tratamientos uno, dos y tres, con cero, tres y tres explantes contaminados, respectivamente. Ello, comparado con el tratamiento cuatro que mostró 12 explantes de hojas contaminados, de 48 totales. Todos los resultados, obtenidos en un período de ocho semanas.

Para raíces, el resultado varió, pues se observó un único tratamiento con los mejores resultados, el tratamiento uno. Los datos mostraron 14 explantes de raíces contaminados, de 48 totales. Los tratamientos dos, tres y cuatro revelaron más de la mitad de explantes de raíces contaminados con 29, 33 y 41, respectivamente, de 48 totales. Todos los resultados, obtenidos en un período de ocho semanas.

CUADRO 4. Análisis Kruskal-Wallis para contaminación de hojas y raíces. Chi cuadrado (X^2), valores P y estimación del tamaño de efecto por tratamiento(s).

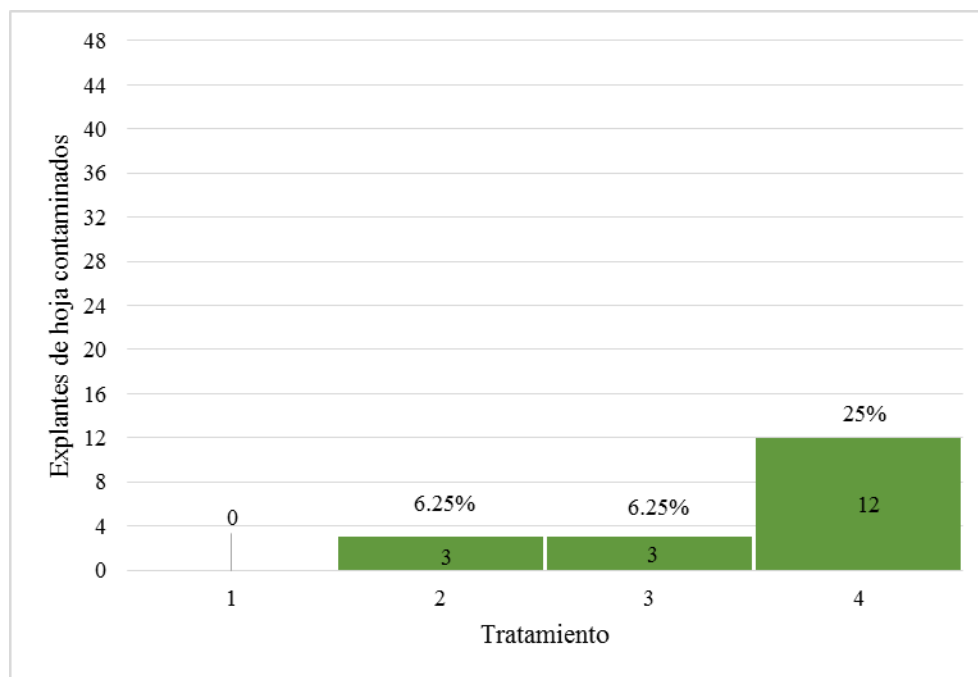
ESTRUCTURA	TRATAMIENTOS	X^2	VALOR P	α	ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE EFECTO
HOJA	1,2,3,4	8.429	0.038	0.05	36.65%
	1,2	3.286	0.07	0.05	-
	1,3	3.286	0.07	0.05	-
	1,4	7.527	0.006	0.05	32.72%
	2,3	0	1	0.05	-
	2,4	2.009	0.156	0.05	-
	3,4	2.009	0.156	0.05	-
RAÍZ	1,2,3,4	14.95	0.02	0.05	31.81%
	1,2	4.539	0.33	0.05	-
	1,3	7.092	0.008	0.05	30.80%
	1,4	11.87	0.001	0.05	51.62%
	2,3	0.332	0.565	0.05	-
	2,4	3.646	0.56	0.05	-
	3,4	2.067	0.151	0.05	-

*Los datos destacados en color verde representan aquellos que sí mostraron diferencias significativas.

La prueba Kruskal-Wallis mostró una diferencia significativa en la contaminación de hojas y raíces por tratamiento, con valores P de 0.038 y 0.02, respectivamente (Cuadro 4). En hojas, el 36.65% de la variación observada se debe a los tratamientos evaluados. Los T1 y T4 demostraron una diferencia significativa con un valor P de 0.006, representando el 32.72% de la variación encontrada.

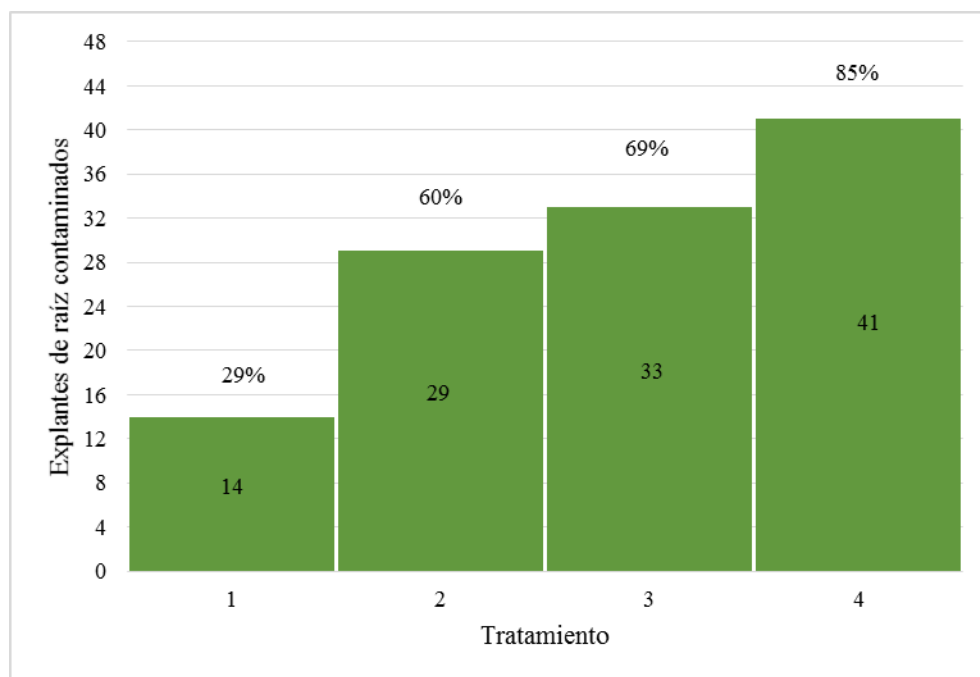
Así mismo, los tratamientos aplicados a raíces también fueron significativos al explicar la varianza, con diferencias en los T1 y T3, para los cuales el valor P es igual a 0.008, representando 30.80% de la diferencia entre tratamientos. Tal como en hojas, los T1 y T4 mostraron una diferencia significativa de 0.001, acreditándoseles el 51.62% de la variación observada. En cuanto a contaminación en hojas y raíces, los T1, T3 y T4 fueron los que mostraron mayor diferencia y explicaron de mejor manera la variación en los resultados.

FIGURA 11. Histograma de cantidad y porcentaje de explantes de hoja contaminados, en cuatro tratamientos. N = 48.



La Figura 11 muestra las diferencias entre tratamientos, previamente evaluadas en el Cuadro 4. Los T1 y T4, con diferencias significativas en la prueba Kruskal-Wallis, manifiestan un contraste de 12 explantes de hoja contaminados (T4), respecto a cero explantes de hoja contaminados (T1), de 48 totales. Así mismo, los T2 y T3 revelaron resultados similares, con hasta tres explantes de hoja contaminados, de 48 totales. La Figura 6 muestra los T1, T2 y T3, como los que obtuvieron mejores resultados respecto a contaminación de explantes de hoja.

FIGURA 12. Histograma de cantidad de explantes de raíz contaminados, en cuatro tratamientos. N = 48.



La Figura 12 explica las diferencias significativas obtenidas en la prueba Kruskal-Wallis para explantes de raíz contaminados. Se observa que ninguno de los tratamientos obtuvo resultados negativos en contaminación. Los tratamientos dos, tres y cuatro (baja concentración de hormonas sin antibiótico, alta concentración de hormonas con antibiótico y alta concentración de hormonas sin antibiótico) mostraron los resultados más altos en número de explantes de raíz contaminados, con 29, 33 y 41, respecto a 48 totales. La diferencia significativa observada en el Cuadro 4 mostró 14 explantes contaminados de 48 totales para T1, respecto a T2, T3 Y T4; una cantidad casi el doble más baja en comparación a los tratamientos dos, tres y cuatro.

Los histogramas para contaminación de hojas y raíces, detallados en las figuras 11 y 12, muestran las diferencias encontradas al evaluar valores P. En la Figura 7 se muestra una clara divergencia entre la cantidad de explantes de hojas contaminados en T1 (cero contaminación), en contraste con T4 en donde 12 explantes de hojas se contaminaron.

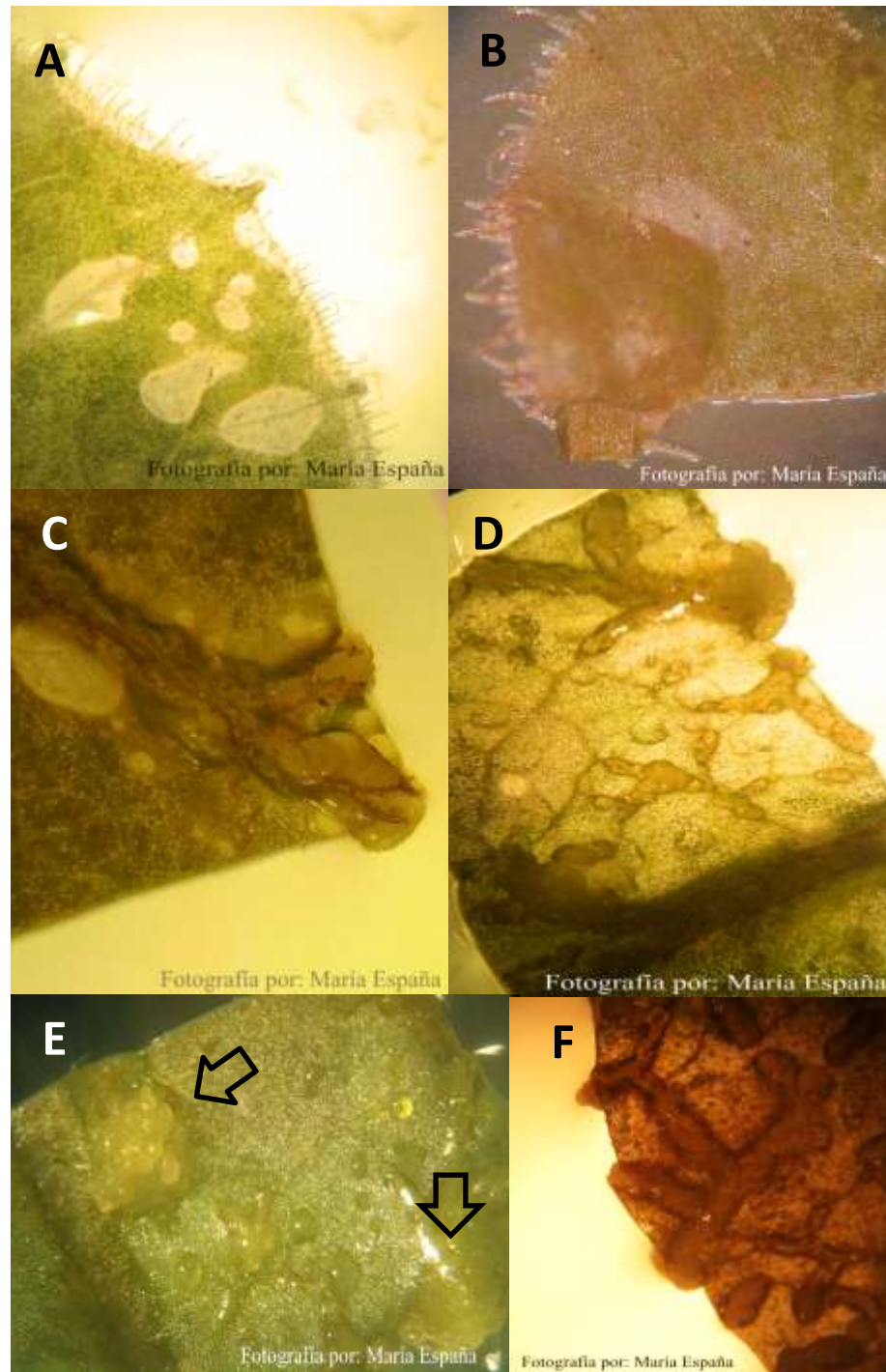
CUADRO 5. Análisis Chi cuadrado (X^2) para contaminación de hojas y raíces entre tres factores: antibiótico (presencia – ausencia), estructura vegetal (hojas y raíces) y concentración de hormonas (alta o baja). Valores P por tratamiento(s).

PRUEBA	VALOR P	CONCLUSIÓN
Antibiótico vs. No antibiótico	0.000000000000000021	Significativa
Hojas vs. Raíces	0.000000000000000000	Significativa
Concentración alta vs. Concentración baja	0.000000000000010500	Significativa

Los resultados para las pruebas entre tres factores, mostraron que tanto la presencia o ausencia de antibióticos, la estructura vegetal y la concentración de hormona son altamente significativos en cuanto a contaminación. Valores p menores a 0.05 prueban su relación con el grado de contaminación encontrado.

C. Formación de callos observada en explantes de hojas y raíces de *Primula sp.*

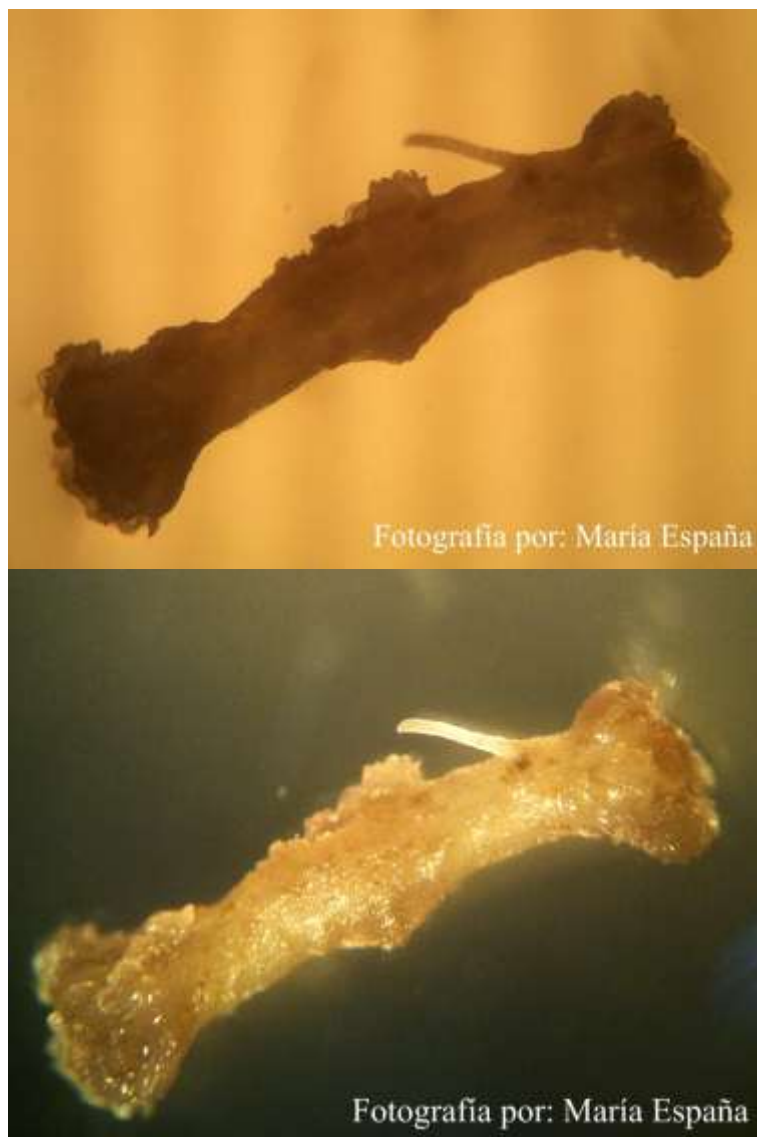
En explantes de hoja, los callos se formaron lentamente, pudiéndose observar con detalle en la Figura 13.

FIGURA 13. Observaciones de formación de callo en explantes de hoja.

En la Figura 13 se observan fotografías de la formación de callo en hojas. Dicho proceso inició por la elongación del tejido vascular (A), que luego formó pequeños bultos (B), mismos que se transformaron en pequeños callos (C y D), que con el paso

de los días adquirieron un mayor tamaño (E) y se extendieron dentro del explante (F). Todo el proceso se obtuvo en un período de 8 semanas. Un proceso similar ocurrió en la formación de callo en explantes de raíz.

FIGURA 14. Observaciones de formación de callo en explantes de raíz.



La Figura 14 muestra la misma imagen, en dos fotografías. Se observan claramente los callos surgiendo, tras un período de ocho semanas.

Los resultados respecto a formación de callos para explantes de hojas y raíces se detallan en los Cuadros 6 y 7, y en las Figuras 11 y 12.

CUADRO 6. Observación de obtención de callos en los tratamientos en un período de ocho semanas.

SEMANA	HOJAS				RAÍCES			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	10	3	2	0	0	0	2
5	0	10	6	2	0	0	0	2
6	0	12	6	3	0	0	2	2
7	0	13	6	5	0	0	3	2
8	0	13	6	5	0	0	3	2

T1 = Tratamiento con concentración de hormonas baja, con antibiótico.

T2 = Tratamiento con concentración de hormonas baja, sin antibiótico.

T3 = Tratamiento con concentración de hormonas alta, con antibiótico.

T4 = Tratamiento con concentración de hormonas alta, sin antibiótico.

*N=48

El Cuadro 6 muestra los resultados en cuanto a obtención de callos para explantes de hojas y raíces (los datos resaltados en gris muestran las cantidades finales). Para hojas, T2 obtuvo un número máximo de 13 explantes que resultaron en formación de callo. Ello, lo separa de los T1, T3 y T4, con los mejores resultados obtenidos (en un período de ocho semanas) para formación de callo en hojas. El segundo con mejores resultados fue T3, pues en un período de ocho semanas, seis de los explantes de hoja resultaron en formación de callo. Ello, respecto a 48 totales. En cuanto a T1, éste mostró resultados más bajos, ya que ningún explante de hoja resultó en formación de callo.

Se observa también que la formación de callos en explantes de raíces fue menor, comparada con la de hojas. Únicamente los T3 y T4 muestran resultados positivos para formación de callos, con tres y dos explantes de raíz, respectivamente, que resultaron en callo.

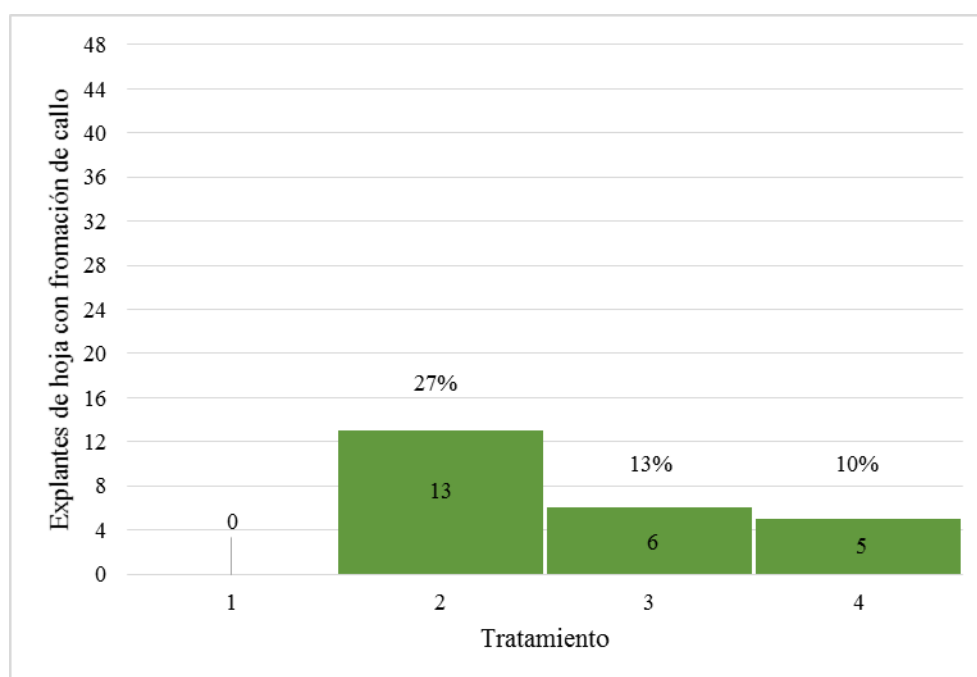
CUADRO 7. Análisis Kruskal-Wallis para formación de callo en hojas y raíces. Chi cuadrado (X^2), valores P y estimación del tamaño de efecto por tratamiento(s).

ESTRUCTURA	TRATAMIENTOS	X^2	VALOR P	α	ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE EFECTO
HOJA	1,2,3,4	8.73	0.03	0.05	37.95%
	1,2	7.493	0.006	0.05	32.57%
	1,3	6	0.014	0.05	26.08%
	1,4	3.273	0.07	0.05	-
	2,3	1.096	0.295	0.05	-
	2,4	2.063	0.151	0.05	-
	3,4	0.347	0.556	0.05	-
RAÍZ	1,2,3,4	0.529	0.467	0.05	-

*Los datos destacados en color gris representan aquellos que sí mostraron diferencias significativas.

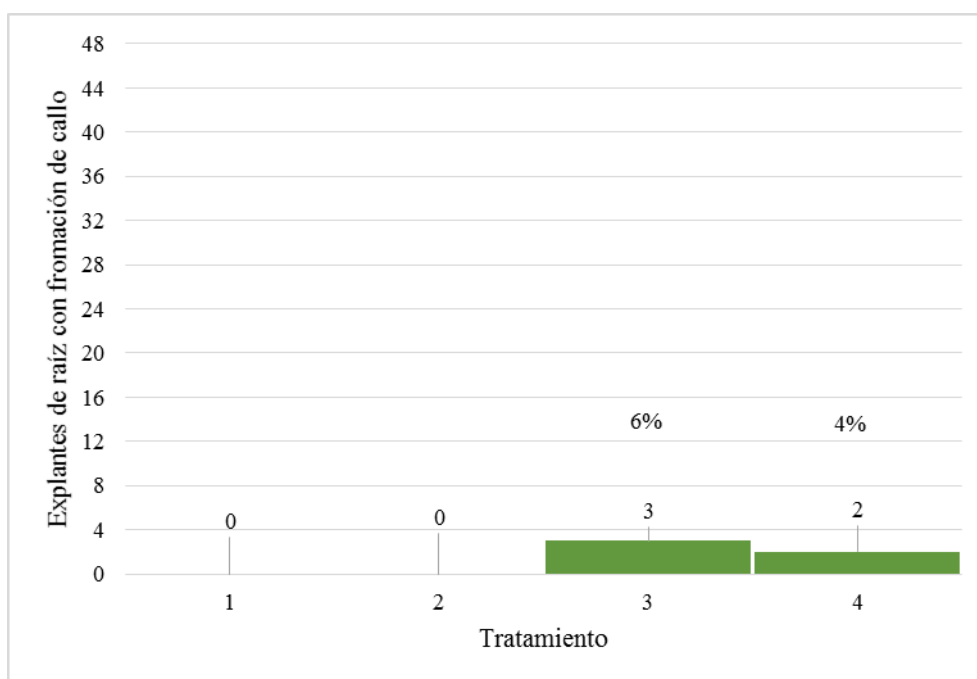
El Cuadro 7 muestra una diferencia significativa en cuanto a crecimiento de callo para hojas. Se observó un valor P de 0.03, para el cual 37.95% de la variabilidad entre tratamientos se debe a los mismos. Los T1, T2 y T3 mostraron la única diferencia significativa, al ser evaluados. Los T1 y T2 obtuvieron un valor P de 0.006 con una estimación del tamaño de efecto de 32.57%. De la misma manera, los T1 y T3 obtuvieron un valor P de 0.014 acreditándoseles el 26.08% de la variabilidad observada. Las raíces no mostraron diferencia significativa en cuanto a los tratamientos aplicados.

FIGURA 15. Histograma de cantidad de explantes de hoja con formación de callo, en cuatro tratamientos. N = 48.



La cantidad de callos obtenidos para explantes de hoja fue alta, como se detalla en la figura 11. Se observa un valor nulo para T1, en comparación con T2 que mostró una alta eficacia, obteniendo hasta 13 hojas con desarrollo de callo (de 48 totales). El T3 obtuvo, de igual manera, buenos resultados pues se obtuvieron hasta 6 explantes de hojas con desarrollo de callo. El T4 (alta concentración de hormonas sin antibiótico) mostró menor capacidad de generación de callo (hasta una hoja con callo generado), aunque dos valores atípicos mostraron que podrían llegarse a obtener hasta dos hojas con callo formado.

FIGURA 16. Histograma de cantidad de explantes de raíz con formación de callo, en cuatro tratamientos. N = 48.



En cuanto a raíces, tal como se mostró en el Cuadro 6, ningún tratamiento obtuvo resultados significativamente distintos, debido a una muy baja generación de callo. Únicamente los T3 y T4 (alta concentración de hormonas con antibiótico y alta concentración de hormonas sin antibiótico) resultaron en formación de callo para tres y dos explantes de raíces, respectivamente, de 48 totales (Figura 12).

CUADRO 8. Análisis Chi cuadrado (X^2) para desarrollo de callo en hojas y raíces entre tres factores: antibiótico (presencia – ausencia), estructura vegetal (hojas y raíces) y concentración de hormonas (alta o baja). Valores P por tratamiento(s).

PRUEBA	VALOR P	CONCLUSIÓN
Antibiótico vs. No antibiótico	0.000046487891597147	Significativa
Hojas vs. Raíces	0.000005304312949889	Significativa
Concentración alta vs. Concentración baja	0.000129079930622528	Significativa

Los resultados para las pruebas entre tres factores, mostraron que tanto la presencia o ausencia de antibióticos, la estructura vegetal y la concentración de hormona son altamente significativos en cuanto a desarrollo de callo. Valores p menores a 0.05 prueban su relación con el número de callos desarrollados durante el período de estudio.

VII. DISCUSIÓN

A. Pruebas preliminares

Para dar inicio a las pruebas preliminares, se obtuvieron plántulas de *Primula* sp. en un vivero de la ciudad de Guatemala. Se consideró la compra de semillas en lugar de plántulas crecidas, sin embargo, los datos de costos (Anexo 4) mostraron ser muy altos ya que, a ello, deben añadirse los costos de envío desde el país de origen hasta Guatemala. Dichas cantidades varían en moneda y época. Además, se debe considerar que los centros de cultivo de *Primula* sp. se encuentran mayoritariamente en Europa y Asia, elevando los costos aún más. En América, pueden adquirirse semillas de *Primula* sp. transportadas de Estados Unidos, sin embargo, los costos son más altos en comparación con otras especies, debido a que dicho país también debe transportar sus cultivos desde Europa o Asia.

Debida la dificultad para adquirir semillas o plántulas en Guatemala, los costos a largo plazo son muy elevados, especialmente, si el objetivo es establecer un laboratorio de cultivo *in vitro* de *Primula* sp. que sea auto sostenible y que produzca suficientes individuos para su venta o con fines de investigación. Para dicho caso, el establecimiento de un laboratorio de cultivo *in vitro* de *Primula* sp. es la forma que proveerá menores costos a largo plazo. Por ello, se decidió obtener las plantas madre de un vivero local y así reducir los costos del estudio.

En cuanto a las pruebas preliminares de medios de cultivo, los seis tratamientos iniciales mostraron gran diferencia en cuanto a formación de callo, durante el tiempo en que se cultivaron (8 semanas). Si bien el ácido indol acético (IAA) es una auxina recomendada, ésta también es fácilmente degradada por componentes como la luz u oxidación enzimática. (Dodds y Roberts 1985). A pesar de que los cultivos fueron almacenados buscando la mayor oscuridad posible, ésta no puede ser garantizada pues el laboratorio de cultivo también mantiene otros tejidos vegetales que requieren de luz y el material utilizado (bolsas de basura limpias) para “crear” un ambiente oscuro, permitían el paso de una pequeña cantidad de luz hacia los cultivos. Ello, pudo ser la fuente de la degradación de IAA y, por tanto, de la nula formación de callo en el medio con IAA y kinetina.

Por su parte, el 2,4-D es quizás, la auxina más recomendada para formación de callo, aunque concentraciones muy altas suprimen toda actividad (Dodds y Roberts 1985). Este fue el caso de los medios MSD-20 y MSD-10 que contenían altas concentraciones de 2,4-D (Apéndice 2) y obtuvieron cero callos formados en un

período de 8 semanas. El ANA es también una auxina altamente recomendada, aunque tiene los mismos efectos que 2,4-D y en altas concentraciones puede suprimir la formación de callo (Masteller y Holdern 1970).

El medio de cultivo con una concentración estándar de 2,4-D (0.1 pm – 5 ppm) ha obtenido los mejores resultados en formación de callo (Masteller y Holdern 1970). Por tanto, la combinación de 2,4-D y BA utilizada en la etapa preliminar del presente estudio contenía las concentraciones deseadas para la formación de callo y fue el medio que logró la formación de callo en un período de ocho semanas.

En cuanto a contaminación durante la etapa preliminar, dado que el contaminante mayormente observado fue una bacteria gram positiva y que un protocolo de desinfección más agresivo probó matar el tejido vegetal, se decidió utilizar un antibiótico (Gentamicina) por sus altas tasas de éxito en la eliminación de patógenos gram positivos y gram negativos *in vitro* e *in vivo* (Rudin *et al.* 1970).

La etapa preliminar culminó tras la formación de al menos un callo de *Primula* sp. Ello ocurrió en un período de ocho semanas, razón por la cual el estudio principal tuvo una período de duración equivalente (8 semanas).

B. Contaminación observada en explantes de hojas y raíces de *Primula* sp.

Los resultados para contaminación determinaron que el protocolo de desinfección establecido es efectivo, sin embargo, también se encontró que la contaminación puede verse significativamente elevada de acuerdo al medio de cultivo utilizado, la estructura vegetal evaluada y la presencia o ausencia del antibiótico (gentamicina). El tratamiento que resultó en menor número de hojas contaminadas (0 hojas) fue T1 (baja concentración de hormonas, con antibiótico) y el tratamiento con mayor número de hojas contaminadas (12 hojas) fue T4 (alta concentración de hormonas, sin antibiótico). Ello implica que el uso del antibiótico gentamicina para la desinfección de explantes de hoja es altamente efectivo, con cero contaminación ante su uso (T1) y alta contaminación en su ausencia (T4). La diferencia entre los tratamientos también podría explicarse, dado que, si bien las hormonas utilizadas (BA y 2,4-D) han reportado resultados satisfactorios en propagación *in vitro* de *Primula* sp. (Morozowska 2004), concentraciones altas de las mismas pueden ser favorables para potenciales patógenos del ambiente o presentes en la misma planta.

Las raíces mostraron altos niveles de contaminación, para todos los tratamientos, con altas cantidades explantes contaminados: 14 (T1), 29 (T2), 33 (T3) y 41 (T4), de 48 explantes totales por tratamiento. En comparación con los resultados de hojas, el tratamiento a concentraciones bajas, con antibiótico (T1), no fue igualmente

exitoso. La diferencia podría basarse, principalmente, en la fisiología de la estructura vegetal utilizada y factores ambientales (patógenos).

Las hojas poseen un área de exposición mayor que las raíces, por lo que es posible alcanzar la mayor parte de la superficie durante la desinfección. Además, las raíces poseen mayor cantidad de tricomas de pequeño tamaño que dificultan el ingreso de los reactivos utilizados durante la desinfección establecida. Incluido el T1 (baja concentración de hormonas, con antibiótico), que mostró mejores resultados en hojas (0 hojas contaminadas), las raíces requieren un tratamiento de desinfección más severo, aunque ello puede llegar a ser dañino para la misma planta, basado en los estudios preliminares que mostraron muerte celular ante un protocolo de desinfección más severo (alcohol etílico 70% por dos minutos y cloro comercial (30%) con Tween 20 por 40 minutos) que el utilizado (alcohol etílico 70% por un minuto y cloro comercial (30%) con Tween 20 por 30 minutos).

Conjuntamente, se presume la presencia de los cocos gram positivos (encontrados en el material contaminado), dentro de las plantas madre (bacterias endófitas). Las bacterias endófitas se clasifican como intermediarios entre bacterias saprófitas y bacterias patógenas ya que no causan síntomas de daño en la planta (Rariz *et al.* 2012). Se han aislado en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, con especies forestales, frutales, plantas herbáceas (caña de azúcar, entre otros), orquídeas (Pérez *et al.* 2010) y *Primula vulgaris* (Seyring 1998, 1999).

Las plantas madres de *Primula* sp. utilizadas para extraer hojas y raíces, no mostraron síntomas de bacterias endófitas, sin embargo, las observaciones mostraron que las mismas surgieron desde el interior de las nervaduras de las hojas y se propagaron hacia el medio de cultivo. De la misma manera, se observó que, en raíces, la contaminación bacteriana radicaba desde el medio de los explantes.

C. Formación de callos

En cuanto a formación de callo, los resultados mostraron una diferencia significativa entre hojas y raíces, así como entre tratamientos.

En hojas, los resultados mostraron una cantidad nula de desarrollo de callo (cero callos) en el tratamiento con baja concentración de hormonas y antibiótico (T1). Ello podría indicar un caso de inhibición por el antibiótico utilizado (Rudin *et al.* 1970), ya que al compararse el T1 con el tratamiento de la misma concentración sin antibiótico (T2), se observa una clara diferencia en el éxito del desarrollo de callo (T2 = 13 callos formados).

En el tratamiento con baja concentración de hormonas sin antibiótico (T2), se observa que los callos comenzaron a formarse, a partir de la semana 4, un resultado

bastante más rápido que mostrado en las pruebas preliminares. Añadido, se obtuvo que, si bien, el tratamiento con baja concentración de hormonas con antibiótico (T1) no fue exitoso para desarrollo de callo, fue el que mostró un índice de contaminación nulo. Ello podría indicar baja calidad en el tratamiento, pues quizás el antibiótico fue capaz de inhibir incluso el crecimiento de patógenos, eliminando toda posibilidad de crecimiento de callo.

El tratamiento con alta concentración de hormonas y antibiótico (T3) mostró índices más bajos de éxito que T2 (baja concentración de hormonas sin antibiótico), con seis explantes de hoja que formaron callo. A diferencia de los tratamientos con baja concentración de hormonas (T1 y T2), los tratamientos con altas concentraciones de hormona (T3 y T4) no mostraron evidencias de inhibición por antibiótico (T3=6 explantes formaron callo, T4=5 explantes formaron callo) aunque no puede descartarse la posibilidad de que sí haya existido y se requiera más tiempo de cultivo para encontrar una diferencia significativa. También debe considerarse la inhibición ya observada por el efecto de hormonas a concentraciones altas (Gaspar *et al.* 1996). Ello podría explicar la ligera diferencia entre T2, T3 y T4, en cuanto a su eficacia para generar callo en un período de ocho semanas (T2=13, T3=6, T4=5). Consecuentemente, debe tomarse en cuenta que T3 (alta concentración de hormonas con antibiótico) obtuvo bajos niveles de contaminación, por lo que el mismo podría alcanzar la eficacia de T2 al evitar la contaminación de explantes que pueden cultivarse por más tiempo y formar más callos.

El tratamiento con alta concentración de hormonas sin antibiótico (T4), no resultó ser tan eficiente como T2 y T3. Se observó que si bien se logró el desarrollo de callo en cinco explantes de hojas, también se produjo una alta contaminación (12 explantes de hoja contaminados). Ello creó gran desventaja para T4, en cuanto a su eficacia para formar callos, pues se obtuvieron callos, pero éstos corrían el riesgo de contaminarse rápidamente. En ello también se refleja cómo el uso del antibiótico gentamicina puede repercutir no sólo en la frecuencia de explantes contaminados, sino en su eficacia como tratamientos adecuados y productivos para formar callo, dado que T4 no contenía gentamicina, y así, probó ser ligeramente beneficioso para formación de callo y medianamente susceptible a contaminación.

En el caso de las raíces, los resultados no fueron los esperados. La baja tasa de desarrollo de callo y la alta tasa de contaminación, hicieron que las raíces fuesen la estructura vegetal menos conveniente para el desarrollo de callo en el presente estudio. Sin embargo, no se descarta su éxito al ser evaluadas con diferentes hormonas o protocolos de desinfección (Schween 2003).

En la evaluación realizada, se encontró que los T3 y T4 fueron capaces de formar dos y un callo, respectivamente. Desafortunadamente, ello no es suficiente

para crear una diferencia significativa en cuanto al desarrollo de callo (análisis Kruskal-Wallis, cuadro 6), comparado con el encontrado en explantes de hojas (análisis Kruskal-Wallis, cuadro 4). La alta frecuencia de contaminación (entre 14 y 41 explantes de raíz contaminados, cuadro 3 en Metodología) se presume como principal factor ante el la baja formación de callo en raíces de *Primula* sp. pues desde la semana 2 ya se observaban altas cantidades de raíces contaminadas (T2=14, T3=8, T4=21), matando el tejido e impidiendo la formación de callo.

Una posible segunda causa de la baja formación de callo en raíces es el tiempo de cultivo, pues quizás ocho semanas no son suficientes para la formación de callo en raíces, aunque los resultados en hojas sí sean favorables.

Los tratamientos con bajas (T1 y T2) y altas (T3 y T4) concentraciones de hormonas y su éxito en el desarrollo de callo para *Primula* sp. dependen en gran medida de un protocolo de desinfección efectivo, el uso de antibióticos y las tasas de contaminación que se generen dentro del cultivo.

VIII. CONCLUSIONES

Los medios de cultivo 1 ppm (BA) + 0.25 ppm (2,4-D) y 2 ppm (BA) + 1 ppm (2,4-D), con y sin antibiótico, fueron evaluados exitosamente, resultando en un total de 24 explantes de hoja con formación de callo (n=192) y 5 explantes de raíz (n=192) con formación de callo, en un período de ocho semanas.

En hojas, el protocolo de desinfección con alcohol etílico (70%) por un minuto, cloro comercial (30%) con Tween 20 por 30 minutos y tres lavados de 15 minutos con agua destilada es efectivo para el desarrollo de callo de *Primula* sp.

En raíces, el protocolo de desinfección con alcohol etílico (70%) por un minuto, cloro comercial (30%) con Tween 20 por 30 minutos y tres lavados de 15 minutos con agua destilada no es efectivo para el desarrollo de callo de *Primula* sp. Se sugiere cambiar el protocolo.

Los tratamientos con concentraciones bajas de hormonas (1 ppm BA+0.25 ppm 2,4-D) sin antibiótico y concentraciones altas de hormonas (2 ppm BA+1 ppm 2,4-D) con antibiótico, mostraron ser los mejores para el desarrollo de callo de *Primula* sp en un período de ocho semanas.

En hojas, el antibiótico gentamicina (50 ppm) contribuye altamente a la prevención de contaminación, con un total de 18 explantes de hoja contaminados (n=192), durante un período de ocho semanas.

En raíces, el antibiótico gentamicina (50 ppm) no contribuye a la prevención de contaminación, con una cantidad total de 117 explantes de raíz contaminados (n=192), en un período de ocho semanas.

IX. RECOMENDACIONES

Llevar a cabo más estudios sobre el cultivo *in vitro* de *Primula* sp. Se sugiere elaborar protocolos con medio de cultivo MS y nuevas hormonas de crecimiento, como Zeatina, 6-[γ , γ -dimetilalamino] purina o agua de coco, dados los resultados positivos que se han reportado (Dodds y Roberts 1985) para la formación de callo en tejidos vegetales.

Se sugiere evaluar nuevas formas de modificar el protocolo de desinfección para hojas y raíces. No se recomienda aumentar las concentraciones o los tiempos de exposición ya establecidos dentro del protocolo de desinfección, pues el tejido vegetal muere. En su lugar, podría evaluarse la respuesta de contaminación para hojas y raíces utilizando nuevos antibióticos como el nitrato de plata, verde brillante o novobiocina. No se recomiendan dosis mayores de gentamicina, pues podría llevar a mutaciones genéticas dentro de los cultivos (Dodd y Roberts).

Aumentar el tiempo de cultivo de cada tejido, a más de ocho semanas para observar las cantidades máximas de formación de callos que cada tratamiento puede estimular.

Establecer un cultivo de *Primula* sp. dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos que podría ser útil en la docencia y como material didáctico/de práctica, para cursos que así lo ameriten.

Se sugiere realizar un estudio fitopatológico a las plantas madre, previo a el cultivo *in vitro*. Ello podría contribuir a la determinación de patógenos, como bacterias endófitas, y reducir los porcentajes de contaminación.

X. LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2014. **Primrose culture guide: *Primula elatior* Crescendo® Mix, Polyantha Primrose**. Publicación en línea en: www.benary.com. [con acceso el 28-02-2014].
- Agrios, G. 2012. **Plant pathology**. Plant diseases caused by bacteria. Impresiones Elsevier. Estados Unidos de América. Pp. 332-367.
- Benson, E., J.E. Danaher, I.M. Pimbley, C.T. Anderson, J.E. Wake, S. Daley y L.K. Adams. 2000. **In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant**. Biodiversity and Conservation 9:711-726.
- Bressani, R. 1994. **El uso de cultivo de tejidos vegetales para la micropropagación de *Tillandsia ionantha scaposa* y *Tillandsia magnusiana***. Trabajo de Graduación de Licenciatura, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala. 62 pp.
- Cerabolini, B., T. De Andreis, R. Ceriani, S. Pierce y B. Raimondi. 2004. **Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucenscens***. Biological Conservation 117:351-356.
- Deng, Y., H. Hua, J. Li y P. Lapinskas. 2001. **Studies on the cultivation and uses of evening primrose (*Oenothera spp.*) in China**. Journal of Economic Botany. 55 (1): 83-92.
- Dodds, J. y Roberts, L. 1981. **Some inhibitory effects of gentamicin on plant tissue cultures**. Society for in vitro biology. 17(6):467-470
- Dodds, J. y Roberts, L. 1985. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge University Press, Londres, Inglaterra. 232 pp.
- Dufour, M. 1996. **Informe final de actividades desarrolladas en cultivo de tejidos: de junio de 1991 hasta marzo de 1996**. Biblioteca CATIE/IICA.

- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. Thorpe. 1996. **Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture.** Journal of In Vitro Cellular and Developmental Biology. 32: 272-289.
- George, E., M. Hall y G. De Klerk. 2007. **Plant propagation by tissue culture.** (Tercera ed.). Springer Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Glover, B. y R. Abbott. 1995. **Low genetic diversity in the Scottish endemic *Primula scotica* Hook.** Journal of New Phytology. 129:147-153
- Hamidoghli, Y., A.R. Noroozi y Zakizadeh, H. 2011. **Organogenesis from seedling derived leaf explants of primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) as a scarce Iranian plant.** Australian Journal of Crop Science 5(4):391 – 395.
- Lapinskas, P. 1982. **Evening primrose: origins and cultivation.**
- Lindbord, R., S. Cousins y O. Eriksson. 2005. **Plant species response to land use change – *Campanula rotundifolia*, *Primula veris* and *Rhinanthus minor*.** Ecography 28:29 – 36.
- Macukanovic, M., D. Rancic y Z. Dajic. 2010. **Palynomorphological study of primrose (*Primula vulgaris* Huds.) grown in natural reserve Obedska Bara (Serbia).**Presentado en el Leatherhead Food Research Association.
- Mast, A., S. Kelso, A. John Richards, D. J. Lang, D. M.S. Feller y E. Conti. 2001. **Phylogenetic relationships in *Primula* L. and related genera (Primulaceae) based on noncoding chloroplast DNA.** International Journal of Plant Sciences 162(6):1381 – 1400.
- Masteller, V. y D. Holden. 1970. **The growth of and organ formation from callus tissue of *Sorghum*.** Journal of Plant Physiology. 45:362-364.
- Merriam-Webster Dictionary. 2015. En:<http://www.merriam-webster.com/> [con acceso el 01 de marzo de 2015].
- Morozowska, M. y M. Wesolowska. 2004. **In vitro clonal propagation of *Primula veris* L. and preliminary phytochemical analysis.** Acta Biológica Cracoviensia: Series Botánica 46:169 – 175.

- Murashige, T., y F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue culture.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nakagawa, S. e I. C. Cuthill. 2007. **Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists.** *Biology Review*. 82:591-605.
- Naroozi, A., Y. Hamidoghli y H. Zakizadeh. 2011. **In vitro seed germination and micropropagation of primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) an endemic endangered Iranian species via shoot tip explants.** *Horticulture, environment and biotechnology* 52(3):298 – 302.
- Pérez, A., J. Rojas y J. Fuentes. 2010. **Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces de pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia.** *Acta biológica Colombiana*. 15(2): 219 – 228.
- Rariz, G., L. Ferrando y A. Fernández. 2012. **Aislamiento de bacterias endófitas fijadores de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos.** *Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUCM: 22 al 24 de mayo de 2012.* UNLP. La Plata, Argentina. 20 pp.
- Rosselló, J. y M. Mayol. 2002. **Seed germination and reproductive features of *Lysimachia minoricensis* (Primulaceae), a wild-extinct plant.** *Annals of Botany* 89:559 – 562
- Rudin, A., A. Healey, C. Phillips, D. Gump y B. Forsyth. 1970. **Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture.** *Applied Microbiology* 20(6):989 – 990.
- Schafer, T., A. Pascale, G. Shimonasky, G. y P. Came. 1972. **Evaluation of gentamicin of use in virology and tissue culture.** *Applied Microbiology* 23(3):565 – 570.
- Scheween, G. y H.G. Schwenkel. 2003. **Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp.** *Plant cell, tissue and organ culture* 72:53 – 61.

- Seyring, M. 1998. **Detection and identification of endophytic bacteria in plant tissue cultures of *Primula vulgaris* Huds.** Gartenbauwissenschaft. 63(1): 27-33.
- Seyring, M. 1999. **Possibility to eliminate endophytic bacteria from plant tissue cultures of *Primula vulgaris* Huds.** Gartenbauwissenschaft. 64(1): 9-13.
- Shimada, T., T. Matsushita y M. Otani. 1997. **Plant regeneration from leaf explants of *Primula cuneifolia* var. *hakusanensis*, “Hakusan-kozakura”.** Plant Biotechnology 14(1):47 – 50.
- Singh, R. y J. Sharma. 2001. **Sarup’s dictionary of biotechnology.** Sarup y Sons. Nueva Deli, India. 256 pp.
- Peterson, L. 2014. **Herbaceous perennials.** En:<https://www.studyblue.com/#flashcard/view/3067347> [con acceso el 01 de marzo de 2015].
- The Plant List. 2014. **Familia: Primulaceae.** Versión 1.1. En:<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Primulaceae/> [con acceso el 9 de abril de 2014].
- Watson, L. y M.J. Dallwitz. 1992. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval: Primulaceae Vent.** En: <http://delta-intkey.com/angio/www/primulac.htm> [con acceso el 9 de abril de 2014].
- Zimmerman, J. 1993. **Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants.** Journal The Plant Cell. 5: 1411 – 1423.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

Preparación de material para cultivo de tejidos: cajas de Petri y rotulación

Las cajas de Petri serán plásticas dado el trabajo con medios de cultivo que poseen ácido 2, 4 – diclorofenoxiacético. Las cajas Petri se comprarán en empaques de 10 o 25 unidades, selladas y esterilizadas. Se verterán los medios dentro de las cajas de Petri dentro de una campana de flujo laminar.

Para finalizar, se colocará Parafilm® en los bordes de las cajas de Petri para impermeabilizarlas. La rotulación utilizada corresponderá al manual pre-establecido por la dirección del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

El material de desinfección y siembra de los cultivos incluye pinzas de punta fina, servilletas, cajas Petri de vidrio, vasos de precipitado de 250 ml y agua estéril. Todo ello será esterilizado utilizando una autoclave a 121 ° C, durante 25 minutos.

ANEXO 2

CUADRO 9. Preparación de medios de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Reactivo	Cantidad (mg/l)		
	MS completo	MSD10	MSD20
Macronutrientes	100	100	100
Micronutrientes	1	1	1
Calcio	10	10	10
Hierro	10	10	10
Vitamina B5	2	2	2
2,4 - D	0	50	100
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Agua destilada	Ajustar volumen	Ajustar volumen	Ajustar volumen
Ajustar pH a	5.8	5.8	5.8
Gelrite/Agar	2 g/3.5 g	2 g/3.5 g	2 g/3.5 g
Autoclave			

*Se preparó un litro por medios de cultivo.

ANEXO 3

CUADRO 10. Presupuesto estimado para cultivo *in vitro* de *Primula* sp. en un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad del Valle de Guatemala.

Renglón de gasto	Solicitada UVG	Contrapartida	Total
PERSONAL	Q7,200.00	Q72,000.00	Q79,200.00
MATERIAL Y EQUIPO	Q152,454.30	Q300.00	Q152,754.30
REACTIVOS (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hormonas y agentes gelificantes)	Q32,790.23		Q32,790.23
TOTAL	Q205,686.74	Q72,399.75	Q278,086.49

*Los precios se estiman de acuerdo con datos cotizados en enero de 2014.

ANEXO 4

CUADRO 11. Estimación de gastos de compra de *Primula* sp. en Guatemala y el extranjero.

Sitio de compra	Cantidad	Estructura vegetal cotizada	Precio en US\$	Precio en €	Precio en Q.
China	1 paquete (50 unidades)	Semillas	1.77	-	14.16 (más gastos de envío)
Europa	1 paquete (40 unidades)	Semillas	-	7.99	69.75 (más gastos de envío)
China	1	Plántula (bonsái)	1.77	-	14.16 (más gastos de envío)
China	1	Plántula (bonsái)	5.99	-	47.92 (más gastos de envío)
China	1 paquete (50 unidades)	Semillas	5.90	-	47.20 (más gastos de envío)
Guatemala	1	Plántula	-	-	25.00 – 35.00

*La estimación NO toma en cuenta los gastos de transporte desde el extranjero. Dicho valor varía por época y por valor de moneda, por lo que no se contempla en los valores presentados en el cuadro.

ANEXO 5

Datos brutos de estudio. Almacenamiento de información para análisis de resultados.

CUADRO 12. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T1BH+ y T1BR+.

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 0 (siembra de cultivo) Siembra de hojas: 18/08/2014 Siembra de raíces: 19/08/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 1 Siembra de hojas: 25/08/2014 Siembra de raíces: 26/08/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 12

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 2 Siembra de hojas: 1/9/2014 Siembra de raíces: 2/9/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 3 Siembra de hojas: 8/9/2014 Siembra de raíces: 9/9/2014	1	0/4	Hojas con brillo y apariencia endurecida	7	0/4	Hojas con brillo y apariencia endurecida	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4		8	0/4		2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4		9	0/4		3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4		10	0/4		4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4		11	0/4		5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4		12	0/4		6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz A
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 12

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz A
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	2/4	Raíces B y D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	1/4	Raíz D
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	2/4	Raíces A y C
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	1/4	Raíz A
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	2/4	Raíces B y D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	1/4	Raíz D
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	2/4	Raíces A y C
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	1/4	Raíz A
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	2/4	Raíces B y D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	3/4	Raíces A, B y D
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	2/4	Raíces A y C

Continuación Cuadro 12

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014 Siembra de raíces: 14/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	2/4	Raíces A y C
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	1/4	Raíz A
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	2/4	Raíces B y D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	3/4	Raíces A, B y D
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	2/4	Raíces A y C

CUADRO 13. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T2BH- y T2BR-

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T2BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T2BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 0 (siembra de cultivo)	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
Siembra de hojas: 18/08/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
Siembra de raíces: 19/08/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
FECHA	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 1	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
Siembra de hojas: 25/08/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
Siembra de raíces: 26/08/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 13

FECHA		REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T2BH+)					REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T2BR+)						
		MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 2	Siembra de hojas: 1/9/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	1/4	Raíz C	7	0/4	No
		2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz D
		3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	1/4	Raíz D
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	1/4	Raíz A	10	1/4	Raíz D
	Siembra de raíces: 2/9/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	1/4	Raíz A. Bacteria.	11	1/4	Raíz D
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	3/4	Raíces A, C y D
Semana 3	Siembra de hojas: 8/9/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	1/4	Raíz C	7	0/4	No
		2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz D
		3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz A	9	1/4	Raíz D
		4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C	10	1/4	Raíz D
	Siembra de raíces: 9/9/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	4/4	Raíces A. Bacteria.	11	1/4	Raíz D
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	3/4	Raíces A, C y D
Semana 4	Siembra de hojas: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	1/4	Raíz C	7	0/4	No
		2	0/4	Observar hoja D	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz D
		3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	1/4	Raíz D
		4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	1/4	Raíz A	10	1/4	Raíz D
	Siembra de raíces: 16/09/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	1/4	Bacteria	11	1/4	Raíz D
		6	1/4	Hoja B	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	4/4	Raíces A, C y D. B muerta

Continuación Cuadro 13

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T2BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T2BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	1/4	Raíz C	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	1/4	Raíz C	8	2/4	Raíces A y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz A	9	1/4	Raíz D
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C	10	1/4	Raíz D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	4/4	Bacteria	11	2/4	Raíces A y D
	6	1/4	Hoja B	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	4/4	Raíces A, C y D. B muerta
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	2/4	Raíces B y C	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	1/4	Raíz C	8	3/4	Raíces A, C y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz A	9	1/4	Raíz D
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C	10	1/4	Raíz D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	4/4	Bacteria	11	2/4	Raíces A y D
	6	1/4	Hoja B	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	4/4	Raíces A, C y D. B muerta
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	2/4	Raíz B y C	7	0/4	No
	2	1/4	Hoja D	8	0/4	No	2	2/4	Raíces B y C	8	3/4	Raíces A, C y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C	9	1/4	Raíz D
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C	10	2/4	Raíces A y D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	4/4	Bacteria	11	2/4	Raíces A y D
	6	1/4	Hoja B	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	4/4	Raíces A, C y D. B muerta

Continuación Cuadro 13

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T2BH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T2BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	2/4	Raíz B y C	7	0/4	No
	2	1/4	Hoja D	8	0/4	No	2	2/4	Raíces B y C	8	3/4	Raíces A, C y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C	9	1/4	Raíz D
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C	10	2/4	Raíces A y D
Siembra de raíces: 14/10/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	2/4	Bacteria	11	2/4	Raíces A y D
	6	1/4	Hoja B	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B	12	4/4	Raíces A, C y D. B muerta

CUADRO 14. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T3AH+ y T3AR+.

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T3AR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 0 (siembra de cultivo) Siembra de hojas: 18/08/2014 Siembra de raíces: 19/08/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 1 Siembra de hojas: 25/08/2014 Siembra de raíces: 26/08/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	1/4	Raíz D
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	Contaminación aislada. No en raíces.	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 14

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T3AR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 2 Siembra de hojas: 1/9/2014 Siembra de raíces: 2/9/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	2/4	Raíces A y D
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz C	9	1/4	Raíz D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	1/4	Raíz D
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	1/4	Raíz C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 3 Siembra de hojas: 8/9/2014 Siembra de raíces: 9/9/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	2/4	Raíces A y D
	2	1/4	Hoja A	8	0/4	No	2	0/4	No	8	1/4	Raíz D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz C	9	1/4	Raíz D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	1/4	Raíz D
	5	1/4	Hoja A	11	0/4	No	5	1/4	Raíz C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	2/4	Raíces A y D
	2	1/4	Hoja A	8	0/4	No	2	0/4	No	8	2/4	Raíces B y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz C	9	2/4	Raíces B y D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	1/4	Raíz D
	5	1/4	Hoja A	11	0/4	No	5	1/4	Raíz C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 14

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T3AR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	1/4	Hoja A	7	0/4	No	1	0/4	No	7	2/4	Raíces A y D
	2	1/4	Hoja A	8	0/4	No	2	0/4	No	8	4/4	Raíces muertas.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz C	9	2/4	Raíces B y D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	1/4	Raíz B	10	1/4	Raíz D
	5	1/4	Hoja A	11	0/4	No	5	1/4	Raíz C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	1/4	Hoja A	7	0/4	No	1	1/4	Hoja A	7	1/4	Raíces A, C y D
	2	1/4	Hoja A	8	0/4	No	2	0/4	No	8	4/4	Raíces muertas.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz C	9	2/4	Raíces B y D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	1/4	Raíz B	10	1/4	Raíz D
	5	1/4	Hoja A	11	0/4	No	5	1/4	Raíz C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	1/4	Hoja A	7	0/4	No	1	4/4	Raíces muertas.	7	3/4	Raíces A, C y D
	2	1/4	Hoja A	8	0/4	No	2	2/4	Raíces A y C	8	4/4	Raíces muertas.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	4/4	Raíces muertas.	9	2/4	Raíces B y D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	4/4	Raíces muertas.	10	1/4	Raíz D
	5	1/4	Hoja A	11	0/4	No	5	2/4	Raíces B y C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	3/4	Raíces B, C y D	12	1/4	Raíz C

Continuación Cuadro 14

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T3AR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014 Siembra de raíces: 14/10/2014	1	1/4	Hoja A	7	0/4	No	1	4/4	Raíces muertas.	7	3/4	Raíces A, C y D
	2	1/4	Hoja A	8	0/4	No	2	2/4	Raíces A y C	8	4/4	Raíces muertas.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	4/4	Raíces muertas.	9	2/4	Raíces B y D
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	4/4	Raíces muertas.	10	1/4	Raíz D
	5	1/4	Hoja A	11	0/4	No	5	2/4	Raíces B y C	11	1/4	Raíz C
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	3/4	Raíces B, C y D	12	1/4	Raíz C

CUADRO 15. Datos brutos de contaminación de explantes de hoja y raíz, en medio T4AH- y T4AR-.

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T4AR-)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 0 (siembra de cultivo) Siembra de hojas: 18/08/2014 Siembra de raíces: 19/08/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 1 Siembra de hojas: 25/08/2014 Siembra de raíces: 26/08/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	1/4	Raíz A. Hongo.
	2	1/4	Hoja B. Hongo.	8	0/4	No	2	1/4	Raíz A. Bacteria.	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	1/4	Raíz A. Bacteria.	9	1/4	Raíz A. Hongo.
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	1/4	Raíz B. Bacteria	12	0/4	No

Continuación Cuadro 15

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T4AR-)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 2 Siembra de hojas: Siembra de raíces:	1	1/4	Hoja C	7	0/4	No	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	1/4	Raíz A. Hongo.
	2	1/4	Hoja B. Hongo.	8	0/4	No	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	1/4	Raíz A. Hongo.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	1/4	Raíz A. Hongo.
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	3/4	Raíces A, B y C	12	3/4	Raíces A, B y C
Semana 3 Siembra de hojas: Siembra de raíces:	1	1/4	Hoja C	7	1/4	Hoja B	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	2/4	Raíces A y D
	2	1/4	Hoja B. Hongo.	8	0/4	No	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	1/4	Raíz A. Hongo.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	1/4	Raíz A. Hongo.
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	1/4	Raíz D
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	3/4	Raíces A, B y C	12	3/4	Raíces A, B y C
Semana 4 Siembra de hojas: Siembra de raíces:	1	1/4	Hoja C	7	1/4	Hoja B	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	2/4	Raíces A y D
	2	1/4	Hoja B. Hongo.	8	0/4	No	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	1/4	Raíz A. Hongo.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	1/4	Raíz A. Hongo.
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	10	1/4	Raíz C
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	11	1/4	Raíz D
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	3/4	Raíces A, B y C	12	3/4	Raíces A, B y C

Continuación Cuadro 15

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T4AR-)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	1/4	Hoja C	7	1/4	Hoja B	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	2/4	Raíces A y D
	2	1/4	Hoja B. Hongo.	8	0/4	No	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	1/4	Raíz A. Hongo.
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	1/4	Raíz A. Hongo.
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	10	1/4	Raíz C
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	11	1/4	Raíz D
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	3/4	Raíces A, B y C	12	3/4	Raíces A, B y C
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	1/4	Hojas muertas.	7	1/4	Hoja B	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	3/4	Raíces A, C y D
	2	1/4	Hojas muertas.	8	1/4	Hoja B	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	3/4	Raíces A, B y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	4/4	Raíces muertas
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	4/4	Raíces muertas	10	2/4	Raíces A y C
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	11	2/4	Raíces B y D
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	3/4	Raíces A, B y C	12	3/4	Raíces A, B y C
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	1/4	Hojas muertas.	7	1/4	Hoja B	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	4/4	Raíces muertas
	2	1/4	Hojas muertas.	8	1/4	Hoja B	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	3/4	Raíces A, B y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	4/4	Raíces muertas
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	4/4	Raíces muertas	10	2/4	Raíces A y C
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	11	3/4	Raíces B, C y D
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	3/4	Raíces A, B y C	12	4/4	Raíces muertas

Continuación Cuadro 15

FECHA	REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE CONTAMINACIÓN EN RAÍCES (T4AR-)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Siembra de hojas: 13/10/2014	1	4/4	Hojas muertas.	7	1/4	Hoja B	1	4/4	Raíces muertas. Hongo.	7	4/4	Raíces muertas
	2	4/4	Hojas muertas.	8	1/4	Hoja B	2	4/4	Raíces muertas. Bacteria.	8	3/4	Raíces A, B y D
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	9	4/4	Raíces muertas
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja B	4	4/4	Raíces muertas	10	2/4	Raíces A y C
Siembra de raíces: 14/10/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	2/4	Raíces A y C. Bacteria.	11	3/4	Raíces B, C y D
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	3/4	Raíces A, B y C	12	4/4	Raíces muertas

CUADRO 16. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz,
en medio T1BH+ y T1BR+.

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 16

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 16

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T1BH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T1BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014 Siembra de raíces: 14/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

CUADRO 17. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T2BH- y T2BR-.

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T2BH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T2BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
<p align="center">Semana 0 (siembra de cultivo)</p> <p>Siembra de hojas: 18/08/2014</p> <p>Siembra de raíces: 19/08/2014</p>	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
<p align="center">Semana 1</p> <p>Siembra de hojas: 25/08/2014</p> <p>Siembra de raíces: 26/08/2014</p>	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
<p align="center">Semana 2</p> <p>Siembra de hojas: 1/9/2014</p> <p>Siembra de raíces: 2/9/2014</p>	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
<p align="center">Semana 3</p> <p>Siembra de hojas: 8/9/2014</p> <p>Siembra de raíces: 9/9/2014</p>	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 17

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T2BH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T2BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	1/4	Hoja D	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	1/4	Hoja D	7	1/4	Hoja C	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	2/4	Hojas C y B	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	3/4	Hojas B, C y D	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja B	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	1/4	Hoja D	7	1/4	Hoja C	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	3/4	Hojas B, C y D	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	3/4	Hojas B, C y D	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	2/4	Hojas A y B	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 17

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T2BH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T2BR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	1/4	Hoja D	7	2/4	Hojas C y D	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	3/4	Hojas B, C y D	8	3/4	Hojas B, C y D	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	2/4	Hojas C y D	9	2/4	Hojas C y D	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	3/4	Hojas B, C y D	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	2/4	Hojas A y B	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014 Siembra de raíces: 14/10/2014	1	1/4	Hoja D	7	2/4	Hojas C y D	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	3/4	Hojas B, C y D	8	3/4	Hojas B, C y D	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	2/4	Hojas C y D	9	2/4	Hojas C y D	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	3/4	Hojas B, C y D	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	2/4	Hojas A y B	6	0/4	No	12	0/4	No

CUADRO 18. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T3AH+ y T3AR+.

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T3AR+)						
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	
Semana 0 (siembra de cultivo)	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 18/08/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 19/08/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 1	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 25/08/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 26/08/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 2	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 1/9/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 2/9/2014	5	0/4	No	11	0/4	Posible callo.	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 3	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 8/9/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 9/9/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 18

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T3AR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	2/4	Hojas B y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja C	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	0/4	No	7	1/4	Hoja A	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	1/4	Hoja C	10	2/4	Hojas B y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja C	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	0/4	No	7	1/4	Hoja A	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	2/4	Hojas A y C
	4	1/4	Hoja C	10	2/4	Hojas B y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja C	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 18

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T3AH+)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T3AR+)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	0/4	No	7	1/4	Hoja A	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	2/4	Hojas A y C
	4	1/4	Hoja C	10	2/4	Hojas B y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja C	6	0/4	No	12	1/4	Hoja B
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014 Siembra de raíces: 14/10/2014	1	0/4	No	7	1/4	Hoja A	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	2/4	Hojas A y C
	4	1/4	Hoja C	10	2/4	Hojas B y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja C	6	0/4	No	12	1/4	Hoja B

CUADRO 19. Datos brutos de desarrollo de callo en explantes de hoja y raíz, en medio T4AH+ y T4AR+.

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T4AR-)						
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	
Semana 0 (siembra de cultivo)	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 18/08/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 19/08/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 1	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 25/08/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 26/08/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 2	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No	
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No	
	Siembra de hojas: 1/9/2014	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
		4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	Siembra de raíces: 2/9/2014	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
		6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 19

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T4AR-)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 3 Siembra de hojas: 8/9/2014 Siembra de raíces: 9/9/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	0/4	No	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	0/4	No	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 4 Siembra de hojas: 16/09/2014 Siembra de raíces: 16/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 5 Siembra de hojas: 22/09/2014 Siembra de raíces: 23/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	0/4	No	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	0/4	No	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	0/4	No	12	0/4	No

Continuación Cuadro 19

FECHA	REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN HOJA (T4AH-)						REGISTRO DE DESARROLLO DE CALLO EN RAÍCES (T4AR-)					
	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON AGAR	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES	MUESTRA EN MEDIO CON GELRITE	CANTIDAD CONTAMINADA	OBSERVACIONES
Semana 6 Siembra de hojas: 29/09/2014 Siembra de raíces: 30/09/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Hojas B y D	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	1/4	Hoja A	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	1/4	Hoja A	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 7 Siembra de hojas: 6/10/2014 Siembra de raíces: 7/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Hojas B y D	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	2/4	Hojas A y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	2/4	Hojas A y B	6	0/4	No	12	0/4	No
Semana 8 Siembra de hojas: 13/10/2014 Siembra de raíces: 14/10/2014	1	0/4	No	7	0/4	No	1	0/4	No	7	0/4	No
	2	0/4	No	8	0/4	No	2	0/4	No	8	0/4	No
	3	0/4	No	9	0/4	No	3	2/4	Hojas B y D	9	0/4	No
	4	0/4	No	10	2/4	Hojas A y C	4	0/4	No	10	0/4	No
	5	0/4	No	11	1/4	Hoja B	5	0/4	No	11	0/4	No
	6	0/4	No	12	2/4	Hojas A y B	6	0/4	No	12	0/4	No

XII. GLOSARIO

1. **2,4-D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Herbicida y hormona reguladora de crecimiento en cultivo de tejidos vegetales (Dodds y Roberts 1985).
2. **ANA:** ácido 1-naftaleneacético. Auxina.
3. **Auxina:** hormona reguladora de crecimiento para estimulación de brotes a partir de un tejido vegetal (Dodds y Roberts 1985).
4. **BA:** 6-benzil amino purina.
5. **Callo:** masa amorfa de células diferenciadas a partir de una célula madre (Singh y Sharma 2001).
6. **Citoquinina:** hormona reguladora de crecimiento para estimulación división celular (Dodds y Roberts 1985).
7. **Embriogénesis:** Proceso de diferenciación celular y generación de embriones, a partir de una sola célula (Singh y Sharma 2001).
8. **Explante:** tejido vivo que se remueve de un organismo y se coloca dentro de un medio de cultivo (Merriam-Webster 2015).
9. **IAA (en inglés):** ácido indol acético (AIA, en español).
10. **KIN:** quinina.
11. **Medio de cultivo:** sustancia nutritiva, consistente de sales minerales, vitaminas, agua, sacarosa y, en ocasiones, hormonas de crecimiento. Puede presentarse de forma líquida o sólida y se encarga de proveer el medio ideal para el desarrollo de cultivos de bacterias, hongos, células animales y/o vegetales (Singh y Sharma 2001).
12. **Organogénesis:** proceso de diferenciación celular y generación de órganos (brotes y raíces), a partir de un callo (Singh y Sharma 2001).