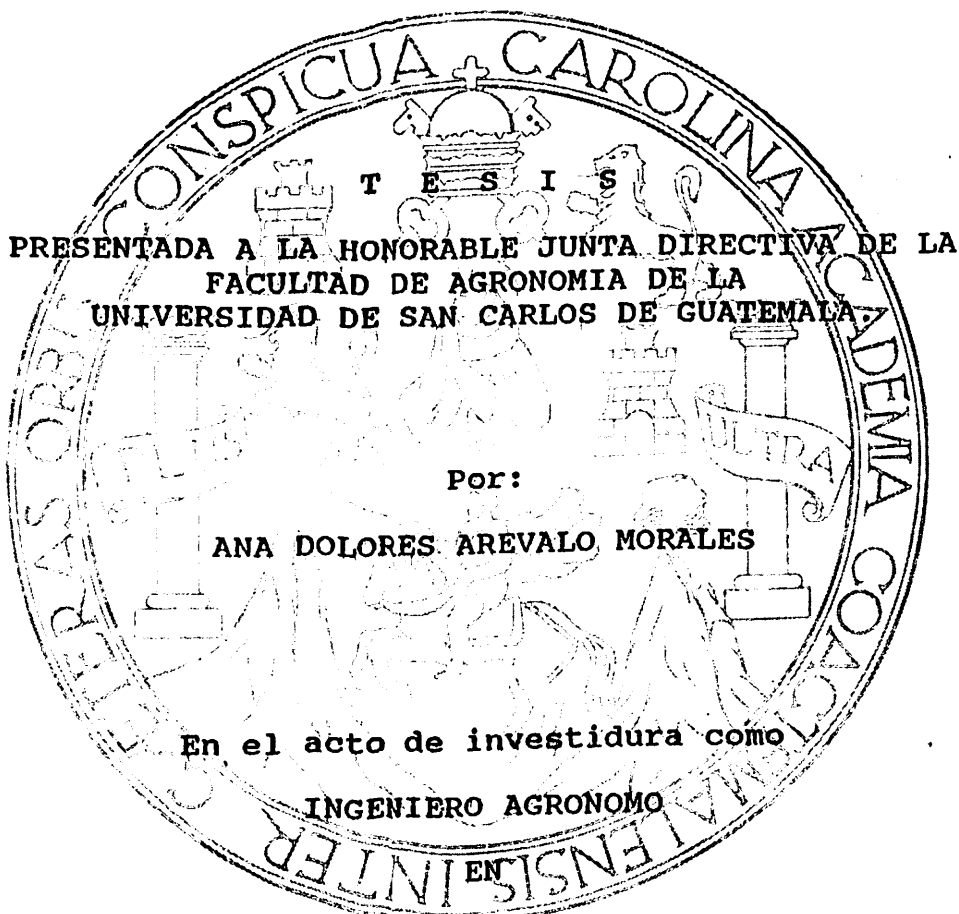


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS



EVALUACION DE LA RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS DE GIPSOFILIA (*Gypsophila paniculata* var. Bristol fine) UTILIZANDO VARIOS EXPLANTES Y TRATAMIENTOS DE AUXINAS-CITOCININAS, EN CONDICIONES DIFERENTES DE LUZ



SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO

Guatemala, noviembre, 1993

R E C T O R

DR. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Maynor Estrada Rosales
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes.
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. Carlos Motta Paz.
VOCAL CUARTO	P.A. Milton Abel Sandoval
VOCAL QUINTO	Br. Juan Gerardo de León Montenegro.
SECRETARIO	Ing. Agr. Marco Romilio Estrada Muy

Guatemala octubre 1993

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

Señores Miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos, tengo el honor de someter a su consideración, el trabajo de tesis titulada:

Evaluación de la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas de Gipsofilia (Gypsophila paniculata var. Bristol fine), utilizando varios explantes y tratamientos de auxinas-citocininas, en condiciones diferentes de luz.

Como requisito previo a optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

Atentamente,

Ana Dolores Arévalo Morales.

ACTO QUE DEDICO

A mis padres

**Consuelo Morales de Arévalo
Enrique N. Arévalo Pérez.
Por el apoyo recibido en el
transcurso de mi carrera.**

**A mis compañeros docentes
y administrativos de la
Facultad de Agronomía.**

**A todos los que me honran
con su presencia**

TESIS QUE DEDICO

A: La Universidad de San Carlos de Guatemala

A: La Facultad de Agronomía.

AGRADECIMIENTOS

- A: El Ing. Agr. Msc. Fernando Rodríguez Bracamonte por el apoyo y ayuda brindada al desarrollo de esta tesis en todas sus etapas, y por la calidad humana manifestada en la asesoría del presente trabajo.
- A: Los Ingenieros Agrónomos Marco Vinicio Fernández y Hector Ramazzini por la orientación recibida en la elaboración del documento.
- A: El Ing. Agr. Ruperto Fuentes y el Señor Reginaldo Soma por el apoyo brindado en la etapa de Laboratorio.
- A: Los Ingenieros Agrónomos, Amilcar Martínez Tambito, Jorge Mario Chiquín y Ernesto Yac por su desinteresada ayuda en la realización del presente trabajo.
- A: Los Ingenieros Agrónomos, Rolando Lara Alecio y Salvador Castillo, por su orientación y ejemplo en mi carrera docente y formación profesional.

INDICE

No.	DESCRIPCION	Pag.
1.	Introducción-----	1
2.	Definición del Problema-----	4
3.	Marco Teórico-----	6
3.1	Marco Conceptual-----	6
3.1.1	Carcterísticas Generales de Gipsofilia-----	6
3.1.2	Anatomía y Morfología del cultivo-----	6
3.1.3	Propagación-----	7
3.1.4	Usos de Gipsofilia-----	8
3.1.5	Historia de la Micropropagación-----	9
3.1.6	Fases de la Micropropagación-----	10
3.1.7	Factores que Influyen en la Micropropagación-----	11
3.1.8	Cultivo de Hojas-----	13
3.1.9	Cultivo de Raíces-----	14
3.1.10	Cultivo de Callo-----	15
3.1.11	Regeneración de Plantas en Cultivo de Tejidos-----	16
3.1.12	Reguladores del Crecimiento-----	17
3.2	Marco Referencial:-----	20
3.2.1	Origen del Material Vegetal-----	20
3.2.2	Estudios realizados sobre induc- ción de callo a partir de explan- tes de hoja-----	20
3.2.3	Trabajos realizados en el cultivo de Gipsofilia en Guatemala-----	21
4.	Objetivos-----	22
5.	Hipótesis-----	22
6.	Metodología-----	25
6.1	Area Experimental-----	25
6.2	Etapas de Estudio-----	25
6.2.1	Primera Etapa-----	25
6.2.2	Segunda Etapa-----	25

6.3	Definición de los Tratamientos-----	26
6.3.1	Medio de Cultivo-----	26
6.3.2	Material Vegetal-----	26
6.3.3	Reguladores del Crecimiento-----	26
6.4	Unidad Experimental-----	28
6.5	Manejo del Experimento-----	29
6.5.1	Desinfección de explantes-----	29
6.5.2	Preparación y siembra -----	30
6.5.3	Condiciones del explantes-----	31
6.6	Variables de Respuesta-----	32
6.6.1	Etapa de inducción de callo-----	32
6.6.2	Etapa de Regeneración de planta-----	32
6.7	Análisis de la Información-----	32
7.	Resultados y Discusión-----	35
7.1	Fase de Inducción de Callo-----	35
7.1.1	Experimento en la Oscuridad-----	35
7.1.2	Experimento en Luz Constante 24 hrs.	43
7.1.3	Experimento en Fotoperíodo, 12 hrs. luz, 12 hrs. oscuridad-----	51
7.1.4	Resultados Finales de los tres experimentos-----	57
7.2	Fase de Brotación-----	64
7.2.1	Contaminación-----	64
7.2.2	Regeneración de Plantas por explante	64
7.2.3	Regeneración de plantas por tratamiento-----	66
8.	Conclusiones-----	70
9.	Recomendaciones-----	71
10.	Bibliografía-----	73
11.	Anexo-----	75

INDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pag.
1.	Fases de Micropropagación de (<u>Gypsofila</u> sp.)---	34
2.	Porcentaje de callos generados por u.e. lograda en cada explante en el experimento en obscuridad.	38
3.	Porcentaje de callos generados por u.e. lograda en cada explante en el experimento en luz 24 hrs.	46
4.	Porcentaje de callos generados por u.e. lograda en cada explante en el experimento en fotoperíodo	55
5.	Porcentaje de callos generados por u.e. lograda en cada explante en los tres experimentos.-----	60.

INDICE DE CUADROS

No	Descripción	Pag.
1.	Composición del medio básico MS Murashige-Skooge 1962 para el cultivo de tejidos-----	27
2.	Relación de las concentraciones de auxinas-citocininas, utilizadas en el medio MS en la inducción de callo a partir de explantes de hoja, tallo y raíz de Gypsophila-----	28
3.	Combinación de auxinas y citocininas utilizadas en el medio de regeneración de plantas a partir de callos-----	29
4.	Unidades experimentales sebradas, logradas, perdidas explantes sembrados y porcentaje de callo generado en el experimento en obscuridad.--	37
5.	Número de callos generados por tratamiento en el experimento en obscuridad-----	39
6.	Porcentaje de consistencia color, pubescencia, de los callos generados en el experimento en obscuridad-----	42
7.	Promedio de tamaño y peso de los callos más grandes y los callos más pequeños generados en el experimento en la obscuridad-----	43

8.	Unidades experimentales sembradas, logradas, perdidas, explantes sembrados y porcentaje de callo generado en el experimento en obscuridad--	45
9.	Número de callo generado por tratamiento en el experimento de luz constante 24 horas.-----	47
10.	Porcentaje de consistencia, color, pubescencia de los callos generados en el experimento de luz constante 24 horas-----	50
11.	Promedio de tamaño y peso de los callos más grandes y los callos más pequeños generados en el experimento de luz constante las 24 horas.	50
12.	Unidades experimentales sembradas, logradas, perdidas, explantes sembrados y porcentaje de callo generado en el experimento en fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas-obscuridad---	51
13	Número de callo generado por tratamiento en el experimento de fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas obscuridad-----	53
14.	Porcentaje de consistencia, color, pubescencia de los callos generados en el experimento de fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas obscuridad.--	56
15.	Promedio de tamaño y peso de los callos más grandes callos más pequeños generados en el experimento de fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas obscuridad.-----	56
16.	Unidades experimentales logradas en los tres experimentos, obscuridad, luz constante 24 horas y fotoperíodo 12 horas luz 12 horas obscuridad----	58
17.	Unidades experimentales logradas y pérdida en los tres experimentos en cada uno de los explantes--	58
18.	Unidades experimentales logradas, explantes sembrados porcentaje de callo generado en cada explante y en los tres experimentos-----	59
19	Callos generados en cada tratamiento y en cada explante en los tres experimentos-----	61
20.	Porcentaje de consistencia, color, pubescencia de los callos de los tres experimentos-----	62
21.	Promedio de tamaño y peso del callo más grande y el callo más pequeño obtenido en los tres experimentos-----	64

22.	Unidades experimentales y porcentaje de callo subcultivado en la cada explante, en el experimento de luz constante 24 horas-----	65
23.	Porcentaje de regeneración de plantas en los tres experimentos, explantes y tratamientos que indujeron callo y brote-----	67
24	Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos Generados a Partir de Hoja Superior	75
25.	Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos Generados a Partir de Hoja Media --	76
26.	Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos Generados a Partir de Hoja Basal --	77
27.	Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos Generados a Partir de Tallo -----	78
28.	Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos Generados a Partir de Raiz-----	79

Evaluación de la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas de Gypsophila, (Gypsophila paniculata var. Bristol fine), utilizando varios explantes y tratamientos de auxinas-citocininas, en condiciones diferentes de luz.

Auxin and cytokinen treatment in callus induction and plant regeneration of various explants of Gypsophila, (Gypsophila paniculata var. Bristol fine), under different light conditions.

RESUMEN

La micropropagación in vitro es una técnica ampliamente utilizada para la propagación a gran escala de plantas con importancia económica.

Esta investigación tiene el objetivo de lograr la regeneración de plantas a partir de callos provenientes de explantes de raíz, tallo y de las hojas de plantas de Gypsophila, (Gypsophila paniculata var. Bristol fine.).

Gypsophila es una planta ornamental utilizada en Guatemala como flor de corte en jardinería, pero en otras partes de Europa se aprovechan también sus propiedades medicinales. Debido a los usos medicinal y ornamental de esta planta, la demanda de los mercados extranjeros se ha incrementado, así como también los agricultores que se dedican a su producción y posterior exportación.

Los agricultores han logrado disminuir el tiempo de la producción del cultivo al importar plántulas del exterior. Para evitar la importación de este material los agricultores han requerido estudios sobre micropropagación de esta planta y en los trabajos efectuados anteriormente solo se obtuvo 2-3 plantas a partir de meristemas. Sin embargo con esta técnica, se pierden las unidades productivas que generan material valioso para ellos

Con la técnica de inducción de callo y posterior regeneración de plantas a partir de otros explantes, se resuelve el problema de la pérdida de material valioso, y permite además obtener muchas plantas de cada explante. Al evaluar esta técnica se abre un nuevo campo en la micropropagación in vitro, aún no utilizado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

Para lograr un mejor resultado de este trabajo, el estudio se dividió en dos fases; la primera contempló la inducción de callo a partir de explantes de hojas, raíz y tallo, y la segunda fase se orientó a la regeneración de plantas a partir de los callos inducidos en la primera fase, utilizando para las dos fases diferentes concentraciones de auxinas-citocininas. Como cada tipo de explante requiere de condiciones variadas de fotoperíodo para su desarrollo, se hicieron tres experimentos en la primera fase, en donde se colocaron los explantes en tres fotoperíodos diferentes y en la segunda fase se colocaron los callos en dos condiciones diferentes de fotoperíodo

Se llegó a la conclusión de que los explantes hoja, tallo y raíz responden a la inducción de callo en las relaciones de concentración de auxinas-citocininas en el rango de 0.3 mg/l a 5.0 mg/l de 2,4-D y de 0.5 a 0.6 mg/l de BAP.

Los callos inducidos en la primera fase, respondieron a la regeneración de plantas de acuerdo a las combinaciones y concentraciones hormonales utilizadas dentro del rango de 1.0 mg/l a 9.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA.

El fotoperíodo de luz constante las 24 horas fué el más efectivo en la inducción de callo y regeneración de plantas.

Se recomienda para futuros trabajos en la inducción de callo y regeneración de plantas de Gypsophila, utilizar los explantes de hoja superior, media, tallo y raíz y aplicar en ellos antes de sembrar un pretratamiento con inmersiones en soluciones de alcohol al 70% durante 2 minutos y en cloro al 0.75% durante 20 minutos; a esta última solución agregar 3 gotas de Tween 20.

Para la fase de inducción de callo, utilizar los tratamientos: para hoja superior y hoja media, la relación auxina-citocinina (0.5 mg/l 2,4-D--5.0 mg/l BAP). Para tallo (0.3mg/l a 3.0 mg/l de 2,4-D--0.5mg/l a 0.6 mg/l de BAP), y para raíz (3.0 mg/l 2,4-D-0.5 lmg/l BAP).

Para la fase de regeneración de plantas utilizar los tratamientos: para callos generados en la oscuridad provenientes de: tallo (1.0 mg/l de BAP), para hoja media (0.5 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de KIN).

Para callos generados en luz constante provenientes de hoja superior (0.5 mg/l de AIA y 3.0mg/l de BAP); para tallo (0.5 mg/l de AIA y 6.0 mg/l a 9.0 mg/l de BAP).

Para callos generados en fotoperíodo 12/12 provenientes de raíz (0.5 mg/l de AIA y 1.0 mg/l a 6 mg/l de BAP).

Se recomienda establecer un procedimiento de desinfección del explante raíz para eliminar la contaminación del material vegetal y volver a evaluarlos con los mismos tratamientos en la fase de inducción de callo y regeneración de plantas, ya que este explante produjo brotes masivos.

1. Introducción

La micropropagación in vitro es una técnica ampliamente utilizada para propagar plantas cuya propagación sexual o asexual es difícil por las características del material o por que se requiere condiciones ambientales específicas. Esta técnica también es utilizada para la propagación a gran escala de plantas con importancia económica, o bien para obtener cultivos libres de patógenos, mejoramiento genético, bioconversión de productos útiles o metabolitos secundarios, formación de híbridos interespecíficos, conservación e intercambio de germoplasma, etc.

Para que el cultivo in vitro sea efectivo en cada uno de sus aplicaciones es indispensable el desarrollo de varias técnicas específicas de acuerdo a las particularidades ecofisiológicas del cultivo que se trate.

Gipsofilia (Gypsophila paniculata var. Bristol fine), es una planta ornamental y medicinal utilizada en Guatemala y otras partes del mundo como flor de corte en jardinería. En Europa esta planta es muy útil en la farmacología, por lo que su demanda del exterior se ha incrementado al igual que el número de los agricultores que se dedican a su producción y exportación.

Al cultivarse en una forma intensiva la disminución del tiempo de cultivo es un factor que se ha logrado disminuir mediante el uso de plántulas producidas e importadas; estas se cultivan y al final de su desarrollo se exporta el tallo floral y la flor en fresco o en seco.

La respuesta de esta planta al cultivo in vitro ha sido buena, y se ha podido regenerar plantas a partir de meristemos apicales del tallo, pero al utilizar esta técnica, se pierde la unidad productiva; por cada meristemo usado, obteniéndose únicamente 2-3 plantas de cada uno.

La evaluación de otras técnicas de cultivo in vitro; como lo es la regeneración de plantas a partir de callo, que se pueden inducir a partir de explantes de hojas, porciones terminales del tallo y raíz, puede dar otra salida al problema de la pérdida de material valioso, ya que con esta técnica no se sacrifican unidades reproductivas, por otro lado representa una alternativa para la producción de una cantidad considerable de plantas por explante sembrado.

Este estudio permite abrir un nuevo campo en las técnicas de micropropagación aún no utilizadas en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (FAUSAC), y puede dar alternativas en cultivos que no pueden ser propagados por meristemos.

Esta investigación tiene el objetivo de lograr la regeneración de plantas a partir de callos provenientes de explantes de las porciones terminales de raíz, tallo y las partes basales, medias y superiores de hojas de una planta que se encuentra al final de su desarrollo vegetativo. El estudio contempló dos fases principales; la primera referente a la inducción de callo a partir de los explantes y la segunda fase contempló la regeneración de plantas a partir de los callos inducidos en la primera fase. Para las dos fases se utilizó como medio de cultivo, el medio de Murashige-Skooge 1962, con diferentes combinaciones de concentraciones de

auxinas-citocininas.

Debido a que cada explante utilizado requiere de condiciones especiales de luz-obscuridad tanto para la inducción de callo, como para la regeneración de plantas, el trabajo presenta experimentos en obscuridad, luz y fotoperíodo en la fase de inducción de callo, y luz y fotoperíodo en la fase de regeneración de plantas.

Las variables de respuesta tanto de la fase de inducción de callo como de la fase de regeneración de plantas se analizaron usando estadísticos que permiten relacionar los datos obtenidos con los conceptos teóricos sobre micropropagación, descartando un diseño experimental, por lo complejo del montaje y análisis de los datos, debido al número de factores estudiados: fotoperíodo, explante, concentración hormonal, inducción de callo, regeneración de plantas, a la vez limitaría el análisis de otras variables obsevasadas en el transcurso del experimento.

El experimento se efectuó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de FAUSAC, perteneciente al área tecnológica, subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas.

2. Definición del Problema

Gipsofila es una planta ornamental y medicinal usada fundamentalmente en Guatemala como flor de corte para arreglos florales y jardinería. A pesar de que en Europa esta planta es muy requerida por sus propiedades medicinales, debido a que de sus tallos y raíces se extrae un compuesto químico llamado saponina, muy útil en farmacología. Los agricultores guatemaltecos que se dedican a su reproducción y exportación, importan la plántula producida bajo condiciones específicas de invernadero, que para una producción a gran escala representa inversiones de muchos recursos físicos y humanos.

La micropropagación de este material se inició en 1992 en FAUSAC utilizando la técnica de cultivo de meristemas, logrando regenerar 2-3 plantas por meristemo. Sin embargo con esta técnica se pierde una unidad reproductiva por meristemo utilizado, lo que representa pérdidas para los agricultores que importan la plántula para su posterior exportación.

El implementar otra técnica de micropropagación a través de la cual se pueda obtener mayor cantidad de plantas a partir de explantes provenientes de órganos vegetales que no sacrifiquen material valioso para el agricultor, como lo son las hojas, tallos y raíces, puede contribuir a generar mayor cantidad de plantas sin pérdidas.

A través de la inducción de callo se puede obtener una gran cantidad de células que en un período corto puede generar una gran cantidad de plantas iguales a la planta madre, de la cual se obtuvo el material.

3. Marco Teórico

3.1 Marco Conceptual:

3.1.1 Características Generales de Gipsofilia (Gypsophila sp.):

Esta planta pertenece a la familia Caryophyllaceae, es anual y existe alrededor de 140 especies distribuidas en Estados Unidos, Asia, Norte de Africa fundamentalmente (2). Esta familia posee alrededor de 80 géneros y un número aproximado de 2,000 especies. Se subdivide en tres subfamilias; alsinoideae, silenoideae, y paronychiodeae; gipsofilia pertenece a la subfamilia silenoideae, conjuntamente con otros géneros como silene, melandrium, dianthus, agrostema etc.

Heywood 1985, menciona que cada uno de estos géneros son bien distinguidos y ampliamente reconocibles; sin embargo dentro de cada género el reconocimiento taxonómico es difícil y controversial (8).

Gipsofilia se desarrolla bien en climas cálidos, templados y fríos en alturas que oscilan entre los 2,000 y los 9,000 pies, con temperaturas de 15°C a 25°C. Esta planta se desarrolla en suelos arcillosos con buen contenido de materia orgánica y con un pH de 6.0 a 7.0 (5).

3.1.2 Anatomía y Morfología del Cultivo:

Gipsofilia es una planta que alcanza los 60 cms. de altura. Germina a los 10 días con un porcentaje de germinación de aproximadamente 60%, aunque en condiciones controladas se logra un 70% de germinación (5).

Posee rizomas que se ramifican y se extienden por el suelo, de cada extensión se forman brotes generativos o vegetativos. El tallo posee vellocidades y es ramificado en su parte apical; el largo de entrenudos es de 3.4 cms. Los nudos son rojos o verdes.

Las hojas son elípticas y pueden encontrarse de forma ovalada o lanceolada, el ápice es puntiagudo. Posee tres nervaduras principales, y sus márgenes son ásperos. Cada hoja mide de 7 a 10 cms. de largo y de 2-3 cms. de ancho, tienen poca vellocidad y son de color verde tenue a verde oscuro.

Las flores son agradables, pequeñas y numerosas, se disponen en estructuras llamadas cabezuelas, pueden presentarse en la parte terminal o lateral del tallo, pero se concentran más en la parte apical del mismo. Cada caliz presenta cinco dientes y generalmente está unido, es de color verde o rojo. Posee 5 brácteas, 5 pétalos, 10 estambres, 2-3 estilos y el ovario posee muchos óvulos, las corolas tienen colores de rosado fuerte a blanco, (2,7,).

Las semillas tienen forma de riñón, se encuentran dentro de una cápsula de 1 cámara. Las semillas miden aproximadamente de 1.8 a 2.2 mm de largo, 1.5-2 mm de ancho y .7 mm de altura; son fuertemente aplanadas y poseen abultamientos, son de color negro como (7).

3.1.3 Propagación:

Es posible su propagación por semilla, necesitando 8, 10 hasta 15 Kg/Ha., a una distancia de siembra de 50x40 cms. La propagación por semilla tiene mayores resultados si se utilizan semilleros.

Para la producción a nivel comercial es mejor la propagación por rizomas (7).

Para la propagación vegetativa se pueden separar de las raíces los rizomas, los cuales serán los que se propagarán(7). Se puede propagar vegetativamente también por injerto, utilizando como patrón plantas cultivadas a la interperie; las púas se toman de ramas de 8-10 cms. producidas de planas en macetas, después de un mes de colocadas en el invernadero. Del patrón se tomarán las raíces las cuales se cortarán 3 cms. abajo de la corona. En la parte superior de la raíz se injerta la púa y se amarra (6).

3.1.4 Usos de Gipsofilia:

Gipsofilia es una planta ornamental de gran utilidad en jardines por su porte decorativo, por lo que es muy usada en mercados de flores, floristerías etc. (5). Tanto gipsofilia como otros géneros de Caryophyllaceae como Dianthus, Saponaria, son cultivados en jardines en diversas formas y se han especializado en los mercados como flor de corte (8).

Gipsofilia también se encuentra dentro de la farmacopea europea ya que tanto su parte foliar como su raíz son utilizadas ampliamente en la industria farmacéutica (11). De su raíz se extrae la droga cuyo nombre comercial es Radix Saponariae Albae; y de la parte foliar la droga utilizada es Hierba Saponariae (7).

(Gypsophila paniculata L) y (Gypsophila arrosti Guess.) poseen de 6 a 30% de saponinas siendo el componente fitoquímico más importante los saponinoglicósidos de los cuales el que se encuentra

en mayor concentración es el compuesto llamado Gypsosid (15).

3.1.5 Historia de la Micropropagación:

La técnica de generar plantas nuevas en un medio de crecimiento artificial y en condiciones asépticas, se inició con investigaciones sobre fisiología vegetal. Así mismo estas invstigaciones tomaron auge cuando Sacks en 1860 y Knops 1861 observaron que los principales nutrientes de las plantas eran compuesos orgánicos, para lo cual prepararon una solución que contenía una mezcla de ellos; esta mezcla se utilizó posteriormente por casi todos los investigadores que siguen este campo de estudio. En 1878 Vockting aportó más información a este campo al estudiar el comportamiento de la formación de nuevas yemas y raíces, o de yemas axilares las cuales se colocaron en una cámara al vacío, (9).

Haberland en 1902 aisló y cultivó tejido vegetal, utilizando asepsia (6), mientras que Kotte en 1922 cultivó conjuntamente con Haberland ápices radiculares de chícharo y maíz, utilizando medio enriquecido con sales ogánicas, glucosa, peptona y varios aminoácidos. Robinson por su parte suplementó este medio agregando glucosa, agar y sales inorgánicas, (9).

Para los años 1934-1939 White cultivó in vitro raíces de tomate y agregó al medio extractos de levadura y vitaminas y conjuntamente con otros colaboradores, Gautheret y Nobecout indujeron el crecimiento de callo en un medio sintético (6).

En la década de los 50-60 Skoog identifica la cinetina y reconoce su función como regulador en la iniciación de la división

celular. En 1962 Murashige y White desarrollan un medio nutritivo con el que logran crecimiento rápido de tejido en tabaco. Este medio es ampliamente utilizado en cultivo in vitro (9).

Después de estos descubrimientos y avances en las investigaciones de cultivo de tejidos, se han llevado a cabo innumerables trabajos aplicando diferentes técnicas de cultivo in vitro, en muchas especies de plantas y utilizando diversos explantes. Todos estos trabajos se han orientados más que todo a la citología, fusión de protoplastos, fitomejoramiento, propagación, mutagénesis, formación de híbridos interespecíficos etc.

3.1.6 Fases de la Micropropagación:

Existen tres pasos importantes, que deben tomarse en cuenta en la micropropagación, según lo propuesto por Murashige en 1974.

3.1.6.1 Asepsia del cultivo:

Los medios de cultivos pueden provocar la proliferación de microorganismos en donde pueden crecer y desarrollarse compitiendo con el cultivo, es por eso que es necesario que todos los explantes estén debidamente limpios y desinfectados. Las sustancias más comunes para desinfectar los explantes son: el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloruro de mercurio, el cloro comercial, alcohol en diferentes concentraciones (12,13,16).

3.1.6.2 Multiplicación:

En esta etapa sucede la formación de nuevas células por división, o por aumento en tamaño. Esta etapa esta influenciada por las condiciones in vitro y la ganancia en peso seco y da como resultado la diferenciación de novo.

3.1.6.3 Enraizamiento de brotes y transplante:

Para que se de esta etapa, se debe trasladar el cultivo a otro medio con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. La última etapa de la micropropagación es el período de endurecimiento o aclimatación en la cual la planta deberá colocarse en condiciones normales para su desarrollo total. Para lograr esta fase se deberá lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que pudieran quedar en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas a las cuales se le abrirán agujeros para irlas aclimatando poco a poco a su nuevo habitat.

3.1.7 Factores que Influyen en la Micropropagación:

3.1.7.1 Explante:

La elección de explante dependerá del estudio a realizar y la especie vegetal analizada. Para la inducción de callo, muchas partes de la planta pueden ser utilizadas, ya que éstas poseen numerosas células que permiten la proliferación callosa. En otros casos, pueden influir otros factores como, disponibilidad del

material, fácil manipuleo, homogeneidad, poca contaminación, rápida respuesta in vitro etc. (13)

3.1.7.2 Medio de Cultivo :

Casi todos los medios de cultivo utilizados hasta la fecha contienen entre 15-35 compuestos que los podemos agrupar dependiendo de su naturaleza química:

A: Sales Inorgánicas, generalmente se incluyen mezcla de macros y micronutrientes.

B: Compuestos Orgánicos, agrupados en carbohidratos de los cuales la sacarosa es la más utilizada; las hormonas que permiten aumento y crecimiento celular, las más utilizadas son las auxinas, las citocininas; las vitaminas de las cuales la única que ha respondido exitosamente es la tiamina; y por último los aminoácidos, el inositol para complementar el medio.

C: Complejos Naturales, los más utilizados es la pulpa de plátano, agua de coco, emulsión de pescado, jugo de naranja, extracto de malta, hidrolizado proteico (caseína), jugo de tomate, extracto de levadura etc.

D: Materiales Inertes, el agar es el más utilizado pues proporciona un medio de soporte excelente para el inóculo. Otros medios se pueden formar con otros compuestos como la poliacrilamida y la silicagel. Cuando el medio es líquido se utiliza papel filtro como soporte (9).

3.1.7.3 Factores Físicos:

Entre los de mayor importancia están la luz y la temperatura, ya que estos contribuyen al desarrollo de los cultivos. La luz juega un papel decisivo en lograr la organogénesis debido a la acumulación de almidón en las células, durante la fotosíntesis. Berrios y Villalobos señalan que la luz en algunos procesos como diferenciación, involucran fotoperíodo que afecta la formación de yemas, período cortos o largos de luz reducen la diferenciación de yemas. El fotoperíodo puede estar influenciado por cambios internos hormonales (auxinas-citocininas). Se encontró que la intensidad lumínica afectaba el tipo de crecimiento del explante, así se asocia la producción de fenoles con la inhibición del crecimiento de callo con intensidades de luz alta. Por último la longitud de onda es crucial para el cultivo in vitro ya que los pigmentos asociados con la fotosíntesis tienen sus espectros de absorción en las longitudes de onda de rojo y azul, de ello proviene la diversidad de lámparas con luces apropiadas para el cultivo in vitro (3).

3.1.8 Cultivo de Hojas:

El cultivo de órganos, cualquiera que éste sea, tiene por finalidad reproducir órganos con una estructura morfo y fisiológicamente organizada. Steeves y Sunex iniciaron las investigaciones de cultivo in vitro utilizando primordios de hojas. La mayoría de estudios utilizando hojas como explantes han dado buenos resultados cuando se emplean primordios de hojas, por ejemplo

con helecho canela (Osmunda cinnamonea), girasol (Helianthus sp), tabaco (Nicotiana sp).

Los primordios de hojas requieren de un medio nutritivo muy simple para completar su desarrollo, utilizando para ello un medio rico en sales minerales y una fuente de carbohidratos que generalmente es la sacarosa al 2% o 3%. El agar se ha utilizado para cultivar primordios grandes, los pequeños generalmente se han cultivado en medio líquido.

Las hojas se cultivan en luz, con un ciclo de luz-obscuro. Hurtado y Merino en 1988 reportan que en el cultivo de hojas, las mismas poseen una forma típica desde el inicio de la fase, hasta que logran su desarrollo, pero que en el transcurso del proceso se observa disminución de tamaño y reducción en el número de células (9).

Street en 1976 observó en explantes de un grupo de células que estimulaban la división de células adyacentes. Las células de la periferia crecen más lentamente, pues las del centro toman nutrientes de ellas y les restan potencialidad para dividirse (12).

3.1.9 Cultivo de Raíces:

Kotte y Robinson fueron los pioneros de esta técnica, ya que en 1922 reportaron crecimiento limitado de los ápices provenientes de raíces de plántulas de trigo (Triticum sativum). White en 1934 cultivó ápices aislados de raíz de tomate (Lycopersicon esculentum) por un tiempo indefinido y utilizando un medio líquido (9).

Las contribuciones que se han obtenido del cultivo de raíz se

han inclinado en nuevos descubrimientos a la fisiología vegetal, por lo que se conoce ahora más sobre el metabolismo de los carbohidratos, el papel de iones minerales, vitaminas y hormonas en lo que se refiere al crecimiento vegetal y en los procesos de diferenciación y desarrollo de raíces.

3.1.10 Cultivo de Callo:

El cultivo de callo fué iniciado por Nobecourt, Gautheret y White, que en 1939 observaron proliferación de masas de tejido desorganizado derivado de raíces de zanahoria, y del procambium del tallo de tabaco (Nicotiana sp.). Estos callos se mantuvieron indefinidamente en un medio de cultivo adicionado con vitaminas y sacarosa.

La inducción de callo puede suceder cuando una porción del vegetal (hoja, raíz, polen, embriones, semillas) estéril, se coloca en un medio de cultivo, con la finalidad de que se induzca y se mantenga un crecimiento y una división celular continua. Es recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo, sin embargo se han obtenido buenos resultados al utilizar plantas maduras.

Hurtado y Merino 1988, define el callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, éstos posteriormente sufren desdiferenciación celular formando una masa amorfa, debido al crecimiento acelerado y desorganizado que presentan (9).

En las investigaciones realizadas, utilizando esta técnica se

ha observado prácticamente dos grupos de callos, los llamados compactos, cuyas células se encuentran fuertemente unidas; y los callos friables que tienen tejido más esponjosos y muchos espacios intercelulares (9,1).

También se ha observado diversidad en la coloración de los mismos que oscila entre los callos sin pigmentación hasta callos de diferentes tonalidades de verde, amarillo, café o rojo. éste fenómeno es ocasionado por factores tanto nutricionales como ambientales (1).

El callo se caracteriza por la totipotencialidad de las células que lo forman; debido a que éstas pueden producir brotes, raíces, embriones y hasta plantas, si son colocadas en un medio nutritivo adecuado y buenas condiciones ambientales.

Sin embargo el cultivo de callo trae como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados; generalmente se presenta la variación epigenética (cambio en la regulación de la expresión de los genes, es una variación dirigida, estable a nivel celular, potencialmente reversible, y restringido al potencial genético de la célula) (16).

3.1.11 * Regeneración de Plantas en cultivo de Tejidos:

La regeneración de plantas que se cultivan in vitro, se pueden lograr mediante dos caminos: directamente de los explantes y a partir de callos. Se puede generar plantas a través de la organogénesis que incluye el desarrollo de yemas o meristemas radicales a partir de explantes directamente o bien a partir de

callo; también se puede generar planta a partir de embriogénesis somática, o sea la producción de embriones a partir de células que no derivan de fusión de gametos (12).

Existe un factor muy importante en la regeneración de la planta a partir de callos, y ésta es la del fenómeno de habituación, en el cual los callos que se mantienen en condiciones indiferenciados por largos períodos, limitan su capacidad morfogénica (12).

3.1.12 Reguladores del Crecimiento:

El crecimiento de las plantas está controlado por procesos fisiológicos que a su vez se manejan por la intervención de varios compuestos orgánicos llamados hormonas que se producen en el interior del vegetal.

En las últimas décadas se han preparado compuestos orgánicos sintéticos con efectos reguladores en los distintos procesos fisiológicos. A estos compuestos se les ha llamado "Reguladores del crecimiento", los que han sido utilizados en propagación de plantas.

En el campo de la propagación in vitro, también se utilizan los reguladores del crecimiento, fundamentalmente los denominados promotores del crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas).

La función biológica de las auxinas se orienta a la expansión de las células de tallo y coleóptilos, también cumplen funciones de división celular y fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden posteriormente crecimiento radiculares. También se ha

utilizado para la iniciación de raíces de varias especies vegetales. Una de las teorías de la acción de las auxinas, indica que las auxinas aumentan la plasticidad de las paredes celulares (Heyn 1931), al aumentar la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de ésta alrededor de la célula, y la presión de turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar, hace que el agua entre a las células, provocando su expansión. (17). Las funciones fundamentales de las citocininas son: provocar la división celular, y la regulación de la diferenciación de los cultivos. Estas dos hormonas interactúan y dan como resultado expresiones diferentes de crecimiento (17).

En el campo de la propagación in vitro, se utilizan ampliamente los reguladores de crecimiento. Para Evans 1981, citado por Litz, los sistemas embriogénicos requieren para la inducción de sus embriones concentraciones altas de auxinas siendo las más utilizadas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) o bien AIA (ácido indolacético). Para la organogénesis en la cual se induce la formación de callo se utilizan diferentes relaciones de concentración de auxinas-citocininas prefiriendo mayores concentraciones de auxinas (12).

Las auxinas son utilizadas en la propagación in vitro para provocar agrandamiento y alargamiento celular y para promover la división celular. Los compuestos más utilizados son 2,4-D, ANA (ácido naftalenacético) y el AIB (ácido indolbútfirico). En general el AIB se utiliza en concentraciones que varían entre 0.001 a 10 mg/L con un punto óptimo de 0.1 a 10 mg/L; 2,4-D por su parte se

utiliza en concentraciones que oscilan entre 0.1 a 10 mg/L siendo su punto óptimo de 1 a 5 mg/L; ANA generalmente se ha utilizado en concentraciones que varían entre 1 a 10 mg/L.

En relación a las citocininas la más utilizada es la KIN (6-furfuril-aminopurina), pero se ha demostrado que existen otras sustancias sintéticas que cumplen la misma actividad biológica que KIN, como lo son SEA y BAP, las cuales se consideran más potentes que la primera. BAP (6-bencilamino purina) es la más utilizada por su disposición en el mercado y bajo costo. ZEA (6(4-hidroxi-e-meil but-trans-2-erilamino)purina) se considera 10 veces más potente que KIN, pero es difícil su obtención en el mercado. BAP tiene su punto óptimo en cuanto a la concentración más utilizada de 0.1 a 2 mg/L, similar a la de KIN.

3.2 Marco Referencial:

3.2.1 Origen del Material Experimental:

El material foliar de gipsofilia que fué utilizado en este estudio se encuentra establecido en la Finca Manuela de San José Pinula, Guatemala. De acuerdo a la clasificación de suelos dada por Simons et al, los suelos de esta región pertenecen a la clase PL Pinula, se desarrollan sobre suelos volcánicos, tienen características de relieve escarpado, buen drenaje, suelos de color café obscuro, textura franco limosa, profundidad de 20-30 m, declive de 20-40% (11).

Esta región está ubicada en la zona de vida Bosque Húmedo Montano Bajo Subtropical, (bhMB) con un clima templado moderado húmedo con invierno benigno, lluvias de mayo a octubre. La temperatura media anual es de 18°C con una máxima absoluta de 25° C y una mínima de 9°C. La precipitación media anual para esta zona es de 1,200 mm y una evapotranspiración de 075. (4)

3.2.1 Estudios realizados sobre inducción de callo a partir de explantes de hojas:

Raju et al. en 1970 presentó trabajos realizados a partir de discos de hojas de Echeverria elegans, y demostró que los tejidos maduros, los parcialmente maduros y los inmaduros producían a través de esta técnica, raíces y brotes (9).

Pierik et al. en 1974 avanzó en las investigaciones e indujo la formación de callos a partir de tejidos inmaduros. Merino en 1988 por su parte presenta la metodología para inducir

organogénesis a partir de explantes de hojas de violeta africana (Saintpaulia ionatha)

En 1987 Berrios y Berthouilly logran inducir embriogénesis somática a partir de lámina foliar en café (Coffea arábica).

Mroginski, Roca reportan especies que han generado plantas a partir de callos, los cuales se indujeron de diferentes explantes, son ellas: tabaco, Nicotiana tabacum, zanahoria Daucus carota , cebada Medicago sativa, trébol Trifolium repens, etc.

Sin embargo no todas las especies responden favorablemente a la regeneración de plantas a partir de callo, como es el caso del mani Arachis hypogae, que no todos los explantes que producen callo generan callo; o por ejemplo, la soya Glycine max que tiene gran facilidad de obtener callos por cultivo de diferentes explantes, pero la regeneración se limita al uso de meristemos apicales caulinares o laterales. Igual comportamiento presenta el frijol, Phaseolus vulgaris, o la yuca Manihot esculenta etc. (13)

3.2.2 Trabajos realizados en el cultivo de Gipsofilia:

En el laboratorio de cultivo de tejidos de FAUSAC se efectuaron ensayos en Gipsofilia. En 1992 se logró la inducción de callo a partir de meristemos apicales, para lo cual se utilizó un medio MS (Murashige y Skooge) suplementado con 1 mg/l de IIA, 1 mg/l de kinetina, sucrosa 3%, agar 0.8% a un pH 5.8. Los callos fueron transferidos a un medio de enraizamiento MS suplementado con 100 mg/l de IBA, 0.4 mg/l de niacina, azúcar 3% y agar 0.8%. De este cultivo se obtuvo la regeneración de plantas.

4. Objetivos

- 4.1 Evaluar la respuesta a la inducción de callo a partir de explantes de hoja basal, media, superior, tallo y raiz; utilizando diferentes relaciones de concentración de auxinas-citocininas, en condiciones de obscuridad, luz y fotoperíodo.
- 4.2 Evaluar la respuesta a la regeneración de plantas a partir de callos provenientes de los explantes de hoja, tallo y raiz, utilizando diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas-citocininas, en condiciones de luz y fotoperíodo.

5. Hipótesis

Los explantes de hoja, tallo y raiz responden a la inducción de callo y regeneración de planta.

6. Metodología

6.1 Area Experimental:

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de FAUSAC, el cual pertenece al Área Tecnológica, Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas.

6.2 Etapas de Estudio:

6.2.1 Primera Etapa:

En esta etapa se evaluó la respuesta de los explantes de hoja, tallo y raíz a la inducción de callo. Debido a las necesidades de cada explante para inducir callo, se montaron 3 experimentos:

1. explantes colocados en un fotoperiodo de 24 horas de oscuridad.
2. explantes colocados en un fotoperiodo de 24 horas de luz.
3. explantes colocados en fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

6.2.2 Segunda Etapa:

Se evaluó la respuesta a la regeneración de plantas en los callos provenientes de la primera etapa. Los callos que en la primera etapa fueron sometidos a oscuridad, fueron transferidos a condiciones de luz constante las 24 horas. Los callos que en la primera etapa fueron sometidos a luz constante 24 horas, y fotoperíodo, fueron colocados en la segunda etapa en las mismas condiciones de luz.

6.3 Definición de los Tratamientos:

6.3.1 Medio de Cultivo:

Primera Etapa: Se utilizó para la inducción de callo el medio de sales minerales de Murashige y Skooge 1962, suplementado con vitaminas. La composición del medio se muestra en el cuadro 1. Se utilizaron 6 concentraciones hormonales de auxinas-citocininas para el experimento de obscuridad, y 5 concentraciones hormonales para los experimentos de luz y fotoperíodo. Cuadro 2.

Segunda Etapa: Para la regeneración de plantas a partir de callos, se utilizó el medio de Murashige Skooge 1962 vitaminas y 5 combinaciones hormonales auxinas (AIA, ANA) -citocininas (BAP-KIN) para el experimento de la obscuridad, y 5 relaciones de concentración auxinas (AIA) - citocininas (BAP) en los experimentos de luz y fotoperíodo. La combinación de hormonas y las concentraciones utilizadas se muestran en el cuadro 3.

6.3.2 Material Vegetal:

Se analizaron los explantes siguientes: ápices de raíz y tallo; hoja en posiciones basal, media y superior de la planta, cuando ésta terminó la fase de su desarrollo vegetativo.

6.3.3 Reguladores del Crecimiento:

Primera Etapa: Se utilizaron en esta etapa las hormonas siguientes: auxinas: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y como citocinina BAP (Bencil-amino purina) en diferentes relaciones. Cuadro 2.

Segunda Etapa: Se utilizaron en esta etapa las combinaciones de

Cuadro 1. Composición del medio basal de Murashige-Skooge 1962 para el cultivo in vitro de tejidos.

COMPONENTES	CONTENIDO DEL MEDIO MS (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650.00
KNO ₃	1900.00
KH ₂ PO ₄	170.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .7H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA	37.30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Glicina	2.00
Tiamina-HCl	0.10
Piridoxina-HCl	0.50
Acido Nictinico	0.50
Mioinositol	100.00
Sacarosa	30,000.00
pH	5.7

FUENTE: Mroginski *et al.* 1991.

auxinas (AIA,ANA) y citocininas (BAP,KIN) de 0.5 mg/l a 1.0 mg/l para la fase de la oscuridad. Para la fase de luz 24 horas y fotoperíodo 12/12 se utilizó diferentes concentraciones de BAP (1.0 mg/l, 3mg/l, 6 mg/l, 9.0 mg/l) con AIA 0.5 mg/l. Cuadro 3.

Cuadro 2.

Relación de las concentraciones de auxinas-citocininas, utilizadas en el medio MS= Murashige-Skooge 1962, en la inducción de callo a partir de explantes de hoja, tallo, raiz, en Gipsofilia.

C O N C E T R A C I O N		R E L A C I O N
2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	
5.0	0.5	10:1
3.0	0.5	6:1
0.5	0.5	1:1
0.5	3.0	1:6
0.5	5.0	1:10

6.4.2 Unidad Experimental:

Primera Etapa: Para la inducción de callo la unidad experimental la constituyó un frasco de 100 ml con 4 explantes cada uno. A cada frasco se le agregó 20 ml del medio de cultivo.

Segunda Etapa: Para la regeneración de plantas, la unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 16x25 mm al cual se le agregó 10 ml del medio de cultivo, colocándo un callo por tubo.

Cuadro 3. Combinación de auxinas-citocininas utilizadas en el medio de regeneración de plantas a partir de callos de Gipsofilia.

MEDIO BASAL	COMBINACION Y CONCENTRACIONES DE AUXINAS-CITOCININAS (mg/l) PARA LA INDUCCION DE CALLO.				
	OBSCURIDAD		LUZ Y FOTOPERIODO		
	AIA.-ANA	BAP-KIN	BAP	AIA	
MURASHIGE Y SKOOGÉ	A.	--	1.0	1.0	0.5
	B.	0.5	1.0	3.0	0.5
	C.	0.5	1.0	6.0	0.5
	D.	0.5	1.0	9.0	0.5
	E.	0.5	1.0		

6.5 Manejo del Experimento:

6.5.1 Desinfección de los Explantes:

Para la desinfección de los explantes se siguieron dos metodologías, una en la fase de inducción de callo en condiciones de obscuridad, y la segunda utilizada tanto en la fase de luz constante como de fotoperíodo.

Primera metodología de desinfección:

Se eliminó el exceso de tierra y cualquier otro material que estuviera presente en las hojas, tallo o raíz con abundante agua. Posteriormente se sumergió el material vegetal en una solución de alcohol al 70 % por espacio de 1 minuto; se lavó el material una vez con agua destilada y se colocó en una solución de cloro al 0.75

% durante 15 minutos. En la cámara de flujo laminar se lavó tres veces con agua esteril antes de proceder a cortar los explantes y sembrarlos en el medio de cultivo.

Segunda metodología de desinfección:

Todo el material vegetal (hojas, tallo y raíz) se lavó con agua y jabón en abundancia, para eliminar el exceso de tierra y otros elementos que pudieran estar presentes. Se colocó el material ya lavado en una solución de alcohol al 70 % durante 2 minutos, se lavó con agua destilada. Enseguida se colocó el material vegetal en una solución de cloro al 0.75 % durante 20 minutos. A esta solución se le agregó 3 gotas de Tween 20, y al final del tiempo se lavó tres veces con agua esteril adentro de la cámara de flujo laminar, antes de ser sembrados en los medios de cultivo.

6.5.2 Preparación y Siembra de los Explantes:

Explantes Foliare: Los explantes foliars se cortaron en segmentos de 0.5 cm² y se les eliminó la epidermis del envéz; sobre este lado se sembraron en el medio de cultivo (9).

Explantes de Tallo: Se cortaron tallos terminales de las plantas de gipsofilia, éstos median aproximadamente 5 cms. de largo. Los tallos se desinfectaron según lo señalado en la sección 7.5.1. Posteriormente en la cámara de flujo laminar, cada tallo terminal se cortó en segmentos de 0.5 cms. y se eliminó la epidermis. Cada nuevo segmento se cortó diagonalmente en dos secciones; cada

sección se colocó sobre el medio de cultivo con el cambium hacia arriba (12).

Explantes de Raiz: Se cortaron porciones de raiz del extremo terminal, de aproximadamente 5 cms. de largo, éstos se desinfectaron según lo señalado en la sección 7.5.1. En la cámara de flujo laminar se cortaron en segmentos más pequeños, los cuales se sembraron sobre el medio de cultivo del lado del corte transversal.

6.5.3 Condiciones del Explante:

Se montaron tres experimentos en condiciones de luz-obscuridad diferentes.

1. Condiciones de total obscuridad: todos los explantes después de ser desinfectados y sembrados se colocaron en una incubadora sin luz, a 25°C, durante 8 días, posteriormente fueron trasladados a una estantería con luz constante las 24 horas, por un período de 15 días.
2. Condiciones de luz las 24 horas: los explantes después de su desinfección y siembra se colocaron en estanterías en un cuarto de crecimiento con luz blanca que proporciona aproximadamente 2,500 lux las 24 horas durante 20 días.
3. Condiciones de fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad: los explantes después de desinfectados y sembrados fueron colocados en una incubadora a 25°C con luz blanca que proporciona aproximadamente 2,500 lux.

6.6 Variables de Respuesta:

6.6.1 Etapa de Inducción de Callo:

Las variables de respuesta evaluadas fueron: a. número total de callos inducidos en cada tratamiento, b. consistencia de los callos (friables y duros), c. color de los callos (verdes, café, blancos), d. peso promedio de los callos por tratamiento, e. peso del callo más grande y más pequeño, f. tamaño promedio de los callos por tratamiento, g. tamaño del callo más grande y más pequeño; h. unidad experimental sin contaminación. El promedio de tamaño y peso de los callos por tratamiento se obtuvo, tomando el callo más grande y callo más pequeño obtenido entre las cinco unidades experimentales que constituía cada tratamiento.

6.6.2 Etapa de Regeneración de Plantas:

Se evaluaron las variables: a. unidades experimentales sin contaminación del subcultivo, b. tratamientos que regeneraron brotes o, c. cantidad de brotes por callo.

Los pasos a seguir desde la obtención de los explantes hasta la regeneración de plantas de (Gypsophila sp.) se muestran en la Fig. 1/

6.6.3 Análisis de la Información:

Dado la complejidad de las variables y los factores que interactúan en los experimentos, la interpretación de los datos se hizo mediante un análisis descriptivo, usando estadísticos y basado en conceptos teóricos relacionados con el tema. Descartando un

diseño experimental, debido a lo complejo del montaje del experimento y análisis de los datos, al número de factores estudiados: fotoperiodo, explante, relación hormonal, inducción de callo, regeneración de plantas, a la vez limitaría el análisis de otras variables observadas en el transcurso del experimento.

FIGURA 1. Fases de la Micropropagación de (Gypsophila sp.)

ETAPAS	DESINFECCION PREPARACION DEL MATEIAL	SIEMBRA	INDUCCION DE CALLO	REGENERACION DE PLANTAS
DIAS	1	1	8-20	20-30
DESINFECCION	Alcohol 70% 1-2 minutos. Cloro 0.75% 15-20 seg.			
UNIDAD EXPERIMENTAL			Frasco 150 ml (4 explantes c/u) (400 u.e.)	tubo de ensayo 1 callo (645 u.e)
TRATAMIENTOS			MS+ 2.4-D y BAP	MS+ KIN-ANA KIN AIA P-ANA BAP-AIA

7. Resultados y Discusión

7.1 Fase de Inducción de Callo:

Los resultados y su discusión se presentan en tres fases de acuerdo al tratamiento de luz al que fueron sometidos los explantes. Se hace enseguida una discusión de los resultados finales del comportamiento de los explantes a la inducción de callo en los tres experimentos.

7.1.1 Experimento en la oscuridad:

7.1.1.1 Desinfección del material:

De las 150 unidades experimentales (u.e.) que contituyeron el experimento, 49 de ellas o sea el 32.66%, lograron generar callo, el resto sufrió contaminación, debido a que algunos órganos del vegetal traen consigo restos de suelo y otros materiales que pueden contaminar el medio de cultivo, y porque la metodología de desinfección fue insuficiente para controlar dicha contaminación.

El mejor explante fué hoja superior ya que generó 89 callos de 23 u.e. logradas, la poca contaminación observada en hoja superior se debió a que el tipo de explante, o sea los primordios foliares se encuentran protegidos por hojas externas de mayor tamaño.

El resto de explantes perdieron más de 15 u.e., más aún raíz que perdió el 100% de ellas, lo que sugiere que el tratamiento dado a los materiales, no fué el suficiente, y que es necesario darles un pretratamiento adecuado a los materiales antes de la siembra, por ejemplo ampliar el tiempo de remojo en alcohol y cloro o lavar con agua y jabón en abundancia, o bien en casos extremos

dejar los materiales inmersos en soluciones fungicidas por horas.

El explante raíz por el tipo de estructura utilizada para inducir callo, o sea los ápices radiculares, sufrieron mucha contaminación, debido a que éstos se encuentran muy profundos, lo que impide un poco su extracción, con el riesgo de dañarlos. Otro factor es que por estar en contacto con la tierra, poseen excesivos microorganismos, que rápidamente proliferan en el medio nutritivo, Cuadro 4., Figura 2.

7.1.1.2 Regeneración de Callo:

De los 600 explantes sembrados en la 150 u.e., únicamente 178, 29.66% de ellos generaron callo, esto debido a la contaminación de algunos explantes. Hoja superior y hoja media tienen los más altos porcentajes de regeneración de callo dentro de sus u.e. logradas. A pesar de que hoja media tiene un 100% de inducción de callo éste explante logro únicamente 9 u.e., mientras que hoja superior logró 23 u.e, por lo que se considera más significativo el análisis en hoja superior.

Los explantes de raíz, tallo y hoja basal debido a la contaminación, presentaron % más bajos que los dos explantes anteriores, lo que no permitió hacer un análisis más efectivo, sin embargo con los callos obtenidos de las u.e logradas, se puede inferir que al controlar la contaminación es factible la inducción de buen porcentaje de callo. Cuadro 4, Figura 2.

7.1.1.3 Callos generados por tratamiento:

Para los explantes de hoja, los mejores tratamientos fueron el equivalente a (3.0 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP); y (0.5 mg/l de 2,4-D y 5.0 mg/l de BAP), respectivamente.

Cuadro 4 Unidades experimentales sembradas, logradas, perdidas, explantes sembrados y porcentaje de callo generado, en el experimento en obscuridad.

EXPLANTES	u.e sembrada	u.e lograda	u.e perdida	explante sembrado	explante sembrado por u.e lograda	callos generados por u.e lograda	% callo generado por u.e lograda
HOJA SUPERIOR	30	23	7	120	92	89	96.7
HOJA MEDIA	30	9	21	120	36	36	100.0
HOJA BASAL	30	13	17	120	52	40	76.9
RAIZ	30	0	30	120	0	0	0
TALLO	30	4	26	120	16	13	81.2
TOTAL	150	49	101	600	196	178	
TOTAL (%)	100	32.6	67.33	100	100	90.81	

En hoja superior y tallo el requerimiento de citocininas fué menor debido a la naturaleza de las células meristemáticas que constituyen el explante. Las células meristemáticas generalmente se encuentran en continua división celular y en ellas es frecuente encontrar citocininas endógenas (17)

Los explantes de hoja media, y basal respondieron mejor con tratamientos con altas concentraciones de citocininas. En estos tejidos fundamentalmente los de hojas basales es menos frecuente encontrar células en división y por lo tanto la presencia de citocininas endógenas.

El requerimiento de auxinas para todos los explantes, estuvo en el rango de 0.3 mg/l a 3.0 mg/l que es suficiente para la inducción de masas callosas.

En este experimento en donde los explantes se colocaron en total obscuridad se trabajo con un tratamiento que contenía concentraciones muy bajas de auxinas-citocininas en el rango de

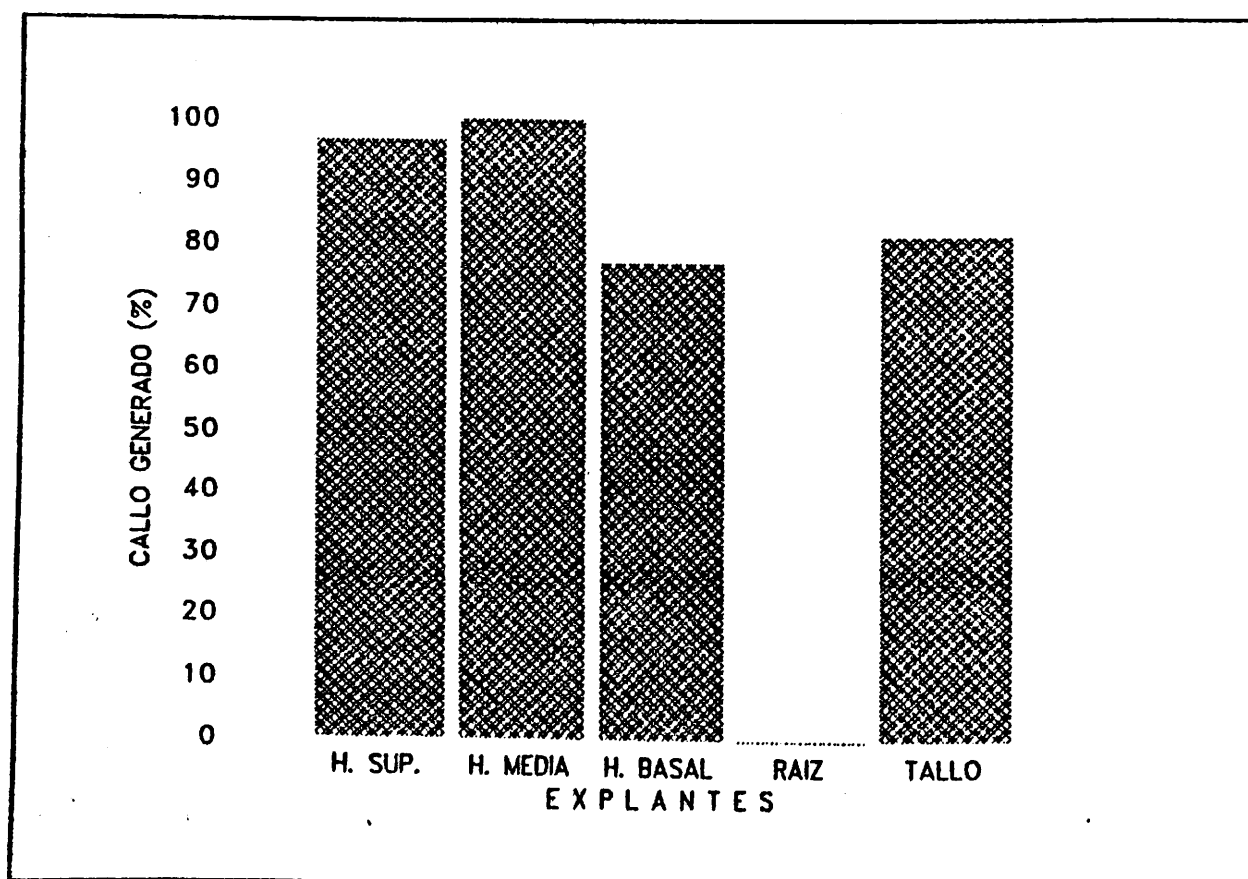


Figura 2. Porcentaje de callos generados por explante en obscuridad

0.3mg/l de 2,4-D a 0.6 mg/l de BAP. En los explantes de hoja este tratamiento respondió favorablemente por lo que demuestra que con bajas concentraciones de hormona se puede estar asegurando tanto la división como el alargamiento celular en ausencia de luz, Cuadro 5.

Cuadro 5. Número de callós generados por tratamiento en el experimento en obscuridad total.

T R A T A M I E N T O S

EXPLANTES	1o. 10:1 (a)	2o. 6:1 (b)	3o. 1:1 (c)	4o. 1:6 (d)	5o 1:10 (e)	6o. 1:2 (f)
HOJA SUPERIOR	16	20	16	8	13	16
HOJA MEDIA	--	--	--	--	20	16
HOJA BASAL	--	8	--	--	16	16
RAIZ	--	--	--	--	--	--
TALLO	--	--	5	--	4	4

a: 5.0 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP

b: 3.0 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP

c. 0.5 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP

d. 0.5 mg/l 2,4-D y 3.0 mg/l BAP

e. 0.5 mg/l 2,4-D y 5.0 mg/l BAP

f. 0.3 mg/l 2,4-D y 0.6 mg/l BAP

7.1.1.4 Consistencia de callo:

Todos los callos provenientes de explantes de hoja, representaron un 100% de callo friable, es decir, callos cuya agrupación de células es frágil y en el momento de dividirlos se fraccionan con facilidad, generalmente poseen agrupaciones de células de color blanco o verde claro, encontrándose entre cada grupo de células muchos espacios porosos. Para estos tres explantes, el mejor tratamiento que indujo callo fué (0.5mg/l de 2,4-D y 5.0 mg/l de BAP) en donde se observa altas concentraciones de citocininas y bajas de auxinas.

Según lo indica Weaber las auxinas provocan plasticidad en las paredes de las células que hacen que pierdan presión de turgencia y se expandan, permitiendo el paso de agua (17). Este fenómeno podría estar sucediendo en las células que forman la masa callosa, y que las mínimas concentraciones de auxinas utilizadas, inducirían la formación de células más grandes y más alargadas; mientras que las altas concentraciones de citocininas podrían estar provocando división celular, que sumado a la característica anterior, estaría dando los callos grandes y friables que se observaron en estos explantes.

El explante tallo también presenta callos de consistencia friable en un 66.67%, generando también un 33.33% de callo semicompacto. Los callos semicompactos son agrupaciones de células que se encuentran más entrelazadas, impidiendo la penetración de aire entre ellos. En este explante fué difícil hacer una análisis más detallado del comportamiento antes los diferentes tratamientos, puesto que el número de ellos fué muy pequeño, Cuadro 6.

7.1.1.5 Color Predominante de los callos:

Todos los callos a los 8 días eran blancos debido a la falta de luz y la incapacidad de las células a fotosintetizar. logrando agrandar sus células y producir masas callosas. Estos fueron trasladados a condiciones de luz las 24 horas. A los 20 días tenían un color de verde claro en un 77.08%, por la influencia de la luz.

El explante que generó un 100% de callo verde fué hoja media, los demás explantes produjeron un 25-30% de callo café a café amarillento. Estos callos al trasladarlos a un ambiente de luz constante 24 horas no tuvieron la capacidad de fotosintetizar y al poco tiempo murieron, Cuadro 6.

7.1.1.6 Pubescencia de los callos:

Al trasladar los callos a nuevas condiciones de luz, después de 15 días se inició el crecimiento de estructuras pubescentes blancas alrededor o por encima del callo. Hoja superior y hoja basal presentaron esta característica en un 50% de los callos, Cuadro 6.

7.1.1.7 Tamaño y peso del callo más grande y más pequeño

El callo más grande se encontró en el explante de hoja superior midiendo 4.5 cms. En este explante se produjo callo en los rangos 0.3 a 5.0 mg/l de 2,4-D y de 0.6 a 5.0 mg/l de BAP, lo que provocó bastante proliferación callosa en algunos explantes. el resto de ellos produjo callos arriba de 2.5 cms.

Los callos más pequeños crecieron hasta un rango de 0.35 cms.- 0.38 cms. encontrándose en hoja basal.

El crecimiento de los callos se relaciona un poco con la consistencia de los mismos, ya que en este experimento se presenta un 91.67% de callo friable, en donde se encuentran la mayoría de células alargadas y expandidas, ocupando más volumen.



El callo más pesado se encontró en el explante hoja media, con un peso de 2.5 gr. que supera al callo más pesado de hoja superior y hoja basal. A pesar de que los tres callos generados por explante de hoja produjeron callos friables, los callos generados por hoja media parece ser que tenían mas agregados celulares y

Cuadro 6 Porcentaje de consistencia, color, pubescencia, de los callos generados en el experimento en obscuridad.

VARIABLES	E X P L A N T E S					Total%
	Hs (a)	Hm (b)	Hb (c)	r (d)	t (e)	
Consistencia (%)	fr (f) 100	fr 100	fr 100	-- ---	fr-sc. (g) 66.6-33.3	friable 91.67
Color (%)	verde 83.3	verde 100	verde 75	---	verde 50	77.08
Pubescencia (%)	50	50	50	---	50	30.0

a= Hs =Hoja superior

b= Hm Hoja media

c= Hb Hoja basal

d= r raiz

e= t tallo

f= fr friable

g= sc semicompacto

menos espacio poroso. Esto puede relacionarse con el tratamiento que funcionó mejor en este explante cuyas concentraciones altas de citocininas podría ocasionar mayor división celular. En hoja superior y basal se indujo callos a partir de otros tratamientos con menores concentraciones de citocininas Cuadro 5, mientras que hoja media lo hizo con un tratamiento con altas concentraciones de ella.

Los callos con menos peso se encontraron en hoja superior, hoja basal y tallo, llegando a pesar entre 0.026 gr. hasta 0.21 gr. que fué encontrado en hoja media. De acuerdo a los resultados hoja

media podría estar produciendo mayor división celular debido a las altas concentraciones de citocininas utilizadas en el tratamiento (0.5 mg/l de 2,4-D--5.0 mg/l de BAP; y hoja superior y tallo estarían provocando mas alargamiento celular, ya que en estos últimos se encontraron los callos más pequeños, Cuadro 7.

Cuadro 7 Tamaño y peso de los callos más grandes y más pequeños generados en el experimento en obscuridad.

VARIABLES	E X P L A N T E S					Total%
	Hs (a)	Hm (b)	Hb (c)	r (d)	t (e)	
Tamaño callo mas grande (cms)	4.5	3.0	1.6	---	2.5	x 2.9
Tamaño callo más pequeño	0.4	0.8	0.38	---	0.35	x 0.48
Callo mas pesado	1.28	2.5	0.38	---	1.325	x 1.37
Callo menos pesado	0.058	0.21	0.05	---	0.026	x 0.09

a= Hs =Hoja superior

b= Hm Hoja media

c= Hb Hoja basal

d= r raiz

e= t tallo

7.1.2 Experimento en Luz constante 24 horas.

7.1.2.1 Desinfección del material:

En este experimento se utilizaron 125 u.e. 25 por cada tratamiento y se sembraron un total de 500 explantes. Las u.e. logradas fueron 71 que constituyeron el 56.8% del total.

Debido a el gran porcentaje de contaminación encontrado en el experimento en la oscuridad, se utilizó otra metodología de desinfección, la cual varió en el tiempo que el material estuvo inmerso en las soluciones de alcohol y cloro, además de que se utilizó jabón para lavar los explantes y raspado de la epidermis tanto de tallo como de raíz ; se utilizó Tween 20 agregado a la solución de cloro.

Hoja media fué el explante que más u.e. logró al final de la primera fase, perdiendo únicamente 2 de ellas. Hoja basal y tallo perdieron pocas u.e. 6 y 5 respectivamente. En este caso la metodología empleada para la desinfección de los materiales superó a la utilizada en el experimento en oscuridad. Sin embargo el explante raíz, nuevamente al igual que el experimento en la oscuridad, presentó contaminación casi en su totalidad, por las mismas causas señaladas anteriormente, Cuadro 8.

7.1.2.2 Regeneración de Callo:

De los 500 explantes sembrados en todo el experimento sometido a luz constante las 24 horas, se logró inducir callo en 274 de ellos que equivale a 54.8% del total sembrado. Sin embargo tomando en cuenta las u.e. logradas, de los explantes allí sembrados que fueron 284, se generaron 274 callos que equivale a 96.47%.

Los 5 explantes presentaron porcentajes² altos, de acuerdo a los callos generados de los explantes sembrados en las u.e. logradas. Los porcentajes están arriba del 91.66%.

El explante que mayor porcentaje de callo indujo fué hoja media con un 97.82%, ya que de 92 explantes se logró la inducción de 90 callos .

El explante raiz, a pesar de solo contar con 3 u.e. de su 12 explantes indujo callo en 10 de ellos, por lo que se puede deducir que si se controla el problema de contaminación del material, puede generar suficiente callo. Cuadro 8, Figura 3.

Cuadro 8. Unidades experimentales sembradas, logradas, perdidas, explantes sembrados y porcentaje de callo generado, en el experimento en luz constante las 24 horas.

EXPLANTES	u.e sembrada	u.e lograda	u.e perdida	explante sembrado	explante sembrado por u.e lograda	callos generados por u.e lograda	% callo generado por u.e lograda
HOJA SUPERIOR	25	6	19	100	24	22	91.6
HOJA MEDIA	25	23	2	100	92	90	97.8
HOJA BASAL	25	19	6	100	76	75	98.68
RAIZ	25	3	22	100	12	10	83.33
TALLO	25	20	5	100	80	77	96.3
TOTAL	125	71	54	500	284	274	
TOTAL (%)	100	56.8	43.2	100	100	96.47	

7.1.2.3 Callos generados por tratamiento:

En hoja superior a pesar de la alta contaminación, se generó callo en 4 tratamientos, pero respondieron mejor los tratamientos (0.5 mg/l de 2,4-D y 3.0 mg/l de BAP) y (0.5 mg/l de 2,4-D y 5.0 mg/l de BAP), con 8 callos cada uno. En este explante por la poca cantidad de callos generados, solo se puede inferir que el rango para inducirlos fué de auxinas, entre (3.0 mg/l a 0.5 mg/l) y de citocininas el rango entre (0.5 mg/l a 5 mg/l). Esto sugiere que el alargamiento celular se produjo con concentraciones bajas de

auxinas, y para la división celular se utilizaron altas concentraciones. La luz podría estar influyendo en la primera fase de desarrollo del callo para inducir más división celular y por eso la necesidad de consumir más citocininas, Cuadro 9.

Hoja media presentó buena generación de callo en los 5 tratamientos, siendo los mejores los tratamientos (5.0 mg/l de auxina y 0.5 mg/l de citocininas) y (0.5 mg/l de auxinas y 0.5 mg/

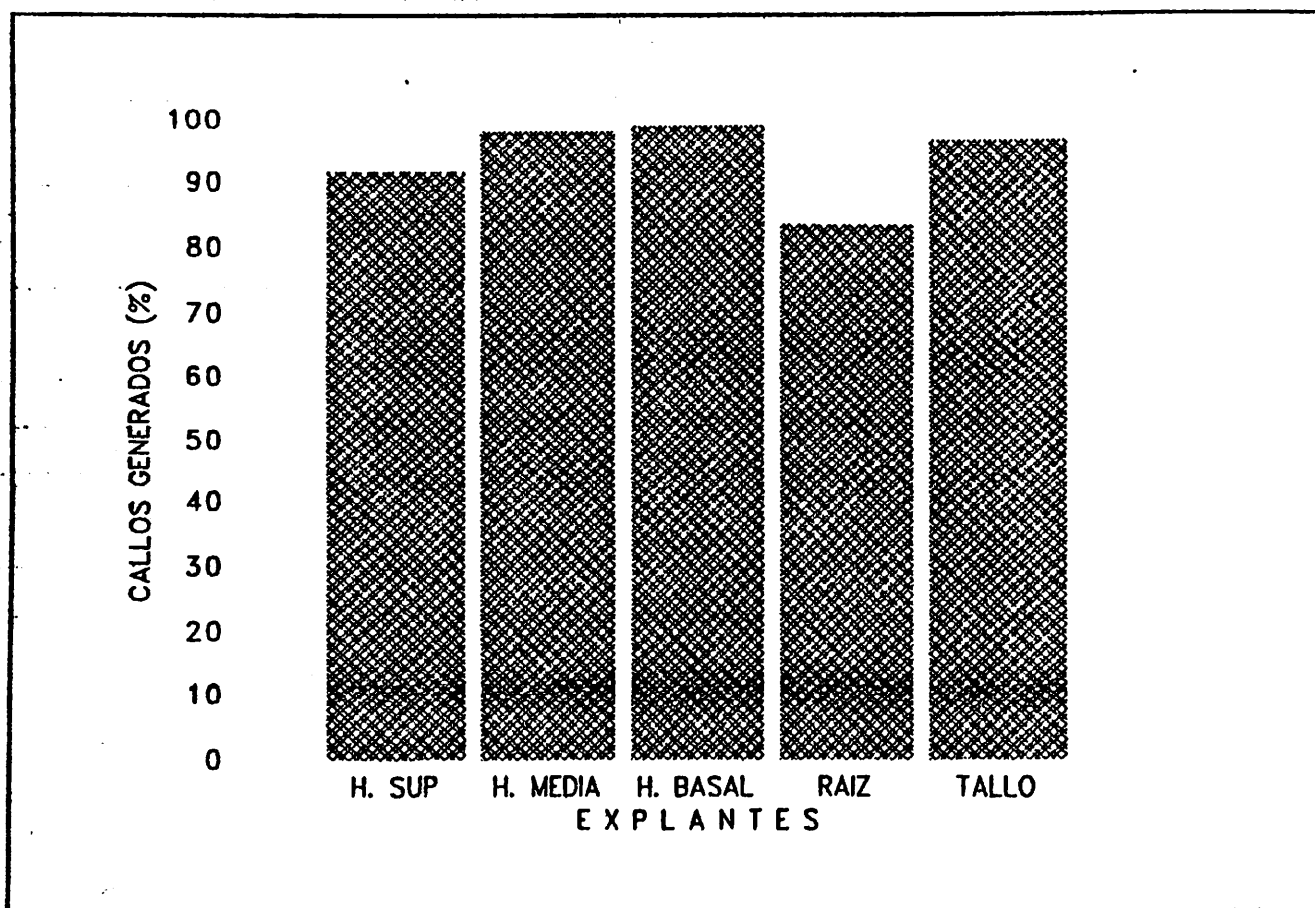


Figura 3. Porcentaje de callo generado por explante en luz constante 24 horas.

Cuadro 9. Número de callos generados por tratamiento en el experimento de luz constante las 24 horas.

T R A T A M I E N T O S

EXPLANTES	1o. 10:1 (a)	2o. 6:1 (b)	3o. 1:1 (c)	4o. 1:6 (d)	5o 1:10 (e)	Total
HOJA SUPERIOR	0	3	3	8	8	22
HOJA MEDIA	20	18	16	16	20	90
HOJA BASAL	20	16	16	15	8	75
RAIZ	--	--	10	--	--	10
TALLO	16	18	16	12	15	77

a: 5.0 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP

b: 3.0 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP

c. 0.5 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP

d. 0.5 mg/l 2,4-D y 3.0 mg/l BAP

e. 0.5 mg/l 2,4-D y 5.0 mg/l BAP

de citocininas) ambos con 100% de inducción de callo. Esto indica que este explante responde bien a los rangos de auxinas y citocininas que se ensayaron, ya que en todos los tratamientos se obtuvo buena inducción de callo.

El mismo comportamiento mostraron los explantes hoja basal y tallo ya que indujeron callo en todos los tratamientos y en buen número. En estos explantes los mejores tratamientos fueron aquellos en donde se ensayaron bajas concentraciones de auxina 0.5 mg/l y concentraciones de 0.5 mg/l, 3 mg/l y 5.0 mg/l de citocininas. Al igual que el explante hoja media y superior necesitaron concentraciones altas de citocininas para inducir callo, esto debido indudablemente a la influencia de la luz.

Los pocos callos inducidos por raiz, respondieron al tratamiento (0.5 mg/l de auxina y 0.5 mg/l de citocinina). En raiz,

de los 12 explantes que se sembraron en la u.e. logradas, 10 de ellos indujeron callo, equivalente a el 83.3% de esas u. e., lo que hace suponer que si se controla la contaminación, se puede inducir buen porcentaje de callos. Este explante respondió a las mínimas concentraciones de auxina y citocininas, suficientes para provocar alargamiento y división celular, Cuadro 9.

7.1.2.4 Consistencia de Callo:

En este experimento se observó dos tipos de callos, los friables y los semicompactos. En los explantes de hoja superior, media y basal, predominó el callo semicompacto con un 88.54%, 57.78% y 52% respectivamente, mientras que en tallo y raíz predominó el callo friable en un 100% y 56.58%, respectivamente.

Debido a que en este experimento los explantes de hoja respondieron a concentraciones altas de citocininas, es de suponer que la hormona tuvo una influencia mayor en el proceso de división celular. Estos explantes no formaron callos en la obscuridad como en el experimento anterior, por lo que tuvieron menos posibilidad de que las células se alargaran. Las células sufrieron desdiferenciación conjuntamente con el proceso de división celular, puede ser ésta la causa de la formación de masas callosas mas compactas.

El explante tallo logró callos de los dos tipos, friables y semicompactos, en mayor proporción los callos friables, a pesar de responder a tratamientos con menos concentración de citocininas.

En raíz no se puede hacer un análisis detallado del comportamiento de sus callos ya que se generaron muy pocos, sin embargo se pudo observar que el 100% fueron friables debido sin duda a las bajas concentraciones de auxinas y citocininas utilizadas en ese tratamiento, Cuadro 10.

7.1.2.6 Pubescencia de los Callos por Explante;

En este experimento se obtuvo el 20% de pubescencia en los callos, fundamentalmente en los explantes de hoja media y basal, con 40% cada uno. Esta característica se asocia a la pubescencia presente en las hojas de este cultivo, Cuadro 10.

7.1.2.7 Tamaño y Peso del Callo más Pequeño y más Grande.

El callo más grande y más pesado fué encontrado en el explante tallo con 3.2 cms. y 4.135 gr.. En general se observa en todos los explantes, callos grandes que sobrepasan los 12 cms y un promedio de 2.3 gr. En este experimento se observó la presencia de más cantidad de callos semicompactos y se asocia esta característica con el peso obtenido en algunos de ellos. Un callo semicompacto supuestamente tiene menos espacios porosos y más masa celular por estar las células fuertemente unidas, (9,1). Se observó que el comportamiento en tamaño y peso de los callos es uniforme en este experimento, Cuadro 11.

Cuadro 10. Porcentaje de consistencia, color y pubescencia de callos generados en el experimento en luz constante 24 horas.

VARIABLES	E X P L A N T E S					Total%
	Hs (a)	Hm (b)	Hb (c)	r (d)	t (e)	
Consistencia (%)	sc (f) 88.54	sc 57.78	sc 52	fr 100	fr (g) 56.58	friable 51.65
Color (%)	verde 60	verde 80	verde 60	verde 100	verde 60	verde 72
Pubescencia (%)	20	40	40	---	---	20

a= Hs =Hoja superior
b= Hm Hoja media
c= Hb Hoja basal

d= r raiz
e= t tallo
f= sc semicompatto
g= fr friable

Cuadro 11. Tamaño y peso de los callos más grandes y más pequeños generados en el experimento en luz constante 24 horas.

VARIABLES	E X P L A N T E S					Total x
	Hs (a)	Hm (b)	Hb (c)	r (d)	t (e)	
Tamaño callo más grande (cms)	2.33	2.71	2.1	2.5	3.2	x 2.57
Tamaño callo más pequeño	0.69	1.08	0.92	---	0.91	x 0.9
Callo más pesado	2.75	2.33	0.47	1.75	4.2	x 2.31
Callo menos pesado (cms)	0.055	0.10	0.12	---	0.23	x 0.13

a= Hs =Hoja superior
b= Hm Hoja media
c= Hb Hoja basal

d. r = raiz
e. t = tallo
f. sc= semicompatto
g. fr= friable.

7.1.3 Experimento en Fotoperíodo, 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

7.1.3.1 Desinfección del material:

Al igual que en el experimento de luz constante 24 horas, en este experimento se ensayaron 125 u.e. para evaluar los 5 tratamientos y los 5 explantes. Únicamente 53 u.e. o sea el 42.4% del total produjo callo. De las 53 u.e. logradas se indujo callo en un 85.85% que corresponde a 182 callos, Cuadro 12.

Cuadro 12 Unidades experimentales sembradas, logradas, perdidas, explantes sembrados y porcentaje de callo generado, en el experimento en fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

EXPLAN- TES	u.e sem- bra- da	u.e lo- gra- da	u.e per- dida	ex- pl- ante sem- bra- do	explan- te sembra- do por u.e lograda	callos gene- rados por u.e lograda	% callo ge- nerado por u.e lograda
HOJA SUPERIOR	25	18	7	100	72	72	100.0
HOJA MEDIA	25	10	15	100	40	26	65.0
HOJA BASAL	25	21	4	100	84	82	97.6
RAIZ	25	2	23	100	8	2	25.0
TALLO	25	2	23	100	8	--	--
TOTAL	125	53	72	500	212	182	
TOTAL (%)	100	42.4	58	100	100	85.5	

Hoja superior y hoja basal lograron más del 70% de u.e., mientras que de hoja media solo se logró el 40%.

Tallo y raiz no perdió todas sus u.e. por contaminación, tallo por ejemplo solo perdió 3 u.e. por contaminación, mientras que raiz perdió 13 u.e. De las 12 u.e. logradas en raiz, solo se generaron 2 callos. Este experimento presentó un 50% de contaminación, lo que indica que la metodología utilizada superó a la practicada en el experimento en obscuridad, pero que es indispensable mejorarla.

Cuadro 12.

7.1.3.2 Regeneración de Callo:

En este experimento se sembraron un total de 500 explantes de los cuales únicamente 182 formaron callo de 212 explantes sembrados en la u.e. logradas

Hoja superior y hoja basal son los dos explantes que generaron mayor cantidad de callo con un 100% y 97.62% respectivamente. Hoja media produjo callo en menor cantidad 65% comparado con los explantes anteriores.

El comportamiento de tallo y raiz fue similar que en los experimentos obscuridad y luz las 24 horas; generando pocas cantidades de callo, debido fundamentalmente a la contaminación del material. En este caso la contaminación de las u.e. fué similar a la de los otros explantes, pero estos dos explantes no llegaron a inducir callo. Solo se logró la formación de 2 callos en el explante de raiz, Cuadro 12, Figura 4.

7.1.3.3 Callos Generados por Tratamiento :

Hoja superior respondió a todos los tratamientos, obteniendo 52% de inducción de callo que equivalen a 72 callos. En general se

observa que hoja superior y hoja basal presentan bastante uniformidad en la inducción de callo en todos los tratamientos por lo que es difícil analizar la influencia de las hormonas en los mismos. Únicamente se puede inferir que estos explantes responden bien a concentraciones de auxinas y citocininas en el rango de (0.5 mg/l a 5.0 mg/l, Cuadro 13.

Hoja media perdió muchas u.e., pero sus mejores tratamientos se encuentran en los extremos de los tratamientos, es decir el tratamiento (5.0 mg/l de auxinas y 0.5 mg/l de citocininas) y el tratamiento (0.5 mg/l y 5.0 mg/l), por lo que se deduce que este explante responde a los rangos de auxinas-citocininas ensayados.

Raiz produjo únicamente dos callos en los tratamientos (3.0mg/l de auxinas y 0.5 mg/l de citocininas) y el (0.5 mg/l de auxinas y 3 mg/l de citocininas). Por la poca cantidad de callos no se puede hacer un análisis sobre el comportamiento de las hormonas, Cuadro 13

Cuadro 13. Número de callos generados por tratamiento en cada explante.

EXPLANTES	T R A T A M I E N T O S					Total
	1o. 10:1 (a)	2o. 6:1 (b)	3o. 1:1 (c)	4o. 1;6 (d)	5o 1:10 (e)	
HOJA SUPERIOR	16	12	16	16	12	72
HOJA MEDIA	8	8	3	0	8	26
HOJA BASAL	12	18	20	16	16	82
RAIZ	--	1	--	1	--	2
TALLO	--	--	--	--	--	--

a: 5.0 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP e. 0.5 mg/l 2,4-D y 5.0 mg/l BAP
 b: 3.0 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP
 c. 0.5 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l BAP
 d. 0.5 mg/l 2,4-D y 3.0 mg/l BAP

7.1.3.4 , Consistencia de Callo:

Se encontró que los callos formados por hoja superior, media y basal generaron callos semicompactos en un 100%, 100% y 80% respectivamente, sucediendo el mismo fenómeno que en el experimento colocado en luz constante las 24 horas. Nuevamente raíz formó callos friables en un 100% y 70%.

Este experimento indujo un 70% de callo semicompacto, porcentaje mucho mayor que el obtenido en el experimento de luz constante 24 horas. Sin duda la diferencia radica en que el porcentaje de callos friables en este experimento es de 100% pero sobre 2 callos únicamente, mientras que en el experimento anterior el número de callos friables fué de 87 callos, Cuadro 14.

7.1.3.5 Color predominante por explante:

El color predominante en todos los callos fué el verde en un 100% en hoja media, hoja basal y raíz. Solo hoja superior presentó un 40% de callos de otro color, generalmente de color café. El color café está asociado a la senescencia de los callos, pues se observó que los callos que presentaron este color, al poco tiempo murieron. Este fenómeno pudo suceder por excesos de hormona en algunos tratamientos, ya que este explante funcionó y generó callo en todos los tratamientos, Cuadro 15

7.1.3.6 Pubescencia de Callos por Explante:

Nuevamente esta característica se presentó en los explantes de hoja, encontrándose en un 60% en hoja superior, los otros dos explantes presentaron porcentajes de 25% y 40%, con un promedio de

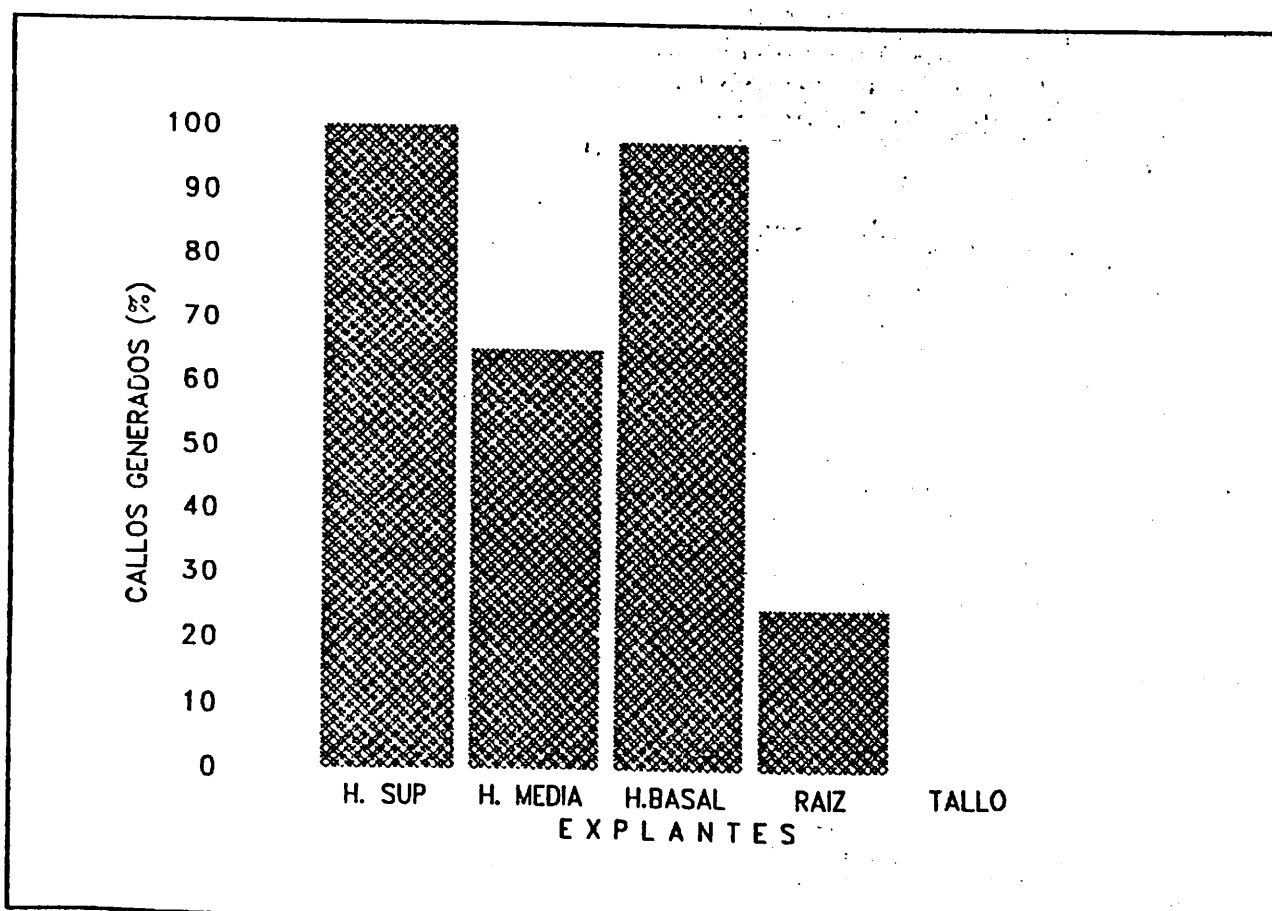


Figura 4. Callos generados por explante en fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

pubescencia de 41.66 % en todos los explantes.

Al igual que en los dos experimentos anteriores, esta característica solo se manifestó en los callos provenientes de explantes de hoja, y se asocia a la pubescencia que ésta presenta, Cuadro 14.

Cuadro 14 Porcentaje de consistencia, color, y pubescencia, de los callos generados en el experimento en fotoperiodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

VARIABLES	E X P L A N T E S					Total%
	Hs (a)	Hm (b)	Hb (c)	r (d)	t (e)	
Consistencia (%)	sc (f) 100	sc 100	sc 80	fr (g) 100	sc --	sc. 93.39
Color (%)	verde 60	verde 100	verde 100	verde 100	-- --	verde 90
Pubescencia (%)	60	25	40	40	--	41.66

Hoja superior
b= Hm Hoja media
c= Hb Hoja basal

e = t tallo
f = sc semicompacto
g = fr friable

Cuadro 15 Tamaño y peso del callo más grande y callo más pequeño del experimento en fotoperiodo.

VARIABLES	E X P L A N T E S					Total% x
	Hs (a)	Hm (b)	Hb (c)	r (d)	t (e)	
Tamaño callo más grande (cms)	2.7	2.8	2.08	2.18	--	x 2.61
Tamaño callo más pequeño	0.87	0.44	1.0	---	---	0.77
Callo más pesado (grs.)	1.52	1.81	1.15	1.5	---	x 1.49
Callo menos pesado (cms)	0.078	0.03	0.199	---	---	x 0.10

a= Hs =Hoja superior
b= Hm Hoja media
c= Hb Hoja basal

d= r raiz
e= t tallo

7.1.3.7 Tamaño y Peso del Callo más Grande y más Pequeño:

El tamaño del callo para todos los explantes fué bastante uniforme alrededor de 2.61 cms. El callo más grande lo produjo hoja media. Los pesos promedios también se encuentran uniformes en todos los explantes. Los explantes que indujeron callos más grandes fueron hoja superior y hoja media; 2.7 y 2.8 cms. respectivamente.

Los callos más pesados los produjo también hoja superior con 1.52 gr. y hoja media con 1.81 gr. En este experimento estos dos explantes produjeron 100% de callo semicompacto, pero aún así estos callos son menos pesados que los obtenidos en el experimento de luz constante las 24 horas. Cuadro 15.

7.1.4 Resultados Finales de los Tres Experimentos:

7.1.4.1 Desinfección de los materiales:

El experimento en obscuridad obtuvo en esta primera fase de inducción de callo, un número considerable de u.e. perdidas, pero al cambiar la metodología de desinfección del material se logró aumentar las u.e. tanto en el experimento en luz las 24 horas, como en el de fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas obscuridad, Cuadro 16.

En toda la fase de inducción de callo se perdió el 57% de u.e. lo que indica que el método de desinfección utilizado, fundamentalmente en el experimento de obscuridad no fué efectiva.

Los explantes que mejor funcionaron en cuanto a la desinfección fue hoja superior en obscuridad con un 76% de u.e. logradas;

hoja media en el experimento de luz con un 92% de u.e. logradas; y hoja basal en el experimento de fotoperíodo con un 84% de u.e. logradas.

Los explantes de raíz y tallo tuvieron altos porcentajes de contaminación fundamentalmente en los experimentos de oscuridad y luz, por lo que es necesario aplicar un pretratamiento a los materiales antes de ser sembrados, Cuadro 17.

Cuadro 16. Unidades experimentales logradas en los experimentos de oscuridad, luz constante 24 horas, y fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

VARIABLES	EXPERIMENTOS				
	OBS.	LUZ	FOTO	TOTAL	TOTAL%
U.e. sembrada	150	125	125	400	100
U.e. lograda	49	71	53	172	43
U.e. perdida	101	54	72	228	57
% u.e. lograda	32.66	56.8	42.2		

Cuadro 17. Unidades experimentales logradas y perdidas en los tres experimentos, en cada uno de los explantes.

VARIABLES	TRATAMIENTO OSCURIDAD					TRATAMIENTO LUZ 24 HORAS					TRATAMIENTO FOTOPERIODO				
	hs	hm	hs	r	t	hs	hm	hs	r	t	hs	hm	hb	r	t
U.e. logradas	23	9	13	-	4	6	23	19	3	19	18	10	21	2	2
% u.e. lograda	76	30	43	-	13	24	92	76	12	76	72	40	84	8	8
U.e. perdida	7	21	17	30	26	19	2	6	22	6	7	15	4	23	23
% U.e. perdida	23	70	57	100		76	8	24	88	24	29	60	16	92	92

7.1.4.2 Inducción de Callo por Explante:

En 172 u.e. logradas en los 3 experimentos, se sembraron un total de 668 explantes que generaron 634 callos o sea un 92.15%.

El explante que mayor cantidad de callos produjo fué hoja basal con 197 de 212 explantes sembrados; sin embargo fué hoja superior quien reporta los más altos porcentajes de inducción de callo, pues de 188 explantes sembrados, se obtuvo 183 callos con un 97.81% de inducción. En general todos los explantes de hoja generaron callos arriba del 90%. Tallo presentó un 90% de inducción de callo pero sobre 25 u.e. logradas. Cuadro 18, Fig 5.

Cuadro 18 Unidades experimentales logradas, explantes sembrados y porcentaje de callo generado, en cada explante y en los tres experimentos.

EXPLANTES	u.e lograda	explante sembrado	callos generados por u.e lograda	% callo generado por u.e lograda
HOJA SUPERIOR	47	188	183	97.8
HOJA MEDIA	42	168	152	90.4
HOJA BASAL	53	211	197	92.9
RAIZ	5	20	12	60.0
TALLO	25	100	90	90.0
TOTAL	172	688	634	
TOTAL (%)	100	100	92.15	

Raiz fué el explante que menor cantidad de callos produjo debido fundamentalmente a los porcentajes altos de contaminación obtenidos. Sin embargo el 60% de inducción sobre los explantes sembrados, sugiere que controlando la contaminación del material vegetal, se podría inducir buenas cantidades de callo.

7.1.4.3 Callos generados por cada tratamiento en los tres experimentos.

El tratamiento que mayor número de callos formó fué el tratamiento (0.5 mg/l de 2,4-D y 5,0 mg/l de BAP) con un total de 140 callos en todos los explantes.

El tratamiento (3.0 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP) y el tratamiento (0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP) también generaron buena cantidad de callos de acuerdo a las u.e. logradas.

Los explantes de raiz y tallo funcionaron mejor con el tratamiento 3 (0.5 mg/l 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP), pero debido a

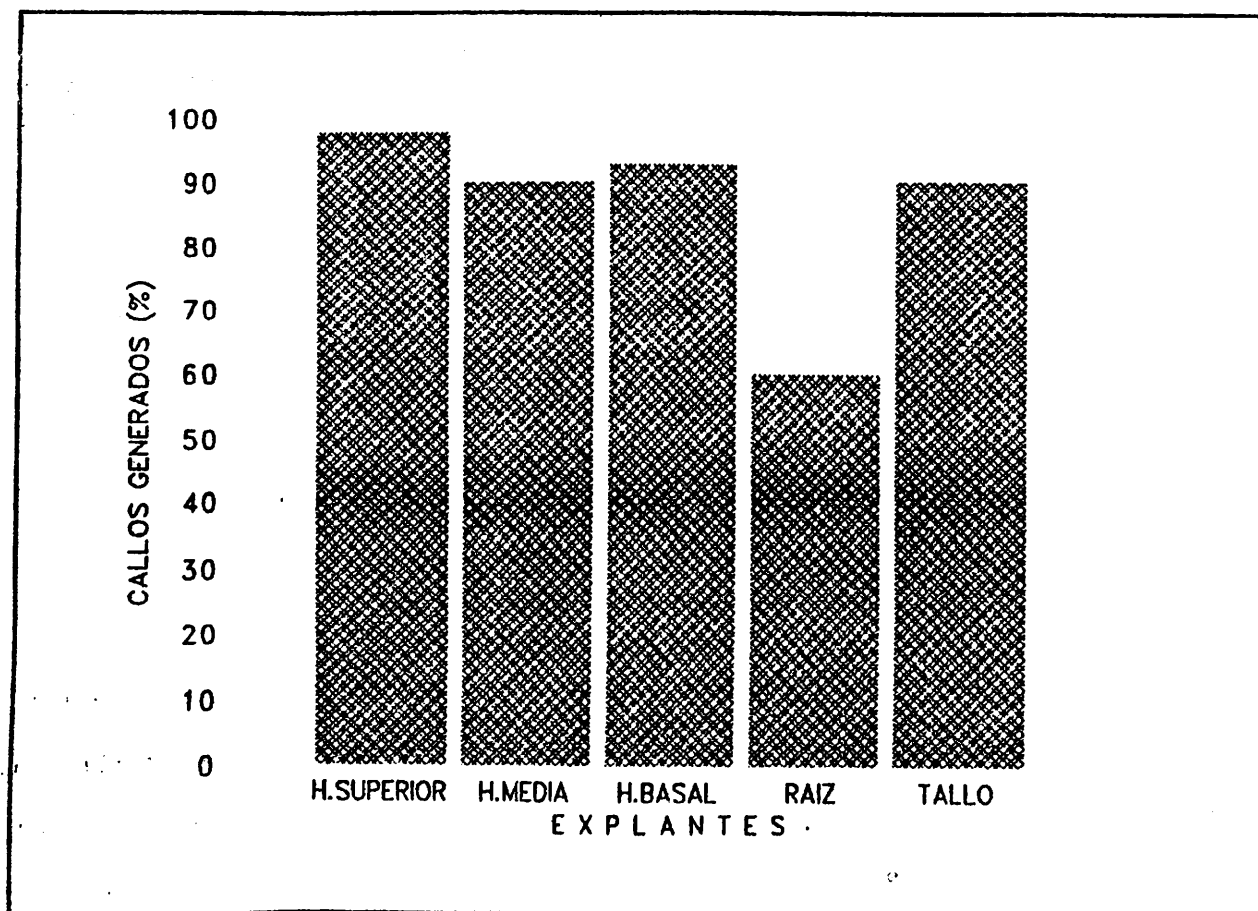


Figura 5. Callos generados por explante en los tres experimentos.

la pérdida de u.e. en algunos tratamientos, no es posible hacer un análisis más confiable sobre el comportamiento de los tratamientos en estos explantes, Cuadro 19.

Cuadro 19. Callos generados en cada uno de los tratamientos y en cada explante en los tres experimentos.

T R A T A M I E N T O S

EXPLANTES	1o. (a)	2o. (b)	3o. c	4o. (d)	5o. e	6o. (f)	TOTAL
HOJA SUPERIOR	32	35	35	32	33	16	183
HOJA MEDIA	28	25	19	16	48	16	152
HOJA BASAL	32	42	36	31	40	16	197
RAIZ	--	1	10	1	--	--	12
TALLO	16	18	21	12	19	4	90

a= tratamiento 1 = 5.0 mg/l 2,4-D--0.5 mg/ BAP
 b= tratamiento 2 = 3.0 mg/l 2,4-D--0.5 mg/l BAP
 c= tratamiento 3= 0.5 mg/l 2,4-D--0.5 mg/l BAP
 d= tratamiento 4= 0.5 mg/l 2,4-D--3.0 mg/l BAP
 e= tratamiento 5= 0.5 mg/l 2,4-D--5.0 mg/l BAP
 f= tratamiento 6= 0.3 mg/l 2,4-D--0.6 mg/l BAP

7.1.4.4 Consistencia Predominante de los Callos en los 3 experimentos.

En relación a la consistencia de los callos que predominó en los tres experimentos efectuado, se observó un promedio de 57.77% de callo friable y un promedio de 42.23% de callo semicom-
 pacto. Cuadro 20. En los promedios presentados, no se observa una diferencia significativa, ya que en los experimentos de luz y fotoperíodo, la inducción de callo se mantuvo uniforme en todos los tratamientos, utilizando en algunos de ellos altas concentraciones de auxinas y en otras altas concentraciones de citocininas, esto provocó casi igual número de callos friables y semicom-
 pactos. Este fenómeno se presentó en dos de los tres experimentos. Sólo en el

Cuadro 20 Porcentaje de consistencia , color, pubescencia, los callos del los tres experimentos.

VARIABLES	OBSCURIDAD	LUZ	FOTOPERIODO	TOTAL%
Cnsistencia				
Callo friable	91.67	51.65	30	57.77
Callo sc.	8.33	48.35	70	42.2
-----	-----	-----	-----	-----
Color				
Verde	77.08	71.0	90	79.69
Otro color	22.92	28.0	10	20.30
-----	-----	-----	-----	-----
Pubescencia (%)	20.0	20.0	41.66	27.22

experimento de obscuridad se formó un alto porcentaje de callos friables, lo que permite observar la influencia de las auxinas en el alargamiento celular. Cuadro 20.

7.1.4.5. Color predominante en los 3 experimentos:

El color predominante en los 3 experimentos fué el verde, presentando un promedio de 79.69% en los datos reportados de cada experimento. El color verde se asocia tanto a la constitución característica del callo friable, y también a las masas celulares que son capaces de fotosintetizar. Los callos semicompactos también presentan color verde en sus agregados, es por ello la proporción alta de color verde presentada por estos callos.

Otros colores de callo fueron notorios en esta fase de inducción como por ejemplo el café, café amarillento y blanco. Los dos primeros asociados a la senescencia de los callos pues se observó que éstos callos no crecieron y al poco tiempo murieron. Estos callos son incapaces de realizar fotosíntesis y seguir creciendo. Los callos blancos sólo se obtuvieron en la primera

fase del experimento de la obscuridad, Cuadro 20.

7.1.4.6 Pubescencia de los Callos en los tres experimentos:

Esta característica se presentó en un promedio de 27.22% de los callos generados en los tres experimentos, presentándose mayor cantidad de pubescencia en los callos sometidos a fotoperíodo con 41.66%. Esta característica de algunos callos, se encontró en los explantes de hoja fundamentalmente, y está asociada con la pubescencia presente en ellas. Esta característica no influye en el desarrollo de los callos, ya que crece a la par de ellos, tampoco está influenciada por los tratamientos, pues se observó la presencia de callos pubescentes en casi todos los tratamientos.

7.1.4.7 Promedio de Tamaño y Peso de los Callos Generados en los Tres Experimentos

El promedio de callo más grande inducido en los experimentos fué de 2.69 cms, encontrándose el callo más grande en el experimento en la obscuridad con un promedio de 2.9 cms. Este tamaño se logró ya que este experimento generó muchos callos friables, en donde supuestamente las células se encuentran mas expandidas y existen muchos espacios intercelulares entre ellas, (1.19).

El promedio de callo más pesado se encontró en el experimento de luz en donde se generaron callos tanto friables como semicompacto, Cuadro 21. El peso de los callos no siempre está relacionado con el tamaño de los mismos, sin embargo en este experimento se dió la

tendencia de a mayor callo semicompacto mayores eran los promedios de pesos encontrados. En el experimento de fotoperíodo se presentó un 70% de callo semicompactos, pero el peso reportado por los callos es menor que el reportado por los callos del experimento de luz las 24 horas, que obtuvo un 48.35% de callo semicompacto . En general al analizar todos los datos de los tres experimentos, no es posible sacar una relación de peso-consistencia, ya que el número de callos en cada experimento fué diferente.

Cuadro 21 Promedio de tamaño y peso del callo más grande y callo más pequeño obtenido en los tres experimentos.

VARIABLES	OBSCURIDAD	LUZ	FOTOPERIODO	TOTAL%
Tamaño callo más grande (cms.)	2.9	2.57	2.61	2.69
Tamaño callo más pequeño (cms.)	0.48	0.9	0.77	0.72
Callo más pesado (gr.)	1.37	2.31	1.49	1.72
Callo menos pesado (gr.)	0.09	0.13	0.10	0.32

7.2 Fase de Brotación:

7.2.1 Contaminación:

En la segunda fase del estudio se subcultivaron un total de 645 u.e., de las cuales se lograron 582 u.e. que equivale a un 90.23%. La contaminación de los subcultivos para esta fase fué solo de 10% para los tres experimentos, Cuadro 22.

7.2.2 Regeneración de Plantas por Explante:

De los callos provenientes del experimento que se sometió

a obscuridad solo generaron planta 2 explantes; hoja media y tallo con un 33.3% de regeneración.

Los callos provenientes del experimento sometido a luz constante las 24 horas, regeneraron planta en 2 explantes; hoja superior y tallo. De este subcultivo se observó que el explante respondió favorablemente en dos tratamientos, en donde brotó el 100% y el 66%, mientras que en hoja superior solo brotó una unidad experimental.

Los callos provenientes del experimento sometido a fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas obscuridad, generaron planta únicamente los provenientes de raíz en tres tratamientos diferentes y con un 33.33% cada uno.

En total generaron planta los explantes hoja superior, hoja media, raíz con un 33.33%; tallo con un 66.66% y 100%. Hoja basal no presentó respuesta a la regeneración de planta en ninguno de los tratamiento ensayados, Cuadro 23.

Cuadro 22. Unidades experimentales y % de callo subcultivado en la fase de regeneración de plantas.

VARIABLES	OBS	LUZ	FOT.	TOTAL
U. experimental subcultivada	225	228	192	645
U. e. sin contaminación	193	222	167	582
% callo subcultivado	85.77	97.36	86.98	90.23

7.2.3 Regeneración de Plantas por Tratamiento:

7.2.3.1 Callos Provenientes del Experimento Oscuridad.

El callo proveniente del explante hoja media y que se indujo en la oscuridad, al ser subcultivado en medio de brotación, y colocado en condiciones de luz constante 24 horas, generó brote con el tratamiento C (0.5 mg/l de Ana y 1.0 mg/l de KIN). En este caso el explante necesitó altas concentraciones de citocinas y bajas de auxinas para inducir callo, y para la brotación concentraciones menores de citocininas; mientras que las concentraciones de auxinas se conservaron en 0.5 mg/l tanto en la inducción de callo como en la fase de brotación. El callo proveniente del explante tallo, al ser subcultivado en el medio A (1.0 mg/l BAP) logró la brotación. Este explante utilizó para inducir callo bajas concentraciones de auxinas y citocininas con el tratamiento 6 (0.3 mg/l 2,4-D--0.6 mg/l BAP), y para la regeneración de plantas, también bajas concentraciones de BAP equivalentes a 1.0 mg/l.

Parece ser que en la primera fase de desarrollo del callo en hoja media es necesario mayores concentraciones de citocininas para provocar proliferación callosa, mientras que en la fase de brotación con una relación estrecha de auxina-citocininas produce la brotación. Callo por el contrario funcionó con bajas concentraciones de auxinas-citocininas, pudiendo desechar las auxinas en la segunda fase. Cuadro 23.

Cuadro 23. Porcentaje de regeneración de plantas en los tres experimentos, explantes y tratamientos que indujeron callo y brote.

Fotoperíodo	Explante	Fase de inducción callo (a)	Fase de regeneración plantas	Fase de brotación (b)	# brotes	Unidad exp.	Porcentaje regeneración
OBSCURIDAD	Hoja media	5	LUZ	C	1	1	33.33
	Tallo	6	LUZ	A	1	1	33.33
LUZ	H.superior	5	LUZ	B	1	1	33.33
	Tallo	3	LUZ	C	1	3	100.00
	Tallo	4	LUZ	D	1	2	66.66
12 hr LUZ, 12 OBS	Raiz	4	POT	A	2	1	33.33
	Raiz	4	POT	B	3	1	33.33
	Raiz	4	POT	C	3	1	33.33

(a) FASE DE INDUCCION DE CALLO

tratamiento 3= 0.5 mg/l 2,4-D --0.5 mg/l BAP
 tratamiento 4= 3.0 mg/l 2,4-D --0.5 mg/l BAP
 tratamiento 5= 5.0 mg/l 2,4-D --0.5 mg/l BAP
 tratamiento 6= 0.3 mg/l 2,4-D --0.6 mg/l BAP

(b) FASE DE BROTACION

callos provenientes de experimento en obscuridad
 tratamiento A 1.0 mg/l de BAP
 tratamiento B 0.5 mg/l de AIA y 1.0 mg/l KIN
 tratamiento C 0.5 mg/l de ANA y 1.0 mg.l KIN
 tratamiento D 0.5 mg/l de AIA y 1.0 mg/l BAP
 tratamiento E 0.5 mg.l de ANA y 1.0 mg/l BAP

callos provenientes de experimento de luz y fotoperíodo
 tratamiento A= 0.1 mg/l BAP
 tratamiento B= 0.3 mg/l BAP
 tratamiento C= 0.6 mg/l BAP
 tratamiento D= 0.9 mg/l BAP
 Todos los tratamientos con 0.5 mg/l de AIA

7.2.3.2 Callos Provenientes del Experimento en Luz Constante las 24 horas.

De los callos provenientes del experimento en luz constante las 24 horas, los provenientes de hoja superior generaron planta utilizando altas concentraciones de citocininas con el tratamiento B que contenía 3.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA. Este

explante indujo callo con concentraciones altas de citocininas 5.0 mg/l y 0.5 mg/l de auxinas. En general este explante necesita altas concentraciones de citocininas para la inducción del callo, necesitando menores concentraciones de la misma hormona en la segunda fase. Las concentraciones de auxina utilizadas fueron de 0.5 mg/l en las dos fase.

El explante tallo generó brotes con dos tratamientos C (6.0 mg/l de BAP), D (9.0 mg/l de BAP) o sea requiriendo altas concentraciones de citocininas. Uno de los callos fue formado a partir del tratamiento (0.5 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP) , y en la segunda fase necesitó 3 mg/l de BAP para generar brote; en este caso las mínimas concentraciones de auxinas-citocininas indujeron callo, necesitando mayores concentraciones de citocininas en la segunda fase. El segundo callo generó brote con el tratamiento D que contenía las más altas concentración de citocininas que se evaluarón en este estudio, es decir 9 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIA., sin embargo para la fase de inducción de callo utilizó también altas concentraciones de citocininas, 3.0 mg/l BAP. Las concentraciones de auxinas de los dos callos provenientes de tallo, utilizaron bajas concentraciones de auxinas en las dos fases, Cuadro 23.

7.2.4. Callos provenientes del Experimento de Fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

En el experimento con callos generados en fotoperíodo, solo se indujo brote en el explante raiz. Raiz fué un material difícil

de trabajar por la alta contaminación que trae del campo, prueba de ello fué que en este experimento se indujeron 2 callos, pero estos callos al subcultivarlos produjeron varios brotes, por unidad experimental, fenómeno que no se presentó en otros tratamientos. Raíz indujo sus callos a partir de altas concentraciones de citocininas (0.5 mg/l 2,4-D y 3.0 mg/l de BAP); en la segunda fase estos callos respondieron a tres tratamientos A, B y C o sea (1.0mg/l, 3.0mg/l y 6.0 mg/l de BAP). Este explante tolera altas concentraciones de citocininas (BAP) en las fases tanto de inducción de callo, como de regeneración de plantas.

En todos los tratamientos que generaron brote se observó que los requerimientos hormonales que utiliza cada explante en la primera fase de inducción de callo, tiende a conservarse en la segunda fase de regeneración de plantas.

Se observó que cada uno de estos brotes al ser subcultivado, puede generar 3-4 brotes que posteriormente pueden ser propagados a través de microestacas. Los brotes al dejarlos crecer en ese mismo medio, se comportan de la misma manera, produciendo varios brotes que pueden llegar hasta 5-6 de un mismo callo.

9. Conclusiones

La respuesta de los explantes hoja, tallo y raiz a la inducción de callo, varió según las relaciones de concentración de auxinas-citocininas utilizadas, dentro del rango de 0.3 mg/l a 5.0 mg/l de 2,4-D y de 0.5 a 0.6 mg.l de BAP.

La respuesta de los callos provenientes de los explantes de hoja, tallo y raiz, generados en la primera fase, varió de acuerdo a las combinaciones y concentraciones hormonales utilizadas dentro del rango de 1.0 mg.l a 9 mg.l de BAP y 0.5 mg/l de AIA.

La metodología de desinfección utilizada en los experimentos de luz constante las 24 horas y fotoperíodo, disminuyó la contaminación de las unidades experimentales.

El orden de contaminación de los explantes de mayor a menor fué raíz, tallo hoja basal, hoja media y hoja superior.

El fotoperíodo de luz constante las 24 horas fué el más efectivo en la inducción de callo y regeneración de plantas.

10. Recomendaciones

Para la desinfección de los explantes se recomienda lavar los materiales con agua y jabón, y colocarlos en soluciones de alcohol al 70% durante 2 minutos, lavar con agua destilada y colocarlos nuevamente en una solución de cloro al 0.75 % con 3 gotas de Tween 20, durante 20 minutos, lavar tres veces los explantes con agua estéril en la cámara de flujo laminar.

Utilizar los explantes de hoja superior, media, tallo y raíz para la inducción de callo y regeneración de plantas.

Para la fase de inducción de callo, utilizar los tratamientos siguientes:

Para hoja superior y hoja media, la relación auxina-citocinina (0.5 mg/l 2,4-D--5.0 mg/l BAP).

Para tallo utilizar la relación auxinas-citocininas en los rangos de (0.3 mg/l a 3.0 mg/l de 2.4-D y 0.5 mg/l a 0.6 mg/l de de BAP).

Para raíz utilizar la relación auxina-citocininas de(3.0 mg/l de 2,4-D - 0.5 mg/l de BAP).

Para la fase regeneración de plantas utilizar los tratamientos siguientes:

Para callos provenientes de obscuridad:

Callos provenientes de tallo: la concentración de citocininas de (1.0 mg/l de BAP).

Callos provenientes de hoja media: la relación auxina-citocinina de (0.5 mg/l de ANA y 1.0 mg/l de KIN)

Para callos provenientes de luz constante 24 horas:

Callos provenientes de hoja superior: la relación auxina-citocinina de (0.5 mg/l de AIA y 3.0 mg/l de BAP)

Callos provenientes de tallo: la relación auxina-citocinina en el rango de (0.5 mg/l de AIA y de 6.0 mg/l a 9 mg/l de BAP).

Para callos provenientes de fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas obscuridad:

Callos provenientes de raiz: la relación auxina-citocinina en el rango de (0.5 mg/l de AIA y de 1.0 mg/ a 6 mg/l de BAP).

Establecer un procedimiento de desinfección del explante raiz para eliminar la contaminación y evaluarlo nuevamente en las fases de inducción de callo y regeneración de plantas, con los mismos tratamientos, ya que fué el único explante que produjo brotes masivos.

11. Bibliografía

1. ALVARADO, G.J. 1992. Evaluación de medios de cultivo para la inducción de callo y regeneración de plantas en frijol (Phaseolus vulgaris L.) variedad Quineck Che. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 70 p.
2. BAILEY, L.H. 1949. Manual of cultivated plants. New York, MacMillian. p. 30
3. BERRIOR, A.; BERTHOULY, M. 1987. Tecnología del cultivo de tejidos de café, medios y métodos de cultivo in vitro. Manual 2. s.n.t. 37 p.
4. CRUZ, J.R. DE LA, 1982. Clasificación de las zonas de vida de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.
5. GUDIEL, V.M. 1987. Manual de floricultura. Guatemala, Productos Superb. p. 131-132.
6. HARTMANN, H.T. 1984. Propagación de plantas, principios y prácticas. México, D.F., México, CECSA p. 639-666.
7. HEEGER, E.F. 1989. Handbuch des arzneiund gewürz pflanzenbaves. Frankfurt am Main, Verlag, Harri Deutsch. p. 641.
8. HEYWOOD, W.H. 1965. Flowering plants of the world. New Jersey, EE.UU., Prentice Hall, Engle Wood Cliffs. p. 67-69.
9. HURTADO, M.D.; MERINO, M.E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México D.F., México, Trillas. 232 p.
10. KRIKORIAN, A.D. 1991. Propagación clonal in vitro. In Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. Willian Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 95-126.
11. LASZLO, H. 1990. Gyógynovenek termesztése es feldolgazá. Budapest, Mezogazdasági Kiado. p. 190.
12. LITZ, R.E.; JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos; embriogénesis somática y organogénesis. In Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. Willian Roca; Luis A. Mroginski, Colombia, CIAT. p. 143-172.

13. MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. In Cultivo de Tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. Willian Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p.19-40
14. SIMMONS, CH.S.; TARANO, J.M.; PINTO, J.M. 1959. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulsona. Guatemala, José de Pineda Ibarra. 1000 p.
15. STAHL, E.W. 1981. Pharmazeutische biología. Stugart, New York, Gustav Fischer Verlag. p. 165
16. VILLALOBOS, W.M. THORPE, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. Willian Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 127-141
17. WEAVER, R.J. 1987. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, D.F., Trillas. 622 p.

Vo. Bo. Rolando Barrios.

A N E X O

Cuadro 24.

Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos, Generado a Partir de Hoja Superior.

EXPLANTE	FOTOPERIODO	TRATAMIENTOS		# DE CALLO	% DE CALLOS	CONSISTENCIA EN PORCIENTO		
		CONCENTRACION				FRIABLE	SEMICOMPACTO	
		2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)					
H O J A SUPERIOR	OBSCURIDAD	5.0	0.5	10:1	16	53	100	0
		3.0	0.5	6:1	20	66	100	0
		0.5	0.5	1:1	16	53	100	0
		0.3	0.6	1:2	16	53	100	0
		0.5	3.0	1:6	8	11	100	0
	LUZ 24 hrs	0.5	5.0	1:10	13	43	100	0
		5.0	0.5	10:1	0	0	--	----
		3.0	0.5	6:1	3	24	33	67
		0.5	0.5	1:1	3	24	100	0
		0.5	3.0	1:6	8	32	100	0
FOTOPERIODO 12 hrs luz 12 hrs obs	0.5	5.0	1:10	8	32	13	87	
	5.0	0.5	10:1	16	64	0	100	
	3.0	0.5	6:1	12	48	0	100	
	0.5	0.5	1:1	16	64	0	100	
	0.5	3.0	1:6	16	64	0	100	
		0.5	5.0	1:10	12	48	0	100

Cuadro 25.

Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos, Generados a Partir de Hoja Media.

EXPLANTE	FOTOPERIODO	TRATAMIENTOS				# DE CALLO	% DE CALLOS	CONSISTENCIA EN FORCIENTO	
		CONCENTRACION		RELACION	FRIABLE			SEMICOMPACTO	
		2,4-D (ug/l)	SAP (ug/l)						
H O J A M E D I A	OBSCURIDAD	5.0	0.5	10:1	0	0	--	--	
		3.0	0.5	8:1	0	0	--	--	
		0.5	0.5	1:1	0	0	--	--	
		0.3	0.6	1:2	16	53	100	0	
		0.5	3.0	1:6	0	0	--	--	
	0.5	5.0	1:10	20	66	100	0		
	5.0	0.5	10:1	20	80	100	0		
	3.0	0.5	6:1	18	72	100	0		
	0.5	0.5	1:1	16	64	0	100		
	0.5	3.0	1:6	16	64	0	100		
L U Z 24 hrs	0.5	5.0	1:10	20	80	0	100		
	5.0	0.5	10:1	8	32	0	100		
	3.0	0.5	6:1	7	28	0	100		
	0.5	0.5	1:1	3	12	0	100		
	0.5	3.0	1:6	0	0	0	100		
FOTOPERIODO 12 hrs luz 12 hrs obs	0.5	5.0	1:10	8	32	0	100		
	0.5	5.0	1:10	8	32	0	100		

Cuadro 26.

Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos, Generados a Partir de Hoja Basal.

EXPLANTE	FOTOPERIODO	TRATAMIENTOS			# DE CALLO	% DE CALLOS	CONSISTENCIA EN PORCIENTO	
		CONCENTRACION		RELACION			FRIABLE	SEMICOMPACTO
		2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)					
H O J A B A S A L	OBSCURIDAD	5.0	0.5	10:1	0	0	--	--
		3.0	0.5	6:1	8	27	100	0-
		0.5	0.5	1:1	0	0	--	--
		0.3	0.6	1:2	16	53	100	0
		0.5	3.0	1:6	0	0	--	--
		0.5	5.0	1:10	16	53	100	0
	L U Z 24 hrs	5.0	0.5	10:1	20	80	100	0
		3.0	0.5	6:1	16	64	100	0
		0.5	0.5	1:1	16	64	0	100
		0.5	3.0	1:6	15	60	0	100
		0.5	5.0	1:10	8	32	0	100
		5.0	0.5	10:1	12	48	100	0
FOTOPERIODO 12 hrs luz 12 hrs obs	3.0	0.5	6:1	18	72	0	100	
	0.5	0.5	1:1	20	80	0	100	
	0.5	3.0	1:6	16	64	0	100	
	0.5	5.0	1:10	16	64	0	100	
	5.0	0.5	10:1	12	48	100	0	
	3.0	0.5	6:1	18	72	0	100	

Cuadro 27.

Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos, Generados a Partir de Tallo.

EXPLANTE	FOTOPERIODO	TRATAMIENTOS				# DE CALLO	% DE CALLOS	CONSISTENCIA EN PORCIENTO	
		CONCENTRACION		RELACION	FRIABLE			SEMICOMPACTO	
		2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)						
T A L L O	OBSCURIDAD	5.0	0.5	10:1	--	--	--	--	
		3.0	0.5	6:1	--	--	--	--	
		0.5	0.5	1:1	5	20	100	0	
		0.3	0.6	1:2	4	16	100	0	
		0.5	3.0	1:6	--	--	--	--	
		0.5	5.0	1:10	4	16	0	100	
	LUZ 24 hrs	5.0	0.5	10:1	16	53	100	0	
		3.0	0.5	6:1	18	72	100	0	
		0.5	0.5	1:1	16	53	100	0	
		0.5	3.0	1:6	12	48	70	30	
		0.5	5.0	1:10	15	60	0	100	
		5.0	0.5	10:1	--	--	--	--	
FOTOPERIODO 12 hrs luz 12 hrs obs	3.0	0.5	6:1	--	--	--	--		
	0.5	0.5	1:1	--	--	--	--		
	0.5	3.0	1:6	--	--	--	--		
	0.5	5.0	1:10	--	--	--	--		

Cuadro 28.

Número, Porcentaje y Consistencia de Callos por Tratamientos, Generados a Partir de Raíz.

EXPLANTE	FOTOPERIODO	TRATAMIENTOS			# DE CALLO	% DE CALLOS	CONSISTENCIA EN PORCIENTO	
		CONCENTRACION		RELACION			FRIABLE	SEMICOMPACTO
		2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)					
R A I Z	-	5.0	0.5	10:1	--	--	--	--
		3.0	0.5	6:1	--	--	--	--
		0.5	0.5	1:1	--	--	--	--
		0.3	0.6	1:2	--	--	--	--
		0.5	3.0	1:6	--	--	--	--
		0.5	5.0	1:10	--	--	--	--
	LUZ 24 hrs	5.0	0.5	10:1	--	--	--	--
		3.0	0.5	6:1	--	--	--	--
		0.5	0.5	1:1	10	40	100	0
		0.5	3.0	1:6	--	--	--	--
		0.5	5.0	1:10	--	--	--	--
		5.0	0.5	10:1	--	--	--	--
FOTOPERIODO 12 hrs luz 12 hrs obs	3.0	0.5	6:1	1	4	100	0	
	0.5	0.5	1:1	--	--	--	--	
	0.5	3.0	1:6	1	4	100	0	
	0.5	5.0	1:10	--	--	--	--	



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

Ref. Sem.049-93

LA TESIS TITULADA "EVALUACION DE LA RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS DE GIPSOFILIA (Gypsophila paniculata var. Bristol fine) UTILIZANDO VARIOS EXPLANTES Y TRATAMIENTOS DE AUXINAS-CITOCININAS, EN CONDICIONES DIFERENTES DE LUZ"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: ANA DOLORES AREVALO MORALES

CARNET No: 41125

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Héctor Ramazzini
 Ing. Agr. Marco Vinicio Fernández

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte
 ASESOR



Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
 DIRECTOR DEL IIA

I M P R I M A S E

Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
 DECANO



c.c. Control Académico
 Archivo
 /prr.

APARTADO POSTAL 1515 01901 GUATEMALA, C. A.
 TELEFONO 769794 FAX (5022) 769770