

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.

**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.**

PRESENTA:

DEISY RUTH ESCALANTE REVUELTA.

PROYECTO:

**PROTOCOLO PARA EL RESCATE DE EMBRIONES EN *Citrus volkameriana pasq*, A
PARTIR DE SEMILLA TOLERANTES AL VIRUS DE LA TRISTEZA.**

ASESOR:

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

REVISORES:

DRA. PATRICIA SANCHEZ ITURBE.

DR. REINER RINCÓN ROSALES.

PERÍODO: ENERO-JUNIO 2011

I N D I C E.

CONTENIDO.	PÁGINA.
1. INTRODUCCIÓN.	3
2. JUSTIFICACIÓN.	4
3. OBJETIVOS GENERALES.	5
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	5
4. ÁREA EN QUE SE PARTICIPÓ.	6
5. PROBLEMAS A RESOLVER.	7
6. ALCANCES Y LIMITACIONES.	8
7. FUNDAMENTO TEÓRICO.	9
7.1. <i>Citrus volkameriana Pasq.</i>	9
7.2. POLIEMBRIONIA.	10
7.3. PORTAINJERTOS DE MEJORAMIENTO.	11
8. METODOLOGÍA.	12
9. RESULTADOS.	18
9.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	39
10. CONCLUSIÓN.	41
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	42

1.- INTRODUCCIÓN

Durante la década de los años 1980, la hibridación somática fue promocionada como una biotécnica que revolucionaría la agricultura y una mejora de la investigación en las plantas. Esta predicción nunca se materializó, los esfuerzos de investigación se han desplazado en gran medida a las estrategias de base molecular. Razones por las que la hibridación somática no tiene un impacto importante en desarrollo de muchos cultivos, debido a una serie de dificultades que se pueden presentar tales como las dificultades en protoplastos en cuanto a el aislamiento, la cultura y la regeneración de plantas en el cultivo de muchos genotipos, y los niveles de diploides elevada que resulta cuando las plantas podrían ser producidas en una hibridación somática. Las biotécnicas desarrollados son a menudo ignoradas u olvidadas antes de que alcancen su pleno potencial, y este fue el caso de la hibridación somática.

Estas técnicas, Sin embargo, pueden tener un gran potencial para productos específicos en los que los impedimentos para su aplicación son mínimos, como es el caso de hibridación somática en los cítricos. La regeneración de los protoplastos de la planta en cítricos es posible para muchos patrones importantes de cítricos y para cultivares de injertos. (Vardi et al, 1982;. Grosser, 1994a). El primer híbrido somático fue entre *Citrus senensis* y *Poncirus trifoliata* el cual se obtuvo en 1985 por Ohgawara et al. Presentando un elevado nivel de aploides (principalmente tetraploide).

La hibridación somática de los cítricos puede realmente tener un impacto positivo en el rendimiento hortícola de los patrones (Grosser et al, 1996a.; Ollitrault et al., 1998a), y tienen un valor específico en la reproducción de

esquemas (Grosser y Gmitter, 1990, 1996, Grosser et al, 1992,. 1998a; Ollitrault et al, 1998b)..

El aumento de la competencia en los mercados internacionales de cítricos y la problemática de las distintas enfermedades que los atacan han estimulado el interés en todo el mundo, para la mejora en los cítricos. Algunas de las mejoras específicas con potencial repercusiones económicas incluyen la mejora de calidad de la fruta para el mercado, resistencia a las plagas en portainjertos y para aumentar la eficiencia de la producción y la longevidad de los árboles. Existen estrategias que involucren aplicaciones de la hibridación somática para cumplir estos objetivos los cuales se han desarrollado e implementado.

2.- JUSTIFICACIÓN.

De los cítricos la mayoría de las plantaciones están injertadas sobre naranjo agrío (*Citrus aurantium L.*), el cual susceptible a la tristeza de los cítricos; por lo que la situación de dicha especie por portainjertos tolerantes a la mencionada enfermedad, en combinación con la utilidad de material vegetal libre de virus, es una estrategia para asegurar la producción. Sin embargo, actualmente no se dispone de suficiente material certificado y semillas de portainjertos tolerantes. Especies como *Citrus reshni* Hort. Ex Tan.; *C. volkameriana* Pasq. Y *C. amblycarpa* Ochse son especies tolerantes al ataque del virus que produce dicha enfermedad, por lo que pueden ser considerados como alternativa de cambio. Estas tres especies presentan poliembrionia; es decir que presentan más de un embrión dentro de una semilla, de los cuales generalmente uno es de origen sexual y el resto origen asexual.

Los embriones asexuales dan origen a plantas genéticamente uniformes e iguales a la planta madre, por lo que el cultivo de estos embriones podría clonar los portainjertos tolerantes a la tristeza y de esta forma disponer en menos tiempo de la cantidad de portainjertos requerida para la producción de cítricos (Andrade, 2002).

Para la realización de este protocolo, en el que se incluye la separación de los embriones y la germinación *In vitro*, se realizara un diseño experimental, con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Centurion, es un diseño factor categórico individual.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar diferentes estrategias para obtener embriones de *Citrus Volkameriana* Pasq.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Desarrollar la técnica adecuada para disociar los embriones a nivel *In vitro*.
- Desarrollar el modelo experimental para la germinación *In vitro* de embriones.

4. ÁREA EN QUE SE PARTICIPÓ.

La citricultura moderna no admite las plantaciones iniciadas desde la semilla, pues tardan muchos años en producir y tiene problemas con el suelo y con algunas enfermedades.

Como consecuencia los arboles de cítricos actualmente están formados por dos partes el patrón y la variedad de modo que combinen entre si dando como resultado las mejores características posibles, de acuerdo con el medio en particular en el que se desarrollen. La selección de los patrones representa en la actualidad, un aspecto de máxima importancia en citricultura una buena elección del patrón pues de ello depende el éxito de la plantación ya que esta aporta a la planta el sistema radicular. Las raíces son quienes absorben el agua y los nutrientes, acumulan los carbohidratos sintetizados en las hojas, adaptan al cultivar a las condiciones del suelo y confieren tolerancia a enfermedades.

A más de 20 características de una variedad o cultivar se hallan influenciadas por el patrón, como el vigor, el tamaño del árbol, el desarrollo de las raíces, la cosecha, tamaño y calidad de la fruta, la época de maduración, tolerancia al frío, adaptación a las condiciones del suelo como Ph, salinidad, exceso de humedad, nematodos, tolerancia a virosis, etc.

Sin embargo no existe el patrón perfecto y su elección debe ser en función de los principales factores limitantes de cada región citrícola, el clima, el tipo de suelo, el cultivar a usar y aunque un patrón se adapte en un porcentaje alto, no es conveniente tener un solo tipo de patrón, tomando en cuenta que todos son susceptibles a diferentes enfermedades.

Su morfología y desarrollo dependen de cada variedad de patrón, con *Citrus volkameriana Pasq* las raíces son profundas y vigorosas, los *citranges* tienen un sistema poco desarrollado, los de *cleopatra* y *agrió* tienen un tamaño intermedio, esto tiene que promediarse con la textura del suelo. Los suelos con más de 8% de caliza o más del 20% de carbonato de calcio limitan el desarrollo de los *citranges*.)

5.- PROBLEMA A RESOLVER.

La industria mundial de cítricos requiere de nuevas variedades, no solo para satisfacer el mercado de fruta fresca que demanda alta calidad, ausencia de semillas y alto contenido de acidez, así como para atender las necesidades de la industria que clama por alta calidad en los jugos y aceites. También se requiere que se incorporen otras características agronómicas, que ayuden a reducir las amenazas que representan algunas enfermedades de alto impacto económico (Viloria y Grosser, 2005).

Actualmente el cultivo de los cítricos en México está siendo amenazado por enfermedades de alto impacto económico como es la tristeza de los cítricos (VTC), que se ha considerado como la enfermedad de tipo viral de mayor importancia económica que afecta al cultivo de los cítricos en todo el mundo. El VTC es transmitido por injerto durante la propagación, o bien es diseminado de forma muy eficiente por el pulgón café (*Toxoptera citricida* Kirkaldi). Se han detectado árboles infectados con VTC en 20 de los 23 estados productores de cítricos del país. Por su parte el pulgón café ya se encuentra en los estados del sureste mexicano, algunos estados del centro y recientemente se le detectó en el estado Guerrero que es uno de los cuatro principales estados productores de cítricos.

De acuerdo con Harms (1992), las enfermedades causadas por virus son especialmente problemáticas ya que además de provocar un serio impacto económico, debido a sus propiedades físicas y biológicas, hacen muy difícil su control (Slack y German, 1998). Por lo que el desarrollo de variedades resistentes es la mejor opción, y ha sido uno de los métodos más eficientes, económicos y ambientalmente seguros para el control de enfermedades virales en plantas (Papu et al., 1995)

En general, el mejoramiento genético en cítricos, se ha dirigido hacia dos grandes temas: a) la producción de portainjertos y b) generación de variedades. En el primer caso se pretende obtener genotipos con resistencia a factores bióticos y abióticos tales como; virus, Phytophthora, nematodos, salinidad, sequía y bajas temperaturas, asimismo, que induzcan un porte bajo a los árboles y la producción temprana. Respecto al segundo, se ha tratado de generar variedades con buena producción, de madurez precoz, fruta de buen tamaño

6.- ALCANCES Y LIMITACIONES

La estrategia del rescate y cultivo In vitro de embriones en un medio nutritivo es una alternativa que asegura la germinación del embrión y el desarrollo de los descendientes de los cruzamientos. El éxito del rescate de los embriones va a depender de la composición del medio de cultivo, del estado de desarrollo del embrión y del genotipo. Por otro lado las limitaciones para desarrollar este proyecto, pueden depender de las condiciones y características de las semillas, de las cuales se extraen los embriones; pues tienen un papel importante: la edad de la planta, el estado nutrimental, y fisiología de la misma, de ello depende el número de embriones nucelares en una semilla.

7.- FUNDAMENTO TEÓRICO.

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a las selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre.

Citrus x limón, el limonero, es un pequeño árbol frutal perenne que puede alcanzar más de 4 m de altura. Su fruto es el limón, una fruta comestible de sabor ácido y extremadamente fragante que se usa en la alimentación. El limonero posee una madera con corteza lisa y madera dura y amarillenta muy apreciada para trabajos de ebanistería. Botánicamente, es una especie híbrida entre *C. medica* (cidro o limón francés) y *C. aurantium* (naranja amarga) (Gulsen y Roose, 2001) . Aunque otros autores creen que es el resultado de diversos retrocruces entre *Citrus medica* y *Citrus aurantifolia* (Mabberley, 2005).

7.1.- *Citrus. Volkameriana Pasq.-*

Familia: *Rutaceae*

Genero: *Citrus*

Especie: *Citrus volkameriana Pasq.*

Este tipo de patrón es un Híbrido natural de limonero, ejerce una influencia vital en la producción y comportamiento de los cítricos. Las ventajas que se obtienen con la utilización de este patrón con múltiples y entre ellas se pueden mencionar las siguientes: una mejor adaptabilidad a diferentes condiciones de suelo y clima; mayor uniformidad en calidad de fruto y época de producción; presenta buena tolerancia a la caliza y una moderada resistencia al frío, a la salinidad y los

ataques de *Phytophthora pp.* Y de mal seco. Es tolerante a la tristeza, *exocortis* y probablemente a *xyloporosis*. Se ha mostrado, sin embargo sensible a algunas virosis.

La mayoría de cultivares de limas y limones presentan el fenómeno conocido como apomixis o poliembrionía y producen varios embriones en cada semilla (Soost y Roose, 1996). La embrionía nucelar, junto con heterocigocidad, esterilidad, incompatibilidad y largo período juvenil, han dificultado el mejoramiento genético la mayoría de los cítricos mediante la hibridación sexual convencional (Kochba y Spieguel-Roy, 1977; Aliza-Vardi, 1981; Vardi et al., 1996;) y esto ha impedido que los fitomejoradores utilicen las fuentes de variación existentes para incorporar genes de resistencia que pueden estar presentes en los géneros cercanos a los cítricos (Rocha-Peña et al., 1995).

7.2.- POLIEMBRIONIA.

La embriogénesis somática en los cítricos tras una completa revisión sobre los estudios del cultivo de tejidos de cítricos ha sido publicada por Botón y Kojba, los cuales informan que la mayoría de las especies de cítricos son poliembriónicas y pueden producir de uno a 40 embriones en la nucela. La poliembrionía se cree que es un carácter recesivo, hereditario controlado por múltiples genes.

Estos genes pueden regular la síntesis de un potente inhibidor de la embriogénesis en células de variedades poliembriónicas. Esta proporcionada por polinización, y posiblemente por la fertilización y el desarrollo temprano de un embrión cigótico. La frecuencia de poliembrionía está influenciada por el estado nutricional de la fruta y factores ambientales externos.

La poliembrionía es la formación de mas de un embrión dentro de un ovulo. De acuerdo con Lakshmsnsn y Smbegoakar (1984), la poliembrionía en angiospermas puede se clasificada como simple o múltiple dependiendo de la presencia de uno o varios sacos embrionarios dentro del mismo ovulo. En las especies de Citrus, la embrionía nucelar parece ocurrir solo en presencia de la reproducción sexual normal, ya que el estímulo del embrión cigótico en desarrollo conduce al crecimiento posterior de de los embriones apomicticos de la nucela. Asi , los procesos sexual y apomictico coexisten dentro del mismo ovulo. (Richards, 1986).

El numero de embriones nucleares en una semilla varia con: la edad de la planta, el estado nutrimental, y fisiología de la misma, el polen progenitor, la posición de las ramas del árbol, la carga de frutos, los factores ambientales (Frost y Soost, 1968). También el número de plántulas por semilla varía de una especie a otra así, citrus macrocarpa produce alrededor de 21, mientras que C. unshiu produce cerca de 40 (Lakshmsnsn y Smbegoakar 1984).

7.3.- PORTAINJERTOS DE MEJORAMIENTO:

El uso de portainjertos es inherente a la citricultura mundial. Algunos genotipos de portainjertos son en general de más amplia adaptación y ofrecen mejor resistencia a las enfermedades que la mayoría de vástagos cultivados en sus propias raíces. En ciernes de una selección de árboles maduros en portainjertos de las semillas evita juventud y mantiene la integridad de cultivar.

Los árboles en patrones por lo tanto entran en producción más rápida y generalmente producen mayor calidad de la fruta de los árboles. Sin embargo, la necesidad de mejorar los portainjertos de cítricos nunca ha sido mayor.

Los portainjertos de cítricos comerciales utilizados en todo el mundo rara vez se cumplen todos los criterios de selección de una ubicación específica, incluyendo la enfermedad y resistencia a los nematodos, resistencia al frío, la adaptación a distintos suelos y condiciones, el tamaño del árbol apropiado, y altos rendimientos en cuanto a la calidad de la fruta.

La técnica de hibridación somática es muy apropiada para los cítricos patrones de crianza. De hecho, se permite la adición de los genomas nucleares de los dos genitores complementarios sin recombinación. De esta manera, los rasgos dominantes pueden ser efectivamente apilados en cada híbrido.

8.- METODOLOGÍA.

El trabajo se realizó a partir de semillas de *Citrus Volkamerian pasq.* (Limón volkameriano), donadas por el Departamento de Tecnologías, del Instituto para la Reconversión productiva y Bioenergéticos.

Para el desarrollo del trabajo, se dividió en dos fases, en la primer fase se lleva a cabo la separación de los embriones contenidos en la semilla de *Citrus Volkameriana pasq* y su establecimiento *In vitro* Y la segunda fase, consiste en el desarrollo del diseño experimental a partir de los embriones germinados durante la primera fase. Además se desarrollaron dos estrategias en cuanto a las condiciones de oscuridad, para el desarrollo de los embriones.

8.1.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 1:

8.1.1 PRIMER FASE.

A) Desinfección de las semillas:

Las semillas de *Citrus volkameriana Pasq.* que se utilizaron estaban previamente secas. Se eliminaron manualmente los tegumentos de la semilla, posteriormente fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.7%, las semillas fueron sumergidas en la solución durante 15 min. Para la esterilización de la superficie y se enjuagaron varias veces con agua destilada. Todo este trabajo se realizó en una campana de flujo laminar y utilizando materiales estériles.

B) El medio de cultivo utilizado para el establecimiento, fue el medio de Murashige y skoog (1962) medio MS. Este medio de cultivo está compuesto por: Macronutrientes, Micronutrientes, Quelatos, Vitaminas, Mio-inositol, Fosfato, Azúcar y phytigel para solidificar al medio. Siendo el Ph final del medio de 5.7. El medio fue calentado hasta ebullición para ser luego vertido en frascos de cristal tipo gerber. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a una presión de 15 lb con una temperatura de 121°C por un periodo de 20 min.

C) En la fase de desinfección las semillas fueron ablandadas por la solución, por lo tanto dichas semillas fueron partidas naturalmente (sin realizar corte alguno), los embriones fueron escindidos de la semilla posteriormente fueron sembradas en el medio sólido de sales (MS) y se incubaron a 27°C, en completa oscuridad por un periodo de 4 semanas. Transcurrido este tiempo, fueron expuestas a la luz en un periodo de 10 días, con un fotoperiodo de 16

hrs.luz. Como estrategia para obtener condiciones de oscuridad, los frascos fueron envueltos en bolsas de polietileno color negro, y puestas en estantes.

8.1.3 SEGUNDA FASE.

En esta fase se llevara a cabo el diseño experimental de los embriones germinados en la primera etapa. Para lo cual se utilizo un diseño estadístico, factor categórico individual con 55 unidades experimentales, con grados de libertad por error 50, para evaluar el efecto del BAP con 5 niveles. Las 55 unidades se obtendrán de los embriones germinados en la primera fase, para ello se volverán a sembrar los embriones en un nuevo medio de cultivo.

A) El medio de cultivo utilizado para el desarrollo de los embriones, fue el medio de Murashige y skoog (1962) medio MS. Este medio de cultivo esta compuesto por: Macronutrientes, Micronutrientes, Quelatos, Vitaminas, Mio-inositol, Fosfato, Azúcar y phytigel para solidificar al medio; para esta etapa el medio se suplemento con Bencilaminopurina (BAP) en concentraciones diferentes (0,0.5,1,1.5,2 mg/L). Siendo el Ph final del medio de 5.7. El medio fue calentado hasta ebullición para ser luego vertido en frascos de cristal tipo gerber. La esterilización se llevo a acabo en autoclave a una presión de 15 lb con una temperatura de 121°C por un periodo de 20 min.

B) Los embriones germinados, fueron sembrados en el medio de cultivo que contiene las diferentes concentraciones del regulador de crecimiento; las muestras fueron incubadas en primer lugar en la oscuridad durante 30 días y luego fue trasladado a un fotoperiodo de 16 hrs (las muestras fueron colocadas, conforme a la numeración del cuadro No. 1).

Como estrategia para obtener condiciones de oscuridad, los frascos fueron envueltos en bolsas de polietileno color negro, y puestas en estantes.

La valoración se realizó después de 45 días de cultivo para determinar; números de explantes, números de brotes por explantes.

Cuadro No.1. Colocación de frascos para el diseño experimental (STATGRAPHICS Centurión).

No. De frasco.	Concentración.	No. De frasco.	Concentración.
1	0	29	0.5
2	0.5	30	1
3	1.5	31	1.5
4	0	32	0
5	0	33	1.5
6	1.5	34	1
7	2	35	1
8	1	36	1.5
9	2	37	0.5
10	2	38	0.5
11	0.5	39	0
12	1	40	0
13	2	41	1
14	0.5	42	2
15	2	43	1
16	1	44	0
17	1	45	2
18	2	46	0
19	1	47	0.5
20	1	48	2
21	0	49	0.5
22	2	50	1.5
23	0.5	51	0.5
24	0.5	52	1.5
25	1.5	53	1.5
26	1.5	54	2
27	1.5	55	0
28	0		

8.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 2:

8.2.1 PRIMER FASE.

A) Desinfección de las semillas:

Las semillas de *Citrus volkameriana Pasq.* que se utilizaron estaban previamente secas. Se eliminaron manualmente los tegumentos de la semilla, posteriormente fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.7%, las semillas fueron sumergidas en la solución durante 15 min. Para la esterilización de la superficie y se enjuagaron varias veces con agua destilada. Todo este trabajo se realizó en una campana de flujo laminar y utilizando materiales estériles.

B) El medio de cultivo utilizado para el establecimiento, fue el medio de Murashige y skoog (962) medio MS. Este medio de cultivo está compuesto por: Macronutrientes, Micronutrientes, Quelatos, Vitaminas, Mio-inositol, Fosfato, Azúcar y phytigel para solidificar al medio. Siendo el Ph final del medio de 5.7. El medio fue calentado hasta ebullición para ser luego vertido en frascos de cristal tipo gerber. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a una presión de 15 lb con una temperatura de 121°C por un periodo de 20 min.

C) En la fase de desinfección las semillas fueron ablandadas por la solución, por lo tanto dichas semillas fueron partidas naturalmente (sin realizar corte alguno), los embriones fueron escindidos de la semilla posteriormente fueron sembradas en el medio sólido de sales (MS) y se incubaron a 27°C, como estrategia, los frascos fueron colocados en un estante en el cual estaban a media luz. Los embriones en esta ocasión, no se desarrollaron en condiciones de oscuridad; el periodo que estuvo en esta fase de media luz fue de 49 días.

8.2.3 SEGUNDA FASE.

En esta fase se llevara a cabo el diseño experimental de los embriones germinados en la primera etapa. Para lo cual se utilizo un modelo estadístico, que consta de 55 unidades experimentales para evaluar el efecto de BAP con 5 niveles. Las 55 unidades se obtendrán de los embriones germinados en la primera fase, para ello se volverán a sembrar los embriones en un nuevo medio de cultivo.

A) El medio de cultivo utilizado para el desarrollo de los embriones, fue el medio de Murashige y skoog (1962) medio MS. Este medio de cultivo esta compuesto por: Macronutrientes, Micronutrientes, Quelatos, Vitaminas, Mio-inositol, Fosfato, Azúcar y phytigel para solidificar al medio; para esta etapa el medio se suplemento con Bencilaminopurina (BAP) en concentraciones diferentes (0,0.5,1,1.5,2 mg/L). Siendo el Ph final del medio de 5.7. El medio fue calentado hasta ebullición para ser luego vertido en frascos de cristal tipo gerber. La esterilización se llevo a acabo en autoclave a una presión de 15 lb con una temperatura de 121°C por un periodo de 20 min.

B) Los embriones germinados, fueron sembrados en el medio de cultivo que contiene las diferentes concentraciones del regulador de crecimiento; las muestras fueron incubadas (las muestras fueron colocadas, conforme a la numeración del cuadro No. 1).

Los datos presentados correspondientes a esta estrategia, fueron recabados a los a los 56 días de haber sembrado los embriones. Esta parte del experimento aun continúa desarrollándose, completando los 45 días para finalizar el desarrollo experimental.

9. RESULTADOS.

**Cuadro No.2. Resultados obtenidos, a través del programa STATGRAPHICS
Centurión, correspondientes a la estrategia No.1**

No. De frascos	Concentraciones de BAP.	Presentaron Brotes	Embriones germinados	Cambios en coloración
1	0	0	0	0
2	0.5	0	2	0
3	1.5	0	0	0
4	0	0	2	0
5	0	0	0	0
6	1.5	0	0	1
7	2	0	0	0
8	1	0	0	0
9	2	0	0	1
10	2	0	0	1
11	0.5	0	0	1
12	1	0	0	0
13	2	1	0	0
14	0.5	1	0	0
15	2	1	0	1
16	1	0	0	0
17	1	0	0	1
18	2	1	0	0
19	1	0	0	1
20	1	0	0	0
21	0	0	0	0
22	2	0	0	1
23	0.5	0	0	0
24	0.5	0	0	1
25	1.5	0	0	0
26	1.5	0	0	0
27	1.5	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0.5	0	0	0
30	1	0	0	0
31	1.5	0	0	0
32	0	0	0	0
33	1.5	0	0	0

No. De frascos	Concentraciones de BAP.	Presentaron Brotes	Embriones germinados	Cambios en coloración
34	1	0	0	0
35	1	0	0	0
36	1.5	0	0	0
37	0.5	0	0	1
38	0.5	0	0	1
39	0	0	0	1
40	0	0	0	0
41	1	0	0	0
42	2	0	0	0
43	1	0	0	0
44	0	0	0	0
45	2	0	0	0
46	0	0	0	0
47	0.5	0	0	0
48	2	0	0	0
49	0.5	0	0	0
50	1.5	0	0	0
51	0.5	0	0	0
52	1.5	0	0	0
53	1.5	0	2	0
54	2	0	0	0
55	0	0	0	0

Cuadro No.2. Efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de brotes por explante evaluada a los 75 días de sembradas las semillas de *Citrus volkameriana pasq* utilizando la estrategia experimental 1 descrita en metodología.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 1.

EMBRIONES QUE PRESENTARON BROTES.

En el cuadro 3 se observa que el promedio de número de brotes por explante evaluado a los 45 días varió desde 0 en los tratamientos con 0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de BAP hasta 0.27 en el tratamiento con 2 mg/l de BAP. Se observa que el coeficiente de variación fue desde 0 hasta 360. 4 %. Este Cuadro muestra diferentes estadísticos de Brotes por explante para cada uno de los 5 niveles de BAP.

Hay una diferencia de más de 3 a 1 entre la desviación estándar más pequeña y la más grande. Esto puede causar problemas puesto que el análisis de varianza asume que las desviaciones estándar de todos los niveles son igual.

Cuadro 3. - Resumen Estadístico de la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de brotes por explante.

BAP	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
0	11	0.0	0.0	%	0.0	0.0	0.0	
0.5	11	0.09	0.30	331.66%	0.0	1.0	1.0	4.49
1	11	0.0	0.0	%	0.0	0.0	0.0	
1.5	11	0.0	0.0	%	0.0	0.0	0.0	
2	11	0.27	0.47	171.27%	0.0	1.0	1.0	1.61
Total	55	0.07	0.26	360.36%	0.0	1.0	1.0	10.24

BAP	Curtosis Estandarizada
0	
0.5	7.44
1	
1.5	
2	-0.52
Total	14.84

N=Número de observaciones: 55

En el cuadro 4 se observa el ANOVA descompone la varianza de Brotes explante en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2.5, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Brotes explante entre un nivel de BAP y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro 4.- ANOVA para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de brotes por explante a los 45 días.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.62	4	0.15	2.50	0.05
Intra grupos	3.09	50	0.06		
Total (Corr.)	3.71	54			

Cuadro 5.- Medias para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de brotes por explante a los 45 días con intervalos de confianza del 95.0%

BAP	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	11	0.0	0.075	-0.11	0.11
0.5	11	0.09	0.075	-0.01	0.20
1	11	0.0	0.075	-0.11	0.11
1.5	11	0.0	0.075	-0.11	0.11
2	11	0.27	0.075	0.17	0.38
Total	55	0.07			

Esta tabla muestra la media de Brotes por explante para cada nivel de BAP. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces.

Cuadro No. 6: Pruebas de Múltiple Rangos para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de brotes por explante a los 45 días.

A)

Método: 95.0 porcentaje LSD

BAP	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	11	0.0	X
1	11	0.0	X
1.5	11	0.0	X
0.5	11	0.09	XX
2	11	0.27	X

B)

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 0.5		-0.09	0.213
0 - 1		0.0	0.213
0 - 1.5		0.0	0.213
0 - 2	*	-0.27	0.213
0.5 - 1		0.09	0.213
0.5 - 1.5		0.09	0.213
0.5 - 2		-0.18	0.213
1 - 1.5		0.0	0.213
1 - 2	*	-0.27	0.213
1.5 - 2	*	-0.27	0.213

*indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En el cuadro 6A se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

C) Verificación de Varianza

	Prueba	Valor-P
Levenes	2.5	0.05

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de Brotes por explante dentro de cada uno de los 5 niveles de BAP es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

EMBRIONES GERMINADOS.

En el cuadro 9 se observa que el promedio de número de embriones germinados a los 75 días varió desde 0 en los tratamientos con 0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de BAP hasta 0.2 en el tratamiento con 2 mg/l de BAP. Se observa que el coeficiente de variación fue desde 0 hasta 331.7 %. Este Cuadro muestra diferentes estadísticos de Brotes por explante para cada uno de los 5 niveles de BAP.

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor embriones. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Cuadro No. 7.- Resumen Estadístico de la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones germinados.

BAP	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
0	10	0.2	0.63	316.23%	0.0	2.0	2.0	4.08
0.5	11	0.18	0.60	331.66%	0.0	2.0	2.0	4.49
1	11	0.0	0.0	%	0.0	0.0	0.0	
1.5	11	0.18	0.60	331.66%	0.0	2.0	2.0	4.49
2	11	0.0	0.0	%	0.0	0.0	0.0	
Total	54	0.11	0.46	416.18%	0.0	2.0	2.0	11.98

BAP	Curtosis Estandarizada
0	6.45
0.5	7.45
1	
1.5	7.45
2	
Total	21.71

Esta tabla muestra diferentes estadísticos del número de embriones para cada uno de los 5 niveles de BAP.

Hay una diferencia de más de 3 a 1 entre la desviación estándar más pequeña y la más grande. Esto puede causar problemas puesto que el análisis de varianza asume que las desviaciones estándar de todos los niveles es igual.

El sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 a +2 para los 3 niveles de BAP. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales.

Cuadro No. 8. Tabla ANOVA para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones germinados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.460	4	0.11	0.52	0.72
Intra grupos	10.87	49	0.22		
Total (Corr.)	11.33	53			

El cuadro No. 8. ANOVA descompone la varianza de en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.518952, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de embriones germinados entre un nivel de BAP y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro No. 9. Medias para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones germinado con intervalos de confianza del 95.0%.

BAP	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	10	0.2	0.149	-0.01	0.41
0.5	11	0.18	0.142	-0.02	0.38
1	11	0.0	0.142	-0.20	0.20
1.5	11	0.18	0.142	-0.02	0.38
2	11	0.0	0.142	-0.20	0.20
Total	54	0.111			

Este cuadro muestra la media de embriones separados para cada nivel de BAP. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces.

Cuadro No. 10. Pruebas de Múltiple Rangos la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones germinados.

A)

BAP	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	11	0.0	X
1	11	0.0	X
1.5	11	0.18	X
0.5	11	0.18	X
0	10	0.2	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

B)

Contra- ste	Sig.	Diferenc ia	+/- Límites
0 - 0.5		0.01	0.41
0 - 1		0.2	0.41
0 - 1.5		0.01	0.41
0 - 2		0.2	0.41
0.5 - 1		0.18	0.40
0.5 - 1.5		0.0	0.40
0.5 - 2		0.18	0.40
1 - 1.5		-0.18	0.40
1 - 2		0.0	0.40
1.5 - 2		0.18	0.40

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

C)

	Prueba	Valor-P
Levene' s	0.52	0.72

Verificación de Varianza

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar del número de embriones dentro de cada uno de los 5 niveles de BAP es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

CAMBIOS DE APARIENCIA DE LOS EMBRIONES.

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de los embriones germinados, para los 5 diferentes niveles de BAP. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

En el cuadro 15 se observa que el promedio de número de embriones germinados a los 75 días varió desde 0 en los tratamientos con 0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de BAP hasta 0.3 en el tratamiento con 2 mg/l de BAP. Se observa que el coeficiente de variación fue desde 138.744% hasta 331.7 %. Este Cuadro muestra diferentes estadísticos de Brotes por explante para cada uno de los 5 niveles de BAP.

Cuadro No. 11. Resumen Estadístico de la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones que cambiaron de apariencia.

BAP	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
0	11	0.09	0.30	331.66%	0.0	1.0	1.0	4.49
0.5	11	0.36	0.50	138.74%	0.0	1.0	1.0	0.89
1	11	0.18	0.40	222.49%	0.0	1.0	1.0	2.60
1.5	11	0.09	0.30	331.66%	0.0	1.0	1.0	4.49
2	11	0.36	0.50	138.74%	0.0	1.0	1.0	0.89
Total	55	0.22	0.42	191.04%	0.0	1.0	1.0	4.25

BAP	Curtosis Estandarizada
0	7.45
0.5	-1.33
1	1.38
1.5	7.45
2	-1.33
Total	-0.05

Número de observaciones: 55
Número de niveles: 5

Esta tabla muestra diferentes estadísticos del número de embriones germinados para cada uno de los 5 niveles de BAP. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles.

El sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 a +2 para los 3 niveles de BAP. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales.

Cuadro No.12. ANOVA para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones que cambiaron de apariencia.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.84	4	0.21	1.22	0.31
Intra grupos	8.54	50	0.17		
Total (Corr.)	9.38	54			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los embriones germinados en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 1.2234, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los embriones germinados entre un nivel de BAP y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro No. 13. Medias para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones que cambiaron de apariencia con intervalos de confianza del 95.0%

BAP	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	11	0.09	0.12	-0.09	0.27
0.5	11	0.36	0.12	0.19	0.54
1	11	0.18	0.12	0.00	0.36
1.5	11	0.09	0.12	-0.09	0.27
2	11	0.36	0.12	0.19	0.54
Total	55	0.21			

Esta tabla muestra la media de los embriones germinados para cada nivel de BAP. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media.

Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces.

Cuadro No. 14. Pruebas de Múltiple Rangos la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones que cambiaron de apariencia

A)

BAP	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	11	0.09	X
1.5	11	0.09	X
1	11	0.18	X
2	11	0.36	X
0.5	11	0.36	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

B)

Contras te	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 0.5		-0.27	0.35
0 - 1		-0.09	0.35
0 - 1.5		0.0	0.35
0 - 2		-0.27	0.35
0.5 - 1		0.18	0.35
0.5 - 1.5		0.27	0.35
0.5 - 2		0.0	0.35
1 - 1.5		0.09	0.35
1 - 2		-0.18	0.35
1.5 - 2		-0.27	0.35

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

C)

	Prueba	Valor-P	Verificación de Varianza
Levenes	1.22	0.31	

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar los embriones que cambiaron de apariencia, dentro de cada uno de los 5 niveles de BAP es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 2.

**Cuadro No.15. Resultados obtenidos, a través del programa STATGRAPHICS
Centurión, correspondientes a la estrategia No.1**

No. De frascos	No. De embriones	Embriones germinados.
	2	1
2	2	1
3	3	2
4	2	2
5	2	1
6	2	1
7	2	1
8	1	1
9	2	2
10	2	2
11	2	1
12	2	1
13	3	1
14	2	1
15	2	2
16	1	1
17	1	1
18	2	1
19	1	1
20	2	1
21	2	1
22	2	1
23	3	1
24	2	1
25	3	2
26	2	1
27	2	1
28	2	1
29	2	1
30	2	1
31	2	2
32	1	1
33	2	2
34	1	1
35	1	1
36	3	1
37	2	1

No. De frascos	No. De embriones	Embriones germinados.
38	2	1
39	2	1
40	2	2
41	3	3
42	2	1
43	2	1
44	2	2
45	2	1
46	3	1
47	2	1
48	3	1
49	1	1
50	2	1
51	2	2
52	2	1
53	2	1
54	2	1
55	2	1

Cuadro No.15. Efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones evaluada a los 56 días de sembradas las semillas de *Citrus volkameriana pasq.* Utilizando la estrategia experimental 2 descrita en metodología

NÚMERO DE EMBRIONES.

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para número de embriones para los 5 diferentes niveles de BAP. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

En el cuadro 9 se observa que el promedio de número de embriones germinados a los 56 días varió desde 1.54 en los tratamientos con 0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de BAP hasta 2.27 en el tratamiento con 2 mg/l de BAP. Se observa que el coeficiente de variación fue desde 18.54 hasta 44.48 %. Este Cuadro muestra diferentes estadísticos de Brotes por explante para cada uno de los 5 niveles de BAP.

Cuadro No 16. Resumen Estadístico de la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones.

BAP	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
0	11	2.0	0.45	22.36%	1.0	3.0	2.0	0.0
0.5	11	2.0	0.45	22.36%	1.0	3.0	2.0	0.0
1	11	1.54	0.69	44.49%	1.0	3.0	2.0	1.26
1.5	11	2.27	0.47	20.55%	2.0	3.0	1.0	1.61
2	11	2.18	0.40	18.54%	2.0	3.0	1.0	2.60
Total	55	2.0	0.54	27.22%	1.0	3.0	2.0	0.0

BAP	Curtosis Estandarizada
0	3.38
0.5	3.38
1	0.05
1.5	-0.52
2	1.38
Total	0.90

Esta tabla muestra diferentes estadísticos de número de embriones² para cada uno de los 5 niveles de BAP. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles.

El sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 a +2 para los 3 niveles de BAP. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales.

Cuadro No. 17. ANOVA para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.45	4	0.86	3.44	0.01
Intra grupos	12.54	50	0.25		
Total (Corr.)	16.0	54			

La tabla ANOVA descompone la varianza de número de embriones en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.44203, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de número de embriones² entre un nivel de BAP y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro No. 18. Medias para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones por BAP con intervalos de confianza del 95.0%

BAP	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	11	2.0	0.15	1.78	2.21
0.5	11	2.0	0.15	1.78	2.21
1	11	1.54	0.15	1.33	1.76
1.5	11	2.27	0.15	2.06	2.49
2	11	2.18	0.15	1.97	2.40
Total	55	2.0			

Esta tabla muestra la media de número de embriones para cada nivel de BAP. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces.

Cuadro No. 19. Pruebas de Múltiple Rangos para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre el número de embriones.

A)

BAP	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	11	1.54	X
0	11	2.0	X
0.5	11	2.0	X
2	11	2.18	X
1.5	11	2.27	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

B)

Contra	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 0.5		0.0	0.42
0 - 1	*	0.45	0.42
0 - 1.5		-0.27	0.42
0 - 2		-0.18	0.42
0.5 - 1	*	0.45	0.42
0.5 - 1.5		-0.27	0.42
0.5 - 2		-0.18	0.42
1 - 1.5	*	-0.73	0.42
1 - 2	*	-0.63	0.42
1.5 - 2		0.09	0.42

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

c)

	Prueba	Valor-P	Verificación de Varianza
Levenes	1.15	0.34	

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de número de embriones dentro de cada uno de los 5 niveles de BAP es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

EMBRIONES GERMINADOS.

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para embriones germinados. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de embriones germinados para los 5 diferentes niveles de BAP. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias.

Cuadro No. 20. Resumen Estadístico de la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones germinados.

BAP	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado
0	11	1.27	0.47	36.70%	1.0	2.0	1.0	1.61
0.5	11	1.09	0.30	27.64%	1.0	2.0	1.0	4.49
1	11	1.18	0.60	51.02%	1.0	3.0	2.0	4.49
1.5	11	1.36	0.50	37.00%	1.0	2.0	1.0	0.89
2	11	1.27	0.47	36.70%	1.0	2.0	1.0	1.61
Total	55	1.24	0.47	38.01%	1.0	3.0	2.0	5.50

BAP	Curtosis Estandarizada
0	-0.52
0.5	7.45
1	7.45
1.5	-1.33
2	-0.52
Ttal	3.8961

Esta tabla muestra diferentes estadísticos de embriones germinados para cada uno de los 5 niveles de BAP. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles.

El sesgo estandarizado y/o la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 a +2 para los 2 niveles de BAP. Esto indica algo de no normalidad significativa en los datos, lo cual viola el supuesto de que los datos provienen de distribuciones normales.

Cuadro No. 21. ANOVA para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones germinados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.47	4	0.12	0.52	0.72
Intra grupos	11.45	50	0.23		
Total (Corr.)	11.93	54			

La tabla ANOVA descompone la varianza de embriones germinados en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.515873, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de embriones germinados entre un nivel de BAP y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Cuadro No. 22. Medias para la evaluación de diferentes concentraciones de BAP sobre embriones germinados con intervalos de confianza del 95.0%

BAP	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior
0	11	1.27	0.14	1.07	1.48
0.5	11	1.09	0.14	0.89	1.29
1	11	1.18	0.14	0.98	1.39
1.5	11	1.36	0.14	1.16	1.57
2	11	1.27	0.14	1.07	1.48
Total	55	1.23			

Esta tabla muestra la media de embriones germinados para cada nivel de BAP. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95.0% de las veces.

Cuadro No. 23. Pruebas de Múltiple Rangos para embriones germinados por BAP

A)

BAP	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0.5	11	1.09	X
1	11	1.18	X
0	11	1.27	X
2	11	1.27	X
1.5	11	1.36	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

B)

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 0.5		0.18	0.40
0 - 1		0.09	0.40
0 - 1.5		-0.09	0.40
0 - 2		0.0	0.40
0.5 - 1		-0.09	0.40
0.5 - 1.5		-0.27	0.40
0.5 - 2		-0.18	0.40
1 - 1.5		-0.18	0.40
1 - 2		-0.09	0.40
1.5 - 2		0.09	0.40

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza.

En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

C)

	Prueba	Valor-P
Levenes	0.51	0.72

Verificación de Varianza

El estadístico mostrado en esta tabla evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de embriones germinados dentro de cada uno de los 5 niveles de BAP es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

9.2.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Para la primer estrategia, estadísticamente no se pueden obtener resultados satisfactorios, esto debe a que de los 55 modelos experimentales, aprox. El 34.5% de los embriones presentaron algún cambio en su estructura; de ese porcentaje únicamente el 12.7% pudo germinar, presentando la formación de la planta o presentando la formación de algún brote.

La mayoría de los datos obtenidos a través del programa estadístico, STATGRAPHICS Centurión, no presentan alguna diferencia estadísticamente significativa ya que se necesita tener un porcentaje mayor de los embriones germinados, para indicar con mayor certeza que tanto afecta o favorece la presencia del regulador Bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo para *Citrus volkameriana pasq.*

Al menos eso puede apreciarse para esta estrategia, ya que no se logran apreciar estos cambios ocasionados por el BAP, incluso en los modelos experimentales que no contiene este regulador y fungieron como testigos, presentan características similares, de aquellos modelos que están complementados en diferentes concentraciones del regulador. Algunos de la datos favorables para esta estrategia, fue obtenida a través del método LSD, en la que refleja estadísticamente un pequeña diferencia significativa, de la concentración de 0.5 mg/L con respecto a las demás concentraciones.

En cuanto a la disociación de embriones de cada modelo experimental utilizado, obtenían 2 embriones cada uno, de los cuales únicamente en 7 modelos experimentales se pudieran desarrollar los embriones; esto puede deberse a diferentes factores; en los que podrían incluirse, las características morfológicas de la planta, como su edad, características del fruto y condiciones en las que estuvieron guardadas las semillas antes de su adquisición.

De igual forma podría deberse a las condiciones en las que los embriones fueron puestos para que germinaran, como fue el periodo de oscuridad y luz a la que fueron sometidos, y los días en los que estuvieron en el medio de sales antes de llevarse a cabo el desarrollo del diseño experimental.

En comparación con la segunda estrategia experimental, que presento germinación en los 55 modelos experimentales; y de las semillas utilizadas se les pudo extraer hasta 3 embriones, los cuales han formado la planta o presentado brotes. Las condiciones a las que fueron expuestos los embriones fueron diferentes a la anterior ya que estos, estuvieron en un periodo de media luz por 49 días. Viendo mejores resultados en esta estrategia.

Para el diseño experimental aun no se puede asegurar con certeza, que tanto afecta la presencia del regulador en el medio, ya que esta estrategia aun continúa en la etapa del diseño experimental, obteniendo resultados en el próximo mes. Aun así se pudo analizar esta estrategia, obteniendo resultados satisfactorios, en cuanto al desarrollo de los embriones contenidos en los modelos, en comparación con la estrategia anterior, el programa arrojó un promedio que va de 1.54 – 2.27, presentando el valor de P menor que 0.05, originando así que exista una diferencia estadísticamente significativa.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La estrategia experimental no cumplió con los objetivos estipulados, ya que los embriones separados no germinaron en totalidad, fueron muy pocos los embriones que pudieron desarrollarse, bajos las condiciones de oscuridad y luz a las que fueron sometidas; por lo tanto el desarrollo del diseño experimental no fue satisfactorio.

En la segunda estrategia, la separación de los embriones fue mejor de igual el desarrollo de los mismos bajo las condiciones de media luz a la que fueron expuestos, concluyendo así que esta estrategia fue mejor que la anterior. En cuanto al diseño experimental no se puede concluir, aun se espera que cumpla con el tiempo estipulado, ya que aun sigue desarrollándose pero se esperan muy buenos resultados.

Este proyecto aun se seguirá trabajando hasta el proceso de titulación.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANDRADE R., M.2002. POLIEMBRIONIA E IDENTIFICACIÓN DE PLÁNTULAS CIGÓTICAS Y NUCELARES DE TRES PORTAINJERTOS Y UN CULTIVAR DE CÍTRICOS MEDIANTE RAPD'S. TESIS DEL DR. EN CIENCIAS. PROGRAMA DE GENÉTICA. IRGEP- COLEGIO DE POSTGRADUADOS. MONTECILLO, ESTADO DE MEXICO.

FROST,H.B.;SOOST R. K. 1968. SEED REPRODUCTION: DEVELOPMENT OF GAMETS AND EMBRYOS, PP.290-324. IN: THE CITRUS INDUSTRY, VOL.2. REUTHER, W.;BATCHELOR, L. D.; WEBBER H.J. (EDS). DIVISION OF AGRICULTURE AN SCIENCE, UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS. BERKELEY, CAL. USA.

GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G., JR. PROTOPLAST FUSION AND CITRUS IMPROVEMENT. PLANT BREEDING REV. 8:339±374; 1990.

GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G., JR. NEW CULTIVARS IN THE CITRUS IMPROVEMENT PIPELINE. PROC. INT. SOC. CITRICULT. 1:31±34; 1996.

GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G., JR.; CASTLE, W. S.; CHANDLER, J. L. PRODUCTION AND EVALUATION OF CITRUS SOMATIC HYBRID ROOTSTOCKS: PROGRESS REPORT. PROC. INT. SOC. CITRICULT. 1:203±206; 1996A.

GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G., JR.; LOUZADA, E. S.; CHANDLER, J. L. PRODUCTION OF SOMATIC HYBRIDS AND AUTOTETRAPLOID BREEDING PARENTS FOR SEEDLESS CITRUS DEVELOPMENT. HORTSCIENCE 27:1125±1127; 1992.

GROSSER, J. W.; JIANG, J.; MOURAO-FO, F. A. A.; LOUZADA, E. S.; BAERGEN, K.; CHANDLER, J. L.; GMITTER, F. G., JR. SOMATIC HYBRIDIZATION, AN INTEGRAL COMPONENT OF CITRUS CULTIVAR IMPROVEMENT: I. SCION IMPROVEMENT. HORTSCIENCE 33:1057±1059; 1998A.

GULSEN, O.; M. L. ROOSE (2001). "LEMONS: DIVERSITY AND RELATIONSHIPS WITH SELECTED CITRUS GENOTYPES AS MEASURED WITH NUCLEAR GENOME MARKERS". JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF HORTICULTURAL SCIENCE, 126:309–317

HARMS, C. (1992) ENGINEERING GENETIC DISEASE RESISTANCE INTO CROPS: BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO CROP PROTECTION. CROP PROTECTION 11: 291-306.

KOCHBA, J., SPIEGEL-ROY, P., SAFRAN, H.: ADVENTIVE PLANTS FROM OVULES AND NUCELLI IN CITRUS. - PLANTA 106: 237-245, 1972.

LAKSHMANAN, K,K.; Y AMBEGOAKAR, K, B. 1984. POLIEMBRIONY, PP. 445-474. IN: EMBRIOLOGY OF ANGIOSPERMS. JOHRI, B. M. (ED.). BERLIN: SPRINGER-VERLAG. NEW YORK USA.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. - PHYSIOL. PLANT. 15: 473-497, 1962.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K.; OIYAMA, I. FERTILE FRUITS OBTAINED BY SOMATIC HYBRIDIZATION: NAVEL ORANGE (CITRUS SINENSIS) AND TROYER CITRANGE (C. SINENSIS _ PONCIRUS TRIFOLIATA). THEOR. APPL. GENET. 81:141±143; 1991.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; FROELICHER, Y.; BAKRY, F.; AUBERT, B. ROOTSTOCK BREEDING STRATEGIES FOR THE MEDITERRANEAN CITRUS INDUSTRY; THE SOMATIC HYBRIDIZATION POTENTIAL. FRUIT-PARIS 53:335±344; 1998A.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; SUDAHONO; VANEL, F.; MADEMBA, SY.F.; LURO, F.; AUBERT, B. BIOTECHNOLOGY FOR TRIPLOID MANDARIN BREEDING. FRUITS 53(5):307±317; 1998B.

PAPPU, H. R., S. S. PAPPU, T. KANO, M. KORZUMI, M. CAMBRA, P. MORENO, H. J. SU, S. M. GARNSEY, R. F. LEE AND C. L. NIBLETT (1995) MUTAGENIC ANALYSIS AND LOCALIZATION OF A HIGHLY CONSERVED EPITOPE NEAR THE AMINO TERMINAL END OF THE CITRUS TRISTEZA CLOSTEROVIRUS CAPSID PROTEIN. PHYTOPATHOLOGY. 85: 1311-1315.

RICHARDS,A.J.1986. PLANT BREEDING SYSTEMS.GEORGE ALLEN AND UNWIN.
LONDON, UK.529P.

SLACK, S. A. AND T. L GERMAN (1998) IMPACT OF TRANSGENIC VIRAL
RESISTANCE ON SEED POTATO CERTIFICATION. AMER. J. OF POTATO RES. 75:
265-268.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. PLANT REGENERATION FROM CITRUS
PROTOPLASTS: VARIABILITY IN METHODOLOGICAL REQUIREMENTS AMONG
CULTIVARS AND SPECIES. THEOR. APPL. GENET. 62:171±176; 1982.

VILORIA, Z., GROSSER, J.W. Y BRACHO, B. 2005. PLANT CELL TISS. ORG. CULT,. 82:
159-167

REFERENCIAS VIRTUALES.

A CLASSIFICATION FOR EDIBLE CITRUS (RUTACEAE) D.J.
MABBERLEY[HTTP://WWW.RBGSYD.NSW.GOV.AU/___DATA/ASSETS/PDF_FILE/00
19/73216/TEL7MAB167.PDF](http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0019/73216/TEL7MAB167.pdf)