



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ.

INGENIERIA BIOQUIMICA

PRESENTA:

RAMIREZ SANTIZO FREDY ULISES

NUMERO DE CONTROL

12270703

NOMBRE DEL PROYECTO:

Evaluación del efecto de reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática indirecta de *Coffea arábica*, variedad Catimor y Oro azteca.

PERIODO DE REALIZACION:

ENERO- JUNIO 2017

DR. FEDERICO ANTONIO GUTIERREZ M.

Asesor Interno

IBQ. DEISY RUTH ESCALANTE REVUELTA

Asesor Externo

TUXTLA GUTIERREZ CHIAPAS

INDICE

1.- INTRODUCCION	6
2.- MARCO CONTEXTUAL	8
2.1- Descripción de la empresa	8
2.2- Coffea arabica	9
2.3- Oro azteca	9
2.4 Catimor	9
2.5 Micropropagación	10
2.6 Embriogénesis somática	11
2.7 Medio de cultivo	12
2.8 Medio de cultivo Murashige y Skoog	13
2.9 Soluciones madre	14
2.10- Reguladores de crecimiento	16
2.11- Contaminación	18
2.12- Oxidación	18
2.13- Antioxidantes	19
3.- JUSTIFICACIÓN	20
4.- OBJETIVO GENERALES	21
5.- OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
6.- ALCANCES	22
7.- LIMITACIONES	23
8.- PROBLEMAS A RESOLVER	23

9.- MATERIALES Y MÉTODOS	23
10.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
10.1- Contaminación	41
10.2.- Oxidación	41
10.3- Efecto de 2,4-D y BAP en la inducción de callos en la variedad Oro azteca	42
10.4.- Efecto de 2,4-D y BAP en la inducción de callos en la variedad Catimor	46
10.5.- Evaluación de reguladores en producción de callo Inducción de embriones somáticos	46
10.6.- Efecto de AIA y BAP en la inducción de embriones en la variedad Oro azteca	48
10.7.- Efecto de AIA y KNO₃ en la inducción de embriones en la variedad Catimor	51
11.- CONCLUSIONES	52
11.1- Contaminación	52
11.2 Oxidación	52
11.3 Evaluación de reguladores en producción de callo	53
11.4 Evaluación de reguladores en producción en embriones	53
12.- BIBLIOGRAFIA	56
13.- ANEXOS	57

ABREVIATURAS

BAP = Bencilaminopurina

ANA = ácido naftalenoacético

AIA = ácido indol acético

Mg/l = miligramos sobre litro.

CO₂ = dióxido de carbono

Mn = magnesio

Zn = zinc

Cu = cobre

Ni = níquel

Al = aluminio

I = yodo

P/V = Peso sobre volumen

ABA = ácido abscísico

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: desinfección de plantas antes de ingresar al laboratorio -----	25
FIGURA 2: partes a utilizar de las plantas madres de cafés -----	28
FIGURA 3: seccionamiento de la hoja de las plantas de café De 3- 12 meses de edad, tamaño de explantes 1cm ² -----	29
FIGURA 4: condiciones en el cual s debe inducir los explantes De <i>C. arabica</i> . Frascos Gerber (70 mm x 45 mm). -----	39
FIGURA 5 A: explantes oxidados de <i>C. Arabica</i> .-----	42
FIGURA 5 B: explantes oxidados de <i>C. arabica</i> -----	42
FIGURA 6: comparación de porcentaje de explantes <i>C. arabica</i> Oro azteca y Catimor en presencia de oxidación -----	43
FIGURA 7: porcentaje de explantes <i>C. arabica</i> oro azteca y Catimor en presencia de contaminación -----	43
FIGURA 8: Explantes <i>C. arabica</i> oro azteca y Catimor Contaminados por hongo -----	43
FIGURA 9:	
FIGURA 10: Respuesta en producción de callos en <i>C. arabica</i> variedad oro azteca -----	44
FIGURA 11: Respuesta de callos en los explantes con tratamientos	
FIGURA 12: Formación de callo en los explantes en <i>C. arabica</i> Primeras semanas del explantes, 45 días de inducción -----	47
FIGURA 13: Explante con mayor presencia de callos embriogénicos Después de 60 días de inducción -----	47
FIGURA 14: Efecto de AIA/BAP en la producción de Embriones somáticos -----	49
FIGURA 15: Explante oxidado con producción de Embriones somáticos -----	50
FIGURA 16: Embriones en fase globular -----	50

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: composición de soluciones madres -----	27
TABLA 2: composición de macro elementos, Por litro de medio de cultivo.-----	28
TABLA 3: Composición de micro elementos, Por litro de medio. -----	28
TABLA 4: Composición de vitaminas, por litro de medio. -----	28
TABLA 5: Composición de quelatos por litro de medio. -----	29
TABLA 6: Preparación de reguladores de crecimiento -----	30
TABLA 7: Composición de medio de cultivo ms para Preselección de explantes.-----	30
TABLA 8: Composición del medio de cultivo con Reguladores de crecimiento, 2,4-D/BAP.-----	30
TABLA 9: preparación de antioxidantes para 1 litro de medio ms.-----	31
TABLA 10: combinación de reguladores de crecimiento 18 tratamientos, 2,4-D/BAP mg/l. -----	32
TABLA 11: combinación de tratamientos con reguladores [ANA/KNO ₃] mg/l. para la variedad oro azteca.-----	34
TABLA 12: combinación de tratamientos con Reguladores [AIA/BAP] mg/l. en variedad Catimor.-----	35

INTRODUCCIÓN

Chiapas es un estado con una tradición en el cultivo y en la comercialización de café. La primera vez que se introdujo el cultivo de café al estado fue en 1847 por Gerónimo Manchinelli, en el municipio de Tuxtla Chico. Este provenía de Guatemala, donde las condiciones climáticas y de producción son parecidas, puesto que no hay que olvidar que en centro América el café comenzó a producirse desde el siglo XVII cuando fue traído de Francia. Posteriormente con la llegada de Carlos Gris al Soconusco y el establecimiento de su finca el Majagual, para 1876 Don Matías Romero, un ilustre político y diplomático mexicano, comenzó con el proyecto de colonización, tras este proyecto, en los años consecuentes se establecieron 22 fincas en toda la zona. En nuestro estado la producción de café se divide en lo que es la Región Soconusco; que ocupa gran parte del sur oriente del estado de Chiapas, aunque hablando geográficamente está ubicada en la Vertiente del Pacífico. Su clima difiere de los demás estados, ya que las precipitaciones son del orden de los 2 mil 500 hasta cinco mil mm anuales durante la mayor parte del año, sin períodos significativos de sequía. Los cafetales en esta región se encuentran desde los 200 hasta los 1 mil 800 m.s.n.m. y lo que es la Región Centro Norte y Selva Lacandona Chiapas que se caracterizan por tener periodos de sequía prolongados de noviembre hasta abril, aunque en esta zona se encuentra mucha influencia directa de vientos húmedos del Golfo de México. Como característica, los cafetales en esta región se ubican desde los 300 a los 1200 m.s.n.m.

El café es el producto agrícola más importante en el mercado internacional (Dublin, 1991), El sector cafetalero está sufriendo actualmente una gran crisis debido a la infestación por el hongo *Hemileia vastatrix* conocido comúnmente como roya del café. La roya del café apareció en centro América en 1976, pero había afectado la producción gravemente. Debido a esto, numerosos estudios de cultivos *in vitro* han sido desarrollados con el fin de obtener un mejoramiento genético del mismo. (Staritsky, 1970) fue el primero en reportar el desarrollo de embriones somáticos en *Coffea canephora* Pierre a partir de tallos orto trópicos. Posteriormente (Sondahl and Sharp, 1977) describieron un procedimiento para obtener un callo embriogénico de alta frecuencia a partir de ex plantas foliares de *Coffea arabica* (cv Bourbon). (Sondahl et al, 1979) demostraron que los embriones somáticos en café se originan de las células del mesó filo. Posteriores trabajos acerca de la inducción de embriones somáticos en café se han realizado (Dublin 1981, Pierson 1983, Ya suda 1985, García and Menéndez 1987, Hatanaka et al.1991, Neuenschwander and Bauman 1991, Bieysse et al, 1993, Menéndez and Nieto 1994, Menéndez and García 1997), pero los reportes acerca del uso de un

diseño estadístico de superficie de respuesta en la optimización de la embriogénesis somática en café, son escasos.

El Café (*Coffea* sp.) es un rubro muy importante en el mercado agrícola internacional y también es un cultivo esencial para la economía y el consumo. Su propagación *in vitro* se ha realizado por 2 métodos fundamentales: la embriogénesis somática y el cultivo de micro esquejes, donde en corto tiempo se logra la propagación masiva de variedades selectas. Existen amplios antecedentes sobre la inducción de embriogénesis somática en café, una revisión reciente puede encontrarse. Tanto en el café como en los árboles frutales, el grado de éxito de la embriogénesis somática varía según los genotipos cultivados. También (Hartmann and Kester, 1997), mencionan que diferentes plantas responden de un modo distinto a las diversas citocininas y auxinas, debido al control hormonal natural de cada genotipo. Por lo que para cada genotipo se recomienda estudiar: 1. La fuente del explante, el pre-tratamiento del explante, 2. El medio de cultivo: constituyentes orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento, osmolaridad total

Las posibilidades de conseguir embriogénesis somática son mayores cuando se utilizan explantes procedentes de plantas juveniles (Pierik, 1990). (García and Menéndez, 1987) mencionan que en experimentos en café llevados a cabo en el Centro de Botánica Tropical de Venezuela, se utilizaron con éxito, explantes foliares jóvenes, en buen estado y expandidos, los cuales fueron extraídos de los tres nudos superiores de tallos orto-trópicos y plagio-trópicos.

En la presente investigación se evaluaron diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento para el establecimiento de café (*Coffea arábica* L. cv. Catimor y Oro azteca) con el fin de determinar las condiciones óptimas para la multiplicación masiva de estas plantas, mediante el método de embriogénesis somática indirecta. Los resultados son de potencial importancia para su aplicación en la propagación acelerada en gran escala de variedades de interés.

SECRETARIA DEL CAMPO DE CHIAPAS

La Secretaría del Campo, es una Dependencia del Poder Ejecutivo del Estado que tiene como objeto fundamental, generar empleos a través de los jornales de los hombres del campo, incrementar la productividad, integrar la economía familiar de los hombres y mujeres del campo y generar paz social, promover y fomentar en la Entidad, acciones de evaluación, capacitación, asistencia técnica, organización de productores, comercialización de productos, de reconversión productiva y agroindustrial; así como incentivar y fomentar la producción y la productividad agrícola y ganadera para mejorar el nivel de vida de la población rural del Estado.

MISION

Impulsar el desarrollo agropecuario consolidando la actividad humana y económica en un marco de equilibrio, que privilegie la preservación y aprovechamiento racional de los recursos y el potencial productivo, aplicando esquemas de reconversión productiva, tecnologías innovadoras, investigación, capacitación, organización y asistencia técnica integral, financiamiento y comercialización, propiciando incrementos en la producción y productividad para alcanzar la autosuficiencia, la competitividad y el desarrollo sustentable del campo, en beneficio de la población rural.

VISION

Ser una dependencia eficaz y eficiente, que procure el desarrollo económico del Estado, en un marco de equilibrio y aprovechamiento racional de potencial agropecuario impulsando programas y proyectos productivos viables y rentables, que beneficien a la población rural y fortalezcan el desarrollo integral y sustentable de Chiapas.

MARCO TEORICO

COFFEA ARABICA

Coffea arábica es una especie de café originalmente indígena a los bosques de las tierras del sudoeste de Etiopía. También se conoce como el arbusto de café de Arabia, café de montaña, se cree que es la primera especie de café para ser cultivadas y es con mucho, el cultivar dominante, que representa alrededor del 70% de la producción mundial de café producida a partir de menos ácida, más amarga y más altamente cafeína robusta.

VARIEDADES

VARIEDAD CATIMOR

El café Catimor es un híbrido entre las variedades timor y caturra, creado en Portugal en 1959 y los usaron los costarricenses con la idea de crear una variedad que diera mucha producción y que fuera resistente a las enfermedades, pero no tuvo el éxito esperado debido a la gran influencia de la cepa de robusta proveniente del Timor. Más tarde se trató de mejorar en Honduras, pero el resultado tampoco fue fructífero, ya que quedó demostrado que al plantarlo a gran altitud su calidad no estaba a la altura de otros arábica plantados en las mismas condiciones. Hay hasta 18 variedades siendo el más productivo. La planta es de porte bajo y la distancia entre nudos es corta. El fruto de color rojo y su tamaño es relativamente grande. Es tolerante a la roya tiene una alta producción en granos.

VARIEDAD ORO AZTECA

El Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (Inifap) cuenta desde hace varios años con la variedad de café "Oro Azteca", resistente a la roya, pero no se ha distribuido entre los productores en virtud a que "la taza no es buena", aunque ahora con las mezclas existentes puede ser una de las alternativas para la renovación de plantaciones y el control de la plaga. El director del Inifap, Pedro Brajcich Gallegos, advirtió que las condiciones ambientales de las regiones productoras de café de Chiapas hacen propicia la proliferación de la plaga de la roya, al estar presente el inóculo transmisor y ante ese panorama, las condiciones podrían ser peores que las del año pasado.

Dijo que existen avances sustanciales en investigaciones relacionadas con plantas resistentes a esa plaga y en los centros experimentales de Rosario Izapa en Chiapas y en Veracruz, se cuenta con la variedad “Oro Azteca”, aunque “algo que pudiera ser negativo es la calidad de taza, pero con las mezclas existentes es una buena alternativa para reducir la incidencia de la roya”.

En la zona donde se cultiva el café arábigo se tiene una mayor presencia del inóculo transmisor de la plaga, motivo por el cual se requiere una instrumentación adecuada para reducir la incidencia de la misma, no solamente con el uso de productos químicos sino con paquetes tecnológicos que ya existen. “Las condiciones ambientales se están prestando para su presencia, y de seguir así, de seguro será igual o más fuerte que el año pasado, motivo por el cual los productores deben estar atentos a prevenir con productos que ellos ya han aplicado y que la mayoría son base de cobre, aparte del manejo de las plantaciones que es muy importante” (Victorio, 2014).

La variedad de café oro azteca fue presentada como una planta resistente para enfrentar el hongo de la roya que mantiene en crisis al sector cafetalero. La variedad de oro azteca ha sido una de las más resistentes a la roya del café.

La variedad de café mexicano oro azteca es hoy una de las mejores opciones para evitar cultivos diezmados por la roya en todo el país. Se está investigando y buscando alternativas para cafés orgánicos. Las variedades se comportan igual, sea o no orgánico. La variedad oro azteca es la única que se ha generado en el país, pero no la única disponible pues hay otras como la variedad colombiana, la variedad costa rica y la icapu que viene de Brasil. Todas esas son resistentes a la roya, y en el país se está usando oro azteca además de la colombiana.

MICROPROPAGACIÓN

Micropropagación es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades. La micropropagación se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por ingeniería genética, muta génesis o mejora genética. Se utiliza también la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente

En la micropropagación, a partir de un fragmento (ex plante) de una planta seleccionada (llamada planta madre), se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El ex plante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las

plantas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23 °C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Según (Hartmann and Kester, 1997), la embriogénesis consiste en el desarrollo de un embrión, ya sea del cigoto o de otras células de la planta, considerado la primera como reproducción sexual y la última como asexual. Los embriones asexuales son llamados embrioides o embriones somáticos, según (Pierik, 1990), cuando los embriones se regeneran a partir de células o tejidos somáticos se habla de una embriogénesis somática. Y se puede considerar como opuesta a la embriogénesis cigótica. La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Pérez, 1998). El uso de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa una herramienta eficiente para propagar. Además, las plantas obtenidas están libres de enfermedades (Marulanda-Ángel *et al*, 2011).

El desarrollo de embriones somáticos según (Pierik, 1990), comprende una etapa de diferenciación de las células ya diferenciadas y posteriormente la división de estas. El desarrollo de un embrión, a partir de una célula embriogénica se consigue generalmente sin la presencia de auxinas en el medio.

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa. También tiene autonomía frente al tejido generador, ya que histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente (Pérez, 1998). Un embrión cigótico es muy similar morfológicamente a un embrión somático, sobre todo en su desarrollo evolutivo de pro embrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar, si es una dicotiledónea.

Según (Santacreo, 1992), existen dos métodos de obtener embriones somáticos a partir de ex plantas de hoja:

1. Por medio de embriogénesis somática directa o de baja frecuencia, donde los embriones se diferencian a partir de una escasa formación de callo que aparece

en los bordes de los explantes. En este caso los embriones se obtienen de una única célula inducida;

2. Por medio de embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia, donde los embriones somáticos son obtenidos por la multiplicación de las células inducidas. Este tipo de embriogénesis se caracteriza por una fuerte formación de callo en la primera etapa, seguido de una etapa de diferenciación de los embriones somáticos a partir de esa masa de células parenquimatosas.

(Figuroa and Molina, 1996) mencionan que de la embriogénesis somática directa se obtiene un menor número de embriones diferenciados, pero con mayor uniformidad genética que la embriogénesis somática indirecta.

MEDIO DE CULTIVO

Una parte importante del cultivo *in vitro* son los medios de cultivo ya que en ellos se encuentran las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Un medio de cultivo es una solución acuosa en donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales Macro nutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co). Los medios de cultivo se preparan a partir de soluciones concentradas 10 o 100 veces (Soluciones Madre o Stock). En la solución madre se pueden mezclar varias sales minerales siempre que no se produzcan problemas de precipitación. Algunos elementos, como el Fe, se utilizan en forma de quelatos para mantener su disponibilidad durante el cultivo.

CONDICIONES GENERALES PARA EL CULTIVO

Disponibilidad de nutrientes adecuados

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento.

Luz ambiental

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos.

pH

La concentración de iones hidrogeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

Temperatura

Los microorganismos mesòfilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43° C, otros como los psicròfilos crecen a 0° C y los termófilos a 80° C o incluso a temperaturas superiores.

Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios.

MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG

El medio Murashige & Skoog (MS) fue inventado por los científicos (Toshio Murashige and Folke K Skoog, 1962) durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige and Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk and Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macro elementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los micro elementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular.

La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macro elementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los micro

elementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular.

Aunque la composición del medio de Murashige-Skoog da buenos resultados en el cultivo *in vitro* de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutriente en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemos, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos). Los reguladores de crecimiento son componentes exclusivos de los medios de cultivos vegetales.

SOLUCIONES MADRE

Por lo general, la preparación del medio de cultivo se inicia preparando soluciones concentradas (madre) de uno o más compuestos, determinado volumen de cada una de estas soluciones se mezclará más tarde para preparar el medio de cultivo final. Los medios generalmente son preparados a partir de soluciones stock (madres), pueden prepararse y almacenarse en frío por largo tiempo, por lo cual se recomienda el uso de recipientes con tapa de vidrio. Todas las soluciones deben prepararse con agua destilada, (Stein and Janet, 1994).

Una solución es una mezcla homogénea cuyas partículas son menores a 10 angstrom. Estas soluciones están conformadas por soluto y por solvente. El soluto es el que está en menor proporción y por el contrario el solvente esta en mayor proporción. Para diluir una solución es preciso agregar más % de disolvente a dicha solución y éste procedimiento nos da por resultado la dilución de la solución, y por lo tanto el volumen y concentración cambian, aunque el soluto no. Una solución madre o stock es una concentración de algún macro o micro nutriente necesario para el desarrollo adecuado de explantes vegetales.

MACRONUTRIENTES

Son los que se requieren en cantidades de mili moles y son los elementos requeridos en mayor cantidad, (carbono C), oxígeno (O) e hidrógeno (N), aminoácidos, Vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. Comúnmente se adicionan como nitrato o amonio y menos usual como nitrito. El nitrito se añade en concentraciones de 25-40 mili moles y el amonio de 2 a 20 mili moles, fósforo (P) empleado casi universalmente en forma de fosfatos; sin embargo, la alta concentración de fosfato en solución puede detener el crecimiento, azufre (S) como sulfato y con la posibilidad que se agregue en forma de sulfito o como

sulfuro, pero con menos efectividad (Nitsch, 1969). Como fuente de azufre, además de los sulfatos, sulfitos, se encuentran la cisteína, metionina o glutatión. La deficiencia de azufre da por resultado una etiolación; magnesio (Mg) es componente fundamental de la molécula de clorofila; el calcio (Ca) es parte importante integral de la membrana celular, además confiere protección a la membrana contra los efectos deletéreos de los metales pesados, salinidad y pH muy bajos; usualmente se adiciona como cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) y menos comúnmente como fosfato tricálcico (Ca_3PO_4); fósforo y el potasio como el catión mayor y se adiciona en la forma de KNO_3 , KI , KCl Y K_2PO_4 . En términos general fósforo, calcio, magnesio y azufre son requeridos en concentraciones de 1 a 3 mili moles para un buen crecimiento. Sin embargo, existe un antagonismo entre el Ca^{2+} y el Mg^{2+} . Cuando la concentración de Mg^{2+} es alta, se requiere también alta Ca^{2+} . La concentración comparativa es a menudo más importante que la concentración absoluta de iones.

MICRONUTRIENTES

Los micronutrientes o elementos menores se añaden en concentración micro molar. Los elementos menores son seis, a saber: Hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co), boro (B) y molibdeno (Mo) que forman parte de la estructura de algunas proteínas vegetales, o vitaminas de interés bioquímico-fisiológico. De los 6 elementos, el Zn, Mn, Fe, Cu y Mo intervienen en la síntesis de la clorofila y en la estructura del cloroplasto (Sundqvist et al, 1980). El manganeso es considerado como uno de los más esenciales, junto con el boro y el hierro; además tiene importancia de la fotosíntesis en donde interviene en la conservación de la ultra estructura de los cloroplastos. De acuerdo a Galston and Hillman (1961), el Mn es un cofactor de las enzimas peroxidasa que permiten la oxidación del ácido indol acético en las células vegetales. Doershug and Miller (1967) mencionan que la omisión reduce el número de brotes en cotiledones de lechuga. Así mismo, su adición en alta concentración puede compensar la carencia del Mo en raíz de jitomate (Hannay and Street, 1954).

VITAMINAS

Las vitaminas, en la mayoría de los casos, cumplen funciones de cofactores de reacciones enzimáticas (tiamina fosfato, piridoxina), en otros se comportan como sustrato de reacciones metabólicas (ácido nicotínico). La combinación de vitaminas en el medio de cultivo se definió a partir de los primeros estudios de cultivo de raíces. La composición vitamínica, en el caso de medio MS, está constituida por tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina

(vitamina B6), a la que normalmente se le adiciona el aminoácido glicina. Las concentraciones más usuales oscilan entre 0.1 a 0.5 mg/ L de solución de medio. Otros compuestos utilizados son: ácido ascórbico, ácido fólico, riboflavina y biotina. En todos los casos las variaciones en la formulación están dadas por la especie utilizada y la respuesta buscada.

QUELATOS

Las células, tejidos y plántulas cultivadas *in vitro* no poseen las condiciones de irradiación ni la concentración de CO₂ adecuada para realizar fotosíntesis que sustente su crecimiento. Por ello los carbohidratos proporcionan la energía metabólica y los esqueletos carbonados necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, polisacáridos estructurales como celulosa, etc. La sacarosa es el carbohidrato más utilizado en la preparación de medios de cultivo. Las concentraciones varían dentro de ciertos rangos de acuerdo al tipo de respuesta esperada, la más utilizada es de 3% p/v. Otros azúcares como fructuosa, glucosa, celobiosa, maltosa, rafinosa y galactosa son recomendados para algunas especies en particular.

REGULADORES DE CRECIMIENTO

Hay varias sustancias de crecimiento de las plantas que norman su desarrollo, se entiende por reguladores del crecimiento aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta o sintéticas y se traslocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal.

Los reguladores de crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones, resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos como así también para la producción de metabolitos se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura.

AUXINAS

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas

son el AIA (ácido indol-3-acético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido clorofenoxiacético).

Las auxinas causan una rápida extensibilidad de pared en coleótilos y tallos jóvenes, si bien su acción no es directa sobre la pared si no intracelular o en membranas plasmáticas. Simultáneamente las auxinas estimulan la síntesis de enzimas que intervienen en las biosíntesis de polisacáridos en la pared.

CITOCININAS

Promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BAP (bencil adenina), K (cinetina), Zea (zeatina). Incrementan la tasa de división celular, el transporte de los solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas.

Al igual que la mayoría de las hormonas vegetales, las citoquininas inducen gran diversidad de efectos fisiológicos. Por ejemplo, intervienen en el periodo M del ciclo celular, favoreciendo la división. Ocasionan una movilización diferencial de nutrientes hacia los tejidos donde se hallan más concentradas.

GIBERELINAS

Las giberelinas constituyen una familia de compuestos químicos tetra cíclicos de terpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray and Estelle, 1998).

Dentro de las clasificaciones de giberelinas se encuentra una familia de compuestos diterpenicos conocidos como ent-giberelanos. La elongación de tallos, fue el primer efecto que se les asignó a las giberelinas. El proceso de elongación puede deberse a la estimulación de la división o la elongación celular.

Las funciones que llevan a cabo en la planta, son incrementar el crecimiento en los tallos. Interrumpen el periodo de la latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizan las reservas en azúcares, inducen la brotación de yemas. Promueven el desarrollo de los frutos y estimulan la síntesis de Mrna (RNA mensajero).

ACIDO ABSICICO

El ácido abscísico es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad de suelo. Baja o altas temperaturas. El ABA provoca respuestas

que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas.

El ácido abscísico (ABA) reúne todas las condiciones para ser considerado una hormona, presenta efecto inhibitor sobre el crecimiento al ser aplicado a plantas intactas y antagoniza la acción de las hormonas promotoras del mismo; además ejerce una gran variedad de efectos sobre el metabolismo vegetal.

CONTAMINACION DE MEDIO

El éxito de cultivo *in vitro* depende de la prevención y control de los agentes contaminantes como los hongos, bacterias, virus, tiroides, micro plasma.

Los agentes contaminantes no se expresan al principio del experimento, porque la presión osmótica es muy alta debido a la alta concentración de azúcar, a las sales y al pH.

Es importante conocer los microorganismos para así prevenir y controlar la contaminación. Cuando nuestros cultivos se infectan, ya sea con microorganismos o contaminación cruzada, lo más probable es que todo se tenga que desechar, y además de todos los recursos que invertimos en material, está el trabajo y tiempo empeñado. La contaminación puede venir de varias fuentes, las cuales en ocasiones son difíciles de determinar. Por lo que ningún laboratorio queda exento de sufrirla, sin embargo, hay varias formas en las que podemos prevenirla.

El medio ambiente en general, que trae consigo muchos contaminantes, puede ser foco de riesgo. Un factor importante donde la mayoría de veces radica el problema, y que en pocos tomamos en cuenta, es la incubadora y sus componentes.

OXIDACION

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido).

En sustratos orgánicos, la oxidación y reducción involucra la participación de átomos de carbono enlazados en forma covalente a otros átomos (Karp 1998).

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima poli fenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot et al, 1996, Bray et al. 2000).

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro*, son numerosas. Para empezar, la prevención y disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conllevan a la oxidación del mismo.

Para algunas especies los investigadores solventaron el problema con la utilización de una sola estrategia. Por ejemplo, uso de medio líquido, cambio del agente gelificante, uso de carbón activado o la sustitución del regulador de crecimiento (Jambor Benczur et al. 1997). Desafortunadamente, un único método no siempre es suficiente debido a la complejidad del problema, requiriéndose una solución integral que involucre un mayor número de variantes.

ANTIOXIDANTES

En términos generales, un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un compuesto al fenómeno. La descomposición de los ROS y, o RNS formados o la prevención de su formación, son los posibles mecanismos de su acción. De esta forma evitan las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski 2008). Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, tales como capturadores o desactivadores de iones, reaccionando con intermediarios en el equilibrio redox o en la catálisis del transporte de electrones.

Agentes reductores con bajo en solución, previenen el oscurecimiento de tejidos, ya que evitan la oxidación de fenoles y ayudan a una rápida remoción de las quinonas formadas. Los principales antioxidantes endógenos de plantas superiores mencionados incluyen a la glutatióna, ascorbato, tocoferol, prolina y la betaina (George 1996, Shao *et al.* 2008).

JUSTIFICACIÓN

El sector cafetalero está sufriendo actualmente una gran crisis debido a la infestación por el hongo *Hemileia vastatrix* conocido comúnmente como roya del café. La roya del café apareció por primera vez en Centroamérica en 1976, pero nunca había afectado la producción tan gravemente como en el ciclo 2012-2013.

La Secretaría del Campo, es una Dependencia del Poder Ejecutivo del Estado, tiene como objeto fundamental fomentar la producción y la productividad agrícola y ganadera para mejorar el nivel de vida de la población rural del Estado. Así es como el presente proyecto se realizó con el propósito de evaluar los diferentes tratamientos de reguladores de crecimientos y con el tiempo seleccionar un tratamiento y así micro propagar en volumen para la dependencia del estado.

Chiapas es un estado con un tradicional cuidado en el cultivo y de buena comercialización. Y se encuentra caracterizado dentro de las zonas tropicales más importantes en donde se lleva el cultivo y la comercialización del café.

Por medio de la embriogénesis somática directa la cantidad de embriones obtenidos por explante cultivado es muy reducida, en comparación a la cantidad obtenida a través de la embriogénesis somática indirecta. No obstante, presenta la ventaja de reducir considerablemente la variación soma clonal, obteniéndose una mayor uniformidad genética. Además, permite reducir el tiempo necesario para la obtención de embriones somáticos (Molina y Figueroa, 1996; Vicient y Martínez, 1998; Berthouly y Etienne, 1999).

El presente trabajo se establece un protocolo de micropropagación para la producción de materiales de propagación de 2 variedades de *coffea arábica* (oro azteca y Catimor). Los resultados obtenidos constituirán una valiosa herramienta para la propagación masiva en la secretaria del campo de Chiapas.

OBJETIVO GENERAL

- Establecimiento *in vitro* de ex plantas foliares de (*Coffea arábica* L. cv. Catimor y Oro azteca), para la obtención de embriones vía embriogénesis somática indirecta.

OBJETIVO ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes sustancias reguladoras del crecimiento vegetal a diferentes concentraciones para la inducción de callos en los ex plantas de *c. arábica*-, Catimor y oro azteca.
- Evaluar el efecto de AIA/BAP en el proceso de inducción de embriones somáticos en la variedad Oro azteca.
- Evaluar el efecto de ANA/KNO₃ en el proceso de inducción de embriones somáticos en la variedad Catimor.

ALCANCE

En el presente proyecto se pretende lograr establecer *in vitro* explantes foliares de *Coffea arabica* para obtener embriones vía embriogénesis somática indirecta con la finalidad de micro propagar dos variedades de café como Catimor y Oro azteca. permitiendo de esta manera que la secretaria del campo impulse el desarrollo agropecuario, privilegiando la preservación y aprovechamiento racional de los recursos y el potencial productivo.

Ser una dependencia eficaz y eficiente que procure el desarrollo económico del estado, en un marco de equilibrio y aprovechamiento racional de potencial agropecuario impulsando programas y proyectos productivos viables y rentables, que beneficien a la población rural y fortalezcan el desarrollo integral y sustentable de Chiapas.

LIMITACIONES

La principal limitación que se puede detectar al realizar el presente proyecto se refiere a la contaminación del medio, específicamente en los ex plantes, así como también la oxidación del medio.

Los reguladores de crecimiento no pueden ser usados en la Micropropagación de todas las variedades de café, los reguladores usados en este proyecto han mostrado buenos resultados, existen muchos aportes científicos en un variado de especies, no todos actúan de la misma forma en cada especie de café. Al igual del tipo y tamaño de ex plante que se usara para el establecimiento. En la variedad de coffea arábica (oro azteca y Catimor) el ex plante apto son las hojas.

Una de las limitantes que se presenta en la propagación es el suministro de material vegetal con dichas condiciones para la producción de callos y embriones para la multiplicación masiva.

PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZANDOLOS

Los problemas a resolver en este proyecto son contaminación, oxidación de ex plantas. El establecimiento y mantenimiento de los ex plantas requiere de un material vigoroso y con condiciones fitosanitarias adecuadas.

Considerando que el cultivo *in vitro* es un sistema de multiplicación masiva que puede contribuir a la revigorización y a la reducción de agentes fito patógenos, se pretende implementar una estrategia que permitirá el suministro de material vegetal con condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas que podrá ser utilizado en el establecimiento *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales situado en las instalaciones de la secretaria del campo de Tuxtla Gutiérrez Chiapas. Las plantas utilizadas fueron previamente obtenidas del invernadero así teniendo al momento de la extracción del material vegetal de 3 a 12 meses de edad.

En el presente estudio se analizaron distintos reguladores de crecimiento, BAP (Bencil Amino Purina), 2-4, D (2-4 Diclorofenoxiacético) para producción de callos embriogénicos, así como también diferentes concentraciones de ANA, KNO₃ y AIA, BAP para generación de embriones de *Coffea arábica*. (Oro azteca y Catimor).

En la primera parte del trabajo consistió en cultivar tejidos foliares (secciones de hoja) en un medio de sales de Murashige y Skoog (ms). Suplementado con 2-4, D Y BAP (medio 1) y evaluar diferentes reguladores de crecimiento para la formación de callos esto bajo ciertas condiciones de cultivo. Y durante cierto tiempo fue transferido a un medio con ANA/KNO₃ y AIA/BAP después de permanecer semanas en el medio 1 suplementado. Para la formación de embriones somáticos.

MATERIAL VEGETAL

Para la propagación se usaron 2 variedades de café, (Oro azteca y Catimor). La elección de la planta original *coffea arábica* donante de los ex plantas se eligió por el alto rendimiento y por ser una planta joven. El cual se tomaron del invernadero que cuenta la secretaria del campo del estado de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez chis, plantas de entre 3 y 12 meses de edad. Para el establecimiento, se tomaron las hojas jóvenes verdes, sin ninguna lesión y se llevó a un método de desinfección por aspersión.

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCION DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

El proyecto consistió en evaluar los efectos de reguladores de crecimiento en 2 variedades de café *coffea arabica* (Oro azteca y Catimor). El procedimiento para embriogénesis somática indirecta de café consistió en 2 etapas. Inducción de callos e inducción de embriones somáticos.

ETAPA 1: Elección de la planta original donante de ex plantas de *coffea arábica* y establecimiento *in vitro* de los tejidos foliares e inducción de callo.

Para la Obtención de ex plantas, se utilizaron plantas jóvenes (Para ambas especies), Plantas entre 3 – 12 meses de edad. La elección de la planta original *coffea arábica* donante de ex plantas se obtuvo del invernadero que cuenta la secretaria del campo del estado de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez chis.

Antes del establecimiento *in vitro* de los tejidos, se contó con un tratamiento de desinfección en el invernadero para la variedad Catimor y para la variedad Oro azteca no se realizó el procedimiento de aspersión, llevándolo directamente al laboratorio, el tratamiento de desinfección para la variedad Catimor consistió en una aspersión cada 2 días durante una semana de una solución de (5 gr/Lt) de agry- micin y (5 gr / Lt) de oxicop, una semana antes del establecimiento. (FIGURA 1).

Para el establecimiento *in vitro*, se utilizaron hojas jóvenes verdes y completamente expandidas sin ninguna lesión. (FIGURA 2)

FIGURA 1: desinfección de plantas antes de ingresar al laboratorio.

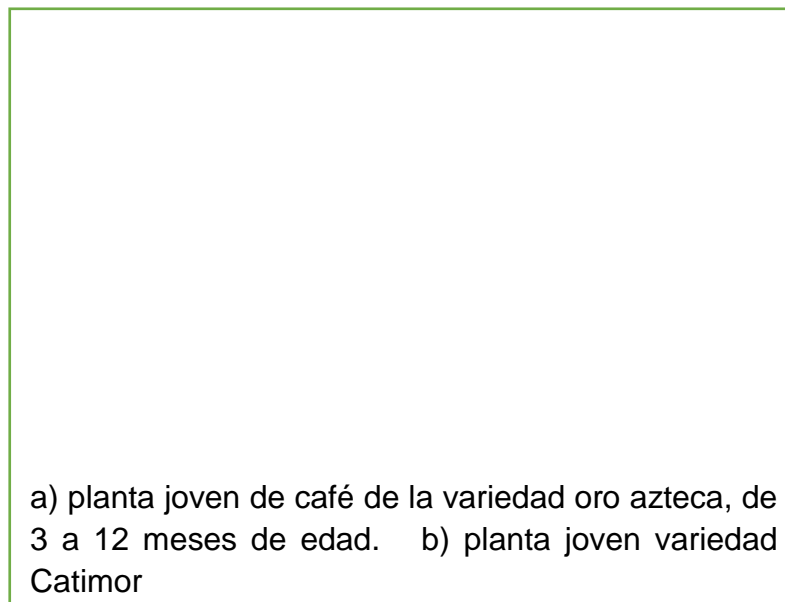


FIGURA 2: partes a utilizar de las plantas madres de cafés

TRATAMIENTO DE DESINFECCION EN LABORATORIO

Dicha metodología corresponde al protocolo de desinfección descrito por Sondahl (1991) y Molina and Figueroa (1996). Para ambas variedades de café se usó la misma metodología,

La desinfección se realizó en condiciones asépticas y consistió de un lavado con agua corriente posteriormente en la inmersión de las hojas jóvenes en una solución de jabón comercial y 2 gotas de tween 20 por 10 minutos en constante agitación, al término del tiempo se realizó dos lavados con agua destilada, luego se sometieron en una solución fungicida con 2 gr/lit de agry micin y 2 gr/ lit de captan en constante agitación durante 30 minutos, se lavó 2 veces con agua destilada para poder retirar residuos .

PARA LA DESINFECCION DENTRO DE CAMPANA

Se preparó una solución de cloro comercial (Hipoclorito de sodio) al 50% para luego sumergir las hojas durante 5 min en constante agitación, se lavó nuevamente 2 veces con agua destilada estéril para remover el cloro y finalmente se preparó una solución de alcohol etileno al 25 % para sumergir y agitar durante 3 minutos y luego lavar 2 veces con agua destilada estéril, Posteriormente se cortaron los ex plantes 1 cm² y se sembraron.

DISECCIÓN DE EX PLANTES

A partir de plantas en condiciones de invernadero de *Coffea arábica* (Catimor y Oro azteca), de 3 a 12 meses de edad que fueron desinfectados, fueron extraídos los ex plantes foliares de 1 centímetro cuadrado de área, de los tres nudos superiores de la planta, los cuales no incluían ni nervadura central, ni lateral. (FIGURA 3).

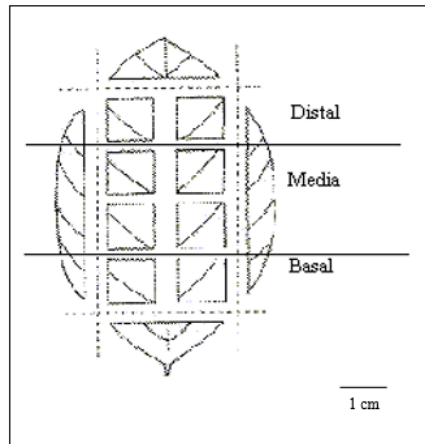


FIGURA 3: seccionamiento de la hoja de las plantas de café de 3 – 12 meses de edad, tamaño de explantes 1 cm².

PREPARACION DE MEDIO MS SIN REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Para el proceso de pre selección de ex plantes se prepararon 2500 ml medio de cultivos sin reguladores, Básicamente, el medio de cultivo utilizado estuvo constituido por las sales de Murashige y Skoog completas (MS), el pH de los medios se ajustó a 5,4 y fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 minutos, 15 PSI y 250 °F. Se utilizó para la preselección de explantes.

Antes de realizar el establecimiento de los explantes se elaboraron las siguientes soluciones.

Tabla 1: soluciones madres

SOLUCIONES MADRE	1 lt de medio
MACRO ELEMENTOS	100 ml
MICROELEMENTOS	10 ml
VITAMINAS	10 ml
QUELATOS	10 ml

TABLA 2: MACRO ELEMENTOS, por cada litro de medio de cultivo agregar 100 ml de macro elementos.

MACROELEMENTOS	1 LT
Nitrato de amonio ($(\text{NH}_4)(\text{NO}_3)$)	16.5 gr
Nitrato de potasio (KNO_3)	19 gr
Cloruro de calcio (CaCl_2)	17.6 gr
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	1.7 gr
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	3.7 gr

TABLA 3: MICRO ELEMENTOS, por cada litro de medio de cultivo agregar 10 ml de micro elementos.

MICRO- ELEMENTOS	1 Lt
Yoduro de potasio (KI)	0.042 gr
Ac. Bórico (H_3BO_3)	0.31 gr
Sulfato de manganeso (MnSO_4)	.80 gr
Sulfato de zinc (ZnSO_4)	0.43 gr
Molibdato de sodio (Na_2MoO_4)	0.012 gr
Sulfato cúprico (CuSO_4)	0.0025 gr
Cloruro de cobalto (CoCl_2)	0.0025 gr

Tabla 4: VITAMINAS, agregar 10 ml por cada litro de medio de cultivo.

VITAMINAS	1 Lt
Ac. Nicotínico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)	0.05 gr
Tiamina	0.01 gr
Piridoxina	0.01 gr
Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	0.2 gr

Tabla 5: QUELATOS, por cada litro de medio de cultivo agregar 10 ml de quelatos.

QUELATOS	1 Lt
EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	4.12 gr
Sulfato ferroso ($FeSO_4$)	2.75 gr

Tabla 6: reguladores de crecimiento

REGULADORES	250 ml
2,4-D	0.25 mg
BAP	0.25 mg
ANA	0.25 mg
AIA	0.25 mg

PRESELECCION DE TEJIDOS

Los ex plantas fueron sembrados en un medio de pre cultivo (medio I) y permanecieron allí durante 72 horas (3 días) en un medio sólido con sales de Murashige and Skoog (1962) con sacarosa 3 % , agar 7,5 g / l. Cada frasco contenía de 2 a 3 ex plantas de 1 cm² cada uno. El medio se preparó sin ningún regulador de crecimiento. Composición del medio murashige & skoog. **(Tabla 1)**.

Tabla 7: composición de medio de cultivo para preselección.

MEDIO MS	1 LT
MACRONUTRIENTES	100 ml
MICRONUTRIENTES	10 ml
VITAMINAS	10 ml
QUELATOS	10 ml
MYO- INOSITOL	0.1 gr
FOSFATO	0.5 gr
SACAROSA	30 gr
PHYTAGEL	2.5 gr

Después de 72 horas Se seleccionaron ex plantas totalmente verdes sin ninguna lesión o presencia de oxidación y se transfirió a un medio suplementado con su respectiva concentración de hormonas.

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE TEJIDOS FOLIARES E INDUCCION DE CALLOS

Para la inducción de callo se utilizó medio de cultivo MS suplementado, con combinaciones de reguladores de crecimiento (**tabla 8**) BAP Y 2-4, D, un ex plante por cada frasco.

Tabla 8: composición del medio de cultivo con reguladores de crecimiento BAP y 2,4-D.

MEDIO MS	1 LT
MACRONUTRIENTES	100 ml
MICRONUTRIENTES	10 ml
VITAMINAS	10 ml

QUELATOS	10 ml
MYO- INOSITOL	0.1 gr
FOSFATO	0.5 gr
SACAROSA	30 gr
PHYTAGEL	2.5 gr
BAP	-----
2-4,D	-----

Tabla 9: antioxidantes

ANTIOXIDANTES	Para 1 Lt de medio
AC. CITRICO	0.150 gr
AC. ASCORBICO	0.100 gr

PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO

Para el establecimiento de *coffea arábica* (Oro azteca Y Catimor), se prepararon 3 lts de medio ms suplementado con reguladores de crecimiento, BAP (Bencil Amino Purina) y 2,4-D (2.4-Diclorofenoxiacético), se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento de hormonas, ciertas concentraciones.

Se preparó medio ms suplementado con su respectiva combinación y concentración de reguladores de crecimiento. BAP Y 2-4D, este medio se esterilizo y se dosifico en frascos chicos de cristal, donde serán sembrados los ex plantas.

Los cultivos se incubaron en la oscuridad, a 23 ± 1 °C. A los 45 d se evaluó la formación de callos con capacidad morfo génica en Catimor y oro azteca.

Medio de inducción de callos.

Para inducir la formación de callos, se llevó a cabo después de las 72 horas del proceso de preselección y se escogieron ex plantas con coloración verdosa en el medio de pre-cultivo, se colocó en un medio solido similar al anterior, solo que suplementado con myo-inositol 100 mg/l, y los reguladores de crecimiento

[0,2.7,4.5,5.3,7.0,8.0,8.5 mg/ml] BAP) y [0,0.3,0.7,1.0] (2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D)) en las combinaciones y concentraciones indicadas. Se realizó una combinación de las concentraciones de reguladores para ambas plantas (oro azteca y Catimor) para la inducción de callos se realizó 28 tratamientos, resultado de la combinación de los reguladores de crecimiento, realizando 5 repeticiones por cada tratamiento, (**tabla 10**).

Tabla 10: combinación de reguladores de crecimiento, 18 tratamientos.

TRATAMIENTO	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)						
		0	8.0	8.5	5.3	2.7	7.0	4.5
I	0	0,0	0,8.0	0,8.5	0,5.3	0,2.7	0,7.0	0,4.5
II	0.3	0.3,0	0.3,8.0	0.3,8.5	0.3,5.3	0.3,2.7	0.3,7.0	0.3,4.5
III	0.7	0.7,0	0.7,8.0	0.7,8.5	0.7,5.3	0.7,2.7	0.7,7.0	0.7,4.5
IV	1	1,0,0	1,0,8.0	1,0,8.5	1,0,5.3	1,0,2.7	1,0,7.0	1,0,4.5

TABLA: TRATAMIENTO 1

TRATAMIENTO	2,4-D	BAP
1.1	0	0
1.2	0	8.0
1.3	0	8.5
1.4	0	5.3
1.5	0	2.7
1.6	0	7.0
1.7	0	4.5

TABLA: TRATAMIENTO 2

TRATAMIENTO	2,4-D	BAP
2.1	0.3	0
2.2	0.3	8.0
2.3	0.3	8.5
2.4	0.3	5.3
2.5	0.3	2.7
2.6	0.3	7.0
2.7	0.3	4.5

TABLA: TRATAMIENTO 3

TRATAMIENTO	2,4-D	BAP
3.1	0.7	0
3.2	0.7	8.0
3.3	0.7	8.5
3.4	0.7	5.3
3.5	0.7	2.7
3.6	0.7	7.0
3.7	0.7	4.5

TABLA: TRATAMIENTO 4

TRATAMIENTO	2,4-D	BAP
4.1	1.0	0
4.2	1.0	8.0
4.3	1.0	8.5
4.4	1.0	5.3
4.5	1.0	2.7
4.6	1.0	7.0
4.7	1.0	4.5

Inducción de callos (combinación de tratamientos)

Los frascos de cultivo se mantuvieron bajo ciertas condiciones, a 23 ± 2 °C en la oscuridad, durante 14 semanas. En las semanas de formación de callos se evaluó. La morfología de los callos, oxidación y contaminación. Se hizo un sub cultivo a medio fresco a las seis semanas con las mismas concentraciones.

EL CRECIMIENTO DE CALLOS Y EL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE REGULADORES 2,4-D Y BAP

Para cada variedad de café se evaluó el crecimiento de callos conforme a las diferentes concentraciones de reguladores realizando un estudio morfológico **a través de un estereoscopio**, así como también evaluó el efecto de cada tratamiento, oxidación y contaminación.

Este proceso se llevó a cabo en el laboratorio de la secretaria del campo, para ello se tomaron los frascos y se llevó al estereoscopio.

Preparación y Cambio de medio MS

Se preparó medio de cultivo MS solido con sus respectivas concentraciones de hormonas y se realizó un cambio de medio a partir de la semana 6 de la inducción.

Evaluación de la oxidación y contaminación de medios

Para cada tipo de ex plante (Catimor y oro azteca) se realizó una observación periódicamente de la oxidación sobre el medio de cultivo MS, En cuanto a la contaminación se realizó una evaluación y se retiró de los estantes.

Una alternativa para prevenir la oxidación en los explantes es el uso de antioxidantes en el medio de cultivo, como ácido cítrico [0.150 mg/lit] y ácido ascórbico [0.100 mg/lit]. Esto ayudara a reducir el porcentaje de oxidación en explantes en cada variedad de café.

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LOS TEJIDOS FOLIARES A (embriones somáticos).

Aplicar la técnica de embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia para permitir la obtención de embriones a partir de callos, mediante el uso de medios de cultivo ms con sus respectivas combinaciones de reguladores de crecimiento se realizó la inducción de callos embriogénicos (Denchev et al., 1992; Berthouly and Etienne, 1999). Se llevó a cabo después de la formación de callos y haber obtenido callos embriogénicos, en cuanto a la inducción de callos embriogénicos-embryones somáticos, se utilizaron 3 reguladores de crecimiento (BAP, AIA Y ANA) y KNO_3 , el regulador de crecimiento que se usó para los ex plantas de oro azteca fue (ANA) Y KNO_3 , y para Catimor se usaron 2 reguladores (AIA y BAP), al igual que en la inducción de callos se realizó una combinación de reguladores dando como resultado 28 tratamientos y 5 repeticiones por cada tratamiento. **(TABLA 11 y 12).**

Preparación y cambio de medio MS

Para inducir la formación de embriones somáticos, se escogieron ex plantas con formación de callos viables a formación de embriones del medio anterior, se colocaron en un medio solido similar al anterior, suplementado con myo-inositol 100 mg/l, y los reguladores de crecimiento [0,1.42,2.85,5.71, mg/ml] (IAA) y [0,2.22,4.44,5.5, mg/ml, BAP] (Bencil Amino Purina)y [0,0.3,0.7,1.0, mg/ml] (ANA) y [0,1.26,2.52,3.0,3.8,4.5 mg/ml] (KNO_3) en las combinaciones y concentraciones indicadas.

INDUCCION DE EMBRIONES (COMBINACION DE TRATAMIENTOS)

TABLA 11: combinación de tratamientos con reguladores (ANA) Y (KNO₃). Para la variedad oro azteca.

TRATAMIENTO	ANA (mg/l)	KNO ₃ (mg/l)						
		0	1.26	2.52	2.52	3.0	3.8	4.5
I	0	0,0	0,1.26	0,2.52	0,2.52	0,3.0	0,3.8	0,4.5
II	0.7	0.7,0	0.7,1.26	0.7,2.52	0.7,2.52	0.7,3.0	0.7,3.8	0.7,4.5
III	0.3	0.3,0	0.3,1.26	0.3,2.52	0.3,2.52	0.3,3.0	0.3,3.8	0.3,4.5
IV	1	1,0	1,1.26	1,2.52	1,2.52	1,3.0	1,3.8	1,4.5

TABLA: TRATAMIENTO 1

TRATAMIENTO	ANA	KNO ₃
1.1	0	0
1.2	0	1.26
1.3	0	2.52
1.4	0	2.52
1.5	0	3.0
1.6	0	3.8
1.7	0	4.5

TABLA: TRATAMIENTO 2

TRATAMIENTO	ANA	KNO ₃
2.1	0.7	0
2.2	0.7	1.26
2.3	0.7	2.52
2.4	0.7	2.52
2.5	0.7	3.0
2.6	0.7	3.8
2.7	0.7	4.5

TABLA: TRATAMIENTO 3

TRATAMIENTO	ANA	KNO ₃
3.1	0.3	0
3.2	0.3	1.26
3.3	0.3	2.52
3.4	0.3	2.52
3.5	0.3	3.0
3.6	0.3	3.8
3.7	0.3	4.5

TABLA: TRATAMIENTO 4

TRATAMIENTO	ANA	KNO ₃
4.1	1.0	0
4.2	1.0	1.26
4.3	1.0	2.52
4.4	1.0	2.52
4.5	1.0	3.0
4.6	1.0	3.8

TABLA 12: combinación de tratamientos con reguladores (AIA) Y (BAP). Para la variedad Catimor.

TRATAMIENTO	IAA (mg/l)	BAP (mg/l)						
		0	2.22	3.5	4.44	5.5	6.3	7.0
I	0	0,0	0,2.22	0,3.5	0,4.44	0,5.5	0,6.3	0,7.0
II	1.42	1.42,0	1.42,2.22	1.42,3.5	1.42,4.44	1.42,5.5	1.42,6.3	1.42,7.0
III	2.85	2.85,0	2.85,2.22	2.85,3.5	2.85,4.44	2.85,5.5	2.85,6.3	2.85,7.0
IV	5.71	5.71,0	5.71,2.22	5.71,3.5	5.71,4.44	5.71,5.5	5.71,6.3	5.71,7.0

TABLA: TRATAMIENTO 1

TRATAMIENTO	AIA	BAP
1.1	0	0
1.2	0	2.22
1.3	0	3.5
1.4	0	4.44
1.5	0	5.55
1.6	0	6.3
1.7	0	7.0

TABLA: TRATAMIENTO 2

TRATAMIENTO	AIA	BAP
2.1	1.42	0
2.2	1.42	2.22
2.3	1.42	3.5
2.4	1.42	4.44
2.5	1.42	5.5
2.6	1.42	6.3
2.7	1.42	7.0

TABLA: TRATAMIENTO 3

TRATAMIENTO	AIA	BAP
3.1	2.85	0
3.2	2.85	2.22
3.3	2.85	3.5
3.4	2.85	4.44
3.5	2.85	5.5
3.6	2.85	6.3
3.7	2.85	7.0

TABLA: TRATAMIENTO 4

TRATAMIENTO	AIA	BAP
4.1	5.71	0
4.2	5.71	2.22
4.3	5.71	3.5
4.4	5.71	4.44
4.5	5.71	5.5
4.6	5.71	6.3
4.7	5.71	7.0

INDUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.

Para ambas variedades los explantes con presencia de callos embriogénicos serán transferidos a un medio de cultivo similar al de inducción de callos, el ex plante seleccionado será transferido al medio con reguladores, (ANA, KNO₃) para la variedad de oro azteca Y (IAA, BAP) para la variedad de Catimor; las concentraciones serán las que se indiquen, en todos los medios anteriores los tejidos serán incubadas a una temperatura de 26 ° C +/- 1°C y en oscuridad.

TRATAMIENTOS

Se realizó dos introducciones de material vegetal (oro azteca y Catimor), cada uno se cultivó en medios de cultivos con sus respectivos reguladores de crecimiento y sus tratamientos usando combinaciones respectivas al cuadro 11 y 12, cada frasco con 1 ex plante por tratamiento, se usaron 28 tratamientos para cada material vegetal cultivando 5 repeticiones por cada tratamiento haciendo un total de 140 tratamientos. En las tablas se resumen los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los segmentos de hojas (ex plantas) de café de las variedades oro azteca y Catimor.

Estudios histológicos de embriones somáticos en ex plantas foliares de café, (oro azteca y Catimor).

Con el objetivo de corroborar el carácter embriogénico de los callos y desarrollo normal de los embriones somáticos, se realizó un análisis histológico. En diferentes estados de desarrollo. Empleando diferentes ex plantas con diferentes tratamientos.

El proceso histológico se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejido vegetal de la secretaria del campo de Chiapas. Para ello, se realizaron observaciones de la morfología de los callos embriogénicos para cada tratamiento; para ello, todos los embriones somáticos producidos en cada tratamiento serán contados visualmente, mediante el estereoscopio.

Condiciones de medio

Los ex plantas se cultivaron en frascos tipo Gerber (70 mm de alto por 45 mm de diámetro), con una densidad de siembra de 1 ex plante por frasco con 25 ml de medio de cultivo aproximadamente. Estos serán expuestos a condiciones

ambientales, en la fase de inducción de embriones, descrito por (Flores y Abdelnour, 2000), los ex plantes se colocaron en la oscuridad a una temperatura de 23 ° C, por un periodo de 4 semanas. **(FIGURA 4).**



FIGURA 4: condiciones en el cual se debe inducir los explantes de *C. arabica*, frascos tipo Gerber (70 mm de alto por 45 mm de diámetro).

Determinación del efecto de cada tratamiento en el proceso de inducción embriones somáticos de café.

Se determinara el efecto de cada tratamiento, combinaciones de (ANA),(KNO₃) y (IAA),(BAP), se realizó después de haber seleccionado a los callos embriogénicos y hecho el cambio de medio suplementado, la Preparación y segundo cambio de medio MS suplementado con su respectiva concentración será después de 3 semanas, Se preparara medio sólido con sales de Murashige and Skoog (1962), con las mismas hormonas de crecimiento.

ANALISIS ESTADISTICO

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando los datos de estadística (STATGRAPHICS) con Número de factores que se describen por separado en diferentes encabezamientos. Los valores se someterán a análisis de varianza (ANOVA), Empleando el modelo lineal general para ANOVA de efecto principal.

La significación entre los valores medios se evaluará aplicando Prueba de rango múltiple de Duncan (DMRT). Un nivel de probabilidad de $P \leq 0.05$ Fue considerado significativo. Los valores en las tablas son seguidos por los estándares Error (valor \pm SE). El porcentaje de datos fue sometido a transformación de raíz cuadrada y denotado por * signo. SEM es el error estándar de los medios de todos los Poblaciones.

Para el análisis estadístico se usó el programa stat graphics versión centurión para ambas variedades de café oro azteca y Catimor, Se determinó el porcentaje de embriones producidos y para cada uno de los tratamientos, se determinó la media y la desviación estándar de la cantidad de embriones producidos por ex plante. Además, con el fin de comparar el potencial embriogénico de los segmentos. Se llevó a cabo una prueba tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN Y OXIDACIÓN PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS

Durante la inducción de callos a partir de ex plantas foliares de *C. arabica* en ambas variedades también se evaluaron 2 condiciones del medio de cultivo, contaminación y oxidación del ex plante. A lo largo de la realización del proyecto hubo pérdida de explantes por contaminación y oxidación, en ambas variedades. Se presentó diferencias y el porcentaje de explantes no contaminados ni oxidados difirió considerablemente según la procedencia de los mismos. La oxidación del ex plante se caracterizó por un cambio en la coloración del tejido vegetal y así mismo el cambio de color del medio de cultivo, estos al poco tiempo llegaron alcanzar un color vino oscuro, causando muerte del explante. (FIGURA 5 A Y 5 B).

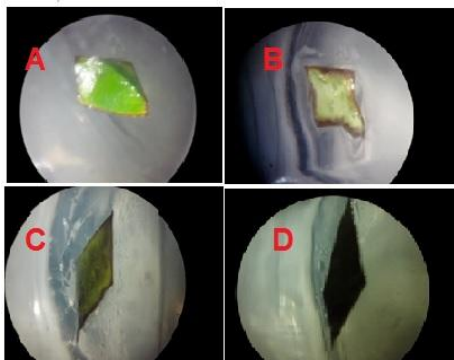


FIGURA 5: A) Explantes oxidados de *C. arabica oro azteca*.

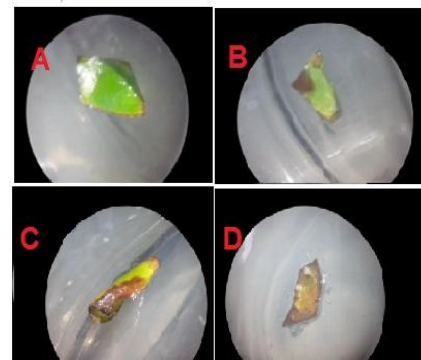


FIGURA 5: B) Explantes oxidados de *C. Arabica Catimor*.

Conforme transcurre los días se observa que la oxidación afecta a los explantes A) primera semana de establecimiento, se nota cicatrización en el explante, B) semana 2 se observa oxidación baja en el explante, C) semana 3 la oxidación cubre la mayor parte del explante. D) semana 4, explante oxidado completamente.

Se observó mayores porcentajes de oxidación en el material vegetal proveniente de la variedad de café (oro azteca), (**Figura 6**). En el caso de los explantes de la variedad Catimor presento un menor porcentaje de oxidación.

Al observar que los explantes presentaban oxidación se realizo un cambio de medio con antioxidantes, usando acido cítrico y acido ascórbico. Los explantes oxidados fueron retirados y se realizo un nuevo establecimiento de explantes de cada variedad de café.

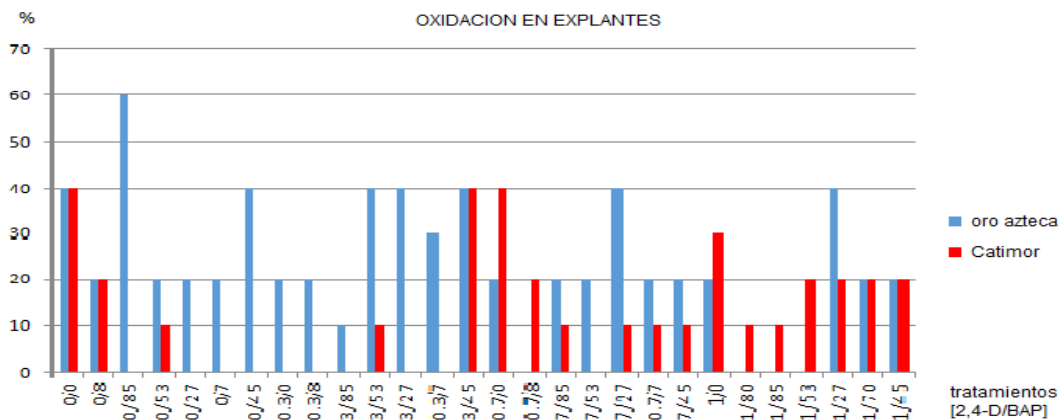


FIGURA 6: comparación de porcentaje de explantes *C. arabica* oro azteca y Catimor en presencia de oxidación.

En cuanto a la variedad *C. arabica* (oro azteca) presentan mayor porcentaje en oxidación de explantes en los tratamientos, el tratamiento con mayor oxidación fue [0/8.5 2,4-D/BAP mg/lit] con un 60 %. La mayor parte de los tratamientos presentaron oxidación. En la variedad Catimor la tasa de oxidación en explantes fue menor. Tratamientos como [0.7/5.3 2,4-D/BAP mg/lit] se observó oxidación del explante pero también se observó una respuesta a la formación de callos.

CONTAMINACION

En cuanto a la contaminación se observó un mayor porcentaje de explantes contaminados cuando estos se le realizo el cambio de medio de cultivo. Las hojas provenientes de la variedad Catimor se presentaron porcentajes de contaminación menores que en la variedad de oro azteca los cuales tratamientos presentaron el 80% de contaminación (**Figura 7**). Ya que se realizo una prueba preliminar dando un tratamiento de desinfección a la variedad Catimor antes de ingresar al laboratorio. En cuanto al tipo de contaminante, se observó una mayor contaminación por hongos en los explantes. En algunos casos la contaminación se debió por bacteria (**Figura 8**).

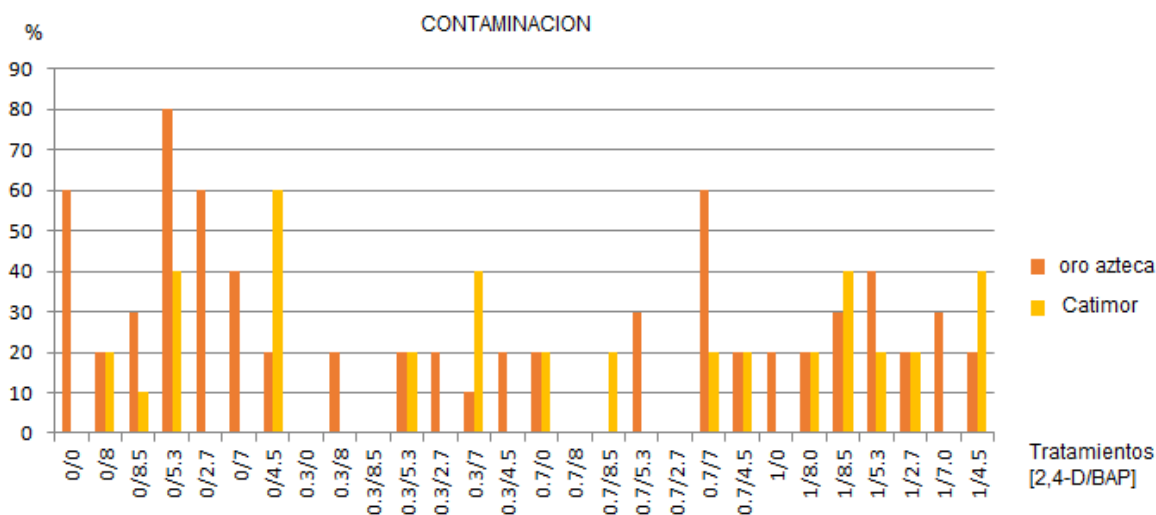


FIGURA 7: porcentaje de explantes *c. arabica* oro azteca y Catimor en presencia de contaminación.

En la figura anterior se observa una diferencia en porcentaje de contaminación conforme al tratamiento que se le dio a cada variedad. En la variedad Oro azteca se observo mayor porcentaje en tratamientos contaminados. En cuanto a la variedad Catimor se uso un metodo de desinfección el cual presento tratamientos con menor porcentajes de contaminación. Se realizo una prueba preliminar en el cual se tomaron algunos explantes con tamaño poco mayor de 1 cm². Y se establecieron en el medio de cultivo.



FIGURA 8: explantes *C. arabica* oro azteca y Catimor contaminados por hongos.

TIPO DE EXPLANTE FOLIAR E INDUCCION DE CALLOS

Antes de realizar la inducción de callos se llevó un proceso de pre selección de explantes, el cual se realizó en medios MS sin reguladores, se escogieron explantes en condiciones óptimas, totalmente verdes.

EFFECTO DE 2-4 D Y BAP EN LA INDUCCION DE CALLOS EN LA VARIEDAD DE CAFÉ ORO AZTECA

En este trabajo se utilizaron 2 hormonas para la inducción de callos, usando auxinas y cito quininas 2,4-D y BAP, al añadir las diferentes concentraciones, los resultados en cuanto a inducción de callo en los explantes de *C.arabica* variedades como oro azteca y Catimor fueron viables. En este caso se utilizó 2,4-D y BAP En la variedad oro azteca y Catimor, en la primera semana solo se observó oxidación en los explantes, se realizó un cambio de medio de cultivo agregando antioxidantes esto para poder prevenir la oxidación de los explantes restantes. Al cabo de 5 semanas de cultivo se empezó a observar los primeros explantes con formación de callosidad. En los tratamientos siguientes, **(FIGURA 10)**. Se utilizaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. En algunos tratamientos el 2,4-D y BAP tuvieron respuestas favorables.

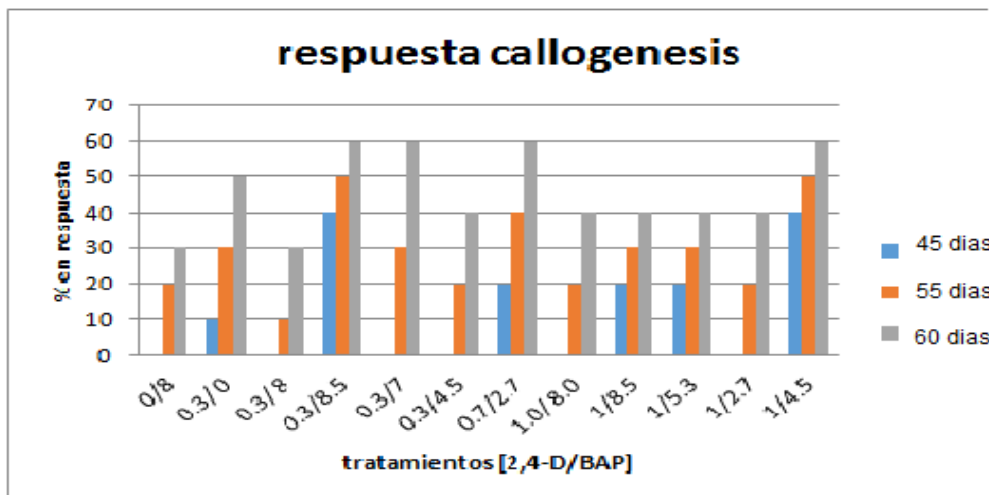


FIGURA 10: respuesta en producción de callos en C. arabica variedad oro azteca

En los primeros 45 días de cultivo, algunos de los tratamientos presentaron formación de callos en el explante. La presencia de formación de callos en oro azteca, fue mediante la cicatrización alrededor de los explantes. Tratamientos con mayor presencia en los primeros 45 días fueron [0.3/8.5] y [1/4.5] 2,4-D/BAP mg/lt. Con un porcentaje del 40 %. Cuando se añadió auxina (2,4-D) y cito quininas (BAP) en bajas concentraciones, solas al medio de cultivo, la inducción de callo en los explantes de hoja fue baja, promoviendo la formación de callo a los 45 días de cultivo dependiendo de la concentración hormonal (**Figura 11**). a los 60 días, concentraciones como [0.3/8.5], [0.3/7], [0.7/2.7], y [1/4.5] presentaron un 60 % de formación de callos en los explantes. Con la variedad de Catimor, un tratamiento se obtuvo un máximo porcentaje de formación de callo que fue de 60%, con una concentración de mgL^{-1} .

El uso de BAP en altas concentraciones, indujo la formación de callos en un 50% a los 55 días, siendo la concentración más efectiva. Cuando los explantes de hojas de C. arabica (oro azteca). Se cultivaron en medio MS, los mejores resultados se obtuvieron a los 60 días con las concentraciones optimas [0.3/8.5, 0.3/7.0, 0.7/2.7 y 1.0/4.5 de 2,4-D/BAP] mgL^{-1} , observándose un 60% de formación de callo, mientras que con la variedad Catimor, los tratamientos con mayor porcentaje en respuesta a la formación de callos fueron [1/8.0 y 1.0/4.5] de 2,4-D/BAP mgL^{-1} . Durante los primeros 45 días con un 40%.

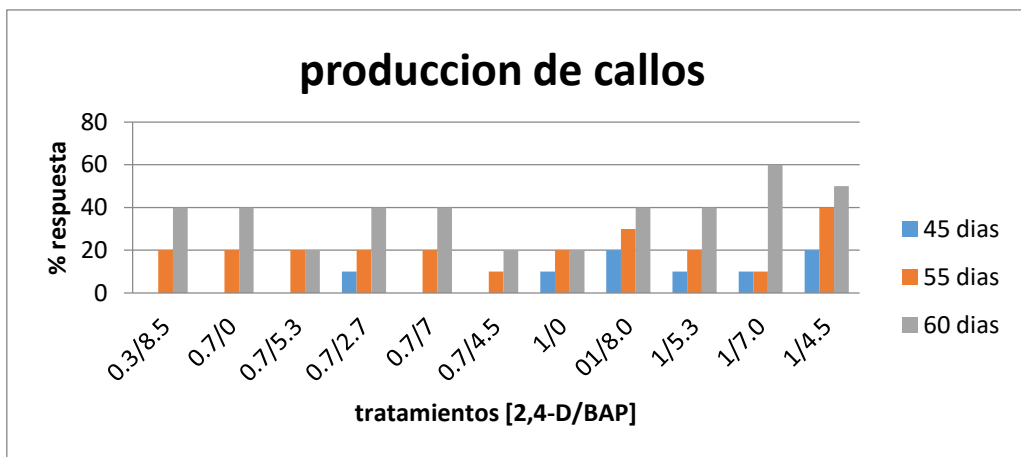


FIGURA 11: respuesta de callos en los explantes con tratamientos 2-3 D y BAP en la variedad de café Catimor.

CUADRO 1: Pruebas de Múltiple Rangos para callos por BAP.

Método: 95.0 porcentaje Duncan

BAP	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	4	0.0	6.36209	X
8	4	5.0	6.36209	X
5.3	4	7.5	6.36209	X
0	4	7.5	6.36209	X
2.7	4	12.5	6.36209	X
8.5	4	15.0	6.36209	X
4.5	4	15.0	6.36209	X

indica una diferencia significativa.

Contraste	Sig.	Diferencia
0 - 2.7		-5.0
0 - 4.5		-7.5
0 - 5.3		0.0
0 - 7		7.5
0 - 8		2.5
0 - 8.5		-7.5
2.7 - 4.5		-2.5
2.7 - 5.3		5.0
2.7 - 7		12.5
2.7 - 8		7.5
2.7 - 8.5		-2.5
4.5 - 5.3		7.5
4.5 - 7		15.0
4.5 - 8		10.0
4.5 - 8.5		0.0
5.3 - 7		7.5
5.3 - 8		2.5
5.3 - 8.5		-7.5
7 - 8		-5.0
7 - 8.5		-15.0
8 - 8.5		-10.0

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. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Cuadro 1.- efecto del BAP, y 2,4-D sobre la inducción de callos en C. arabica variedad oro azteca.

FACTOR	----- presencia de callos en los días-----		
	45	55	60
2,4-D			
0	0.0 a	7.15 b	10.0 c
0.3	10.0 a	16.0 ab	41.4 a
0.7	11.4 a	24.3 a	22.9 bc
1.0	14.3 a	27.2 a	37.15 ab
BAP			
0	7.5a	15 a	22.5 a
2.7	12.5 a	25.0 a	35.0 a
4.5	15.0 a	22.5 a	30.0 a
5.3	7.5 a	12.5 a	20.0 a
7	0 a	15.0 a	30.0 a
8	5.0 a	17.5 a	30.0 a
8.5	15.0 a	22.5 a	27.5 a

NOTA: Esta tabla se aplicó un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

El cuadro muestra una diferencia significativa en cuanto a 2,4-D a partir de los 55 días y con respecto a BAP no hay diferencia estadísticamente significativa.

EFFECTO DE 2-4 D Y BAP EN LA INDUCCION DE CALLOS EN LA VARIEDAD DE CAFÉ CATIMOR.

La mejor respuesta se obtuvo al combinar un tratamiento de [1/7.0] de 2,4-D/BAP mg/l-1 llegándose a encontrar un 60% de formación de callos con la combinación. Cuando se usó 2,4-D junto con BAP, se indujo la formación de callo en número elevado de explantes, obteniéndose respuestas del 60%. Los porcentajes de callo génesis fueron no superiores a aquellos obtenidos con la variedad oro azteca, Ya que con la variedad de oro azteca se obtuvo mayor porcentaje de formación de callos en explantes.

En los otros tratamientos, no hubo aumento de formación de callos. En la **(figura 12)** se observa el crecimiento de callos conforme transcurre el tiempo. Asimismo, se observó ennegrecimiento de los explantes; sin embargo, los porcentajes de oxidación fueron menores que en los medios que contenían combinaciones de la variedad oro azteca. Estos resultados concuerdan con los descritos en otros trabajos donde se ha observado que la adición de BA en el medio de cultivo puede oscurecer el color de los callos por la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de esta planta.

A diferencia de la variedad oro azteca, se observó una tasa mucho menor de proliferación de callos y la formación de embriones con 2,4-D y BAP. Se demostró anteriormente que el 2,4-D a altas concentraciones reduce la formación de callos, incluso causando la muerte del explante.

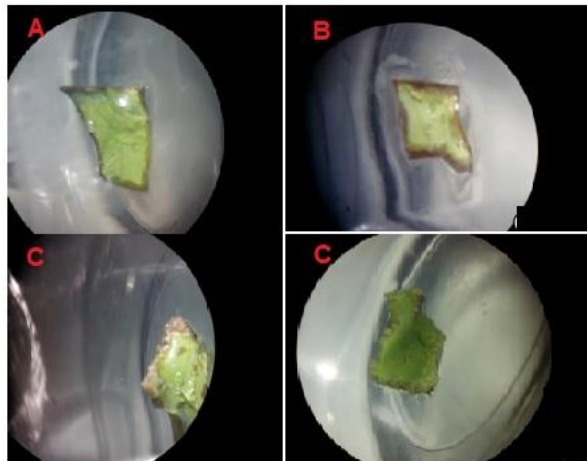


FIGURA 12: formación de callo en los explantes en *C. arabica* a) primeras 5 semanas cicatrización del explante. B) 45 días de inducción presencia de formación de callos. C) día 55 explante con callos viables, d) día 60 explantes con callos embriogénicos.

se observaron callos embriogénicos cuando se cultivaron segmentos de hojas. En 60 días, en 5 semanas se desarrollaron pequeñas cantidades de callos sobre las superficies cortadas de los explantes y posteriormente cubrieron toda la superficie del explante.



Figura 13: explante con mayor presencia de callos embriogénicos después de 60 días de inducción.

(Tratamiento [0.3/7.0 2,4-D/BAP] mg/lit).

Cuadro2.- efecto del BAP, y 2,4-D sobre la inducción de callos en *C. arabica* variedad Catimor.

FACTOR	PRESENCIA DE CALLOS EN LOS DIAS		
	45	55	60
2,4-D			
0	0 a	0 c	0 c
0.3	0 a	2.8 bc	5.8 bc
0.7	1.5 a	12.9 ab	22.8 ab
1	10.0 b	17.15 a	30.0 a
BAP			
0		10.0 a	15.0 a
2.7	35.0 a	5.0 a	10.0 a
4.5	5.0 a	12.5 a	17.5 a
5.3	2.5 a	10.0 a	15.0 a
7	2.5 a	7.5 a	25.0 a
8.0	5.0 a	7.5 a	10.0 a
8.5	0 a	5.0 a	10.0 a

NOTA: procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. . El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

INDUCCIÓN DE CALLOS EMBRIOGENICOS

Los tratamientos con respuestas de callos embriogénicos se transfirieron a un medio de inducción de embriones que contenía diferentes combinaciones hormonales (Tabla).

Los mayores porcentajes de callos se lograron en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con tratamientos de hormonas para la variedad oro azteca y para la variedad Catimor. Los callos se transfirieron a un medio nuevo después de los 60 días.

INDUCCION DE EMBRIONES SOMATICOS

En el presente estudio, BAP mostro una buena respuesta en cuanto a la producción de callos, sin embargo, en la formación de embriones a partir de callos embriogénicos en la variedad *C. arabica* (oro azteca) tuvo igual un mayor número de respuesta a embriones.

EFFECTO DE (AIA, BAP) EN LA INDUCCION DE EMBRIONES EN LA VARIEDAD ORO AZTECA.

La producción de embriones inducida con varias concentraciones de [BAP/AIA] y [ANA/KNO₃] varió cada variedad de café. Cada variedad respondió a un tipo de hormona de crecimiento y una concentración específica. En la variedad oro azteca el uso de BAP en el medio a cierta concentración fue el tratamiento que indujo el mayor porcentaje de producción embriones. Sin embargo los reguladores ANA (ácido naftaleno acético) y BAP (bencil aminopurina) presentaron un efecto sobre algunos explantes. Los embriones somáticos en estado globular fueron evidentes 15 días después del cambio de medio.

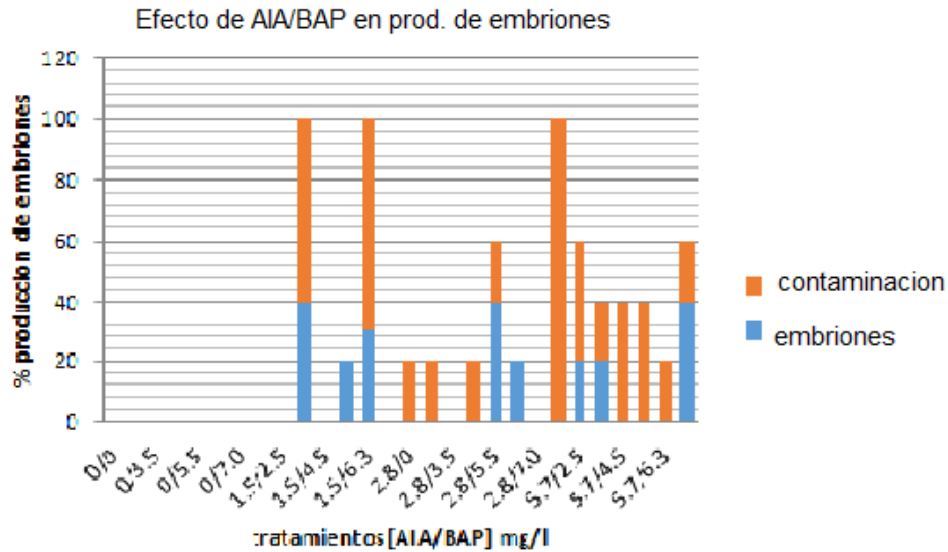


FIGURA 14: efecto de AIA/BAP en la producción de embriones somáticos

Como se muestra en la **(figura 14)** el efecto de los reguladores, los tratamientos con mayor porcentaje en producción de embriones son [1.5/4.5], [2.8/7.0] y [5.7/7.0] AIA/BAP mg/L con un 40 %. Se registró pérdida en explantes por contaminación. Tratamientos con el 100% de contaminación en explantes.

El porcentaje se tomó a partir de los explantes con mejor respuesta en producción de callos embriogénicos



FIGURA 15: explante oxidación con producción de embriones somáticos

En algunos tratamiento oxidados se logró observar el crecimiento de embriones somaticos, cumpliendo con las fases del los embriones, el tratamiento [2.8/7.0] AIA/BAP mg/l. presento embriones globulares y en forma de corazón.

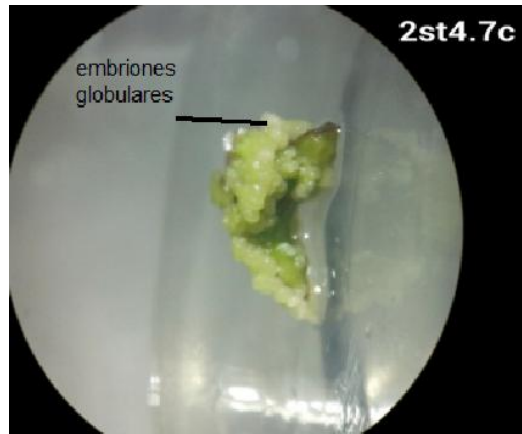


FIGURA 16: embriones en fase globular. En el tratamiento 4.7 [5.7/7.0] AIA/BAP mg/L.

CUADRO 3: efecto del BAP, y 2,4-D sobre la inducción de callos en *C. arabica* variedad Catimor.

FACTOR	PRESENCIA DE EMBRIONES EN LOS DIAS
AIA	
0	0 a
2.8	10.0 a
5.7	14.2 a
1.5	17.1 a
BAP	
0	5.0 a
2.5	5.0 a
3.5	15.0 a
4.5	0 a
5.5	22.5 a
6.3	15.0 a
7	10.0 a

NOTA: Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. 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 honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

EFFECTO DE (ANA, KNO³) EN LA INDUCCION DE EMBRIONES EN LA VARIEDAD CATIMOR.

Mas del 50 % de los explantes cultivados en el medio con reguladores de crecimiento para inducción de callos, presentaron contaminación,

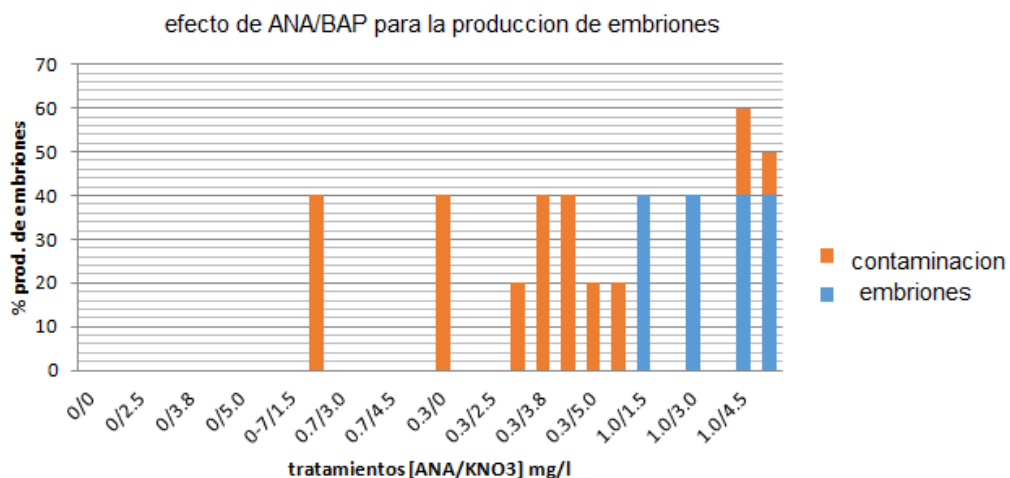


FIGURA 17: Porcentaje del efecto de reguladores ANA/KNO₃ sobre la producción de embriones y de explantes contaminados con presencia de callos embriogénicos.

En cuanto a las respuestas en callos y embriones, ciertos reguladores de crecimiento son determinantes, ya que estos interactúan conforme a ciertas concentraciones. Los efectos evaluados en las dos variedades, que consideran combinaciones de auxinas y citoquininas en cada medio de inducción, permitió obtener repuestas diferencial.

El tipo de explante también se considero como otro factor a la respuesta a la embriogénesis somática en *Coffea arabica*.

CONCLUSIONES

TIPO DE EXPLANTE

Prácticamente, cualquier parte de la planta puede ser cultivada *in vitro*, para regenerar una planta, sin embargo, la elección del explante apropiado es de gran importancia para la exitosa regeneración de nuevas plantas. También varía de acuerdo con el estado de desarrollo y edad de la planta madre. Una planta joven ha demostrado buenos resultados en la Micropropagación.

En general cuanto más grande sea el explante mayor será la posibilidad de inducir la proliferación de callos en los explantes, aunque también sin embargo a mayor sea el tamaño del explante mayor es el riesgo de contaminación.

EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN Y OXIDACIÓN PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS

El protocolo de asepsia de los ex plantes de Catimor y el método de aspersión en el invernadero con una solución de agrymicin y oxicop permitió obtener buena respuesta en la variedad de café Catimor ya que se obtuvo un menor porcentaje de contaminación. Es un método efectivo para el establecimiento de *C. arabica*.

El uso de antioxidantes en el medio de cultivo es una de las maneras de prevenir oxidación en el explante. En este caso se usaron 2 antioxidantes. Ácido cítrico y ácido ascórbico. La presencia de tejidos oxidados fue muy notoria conforme el transcurso del tiempo, sobre todo en la variedad de café oro azteca donde más porcentaje de oxidación hubo.

Una de las causas por el cual provoca este estado, se encuentra el daño que se produce al realizar el corte el explante o en algunos casos por muerte de celular vegetales. La utilización de antioxidantes es de gran importancia para el cultivo *in vitro*. De *C. arabica*.

En la evaluación en contaminación de explantes el tamaño del mismo influye, ya que si entre mayor tamaño tiene más posibilidades de contaminación. Otro de los factores es el estado fisiológico de la planta madre, al ambiente nutricional y el grado de manipulación de la variedad que se empleo.

El uso de sustancias antioxidantes en el medio de cultivo como el acido cítrico y el acido ascórbico fueron de ayuda, ya que permitieron que la oxidación se presentara más en los explantes restantes.

Se encontró que también la embriogénesis somática depende de la interacción del explante con los factores del medio de cultivo, tipo de medio y concentraciones de hormonas de crecimiento.

EFFECTO DE 2-4 D Y BAP EN LA INDUCCION DE CALLOS EN LA VARIEDAD DE CAFÉ ORO AZTECA

Las condiciones óptimas para el establecimiento de explantes de café fueron con los tratamientos, [0.3/0], [0.3/8.5], [0.3/7], [0.7/2.7] y [1/4.5] de 2,4-D/BAP mg/l. mostrando un porcentaje del 50 al 60 % de respuestas de desarrollo de callos. De acuerdo con el cuadro 1 de pruebas de múltiples rangos, muestra una diferencia significativa en cuanto a 2,4-D a partir de los 55 días y con respecto a BAP no hay diferencia estadísticamente significativa.

Mostrando que la auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es la que más efecto tuvo en la inducción de callos en los después de los 55 días. A comparación de BAP que no hubo diferencia significativa y Según (Sagare et al., 2000) el 2,4-D es utilizada para la inducción de embriogénesis somática, así como en presencia de citocininas.

La incubación de los explantes en oscuridad resulto mejor para la formación de los callos,

Con respecto a la figura 10 los tratamientos señalados se obtuvo una respuesta organogénica posiblemente por el uso del explante de la planta madre. Tipo de explante utilizado sin nervadura central y lateral. Aclarando que las condiciones de la planta madre son importantes, condiciones como la edad y el estado fisiológico.

Los medios suplementados con 2,4-D/BAP, en concentraciones bajas no dieron buenos resultados, puesto que los callos formados eran de mala calidad y al poco tiempo empezaron a morir, otros a oxidarse

Solo en el medio con el tratamiento (0.3/0 mg/L 2,4-D/BAP) (figura 10), se obtuvo un callo de tamaño medio y de un color blanco cremoso a los 60 días.

EFFECTO DE 2-4 D Y BAP EN LA INDUCCION DE CALLOS EN LA VARIEDAD DE CAFÉ CATIMOR

A comparación de Oro azteca la variedad Catimor Se encontró también que 2,4-D y BAP influyen en la formación de callos, pero con una respuesta menor, tratamientos como [1/4.5] y [1/7.0] de 2,4-D/BAP mg/l presentan un 50 % de formación de callos.

Otro aspecto a considerar fue que el porcentaje de explantes que formaron callo con 2,4-D fue muy bajo, teniendo el máximo en el medio [1/7.0] con (60%), mientras que en el medio con [1/4.5] solo un 50% de los explantes formaron callo (figura 11). Mientras que en los tratamientos con Oro azteca en todos los demás medios de los explantes formaron callo.

Al igual que en la variedad de Oro azteca 2,4-D influye más en la formación de callos, así como muestra en el cuadro 2 sobre el efecto de BAP y 2,4-D teniendo una diferencia significativa, diciendo que 2,4-D a partir de los 55 días muestra mayor respuesta en bajas concentraciones que BAP.

La auxina como 2,4-D en bajas concentraciones promueven la formación de callos embriogénicos.

EFFECTO DE (AIA, BAP) EN LA INDUCCION DE EMBRIONES EN LA VARIEDAD ORO AZTECA y (ANA/KNO₃) EN CATIMOR

La combinación de AIA/BAP resulto Optima para la inducción de embriones somáticos producidos bajo un fotoperiodo de 16 hrs.

La citocinina promueve la formación de embriones somáticos posiblemente por la síntesis de una sustancia inductora o por la eliminación de un inhibidor (Sondahl et al, 1991).

Respecto al rendimiento evaluado según la producción de embriones, en los distintos tratamientos utilizados, la mayor producción de embriones (se obtuvo con los tratamientos [1.5/4.5],[2.8/5.5] y [5.7/6.3], que consistió en utilizar 2,4-D/BAP para la inducción de callo y [AIA/BAP] para la diferenciación de embriones somáticos; el tratamiento que siguió cercanamente en rendimiento fue [2.8/5.5] AIA/BAP.

El análisis estadístico de tukey indicó que las diferencias en producción de embriones entre los cuatro tratamientos fueron estadísticamente significativas y la prueba a posteriori para comparar las medias mostró que la producción de embriones con el tratamiento [5.7/6.3] de AIA/BAP fue significativamente mayor que con el tratamiento [5.7/4.5].

A continuación, le siguió en rendimiento de ANA/KNO₃ tratamientos [1/1.5%], [1/3.0], [10/4.5], el cual se diferenció del tratamiento. Esta variación redujo notablemente la producción de embriones. Por presencia de contaminación en los

explantes y oxidación. Por último, el tratamiento [1.0/4.5] originó una producción de embriones muy baja, y [1/1.5] una producción alta.

ANA y KNO_3 en altas concentraciones no son aptas para la producción de embriones, concentraciones bajas promueven una mayor formación de embriones somáticos, (Menéndez and Nieto, 1994) demostraron que a menores concentraciones de ANA y KNO_3 favorecen la formación de embriones somáticos.

El ANA en concentraciones menores a 1 mg / l no parece favorecer la embriogénesis somática, al igual que el KNO_3 en concentraciones mayores a 1.26 g / l.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Andrés, G., Kretschmar, L., & Panamericana, E. A. (2014). Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas.

Bhojwani and Dantu, 2013. Sant Saran, and Prem Kumar Dantu. 2013. Plant Tissue Culture : An Introductory Text. ed. Springer.

Chaguaramos, L. (2000). MULTIPLICACION MASIVA DEL CAFE, p. 90–95.

Galston y Hillman (1961), Efect of *in vitro* preincubation with cofactors on the activity of the Indoleacetic Acid Oxidase of Peas. vol, 14, pag. 750-766.

GARCIA, E. G., & M. R. (22 de 2 de 1989). PROPAGACION CLONAL DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. 'Catimor') A PARTIR DE MICROESQUEJES CULTIVADOS IN VITRO.

Jambor-Benczur, E; Nemenyi, A; Szendrak, E; Szafian, Z. 1997. *In vitro* propagation of *Ailanthus altissima* (Swingle) "Purple Dragon". Horticultural Science 29: 22-25.

Matkowski A, Piotrowska M (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* 77: 346-353.

Murashige and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *psychologia plantarum* 15:43-497.

Ruegger, M., Dewey, E., Gray. W. M., Hobbie, L., Turner, J. & Estelle, M. (1998) *Genes Dev.* 12, 198–207.

Silvarolla, Maria B .; Mazzafera, Paulo; Fazuoli, Luiz C. (2004). "Bioquímica de la planta: Un café arábica naturalmente descafeinado". *Naturaleza* . 429 (6994): 826. doi : 10.1038 / 429826a . PMID 15215853.

Salisbury F.B., C.W. Ross. 1994. *Plant Physiology*. Grupo Editorial Iberoamérica.México.

Stein and Janet, 1994. cell cycle and growth control. vol 54, pag 373-374.

Sagare A P, Y L Lee, T C Lin, C C Chen, H S Tsay (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) - a medicinal plant. *Plant Sci.* 160:139-147.

ANEXOS

CUADRO: cuadro de tratamientos combinados de AIA/BAP y porcentaje de respuesta en la producción de embriones en la variedad oro azteca.

tratamiento AIA/BAP mg/l	% prod. de embriones
0/0	0
0/2.50	0
0/3.5	0
0/4.5	0
0/5.5	0
0/6.3	0
0/7.0	0
1.5/0	20
1.5/2.5	0
1.5/3.5	40
1.5/4.5	0
1.5/5.5	20
1.5/6.3	40
1.5/7.0	0
2.8/0	0
2.8/2.5	0
2.8/3.5	0
2.8/4.5	0
2.8/5.5	50
2.8/6.3	20
2.8/7.0	0
5.7/0	0
5.7/2.5	20
5.7/3.5	20
5.7/4.5	0
5.7/5.5	20
5.7/6.3	0
5.7/7.0	40

ANEXO 3

CUADRO: cuadro de tratamientos combinados de [2,4-D/BAP mg/l] y porcentaje en oxidación, contaminación y en la producción de callos en variedad Catimor.

tratamiento		% oxidacion	% contaminacion	% prod. de callos		
2,4-D mg/l	BAP mg/l			45 dias	55 dias	60 dias
0	0	40	0	0	0	0
0	8	20	20	0	0	0
0	8.5	0	10	0	0	0
0	5.3	10	40	0	0	0
0	2.7	0	20	0	0	0
0	7	0	20	0	0	0
0	4.5	0	100	0	0	0
0.3	0	0	30	0	0	0
0.3	8	0	0	0	0	0
0.3	8.5	0	20	0	20	40
0.3	5.3	10	20	0	0	0
0.3	2.7	0	0	0	0	0
0.3	7	0	40	0	0	0
0.3	4.5	40	20	0	0	0
0.7	0	40	20	0	20	40
0.7	8	20	0	0	0	0
0.7	8.5	10	20	0	0	0
0.7	5.3	0	0	0	20	20
0.7	2.7	10	0	10	20	40
0.7	7	10	20	0	20	40
0.7	4.5	10	20	0	10	20
1	0	30	0	10	20	20
1	8	10	20	20	30	40
1	8.5	10	40	0	0	0
1	5.3	20	20	10	20	40
1	2.7	20	20	0	0	0
1	7	20	0	10	10	60
1	4.5	20	40	20	40	50

ANEXO 4.

CUADRO: cuadro de tratamientos combinados de [ANA/KNO3 mg/l] y porcentaje en la producción de embriones en variedad Catimor.

tratamiento ANA/KNO3	% prod. Embrione	contaminacion
0/0	0	0
0/1.5	0	0
0/2.5	0	0
0/3.0	0	0
0/3.8	0	0
0/4.5	0	0
0/5.0	0	0
0.7/0	0	0
0.7/1.5	0	0
0.7/2.5	0	40
0.7/3.0	0	0
0.7/3.8	0	0
0.7/4.5	0	0
0.7/5.0	0	0
0.3/0	0	40
0.3/1.5	0	0
0.3/2.5	0	0
0.3/3.0	0	20
0.3/3.8	0	40
0.3/4.5	0	40
0.3/5.0	0	20
1.0/0	0	20
1.0/1.5	40	0
1.0/2.5	0	0
1.0/3.0	40	0
1.0/3.8	0	0
1.0/4.5	40	20
1.0/5.0	40	10

ANEXO 5

Pruebas de Múltiple Rangos para callos por BAP en oro azteca a los 45 días.

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>bap</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	4	0.0	6.36209	X
8	4	5.0	6.36209	X
5.3	4	7.5	6.36209	X
0	4	7.5	6.36209	X
2.7	4	12.5	6.36209	X
8.5	4	15.0	6.36209	X
4.5	4	15.0	6.36209	X

* 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. 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 comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
0 - 2.7		-5.0
0 - 4.5		-7.5
0 - 5.3		0.0
0 - 7		7.5
0 - 8		2.5
0 - 8.5		-7.5
2.7 - 4.5		-2.5
2.7 - 5.3		5.0
2.7 - 7		12.5
2.7 - 8		7.5
2.7 - 8.5		-2.5
4.5 - 5.3		7.5
4.5 - 7		15.0
4.5 - 8		10.0
4.5 - 8.5		0.0
5.3 - 7		7.5
5.3 - 8		2.5
5.3 - 8.5		-7.5
7 - 8		-5.0
7 - 8.5		-15.0
8 - 8.5		-10.0

Pruebas de Múltiple Rangos para callos por 2,4-D en Catimor.

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>2,4-D</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	7	0.0	4.80929	X
0.7	7	10.0	4.80929	X
0.3	7	11.4286	4.80929	X
1	7	14.2857	4.80929	X

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. 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

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
0 - 0.3		-11.4286
0 - 0.7		-10.0
0 - 1		-14.2857
0.3 - 0.7		1.42857
0.3 - 1		-2.85714
0.7 - 1		-4.28571

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 comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para callos con intervalos de confianza del 95.0%

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	28	8.92857			
D					
0	7	0.0	4.80929	-10.104	10.104
0.3	7	11.4286	4.80929	1.32461	21.5325
0.7	7	10.0	4.80929	-0.103961	20.104
1	7	14.2857	4.80929	4.18175	24.3897
bap					
0	4	7.5	6.36209	-5.86628	20.8663
2.7	4	12.5	6.36209	-0.866284	25.8663
4.5	4	15.0	6.36209	1.63372	28.3663
5.3	4	7.5	6.36209	-5.86628	20.8663
7	4	0.0	6.36209	-13.3663	13.3663
8	4	5.0	6.36209	-8.36628	18.3663
8.5	4	15.0	6.36209	1.63372	28.3663

Esta tabla muestra la media de callos para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95.0% para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfico de Medias de la lista de Opciones Gráficas.

ANEXO

Pruebas de Múltiple Rangos para callos a los 55 días por 2,4-D en oro azteca

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>D</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	7	7.14286	5.10657	X
0.7	7	15.7143	5.10657	XX
0.3	7	24.2857	5.10657	X
1	7	27.1429	5.10657	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 0.3	*	-17.1429	15.1724
0 - 0.7		-8.57143	15.1724
0 - 1	*	-20.0	15.1724
0.3 - 0.7		8.57143	15.1724
0.3 - 1		-2.85714	15.1724
0.7 - 1		-11.4286	15.1724

* indica una diferencia significativa.

Nota: tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Pruebas de Múltiple Rangos para callos de 55 días por BAP en oro azteca.

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>bap</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5.3	4	12.5	6.75536	X
7	4	15.0	6.75536	X
0	4	15.0	6.75536	X
8	4	17.5	6.75536	X
4.5	4	22.5	6.75536	X
8.5	4	22.5	6.75536	X
2.7	4	25.0	6.75536	X

* indica una diferencia significativa.

Nota: 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. . 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 comparación múltiple de Duncan. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>
0 - 2.7		-10.0
0 - 4.5		-7.5
0 - 5.3		2.5
0 - 7		0.0
0 - 8		-2.5
0 - 8.5		-7.5
2.7 - 4.5		2.5
2.7 - 5.3		12.5
2.7 - 7		10.0
2.7 - 8		7.5
2.7 - 8.5		2.5
4.5 - 5.3		10.0
4.5 - 7		7.5
4.5 - 8		5.0
4.5 - 8.5		0.0
5.3 - 7		-2.5
5.3 - 8		-5.0
5.3 - 8.5		-10.0
7 - 8		-2.5
7 - 8.5		-7.5
8 - 8.5		-5.0

ANEXO

Pruebas de Múltiple Rangos para callos a los 60 días por 2,3-D en oro azteca.

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>D</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	7	10.0	6.1399	X
0.7	7	22.8571	6.1399	XX
1	7	37.1429	6.1399	XX
0.3	7	41.4286	6.1399	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
0 - 0.3	*	-31.4286	18.2426
0 - 0.7		-12.8571	18.2426
0 - 1	*	-27.1429	18.2426
0.3 - 0.7	*	18.5714	18.2426
0.3 - 1		4.28571	18.2426
0.7 - 1		-14.2857	18.2426

* indica una diferencia significativa.

Nota: 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. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Pruebas de Múltiple Rangos para callos 60 por bap

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>bap</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5.3	4	20.0	8.12233	X
0	4	22.5	8.12233	X
8.5	4	27.5	8.12233	X
4.5	4	30.0	8.12233	X
7	4	30.0	8.12233	X
8	4	30.0	8.12233	X
2.7	4	35.0	8.12233	X

Nota: 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 comparación múltiple de Duncan.