

Anexo 1

Equipos del Laboratorio para realizar el trabajo de investigación.



Cámara de Flujo Laminar



Horno Esterilizador



Autoclave
Esterilización de Calor Húmedo



Horno Microondas

Anexo 2

Elección de la Planta Madre



Escogiendo la planta madre



Plantas seleccionadas

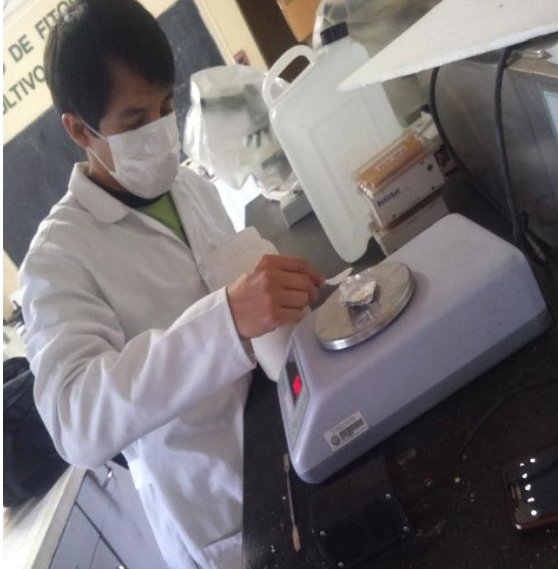
Anexo 3

Esterilización del material de trabajo



Anexo 4

Preparación de los medios de cultivo



Pesado del Agar
(Compuesto solidificante)



Enrrazado



Mezclado de los reactivos en el medio
de cultivo



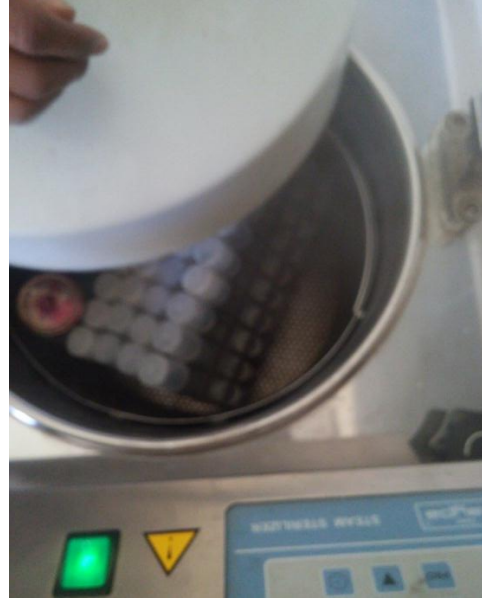
Medición de pH del Medio de Cultivo

Anexo 5

Esterilización de los medios de cultivo en la autoclave



Colocando los medios en la Autoclave



Cerrando la Autoclave

Anexo 6

Extracción de los Segmentos Nodales



Poda de la planta para extraer los segmentos nodales para la desinfección



Extracción de los segmentos nodales

Anexo 7

Desinfección del Material Vegetal



Material para desinfectar



Material Vegetal desinfectado

Anexo 8

Introducción de las variedades de Arándano



Anexo 9

Procedimiento de la Introducción



Desinfección con Alcohol e Hipoclorito de Sodio



Expantes listos para la siembra en los medios de cultivo



Preparados para sacar los explantes después de enjuagarlos tres veces en los frascos con agua destilada



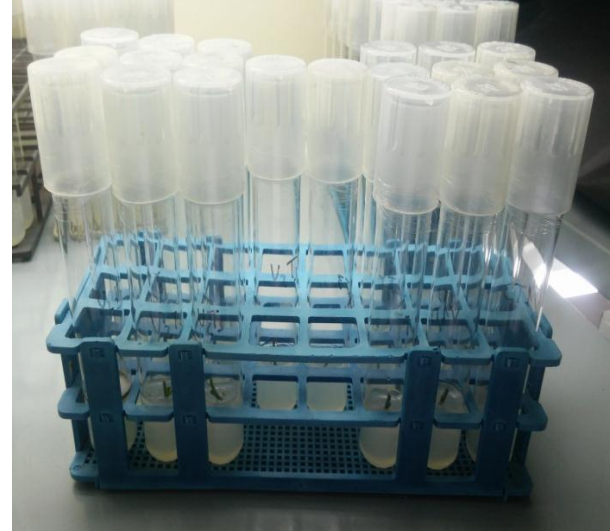
Corte de los extremos de los segmentos nodales debido a que estos se queman cuando se desinfecta con Alcohol e Hipoclorito de Sodio

Anexo 10

Explantos en los medios de cultivo



Flameando el tubo de ensayo su tapa para combatir cualquier agente causal de infección



Ensayo finalizado y listo para ser llevado a la Sala de Crecimiento de Laboratorio

Anexo 11

Sala de Crecimiento



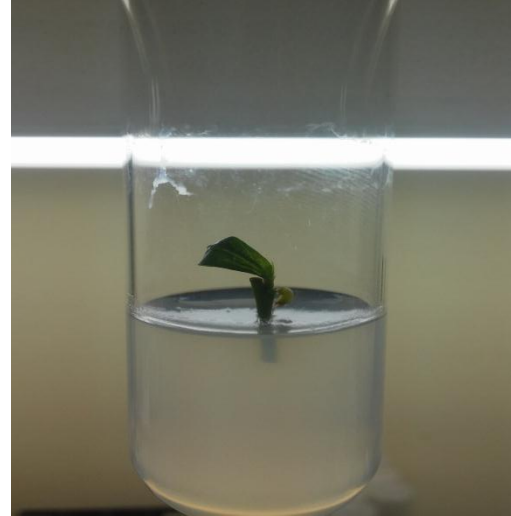
Los explantes Reciben 16 hrs de luz artificial para acelerar su proceso fotosintético, y exista un crecimiento más rápido.

Anexo 12

Evaluación del Primer Ensayo



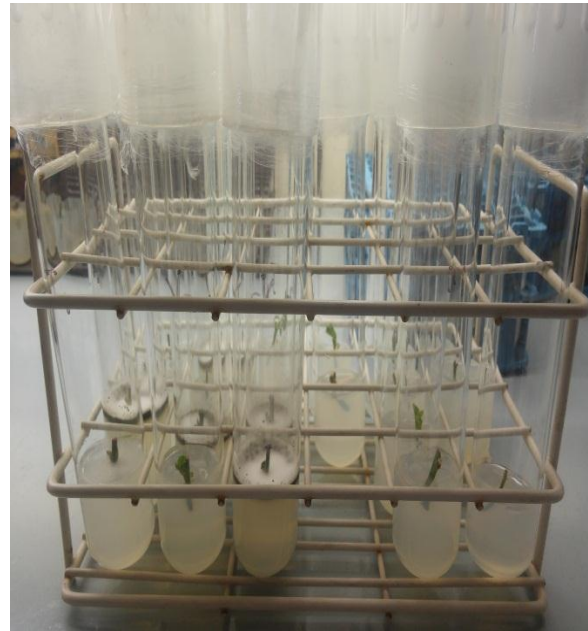
Primer Ensayo (Misty)
Regeneración de los explantes



Regeneración de Explante a los 21 días
Primer ensayo (O Neal)



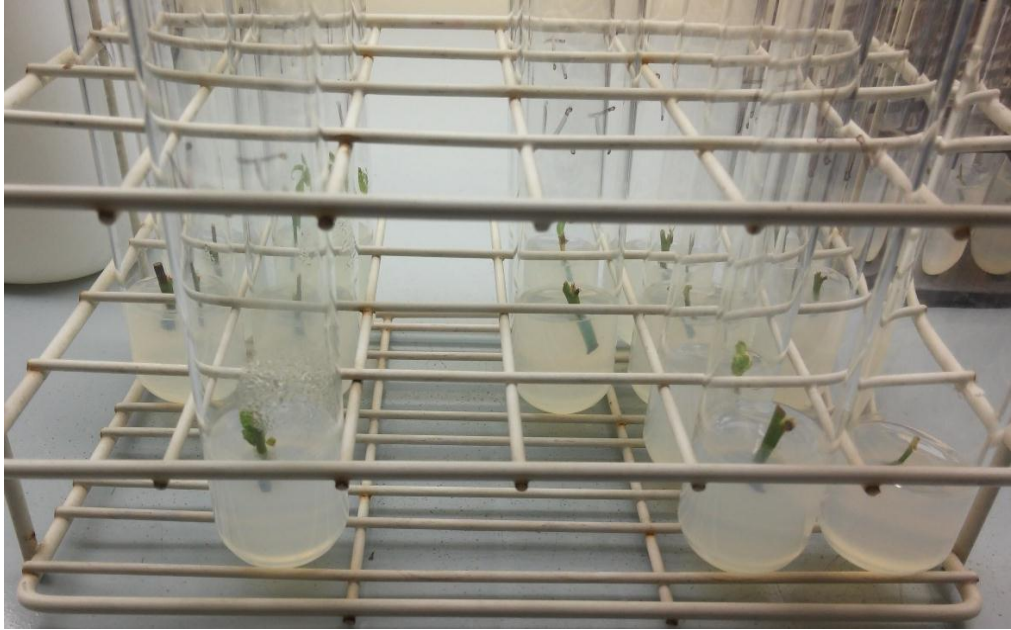
Regeneración O Neal a los 60 días



Evaluación del primer ensayo con muestras
que presentan regeneración y contaminación
Variedad Misty

Anexo 13

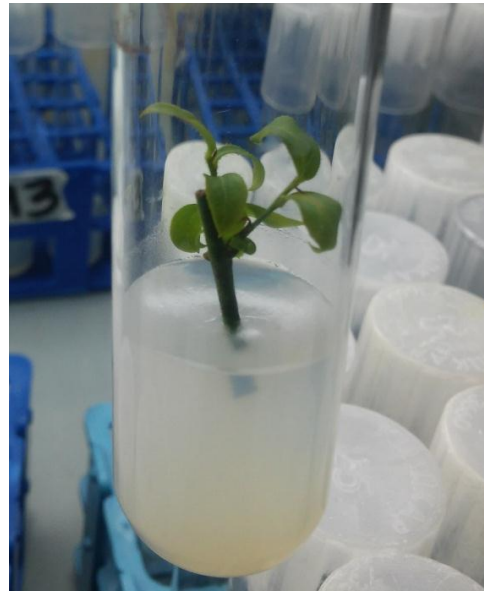
Evaluacion del Segundo Ensayo



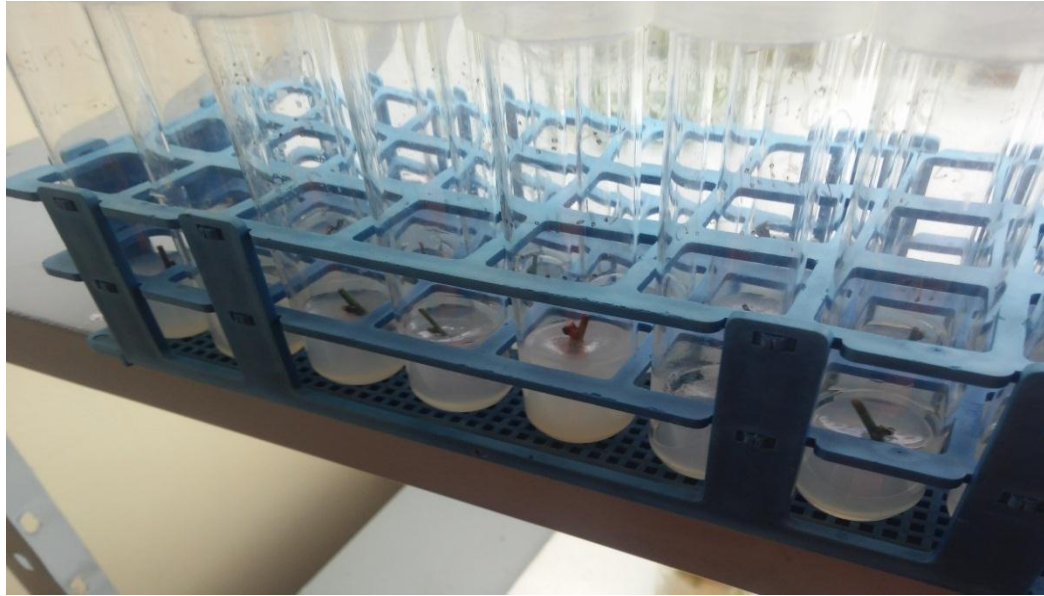
Regeneracion y exclusion de las muestras que fueron contaminadas variedad O Neal



Yema por regenerarse se espera evolución Variedad Misty



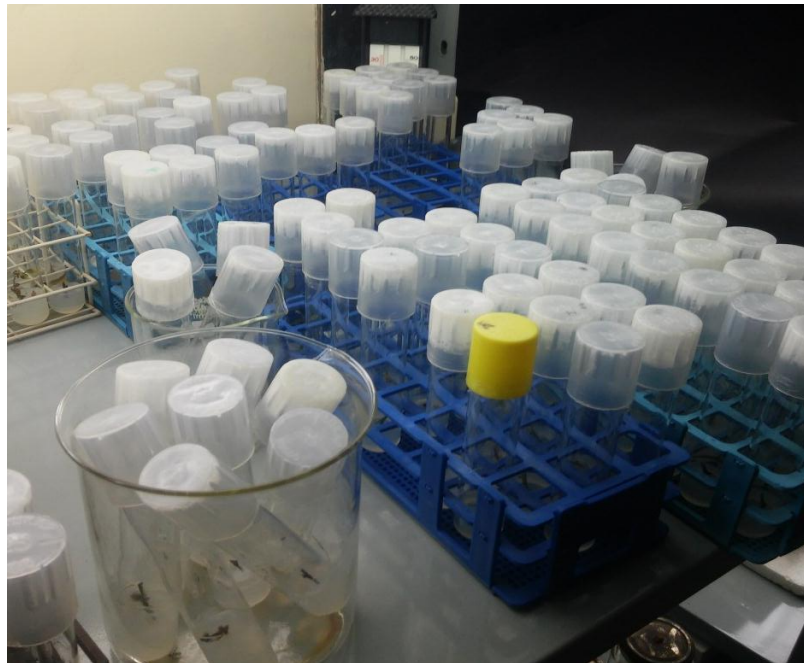
Regeneracion a los 60 dias Variedad O Neal



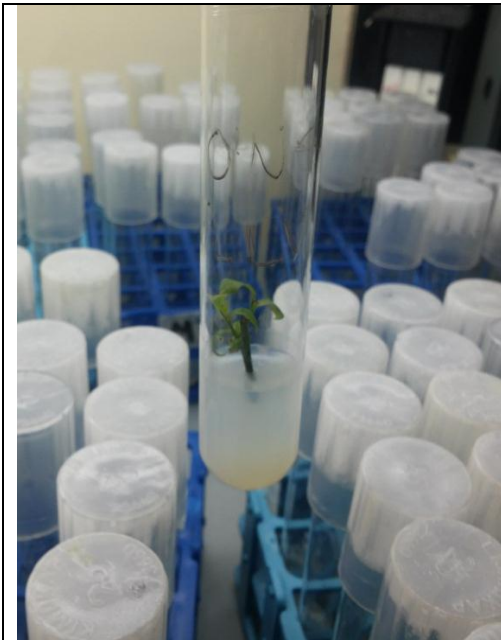
Crecimiento y principios de contaminación del Segundo Ensayo Variedad Misty

Anexo 14

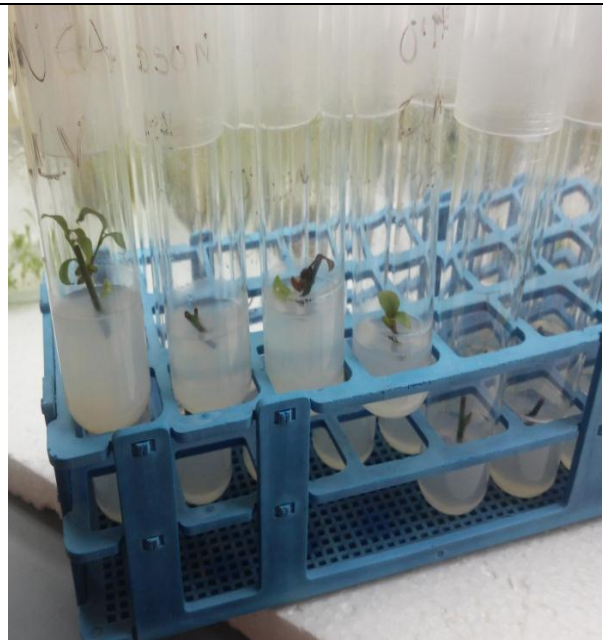
Evaluacion del Tercer Ensayo



Tercer ensayo en la sala de Crecimiento



Explante regenerado Variedad O Neal



Regeneracion Variedad O Neal



Tubo de ensayo contaminado llegando a cubrir el explante

Anexo 15. Protocolo de asepsia de introducción en cultivo in vitro en el laboratorio

El trabajo que se realiza con la técnica del cultivo in vitro se debe realizar con mucho cuidado y asepsia, se debe tomar muy en cuenta el siguiente protocolo de trabajo.

- Realizar el trabajo en ambientes adecuados de laboratorio.
- Usar el guardapolvo en cada una de las fases.
- Lavarse las manos antes de comenzar con el proceso de trabajo.
- Se debe esterilizar y desinfectar los materiales y los medios de cultivos con los que se tiene que trabajar.

Para entrar a la cámara de flujo laminar se debe tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Colocarse barbijo ya que los gérmenes de la boca se pueden transmitir y contaminar los tubos de ensayo, y por ende los explantes que son el material de investigación.
- Limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol antes de introducir el material.
- Limpiarse las manos con alcohol para manipular los instrumentos.
- Flamear los instrumentos para bajar las probabilidades de contaminación en los tubos de ensayo donde están los explante.
- No se debe sacar las manos de la cámara de flujo laminar preferentemente se trabaja en dos así la otra persona ayuda a acercar el material a la cámara de flujo laminar, si por algún motivo el operador retira las manos de la cámara deberá rociar con alcohol sus manos antes de introducirlas nuevamente.
- No se debe manipular por mucho tiempo el material vegetal.

- Se debe acomodar los instrumentos de trabajo de tal forma que sea cómodo para el operador y que sea más fácil usarlos.
- No se debe pasar las manos por encima del material vegetal o de los instrumentos, para así evitar la contaminación que se puede transmitir de las mangas de operador.
- Si en caso que se cayeran las material vegetal sobre el suelo o la base de la cámara de flujo laminar el material deberá ser excluido para su uso.

Anexo 16. Taxonomía del Arandano variedad O Neal y Misty