



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

UNIDAD REGIONAL UNIVERSITARIA DE ZONAS ÁRIDAS

COORDINACION DE POSGRADO

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE NOGAL PECANERO [(*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch]

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS

PRESENTA:

JAZMIN ANAI AVILA TREVIÑO

Bermejillo, Durango., Mayo 2013



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DIRECCION DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

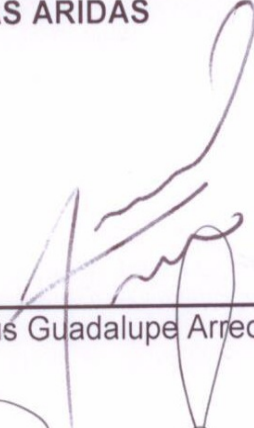


La presente tesis de maestría en ciencias titulada “**Respuestas morfogénicas en la propagación *in vitro* de nogal (*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch**” fue realizada por la C. Jazmin Anai Avila Treviño, bajo la codirección del Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila y el Dr. José Luis Rodríguez de la O, y la asesoría del Dr. Ricardo David Valdez Cepeda y el Dr. Ricardo Trejo Calzada, ha sido evaluada por el Comité Revisor y aprobada como requisito parcial para obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES
Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS**

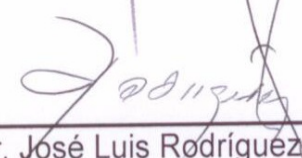
COMITÉ REVISOR

Co-director:



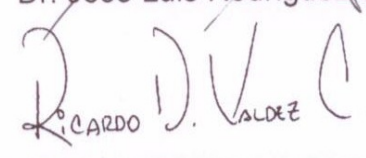
Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

Co-director:



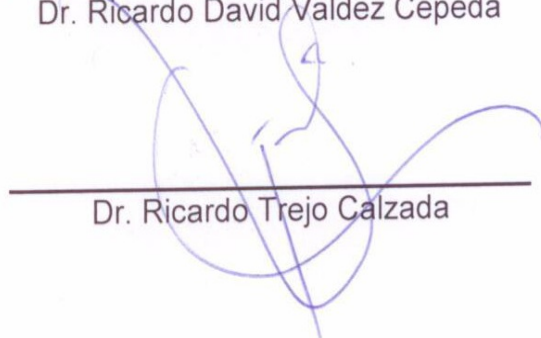
Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesor:



Dr. Ricardo David Valdez Cepeda

Asesor:



Dr. Ricardo Trejo Calzada

DATOS BIOGRÁFICOS

El presente trabajo fue realizado por Jazmin Anai Avila Treviño, Biólogo, egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, perteneciente a la Universidad Juárez del Estado de Durango, generación 2006-2010.

Los estudios de maestría los realizó en el Programa en Recursos Naturales y Medio Ambiente de Zonas Áridas en URUZA-UACH, generación 2011-2012. A sismo, durante el periodo Septiembre-Noviembre 2012, desarrolló una estancia de investigación en la Universidad Politécnica de Valencia, en Valencia, España. Donde participo en diferentes proyectos de investigación orientados a la línea de biotecnología vegetal.

Ha participado en congresos Nacionales:

- **“Desarrollo de protocolo para evitar oxidacion en la etapa inicial de la multiplicacion in vitro de nogal”**. Presentado en el VIII Congreso Nacional Sobre Recursos Bióticos de Zonas Áridas. Octubre de 2012. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo (URUZA-UACH). Bermejillo, Dgo. Modalidad: Ponencia cartel.
- **“Multiplicacion in vitro de nogal (*Carya illinoensis koch*) con tolerancia a salinidad a partir de explantes de arboles adultos”**. Presentado en Expo – Biología. Noviembre de 2009. Facultad de Ciencias Biologicas. Universidad Juarez del Estado de Durango. Gomez Palacio, Dgo. Modalidad: Ponencia oral.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas y Universidad Autónoma de Chapingo, por la oportunidad de seguirme desarrollando como profesionista.

Al Consejo Nacional de Investigación de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de Maestría en Ciencias a través del programa nacional de posgrados de calidad.

A los Doctores Ricardo Valdez, Gamaliel Gaytán y Ricardo Trejo por el tiempo y atención brindada para la revisión de este documento.

A los Doctores José Luis Rodríguez de la O y Jesús Guadalupe Arreola Ávila por su amistad, tiempo, y conocimientos brindados para la realización de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. HIPÓTESIS	3
I.V. ANTECEDENTES	4
4.1. ORIGEN.....	4
4.2. Descripción de la especie.....	5
4.2.1. Clasificación taxonómica	5
4.3. Características morfológicas	6
4.4. Requerimientos del Nogal	10
4.5. Propiedades del nogal.....	11
4.6. Valor nutritivo de la nuez	12
4.7. Distribución	14
4.8. Países productores.....	14
4.9. Producción en México.....	15
4.10. Problemática del nogal	17
4.11. Métodos de propagación.....	18
4.11.1. Propagación Vegetativa.	18
4.12. Micropropagación.....	20
4.13. Ventajas y desventajas de los métodos de propagación	20
4.14. Biotecnología	21
4.15. Desarrollo de la biotecnología en el mundo	22
4.16. Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales.....	24
4.16.1. Embriogénesis	30
4.16.2. Organogénesis	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Material Vegetal.....	34
5.2. Toma de Muestras.....	34
5.3. Etapa de desinfección	35
5.4. Tratamientos con antioxidantes.....	35
5.5. Respuestas morfogénicas	36
5.5.1. Organogénesis	36
5.5.2. Embriogénesis	39
V.I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1. Evaluación de Antioxidantes.....	41
6.2. Respuesta Callogénica a partir de explantes de Hojas.....	45
6.2.1. Biomasa	45
6.3. Respuesta Callogénica a partir de embriones	49
6.3.1 Biomasa	49
6.4. Cultivo <i>in vitro</i> de yemas axilares del tallo.....	54

V.II. CONCLUSIONES.....	56
V.III. RECOMENDACIONES	57
I.X. LITERATURA CITADA	58
ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>Carya illinoensis</i> K	5
Figura 2. Árbol de Nogal	6
Figura 3. Flor de Nogal	7
Figura 5. Nuez con pericarpio y mesocarpio	8
Figura 5. Nuez sin pericarpio y mesocarpio.....	8
Figura 6. Raíz de árbol de nogal	9
Figura 7. Nuez pecanera	11
Figura 8. Principal área de distribución del nogal.....	14
Figura 9. Mapa estados de mayor producción de nuez en México	15
Figura 10. Nivel de necrosamiento en explantes de hojas.	42
Figura 11. Explantes de hojas tratados con Carbón activado al 1%, bajo condiciones de luz (a) y oscuridad (b), con necrosamiento menor al 30%.....	42
Figura 12. Explantes de hoja bajo el tratamiento de Nitrato de plata al 1% en luz (a) y oscuridad (b), con necrosamiento menor al 30%.	43
Figura 13. Explantes de hojas, en el medio testigo en luz (a) y oscuridad (b).. ..	43
Figura 14. Explantes de hojas tratadas con Polivinilpirrolidona al 1.0% en luz (a) y oscuridad (b), con elevado necrosamiento.	44
Figura 15. Explantes de hojas con tratadas Ac. Cítrico $C_6H_8O_7$ 150 mg L ⁻¹ mas Ac. Ascórbico ($C_6H_8O_6$) 100 mg L ⁻¹ , bajo condiciones de luz (a) y oscuridad (b).....	44
Figura 16. Grado de formación de biomasa en explantes de hoja tratados con 2,4-D.	45
Figura 17. Encallamiento en hojas como respuesta a los tratamientos de 2,4-D.	46
Figura 18. A) Estructura de tipo friable; b) Estructura de tipo compacta en callos producidos a partir de explantes de hojas tratados con 2,4-D a razón de 1, 3 y 10 mg L ⁻¹	47
Figura 19. Biomasa con presencia de color blanco (A); Amarillo (B) y Café (C). En callos producidos por explantes de hoja tratados con 2,4-D en dosis de 1, 3 y 10 mg L ⁻¹	48
Figura 20. Grado de formación de biomasa en explantes de hoja tratados con TDZ.....	49

Figura 21. Encallamiento a partir de embriones como respuesta a los tratamientos de TDZ.....	50
Figura 22. A) Estructura de tipo friable; B) Estructura de tipo compacta en callos a partir de embriones tratados con 1, 3 y 10 mg L ⁻¹ de TDZ.....	51
Figura 23. Biomasa con presencia de color Blanco (A); Amarillo (B) y Café (C), en callos producidos a partir de embriones tratados con tdz en dosis de 1, 3 y 10 mg L ⁻¹	52
Figura 24. Estructura de tipo A) Globular; B) Torpedo; C) Corazón; D) Callo con estructuras: globular, torpedo y corazón.	53
Figura 25. Porcentaje de brotación, número de hojas y longitud de plántulas, como respuesta a los tratamientos T1: BA 3, Kin 1, ANA 0.3 mM Y T2: Kin 3.0, BA 1.0, AIB 0.3 mM.	54
Figura 26. Efecto de tratamientos sobre la formación: brotación normal A) T1: BA 3, Kin 1, ANA 0.3 mM. B) T2 Kin 3.0, BA 1.0, AIB 0.3 mM. Brotación múltiple C) T1. D) T2.	55
Figura 27. Efecto de tratamientos sobre la formación de hojas: normal A) T1: BA 3, Kin 1, ANA 0.3 mM. B) T2: Kin 3.0, BA 1.0, AIB 0.3 mM. Múltiple C) T1. D) T2.....	55

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de nutrimentos requeridos por hectárea	10
Tabla 2. Porcentaje de aceite saturado e insaturado en semillas.	12
Tabla 3. Composición de la nuez	13
Tabla 4. Tratamientos con Antioxidantes	35
Tabla 5. Tratamientos con 2,4-Dichlorofenoxiacetico.....	36
Tabla 6. Tratamiento con auxinas y citocinas.....	38

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE NOGAL PECANERO [(*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch]

MORPHOGENIC RESPONSES *in vitro* PROPAGATION OF PECAN [(*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch]

Jazmin Anai Avila Treviño¹, Jesús Guadalupe Arreola Ávila², José Luis Rodríguez De La O³, Dr. Ricardo David Valdez Cepeda⁴, Ricardo Trejo Calcaza⁵.

RESUMEN

El nogal representa uno de los principales cultivos en nuestro país tanto por el valor alimenticio como económico de la nuez (Lemus, 2004). Debido a esto se ha buscado optimizar su producción, utilizando técnicas como el Cultivo de Tejidos *in vitro* que permitan obtener nogales en menor tiempo. En el presente estudio se evaluaron antioxidantes como CA, PVP, AgNO₃ al 1% y C₆H₈O₇ y C₆H₈O₆, a 150 y 100 mg.L⁻¹ respectivamente, bajo condiciones de luz y oscuridad. Se evaluaron también reguladores de crecimiento como 2,4-D (en hojas) y TDZ (en embriones), y combinaciones de BA, Kin, ANA, AIB (en yemas). El objetivo fue promover respuestas embriogénicas y organogénicas a partir del cultivo *in vitro* de diferentes explantes (hojas, yemas y embriones) de nogal pecanero. En explantes de hojas los tratamientos con CA y AgNO₃, promovieron porcentajes de 75 y 83% con menor necrosamiento, correspondiente al nivel 1 (<30%). En la obtención de callo a partir de hojas, 2,4-D a razón de 1 y 3 mg.L⁻¹ indujeron de 33 y 66% con un nivel 3 (>60%). En embriones tratados con TDZ en concentración de 3 mg.L⁻¹ se obtuvo un porcentaje de 58% de callogénesis con nivel 3 (>60%), considerada como la mejor respuesta. El mayor número de brotes, hojas y longitud de planta se observó en yemas tratadas bajo la combinación de KIN, BA y AIB.

Palabras clave: *in vitro*, explantes, antioxidantes, reguladores de crecimiento.

ABSTRAC

The pecan is one of the main crops in our country due to its consumption value as well as economic one (Lemus, 2004). As a result production optimization, based on tissue culture *in vitro* technics that conduct to obtain pecans in short time period is being used. In this study some was evaluated antioxidants such as CA, PVP, 1% AgNO₃ and C₆H₈O₇ and C₆H₈O₆, at 150 and 100 mg L⁻¹ rates respectively, were evaluated under light and dark conditions. There were evaluated also the growth regulators 2,4-D (in leaves), TDZ (in embryos), and combinations of BA, Kin, NAA, IBA (in buds) of pecan. The objective was to promote organogenic and embryogenic responses from *in vitro* culture of different explants (leaves, buds or embryos) of pecan.. In leaves explant Ca and AgNO₃ promoted percentages of 75 and 83% with less necrosis that corresponded to level 1 (<30%). In obtaining callus from leaf, concentrations of 2,4-D at 1 and 3 mg L⁻¹ rates induced a callus genic percentage of 33 and 66% with level 3 (> 60%). In treated embryos with TDZ at 3 mg L⁻¹ rate, was observed a percentage of 58% with callus genic of 3 level (>60%), considered as the best response. The higher shoots number, leaves as well as plant length was observed in buds treated with the combination of KIN, BA and AIB.

Keywords: *in vitro*, explants, antioxidants, growth regulators.

¹Tesista, ²Coodirector, ³Coodirector

¹Tesista, ²Coodirector, ³Coodirector

I. INTRODUCCIÓN

El nogal representa uno de los principales cultivos en nuestro país tanto por el valor alimenticio de la nuez (Lemus, 2004), como por ser una especie forestal de importancia económica para la producción de frutos (Scaltsoyiannes *et al*; 1998). Generalmente la manera mas habitual de propagación de nogal es por vía sexual, esto debido a que es una planta difícil de enraizar, por lo cual se obtienen los portainjertos a través de la germinación de semillas. La propagación por semilla es lenta, además de que se produce una gran cantidad de variantes fenotípicas debido a la variación genética propia de este tipo de reproducción (Castellanos *et al*, 2006). A su vez también es utilizada la propagación vegetativa, la cual se usa para desarrollar la variedad de interés a través de injertos. La limitante principal de esta propagación ha sido el bajo porcentaje de multiplicación, ya que solamente unas cuantas especies se reproducen fácilmente (López y Mateo, 2008). En especies maderables como el nogal se tienen problemas de propagación, ya sea a través de sus semillas, o vía asexual. Debido a esta problemática y a la gran demanda que tiene este cultivo tanto por la necesidad de obtener materiales sobresalientes, resistentes a plagas y enfermedades, hacia factores abióticos, o por sus rendimientos etc; como la propagación masiva que demandan las necesidades de los productores, se ha buscado incrementar su producción ingresando en campos experimentales que permitan obtener nogales con una mejor producción y en menor tiempo. En la actualidad se cuenta con nuevas tecnologías que prometen ser rentables dentro de este ámbito, un ejemplo de esto es el Cultivo de Tejidos *in vitro*. (Rovira y Aleta, 2007). Dentro de esta técnica se

ha implementado el cultivo de callos el cual puede expresar las rutas morfogénicas orientadas tanto a la organogénesis y embriogénesis somática (Castellanos, 2006).

Un estudio realizado sobre este tema, es el presentado por Toosi y Dilmagani (2010), quienes evaluaron los medios de cultivo para el crecimiento de embriones in vitro y la proliferación de nogal *Juglans regia* L. Ellos observaron que el tratamiento óptimo fue la combinación de 0.5 mg L⁻¹ BAP/ 1 mg L⁻¹ IBA. Así mismo, Ipekci y Gozukirmizi (2004), en su investigación con *Paulownia elongata*, lograron producir callos cultivando explantes de hoja en un medio de Murashige y Skoog (MS) adicionado con TDZ y 0.1 mg L⁻¹ de Kin. Donde un promedio de 50.7 embriones somáticos se obtuvieron de 100 mg de callo embriogénico.

A pesar de los estudios que se han realizado para la obtención de nogal (*Carya illinoensis* K.) de forma *in vitro* no se han logrado los mejores resultados, esto porque aun no se ha reportado un protocolo específico que permita el éxito de su multiplicación.

Con el objeto de evaluar las respuestas morfogénicas del Nogal (*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch] se analizaron tanto la organogénesis y embriogénesis somática, utilizando tres materiales vegetales diferentes de estudio yemas, hojas y embriones, sometidos a varios tratamientos (antioxidantes, factor luz y reguladores de crecimiento). Esto con la finalidad de obtener dichas respuestas morfogénicas y así determinar la mejor ruta para la multiplicación in vitro del Nogal *Carya Illinoensis* K.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Establecer las condiciones que nos permitan promover las respuestas asociadas hacia la organogénesis y la embriogénesis somática a partir de diferentes explantes cultivados *in vitro* de Nogal (*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch].

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento, tanto tipos y concentraciones en el medio de cultivo, que permitan optimizar las respuestas embriogénicas y organogénicas en diferentes explantes de nogal cultivados *in vitro*.
- Evaluar el efecto de diferentes antioxidantes que nos permitan controlar el necrosamiento (oxidación) en los diferentes explantes cultivados *in vitro*.

III. HIPÓTESIS

- El manejo adecuado de reguladores de crecimiento, y determinando la mejor fuente de explante, adicionalmente con el control del necrosamiento de tejidos, se promoverán las respuestas morfogénicas *in vitro* de nogal (*Carya illinoensis*) Wangeh K. Koch].

I.V. ANTECEDENTES

4.1. ORIGEN

Los colonizadores españoles llamaron “Nogal” al árbol pecanero y a su fruto la “pecana” le llamaron “nuez”. El nombre de pecana o pecanera es derivado del vocablo indígena Algonquin que le da el nombre de “Pakan” que significa nueces tan duras que requieren una piedra para quebrarlas. Por miles de años, la nuez fue una de las principales fuentes de alimento para los indios americanos (Amiling y Amiling 1980).

El Nogal es nativo de las regiones que incluye Turquía, Irán, Iraq, Afganistán, sur de Rusia y el Este de India. Se han encontrado en Europa restos que datan de la Edad del Hierro. También se ubican formas ancestrales de nogal en el Este de Asia, Sudeste y Norte de Europa y Sudamérica (Lemus, 2004)

El Pecano, *Carya illinoensis* Koch, es una especie frutal perteneciente al grupo de las nueces; miembro de la familia Juglandaceae, la misma del nogal común *Junglans regia* (Lemus, 2004). En América del Norte el nogal pecanero o nuez pecanera se extiende por Texas y Norte de México. La especie es abundante en los ríos y arroyos de Oklahoma central y oriental (Grant, 2000).

En la actualidad el nogal es cultivado en la parte sur de los Estados Unidos y el norte de la República Mexicana (Amiling y Amiling 1980). Las estadísticas nacionales muestran que cuatro estados de la República Mexicana tienen superficies relevantes dedicadas a la producción de nogal: Chihuahua, Coahuila, Sonora y Durango (SAGARPA, 2002).

4.2. Descripción de la especie

4.2.1. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fagales

Familia: Juglandaceae

Género: Carya

Especie: *C. illinoensis*

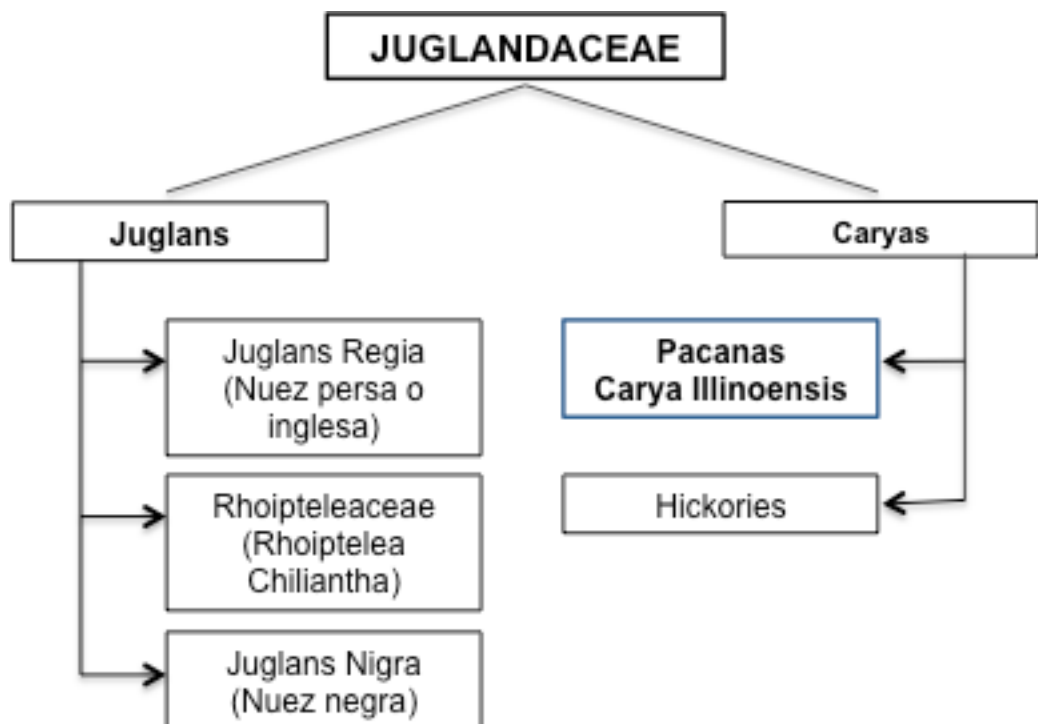


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Carya illinoensis* K. (COMANUEZ, 2012)

4.3. Características morfológicas

El nogal es un árbol de follaje caduco, posee una frondosa copa, y alcanza un tamaño de hasta 30 metros de altura. (Lemus, 2004). Muy vigoroso y longevo, el cual inicia su vida productiva entre los 6 a 10 años de edad y continua produciendo en niveles óptimos y comerciales durante poco más de 50 años, aun y cuando con un buen manejo técnico adecuado se puede alargar su vida productiva teniendo casos de árboles que duran hasta 100 años. (COMENUEZ, 2012). La madera es quebradiza, por lo tanto, los árboles pueden ser fácilmente dañados en zonas con mucho viento o realizando una labor de cosecha muy brusca.



Figura 2. Árbol de nogal

- **Hojas:** Las hojas presentan un verde brillante en el haz y un verde más claro en el envés (Lemus, 2004), son alternas, compuestas pinnadas, de diez a veinte pulgadas de largo, hasta diecisiete folletos que son cuatro a ocho pulgadas de largo (USDA, 2009).

- **Flores:** Posee flores pistiladas (femeninas) y flores estaminadas (masculinas). Las flores pistiladas son producidas en la zona terminal de los brotes del año, apareciendo los frutos en grupos de 2 a 8 nueces. Las flores masculinas se encuentran en la madera que creció el año anterior, organizadas en forma de racimos (amentos). La maduración de ambas no es coincidente, por lo que se debe plantar juntas variedades cuyas flores masculinas y femeninas coincidan en su maduración. La polinización se realiza por el viento (anemófila) (Lemus, 2004).



Figura 3. Flor de Nogal

- **Nuez:** La nuez se considera una drupa (fruto carnoso que contiene una sola semilla), la cual consta de pericarpio, mesocarpio y semilla (almendra). Durante la fase de maduración el pericarpio y el mesocarpio se secan y el endocarpio (cáscara) y la semilla (almendra) son consideradas como la nuez. El Pericarpio y el Mesocarpio es una estructura segmentada en 4 partes que al deshidratarse se abre dejando libre al endocarpio y a la semilla.

La semilla presenta dos cotiledones separados por un tabique central, los cuales provienen de los carpelos florales. Es una nuez de alto valor nutritivo, cuya almendra es rica en proteínas, carbohidratos, grasas (con 94% de aceites insaturados, que reducen el nivel de colesterol en la sangre), minerales, vitaminas y fibras (COMENUEZ, 2012).

Esta drupa mide de 2.5 a 4.5 centímetros de longitud (Lemus, 2004), y pesan de 4 a 12 gramos cada una (COMENUEZ, 2012). La nuez es de forma oblonga, lisa, de cáscara delgada y puntiaguda. Su periodo de desarrollo es largo y se extiende aproximadamente por siete meses (Figura 3) (Lemus, 2004)

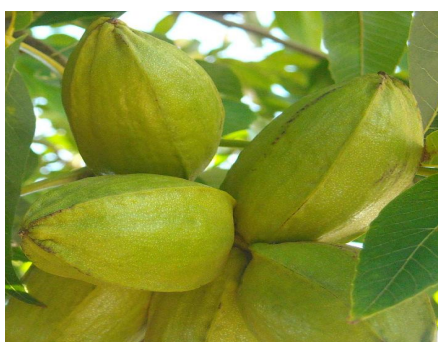


Figura 4. Nuez con pericarpio y mesocarpio



Figura 5. Nuez sin pericarpio y mesocarpio

- **Raíz:** Su sistema radical, en condiciones naturales, puede penetrar a una profundidad de 10 metros, pero en general, en el caso de establecimientos comerciales la mayoría de las raíces se encuentran a 1.2 metros.

Los nogales en su hábitat natural tienen una asociación con hongos no dañinos altamente especializados en las raíces alimentadoras.

Esta infección en las raíces es llamada «micorrizas» (relación hongo-raíz), la relación le permite al árbol la optimización en la toma de nutrientes del suelo por la raíz, mejorando así la eficiencia productiva del árbol. La ramificación y engrosamiento de la ectomicorriza y el manto fúngico aumentan la superficie de exploración del sistema radical, por lo que la absorción de agua y de los nutrientes nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, zinc y cobre es mayor; también el hongo puede desdoblar complejos minerales y orgánicos del suelo a nutrientes asimilables para la planta (González, 2009).



Figura 6. Raíz de árbol de nogal

4.4. Requerimientos del Nogal

El nogal pecanero requiere de 17 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas. No obstante, el nitrógeno y el zinc son los nutrientes a los que presenta mayor respuesta en crecimiento y calidad. En el norte de México las aplicaciones más frecuentes son de nitrógeno, fósforo, potasio y zinc (Ojeda *et al*, 2012)

Nutriente	Kg nutrientes/ha
Nitrógeno	17.06
Fósforo	3.86
Potasio	7.38
Calcio	6.52
Magnesio	0.98
Manganeso	0.138
Hierro	0.054
Boro	0.02
Cobre	0.016
Zinc	0.056
Molibdeno	0.0036

Tabla 1. Cantidad de nutrimentos requeridos por hectárea (Ojeda *et al*; 2007).

4.5. Propiedades del nogal

Estudios recientes han demostrado que los granos de nuez puede mejorar el perfil de lípidos en suero humano y los niveles más bajos de lipoproteínas de baja densidad, debido a su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, se tiene reportado que los granos de nuez tiene la mayor capacidad antioxidante (AC) y el contenido total fenólico extraíble (TP) dentro del grupo de las almendras entre los alimentos con mayor contenido fenólico. De acuerdo con varios estudios, los compuestos fenólicos tienen actividad antirradical y se cree que reducen la incidencia de enfermedades crónicas, incluyendo el Alzheimer, el Parkinson, algunos tipos de cáncer, y otras enfermedades degenerativas.

Las proantocianidinas o taninos condensados (TC) también se han reportado en las nueces del nogal. Este tipo de compuestos tienen actividades biológicas tales como propiedades antioxidantes y antimutagénica, que se ven afectados por el grado de polimerización, el monómero de estructura, y el tipo de enlace entre los monómeros (Villareal *et al*; 2006).



Figura 7. Nuez pecanera

4.6. Valor nutritivo de la nuez

Hoy en día el nogal es una importante fuente de recursos económicos, esto es por la riqueza energética de la nuez como alimento (Lemus, 2004).

Los ingredientes constituyentes de la nuez revelan que es un alimento nutritivo. Contiene aceite con un alto nivel de insaturación superior al de otros aceites vegetales (SAGARPA, 2002).

SEMILLAS	Aceite (%)	
	Saturado	Insaturado
Nuez	03-07	93-97
Maíz	14	86
Cacahuete	18	82
Semilla de algodón	30	70
Soya	14	86

Tabla 2. Porcentaje de aceite saturado e insaturado en semillas.

La nuez es rica en ácidos grasos mono y poliinsaturados, como los Omega 3 y Omega 6, mismos que tienen funciones protectoras en la prevención de coágulos de sangre y reducen el riesgo de cardiopatía coronaria, además contribuyen en el desarrollo normal del sistema nervioso, la nuez pecanera, al mismo tiempo, es fuente de proteína rica en arginina, fitoesteroles y compuestos fitoquímicos, contiene vitamina E, vitaminas del Complejo B y Hierro (SAGARPA, 2011).

La almendra de la nuez tiene menos hidrógeno en su molécula y es metabolizado fácilmente. El contenido de proteína de la nuez es bueno y por el alto nivel de aceite y por su alto contenido de calorías es un alimento que proporciona buena cantidad de energía (SAGARPA, 2002).

COMPOSICIÓN NUTRITIVA DE LA NUEZ			
Nutrientes	Composición	Cant. en proporción de 100 g.	Unidades
Análisis proximal	Calorías	630	kcal
	Proteínas	14,10	g
	Lípidos totales	68,00	g
	Carbohidratos	3,20	g
	Fibra dietética	9,70	g
	Cenizas	1,80	g
Minerales	Agua	3,20	g
	Calcio	89,00	mg
	Cobre	1,30	mg
	Hierro	2,40	mg
	Magnesio	113,00	mg
	Manganeso	2,10	mg
	Fósforo	348,00	mg
	Potasio	391,00	mg
	Sodio	10,00	mg
	Zinc	2,90	mg
Vitaminas	Acido ascórbico	0,88	mg
	Tiamina	0,30	mg
	Riboflavina	0,10	mg
	Niacina	0,82	mg
	Acido Pantotenico	0,45	mg
	Vitamina B-6	0,44	mg
	Acido fólico	56,00	mg
	Vitamina A	146,00	IU

Tabla 3. Composición de la nuez (Lemus, 2004).

4.7. Distribución

El nogal está muy extendido en la mayoría de los países del Hemisferio Norte. La principal área de difusión se sitúa entre los paralelos 10 y 50. En dicha área se encuentra espontáneo formando masas forestales y también cultivado como productor de frutos (Sebastián, 2004).

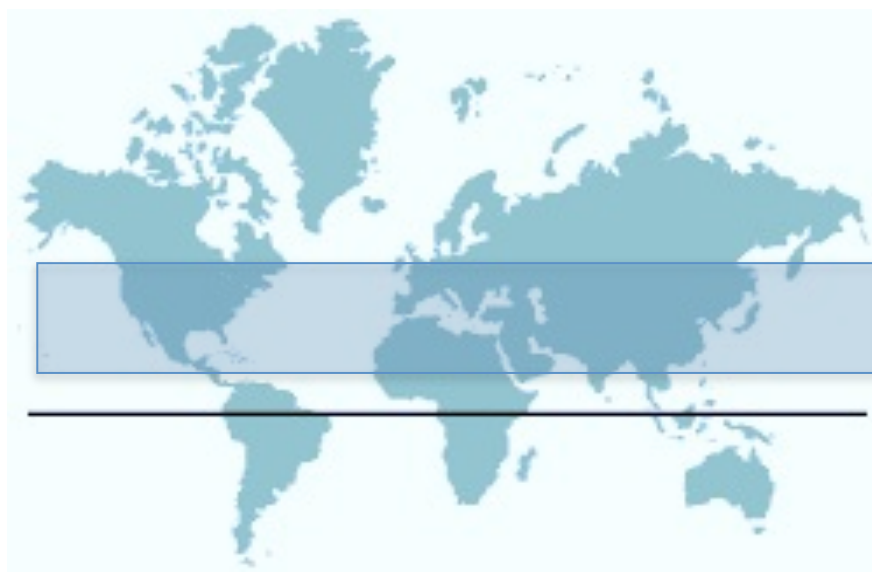


Figura 8. Principal área de distribución del nogal

4.8. Países productores

Existen varios países productores de nuez, de los cuales Estados Unidos de América ocupa el primer lugar con una producción de 113 mil toneladas, que representa al 78.6% de la cosecha. México ocupa el segundo lugar con 28,274 toneladas que equivale al 19.6% Australia, Israel y Sudáfrica producen 1.8% (SAGARPA, 2002).

4.9. Producción en México

La primera plantación del nogal pecanero se estableció en el estado de Nuevo León en el año de 1904. La Comisión Nacional de Fruticultura, reportó en 1980 la existencia de 48 mil hectáreas plantadas de nogal, de las cuales aproximadamente 10 mil correspondían a nogales nativos y criollos. Para 1996, había 59, 695 hectáreas de nogal pecanero plantadas en México, de las cuales 34, 495 eran del estado de Chihuahua; que representa el 58% de la superficie nacional; 12.500 de Coahuila, 6, 200 de Nuevo León, 3, 300 de Durango y 3.200 de Sonora, aproximadamente. Para 1999, Chihuahua tenía 35.135 hectáreas; por lo tanto son un total de 60.335 hectáreas de nogal plantadas en México. En menor importancia en superficie de nogal esta Hidalgo, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Oaxaca, Baja California Norte, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Tamaulipas y Zacatecas (SAGARPA, 2002).



Figura 9. Mapa estados de mayor producción de nuez en México

En México la producción de nuez en condiciones de riego pasó de 19.9 mil t ha⁻¹ en 1980 a 37.8 y 68.9 t ha⁻¹ en 1990 y 2003, respectivamente, con rendimientos unitarios de 0.77, 1.15 y 1.47 t ha⁻¹ para los tres años señalados. La producción nacional se incrementó mas por el aumento en la productividad que por la superficie cosechada, el rendimiento creció 89.5% y la superficie 82.9%. El incremento en la productividad se atribuyo a la introducción de nuevas variedades y al mejor manejo fitosanitario del cultivo. La superficie establecida bajo condiciones de temporal en 2003 ascendió a 2.132 ha, con un rendimiento medio de 560 kg ha⁻¹ (SAGARPA-SIAP, 2005).

En la actualidad la producción de nuez pecanera en México es de aproximadamente 79 mil toneladas, de las cuales 54 mil se producen en el estado de Chihuahua como principal productor, otros estados que destacan en su producción es la Comarca Lagunera (Coahuila-Durango), Sonora y Nuevo León, el rendimiento promedio de este cultivo es de 1.6 ton/ha.

El valor de la producción de la nuez pecanera en 2008 fue de 2,922 millones de pesos; en la producción de este cultivo se emplean de 20 a 40 jornales por hectárea, generando alrededor de 5,000 empleos indirectos en el campo (SAGARPA, 2011).

4.10. Problemática del nogal

El nogal pecanero es una especie muy demandante de zinc (Wood 2006). Curiosamente este árbol es ineficaz en la absorción de dicho elemento del suelo (Tarango *et al*; 2004). En el norte de México, en la mayoría de los casos, se cultiva en suelos de pH alcalino, donde el zinc es un nutrimento limitante, por lo cual debe proveerse vía aplicaciones foliares, que son ambiental y económicamente costosas.

Por otro lado, la reciente sequía en el norte de México ha acentuado la salinidad en las fuentes de agua (Miyamoto, 2005). A su vez, con el uso de sistemas de riego presurizado se aplica sólo el agua para satisfacer el uso consuntivo de los nogales, y de una manera muy fraccionada; así, el lavado de las sales en el suelo ya no ocurre. Conviene tener en cuenta que el nogal pecanero es una especie muy sensible a la salinidad, particularmente a los iones cloruro y sodio (Miyamoto *et al*; 1986).

Además de lo anteriormente mencionado el nogal es una planta difícil de enraizar, por lo cual se obtienen los portainjertos a través de la germinación de semillas, desafortunadamente esta estrategia no es tan exitosa debido a su dificultad de enraizamiento.

4.11. Métodos de propagación

4.11.1. Propagación Vegetativa.

El nogal es una planta difícil de enraizar, motivo por el cual se obtienen los portainjertos a través de la germinación de semillas, para posteriormente ser injertados con la variedad deseada. Para obtener los patrones se han identificado árboles o variedades que se han caracterizado por su uniformidad en la germinación y crecimiento de las nuevas plantas.

Actualmente se sugiere seleccionar los árboles madre para semillas que tengan la adaptación al clima y suelo de la región donde los árboles serán utilizados y procurar no moverlos de lugares fríos a poco fríos porque puede presentarse problemas de daño por heladas (SAGARPA, 2002).

Para la producción de portainjertos debe obtenerse la semillas de variedades o selecciones de plantas cuya semillas promueven un vigor uniforme de las plantas, debido condición permitirá injertar la variedad después de dos años de crecimiento en la mayoría de los árboles. Las selecciones que se han estudiado en la región son: Fructoso, Bala Conchos, Una punta, Larga Conchos, Western Conchos, Dos Puntas, y Riverside, encontrándose que todas poseen buena uniformidad, pero las que mejor desarrollo tienen son: Bala Conchos y Fructoso (SAGARPA, 2002). Los métodos de propagación más comunes son:

- **Semillas**

La época de siembra de las semillas es importante para el buen desarrollo de las plantas. Se ha determinado que sembrar en épocas anteriores a la brotación natural de los árboles induce a una mejor germinación de semilla y su crecimiento es mas rápido. Se sugiere estratificar las nueces en arena o aserrín húmedo a una temperatura de 5° a 7°C durante 30 días, lo cual incrementa y acelera su germinación en el vivero, así como también se logra una mejor uniformidad de los arbolitos logrados. Otra alternativa es colocar las nueces en saco e introducirlas en agua corriente durante una semana. Los resultados obtenidos mediante este sistema, son similares a los obtenidos con el estratificado (SAGARPA, 2002).

- **Injerto**

El uso del injerto en árboles frutales y otras especies es para asegurar una reproducción asexual y por lo tanto tener la misma característica genética propagada en cada variedad. Con el injerto es posible asegurar las características y bondades de las variedades, evitando la variabilidad genética a la que siempre están expuestas las plántulas que se cultivan por semilla. Además es factible lograr en menor tiempo individuos productivos. A través del injerto es posible regenerar los árboles en decadencia o simplemente cambiar la variedad (SAGARPA, 2002).

El método de injertación más popular es el de parche cuadrado o semicanutillo.

4.12. Micropropagación.

El cultivo de tejidos en su acepción amplia puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Esta técnica forma parte de la amplia gama de tecnologías que conforman a la Biotecnología (Levitus, 2010).

4.13. Ventajas y desventajas de los métodos de propagación

- **Ventajas**

- Propagación vegetativa

Los métodos de propagación vegetativa convencionales por estaca, son preferidos para la obtención de un gran número de plantas en poco tiempo (Castellanos *et al*; 2006).

El uso de estacas es un método que permite reproducir plantas con características idénticas al árbol donador o planta madre, y se puede realizar utilizando material de diferentes edades, por lo que las estacas pueden ser leñosas, semileñosas o herbáceas. Este método tiene la ventaja de producir planta enraizada y trasplantada en campo en un período máximo de siete meses (dependiendo de la especie) (Perales *et al*; 2012).

4.14. Biotecnología

Hay muchas definiciones para describir la biotecnología. En términos generales, biotecnología es el uso de organismos vivos o descompuestos para obtener productos de valor para el hombre. Como tal, la biotecnología ha sido utilizada desde los comienzos de la historia en actividades tales como; la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. Históricamente, biotecnología implicaba el uso de organismos para realizar una tarea o función. Si se acepta esta definición, la biotecnología ha estado presente por mucho tiempo en procesos tales como; el compostaje, el cual aumenta la fertilidad del suelo permitiendo que microorganismos del suelo descompongan residuos orgánicos, la producción y uso de vacunas para prevenir enfermedades humanas y animales, la producción de cerveza, vino, queso y yogurt que implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural como leche o jugo de uvas (Martínez *et al*; 2010).

Una definición más exacta y específica de la biotecnología “moderna” hecha por El Convenio sobre la Diversidad Biológica-CDB- es “toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (SAC, 2006), lo cual involucra la manipulación deliberada de sus moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN). Ésta definición implica una serie de técnicas de laboratorio que, durante las últimas décadas, han sido responsables del tremendo interés científico y comercial en biotecnología, la creación de nuevas empresas y la reorientación de investigaciones en Universidades (Martínez *et al*; 2010).

La biotecnología abarca hoy un área amplia del conocimiento que surge de la ciencia básica (biología molecular, microbiología, biología celular, genética, etc.), de la ciencia aplicada (técnicas inmunológicas y bioquímicas, así como técnicas basadas en la física y la electrónica), y de otras tecnologías (fermentaciones, separaciones, purificaciones, informática, robótica y control de procesos). Se trata de una red compleja de conocimientos donde la ciencia y la tecnología se entrelazan y complementan (Muñoz, 2007). Es un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de la biotecnología “tradicional” largamente establecidas y ampliamente conocidas y utilizadas (fermentación de alimentos, control biológico), hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN recombinante (llamadas de ingeniería genética) y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos (Martínez *et al*; 2010).

En su sentido más amplio, la biotecnología es el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad e incluye los métodos convencionales de fitogenética y cultivo (Martínez *et al*; 2010).

4.15. Desarrollo de la biotecnología en el mundo

Por tratarse de un conjunto de tecnologías diversas, el uso de las biotecnologías no se restringe necesariamente a los países desarrollados.

Existe un espacio que los países emergentes pueden ocupar, en función de sus riquezas naturales, siempre que existan prioridades económicas y políticas definidas claramente. La condición fundamental es contar con instituciones competentes que formen una masa crítica de investigadores y personal técnico entrenado.

La biotecnología desempeña un papel importante en el tratamiento de problemas, por ejemplo en el mejoramiento de árboles, en selección de genotipos superiores, en la propagación y en la conservación del germoplasma, por nombrar sólo algunos. Por lo que a nivel mundial se están desarrollando métodos biotecnológicos para complementar los programas convencionales de mejoramiento genético en un contexto comercial, a fin de obtener incrementos continuos en la producción sin aumentar la utilización de tierras o mediante el uso de suelos marginales (Martínez *et al*; 2010).

China e India cuentan hoy con una industria biotecnológica avanzada y diversificada. También América Latina, donde se concentra principalmente en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Cuba y México. Países como Uruguay y Venezuela también tienen actividad en algunas áreas, así como, en menor escala, Ecuador, Costa Rica, Paraguay, Perú y Bolivia (Muñoz, 2007)

En la actualidad esta nueva tecnología proporciona ventajas competitivas al sector farmacéutico, agrícola, alimentario, químico y medioambiental. La integración de la biotecnología en esta amplia gama de sectores no ha sido uniforme a nivel mundial ya que el sector farmacéutico continúa siendo predominante (DNIC *et al*; 2010).

4.16. Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales.

El cultivo de “tejidos *in vitro*” comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo, protoplasto, célula, tejido, órgano etc.) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Este proceso se ha convertido en uno de los puntos más importantes sobre el cual parten las nuevas tecnologías del mejoramiento genético de las plantas y por lo tanto se obtiene así un mejor conocimiento de las funciones fisiológicas de éstas (Ramírez, 2003).

Esta es una herramienta que permite la regeneración de plantas en corto tiempo, lo que ayuda a mejorar y mantener la diversidad en muchas especies, asegurando la disponibilidad de materiales de siembra para los agricultores y los programas de mejora genética de las especies (Sánchez *et al*; 2009).

Existen numerosos objetos que son perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales como: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconservación y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma (Mroginski y Roca, 1993).

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos dependerá en mayor parte del tipo de explante y sistema de cultivo que emplee, lo cual dependerá del objetivo a seguir. El cultivo de callos pueden expresar las rutas morfogénicas orientadas tanto a la organogénesis y embriogénesis somática (Manjkhola *et al*; 2005).

En ambos casos, sin embargo, la iniciación callogénica implica una etapa inicial de la diferenciación del tejido parental.

Aquí se aprovecha el fenómeno de totipotencia celular, que es la capacidad de las células somáticas de regenerar el fenotipo de la planta de la cual se derivan. Puede manifestarse por dos rutas alternativas anteriormente mencionadas (organogénesis; es decir, la diferenciación de meristemas caulinares y/o radicales y embriogénesis concebida como la formación de embriones somáticos siguiendo las fases del embrión cigótico). Dentro de esto ocurren cuatro etapas en el proceso: 1) dediferenciación de células diferenciadas, 2) división celular, 3) iniciación de órganos, y 4) desarrollo de órganos. (Sánchez *et al*, 2009). Así, para establecer cultivos de callos, la determinación del tejido inicial utilizado es un factor fundamental para lograr la respuesta deseada. Los embriones cigóticos, hipocotilos, cotiledones, los núcleos, las anteras, los ovarios y óvulos, pecíolos y raíces, entrenudos y hojas han sido utilizados en la inducción de la callogénesis. Las hojas son de interés ya que permiten la producción en masa de los individuos seleccionados en su etapa adulta (Avilés, 2009)

El inicio del cultivo *in vitro* es una etapa crítica y determinante del éxito de la técnica de micropropagación para cualquier especie. Frecuentemente el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos procedentes de plantas leñosas se ve impedido por la oxidación y necrosis de los tejidos. (Ramírez y Salazar, 1997). Al cortar el tejido, se exudan compuestos fenólicos de los tejidos de las plantas que luego se oxidan ennegreciendo el medio y afectando el crecimiento y supervivencia de los mismos (León *et al*; 1997).

Las técnicas de micropropagación constituyen una herramienta importante para la rápida propagación de numerosas especies vegetales de interés forestal y en horti-fruticultura. Sin embargo, aunque estas metodologías se aplican con éxito a algunas especies vegetales, otras presentan problemas de supervivencia y crecimiento cuando las plantas se llevan a condiciones normales de campo. Uno de los estadios mas críticos en los procesos de micropropagación es el paso de las plántulas desde la fase *in vitro* a las condiciones de crecimiento *ex vitro* (Azcón y Aguilar. 2009). Mediante un apropiado proceso de aclimatación, las plantas micropagadas logran sobrevivir a condiciones *ex vitro* después del trasplante. Un sistema radicular funcional y adecuado en plantas garantiza no solo su supervivencia, si no su desarrollo apropiado durante y después de la etapa de aclimatación en invernadero, en vivero y posterior en el campo (Castellanos, 2006)

En cultivo *in vitro*, los parámetros utilizados habitualmente son variables continuas (aquellas que pueden tomar cualquier valor; peso, tamaño), discretas (aquellas que toman valores enteros, 0, 1, 2... como el número de tallos proliferados) o binarias (vivo- muerto, organogénico-no organogénico). Para el análisis y la extracción de conclusiones a partir de estos tipos de datos, suele recurrirse al análisis de la varianza (ANOVA), aun cuando éste no es el adecuado desde un punto de vista formal, más que para las variables continuas. Las variables discretas y las binomiales deberían analizarse mediante los modelos de regresión de Poisson y logística respectivamente (Gago *et al*; 2009).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta que permite la regeneración de plantas en corto tiempo, lo que ayuda a mejorar y mantener la diversidad en las especies, asegurando la disponibilidad de materiales de siembra para los agricultores y los programas de mejora genética vegetal (Sánchez *et al*; 2009).

Mediante el empleo del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se pueden incrementar el número de individuos en espacios reducidos bajo condiciones controladas (Castellanos *et al*; 2006).

El cultivo de tejidos normalmente se piensa en que es práctico solo para la propagación de aquellos cultivos que son difíciles de propagar por los métodos convencionales. Actualmente la micropropagación, ha resultado beneficiosa para muchos tipos de cultivos y además para aquellos que son fáciles de propagar por métodos convencionales, pero aún con el cultivo *in vitro* se adquieren características ventajosas desde el punto de vista fitosanitario que los hace más ventajosos (Estopa, 2005).

Una de las principales ventajas desde el punto de vista comercial es que la micropropagación es una técnica de clonaje con la cual:

- Se puede llevar a cabo de una manera rápida la multiplicación de un determinado clon.

- Se puede obtener planta durante todo el año.

- Proporciona a la planta características que hacen que aumente el coste de la planta obtenida.

- Desde el punto de vista fisiológico, las plantas adquieren cambios o obtienen características que afectan al crecimiento y fisiología de estas. La mayoría de ellos añaden valor a la planta micropropagada *in vitro*.

- **Desventajas**

- Propagación vegetativa

La propagación por semilla es lenta, además de que se produce una gran cantidad de variantes fenotípicas debido a la variación genética propia de reproducción sexual (Castellanos *et al*; 2006).

La limitante principal de la propagación vegetativa ha sido el bajo porcentaje de multiplicación, ya que solamente unas cuantas especies arbóreas se reproducen fácilmente (*Populus spp*, *Salix spp*, *Platanus spp*, *Tamarix spp.* , y *Ficus* entre otras). Por ello es de principal importancia ampliar el número de especies a propagar y mejorar la técnica (López y Mateo, 2008).

Cuando se habla de especies difíciles de enraizar se hace referencia implícita a que ha rebasado la condición juvenil; en otros casos, el porcentaje de enraizamiento es muy bajo, el tiempo para la formación de nuevas raíces se prolonga a veces hasta un año. El sistema radical es muy pobre y la nueva planta no sobrevive, a pesar de mantenerla en condiciones óptimas. La importancia comercial de la formación de raíces adventicias es considerable (López y Mateo, 2008).

- Micropropagación

Desde el punto de vista genético puede ocurrir que debido al proceso de cultivo *in vitro* salgan a la luz diferencias entre las células, tejidos y órganos. La posibilidad de este riesgo hace que algunos métodos de cultivo de tejido no se utilicen para la multiplicación rutinaria en un laboratorio comercial.

Por eso, la técnica mayoritariamente extendida en la micropropagación es a partir de tejido organizado, principalmente a partir de brotes y entrenudos.

Manteniendo la organización celular que caracteriza a un órgano, mantenemos su integridad y funcionamiento en el cultivo *in vitro* evitando posibles mutaciones (variación somaclonal), de la misma manera que cuando se propagan las plantas vegetativamente (Estopa, 2005).

Las principales limitantes en esta técnica son la contaminación (Hongos, Bacterias, Virus, Mycoplasmas, Microartrópodos y Trips) y la oxidación.

- **Dificultades que presentan las especies leñosas *in vitro*.**

- Menor capacidad regenerativa
- Efecto de dormancia en yemas
- Inducción de rejuvenecimiento
- Menor tasa de multiplicación
- Mayor oxidación inicial del explante
- Desinfección más dificultosa
- Enraizamiento
- Aclimatación limitante.

4.16.1. Embriogénesis

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, descrita por primera vez por Strasburges, 1878 aunque fueron Reinert y Steward *et al.* (1958) quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática en el año 1958.

Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en los cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método (Freire, 2003).

Este proceso por el cual se generan embriones a partir de células somáticas, implica importantes cambios a nivel molecular, tales como la expresión coordinada de aquellos genes que controlan el cambio del patrón de desarrollo vegetativo a un patrón de desarrollo embriogénico. Tanto el establecimiento de un estado totipotente en las células somáticas para iniciar el desarrollo de un embrión, como las diferentes etapas de desarrollo que darán lugar al embrión somático, requieren una reprogramación de los

patrones de expresión génica y una expresión temporal de genes específicos (Sánchez *et al*; 2009).

La embriogénesis somática proporciona un proceso experimental ideal para la investigación de diferenciación de planta, así como la producción a gran escala de plantas. La regeneración de plantas mediante embriogénesis somática ha sido un método preferido para la transformación genética en plantas leñosas perennes porque la embriogénesis somática conduce a la formación de estructuras bipolares, que posee tanto un vástago, una raíz, meristemo y embriones somáticos siempre supone que tienen un origen de célula única y tiene sistema vascular cerrado (Manoj *et al*; 2007).

4.16.2. Organogénesis

Es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el subsecuente enraizamiento final. De la organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Levitus, 2010).

Los brotes pueden formarse directamente o indirectamente. En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se

requiere de una secuencia de medios de cultivo, debido a que los medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa. La organogénesis indirecta, implica la producción masiva de plántulas a partir de embriones u órganos inducidos en tejido de callo. La proliferación de callos desde un explante en particular, es el resultado de la activación mitótica de un pequeño grupo de células colocadas normalmente en la superficie de corte del explante (Anaya *et al*; 2011).

La regeneración in vitro de plantas mediante organogénesis directa (es decir sin la formación previa de callo) es altamente deseable en los trabajos de micropropagación y de conservación de germoplasma (Dolce *et al*; 2004).

Estudios de este tema son reportados por Renukdas *et al*. (2010), donde obtuvieron al menos nueve brotes múltiples de nogal *Carya Illinoensis* (por explantes) los cuales fueron inducidos en WPM modificado que contenía 13,32 μ M de BAP, esto después de tres semanas de cultivo.

Por su parte Sánchez *et al*; 2009, emplearon el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962) complementado con 1,0 mg/l de 6-Bencilaminopurina (BaP). Ellos observaron después de tres semanas de inducción en el medio de cultivo, que los explantes de las dos variedades regeneraron brotes.

A sí mismo, Avilés, 2009 realizó un estudio para definir los aspectos preliminares de nogal (*Juglans regia* L.) en los sistemas de propagación callogénica indirecta, utilizó los medios de cultivo de Murashige y Skoog (MS) Driver Kuniyuki Walnut (DKW) y Planta de Woody (MEM), suplementado con 21,4 μ M naftaleno acético (NAA) y 8,8 μ M 6-

bencilaminopurina (BAP). Analizaron callogénesis (%) y callos nodulares (%). No hubo diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) en callogénesis entre los medios evaluados, pero el porcentaje de callos nodulares fue significativamente mayor en BTM (75%) y WPM (63%). Esto indicó que el medio influye en las características morfogénicas del callo. El callo producido en BTM presentó un mejor potencial morfogénico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales del departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco Edo. de México.

5.1. Material Vegetal

Las plantas de nogal se colocaron en invernadero, donde se les adicionó fungicida (Captan®) y se regaron semanalmente. Una vez transcurridas tres semanas, las plantas estuvieron listas para tomar los explantes.

5.2. Toma de Muestras

Trascurridas las tres semanas se seleccionaron de manera aleatoria yemas y hojas. Se trabajó con yemas, hojas basales, intermedias y terminales y además se extrajo el embrión de las semillas. Los explantes se cortaron en condiciones altamente asépticas utilizando tijeras previamente esterilizadas.

Una vez tomadas las muestras, fueron trasladadas al laboratorio en frascos con una solución de agua corriente con detergente mas tween 80.

Para extraer el embrión, las semillas se pusieron a escarificar durante un período de 24 horas en una solución de agua oxigenada (H_2O_2) y agua destilada H_2O (50%/50%). Una vez transcurrido el tiempo de escarificación, se abrió la semilla para extraer el embrión con la ayuda de un bisturí, pinzas de disección y estereoscopio.

5.3. Etapa de desinfección

- Los explantes y embriones se colocaron en la misma solución de detergente mas tween y se agitaron vigorosamente por dos minutos.
- Posteriormente se colocaron en alcohol al 70% durante 3 minutos.
- Después a hipoclorito de sodio al 10% en agitación por 15 minutos.
- Finalmente se dejaron 24 horas en una solución de Ac. Ascórbico 100 mg L⁻¹ mas Ac. Cítrico 150 mg L⁻¹ disueltos en 100 ml de agua destilada, aforados a un litro, en agitación.

5.4. Tratamientos con antioxidantes

Los tipos de explantes que se sembraron por cada tratamiento fueron cortados en secciones de 1 cm² cada uno y posteriormente sembrados en medio de cultivo MS al 100% (Murashige y Skoog, 1962) en frascos de gerber®, bajo los diferentes tratamientos (Tabla 4) con 12 repeticiones cada uno. Posteriormente se incubaron las muestras de los cuatro tratamientos mas el testigo, tanto en condiciones de oscuridad permanente como bajo periodo de luz/oscuridad (16:8), a una temperatura de 25 ± 1°C, durante cuatro semanas.

Tabla 4. Tratamientos con antioxidantes.

Tratamientos	Carbón activado (CA)	Polivinilpirrolidona (PVP)	Nitrato de plata (AgNO ₃)	Ac. Cítrico C ₆ H ₈ O ₇ y Ac. Ascórbico C ₆ H ₈ O ₆
T0	0%	0%	0%	0%
T1	1.0%	0%	0%	0%
T2	0%	0.1%	0%	0%
T3	0%	0%	1.0%	0%
T4	0%	0%	0%	150 y 100 mg L ⁻¹

MS al 100%, suplementado con 0.4 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 3% de sacarosa, 7.5 g.L⁻¹ de agar agar, a un pH de 5.7 ± 0.1

- Análisis estadístico

El tejido necrosado (TN) fue representado mediante una escala de 1 a 3, donde el 1 corresponde al nivel bajo (<30%); 2 al nivel medio (>30%<60) y el 3 al alto (>60%). Además de la condición Luz/Oscuridad a la cual se le asignaron los valores 1 (Luz) y 2 (Oscuridad). Estos resultados fueron evaluados mediante un análisis de varianza realizado por el paquete estadístico Minitab v.15 (2009). La prueba de Tukey (a un nivel de confianza del 95%) fue realizado por el paquete estadístico PASW v.18 (2009).

5.5. Respuestas morfogénicas

5.5.1. Organogénesis

▪ Hojas

Se utilizaron explantes de hoja de 1 cm, sembradas de forma inversa y con nervadura, de la parte basal, intermedia y terminal de la planta de nogal. En medio de cultivo MS al 100% (Murashige y Skoog, 1962) en tubos Erlen Meyer, bajo 3 diferentes tratamientos (Tabla 6) con 12 repeticiones cada uno. Posteriormente, las muestras de los tres tratamientos se mantuvieron en incubadora bajo condición de oscuridad permanente a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, esto durante cuatro semanas.

Tabla 5. Tratamientos con 2,4-Dichlorofenoxiacético

Tratamientos	2,4-diclorofenoxiacético mg L ⁻¹
	2,4-D
T1	1
T2	3
T3	10

MS al 100%, suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 3% de sacarosa, 7.5 mg L⁻¹ de agar agar, a un pH de 5.7 ± 0.1 .

- Análisis estadístico

Al tipo de estructura se le asignaron tres valores 0 (sin respuesta), 1 (estructura de tipo compacta) y 2 (estructura de tipo friable). A la variable color se le dio una escala de 0 a 3: 0 (sin respuesta), 1 (color blanco), 2 (color amarillo), 3 (color café). Y por último la variable Tejido con formación de callo necrosado representada mediante una escala de 1 a 3: 1 corresponde al nivel bajo (<30%); 2 al nivel medio (>30%<60) y el 3 al alto (>60%).

Estos resultados fueron evaluados mediante un prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$), y una tabla de contingencia, realizadas por el paquete estadístico PASW v.18 (2009).

Además de la variable cuantitativa (biomasa) donde se obtuvo el peso fresco de los callos obtenidos de los tres tratamientos, fue analizada mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico Minitab v.15 (2009), y una comparación de medias entre tratamientos con la prueba de Tukey (con un nivel de confianza del 95%) con el paquete estadístico PASW v.18 (2009).

- Yemas

Se utilizaron yemas axilares de 1 cm de longitud, las cuales fueron sembrados en medio de cultivo MS al 100% (Murashige y Skoog, 1962) en tubos Erlen Meyer, bajo los diferentes tratamientos (Tabla 7) con 12 repeticiones cada uno. Posteriormente se incubaron las muestras de los dos tratamientos un bajo período de luz/oscuridad (16:8), a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, esto durante doce semanas.

Tabla 6. Tratamiento con combinación de reguladores de crecimiento.

Tratamientos	Benciladenina BA	Kinetina KIN	Ac. Naftalenacético ANA	Ac. Indolbutírico AIB
T1	3	1	0.3	
T2	1	3		0.3

MS al 100%, suplementado con 0.4 mg L^{-1} de tiamina, 100 mg L^{-1} de myo-inositol, 3% de sacarosa, 7.5 g L^{-1} de agar agar, a un pH de 5.7 ± 0.1

- Análisis estadístico

Solo variables cuantitativas fueron consideradas: Número de brotes, Longitud de la planta y Número de hojas. Debido a los pocos datos obtenidos, solo se realizó una prueba de ANOVA mediante el paquete PASW v.18 (2009) al considerar porcentajes para las tres variables.

5.5.2. Embriogénesis

- Embriones

Una vez extraídos los embriones, fueron colocados en agua estéril y refrigerados hasta su siembra. Fueron sembrados en medio de cultivo MS al 100% (Murashige y Skoog, 1962) en tubos Erlen Meyer, bajo 3 diferentes tratamientos (Tabla 8) con 12 repeticiones cada uno.

Tabla 8. Tratamientos con Tidiazurón.

Tratamientos	Tidiazurón mg L ⁻¹
T1	1
T2	3
T3	10

MS al 100%, suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 3% de sacarosa, 7.5 g L⁻¹ de agar agar, a un pH de 5.7 ± 0.1

Posteriormente, las muestras de los tres tratamientos se mantuvieron en incubadora bajo condición de oscuridad permanente a una temperatura de 25 ± 1°C, esto durante cuatro semanas.

- Análisis estadístico

A la variable cualitativa Tipo de estructura: a la cual se le asignaron tres valores: 0 (sin respuesta), 1 (estructura de tipo compacta) y 2 (estructura de tipo friable). A la variable color se le dio una escala de 0 a 3, 0 (sin respuesta), 1 (color blanco), 2 (color amarillo), 3 (color café). Y por ultimo, a la variable Tejido con formación de callo se le representó mediante una escala de 1 a 3: donde el 1 corresponde al nivel bajo (<30%); 2 al nivel medio (>30%<60) y el 3 al alto (>60%).

Estos resultados fueron evaluados mediante un prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$), y una tabla de contingencia, realizadas por el paquete estadístico PASW v.18 (2009).

Además de la variable cuantitativa (biomasa) en peso fresco de los callos fue analizada mediante un análisis de varianza realizada con el paquete estadístico Minitab v.15 (2009); mientras que la comparación de medias entre tratamientos se evaluó mediante una prueba de Tukey (con un nivel de confianza del 95%) también realizado por el paquete estadístico PASW v.18 (2009).

V.I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación de Antioxidantes

Después de cuatro semanas de que los antioxidantes fueron aplicados, una respuesta significativa ($p = 0.035$) entre tratamientos fue observada. Los explantes de hojas tratados con carbón activado y nitrato de plata al 1%, respectivamente, indujeron un menor nivel de necrosamiento (Figura 10). La respuesta en la disminución del grado de necrosamiento por efecto de esos antioxidantes (carbón activado y nitrato de plata al 1%) fue de 75 y 83%, respectivamente, los cuales correspondieron al nivel 1 (<30% de necrosamiento por explante). (Figuras 11 y 12).

Esta respuesta fue significativamente diferente en los explantes de hojas tratados con PVP al 1% y Ac. Cítrico más Ac. Ascórbico en dosis de 100 y 150 mg.L⁻¹, respectivamente, cuyo grado de necrosamiento fue similar al testigo el cual fue >60% (Figuras 13,14 y 15). El factor luz-obscuridad obtuvo un efecto no significativo sobre el grado de necrosamiento, por lo que se induce que cualquier condición no influiría el efecto de los tratamientos. Los resultados aquí observados coinciden con lo reportado por Aliyu, 2005, quien obtuvo brotes de explantes de *Anacardium occidentale* L. con la adición de carbón activado, aunque los explantes se mantuvieron en oscuridad. Así mismo, Poornima y Ravishankar (2007) encontraron que el carbón activado, fue más eficaz que el PVP en la reducción de la exudación fenólica en *Psidium guajava* L. En su estudio observaron que alrededor del 60% de los explantes inoculados en el medio suplementado con PVP, mostraron oxidación después de la incubación de cultivos durante más de 30 días.

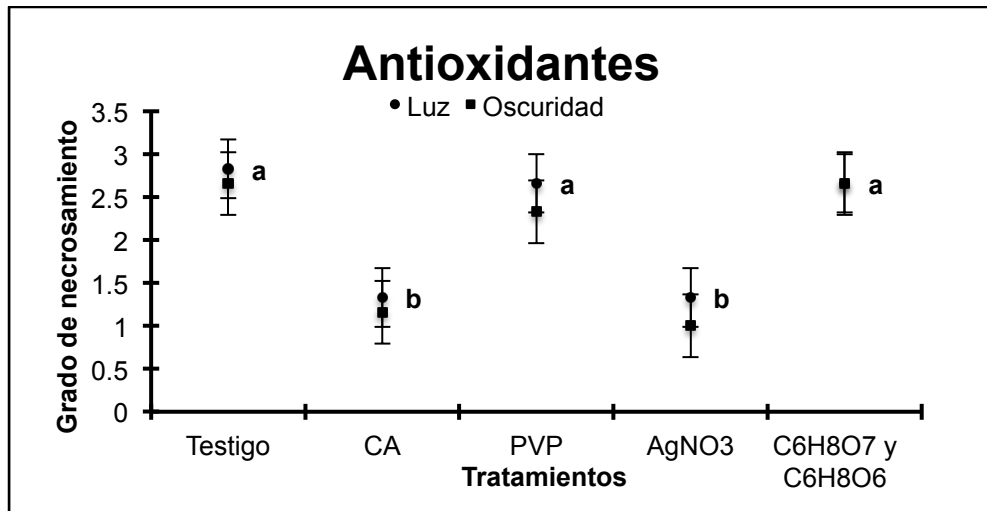


Figura10. Nivel de necrosamiento en explantes de hojas (cuatro semanas después de la siembra), barras verticales representan el error típico de las medias (Medias, n=12, con letras desiguales son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).



Figura 11. Explantes de hojas (doce semanas después de la siembra) tratados con Carbón activado al 1%, bajo condiciones de luz (A) y oscuridad (B), con necrosamiento menor al 30%.

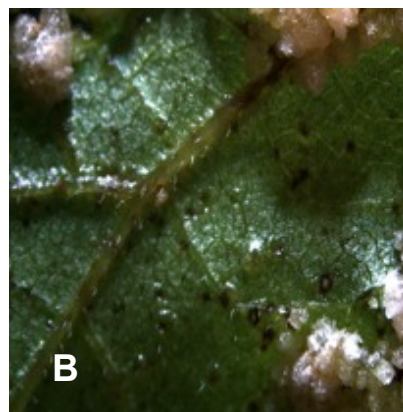
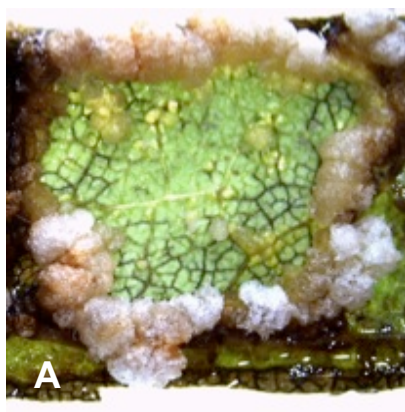


Figura 4. Explantes de hoja (doce semanas después de la siembra) bajo el tratamiento Nitrato de plata al 1% en luz (A) y oscuridad (B), con necrosamiento menor al 30%.

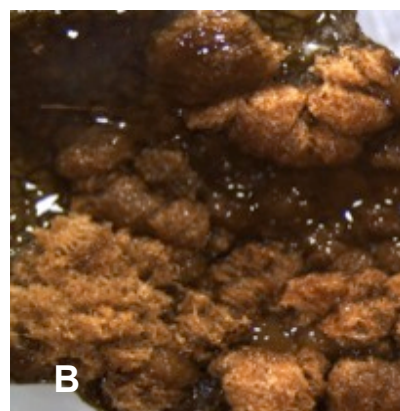
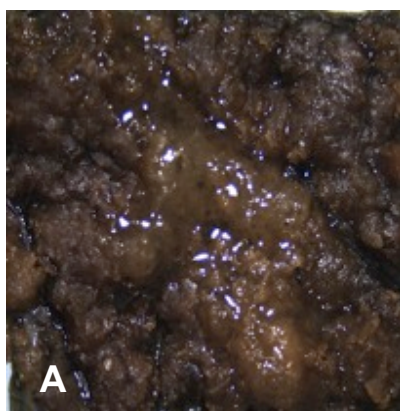


Figura 5. Explantes de hojas (doce semanas después de la siembra), en el medio Testigo en luz (A) y oscuridad (B). (Obsérvese un mayor grado de necrosamiento).

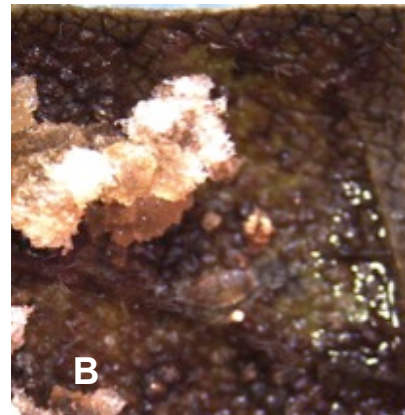
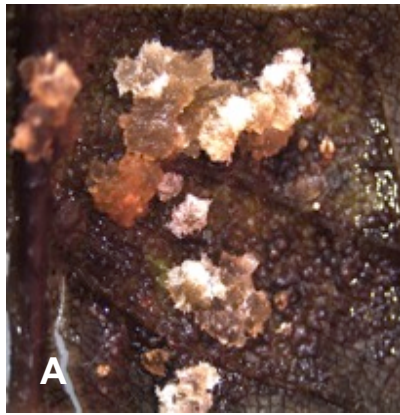


Figura 6. Explantes de hojas (doce semanas después de la siembra) tratadas con Polivinilpirrolidona al 1.0% en luz (A) y oscuridad (B), con elevado necrosamiento.

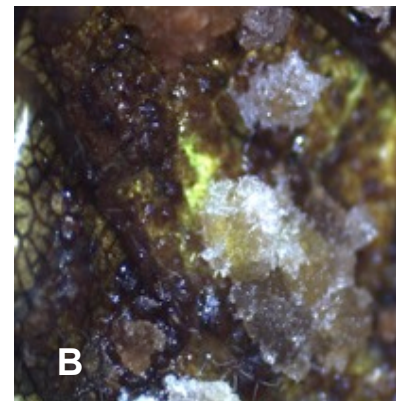
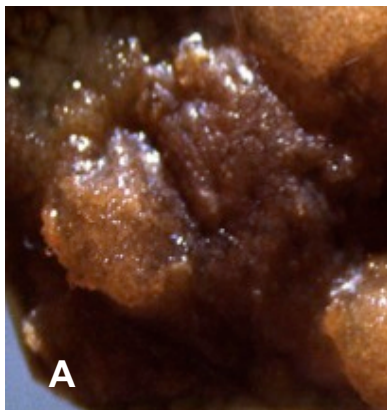


Figura 7. Explantes de hojas (doce semanas después de la siembra) tratadas con Ac. Cítrico ($C_6H_8O_7$) 150mg L^{-1} mas Ac. Ascórbico ($C_6H_8O_6$) 100 mg L^{-1} , bajo condiciones de luz (A) y oscuridad (B). Nótese alto grado de necrosamiento.

6.2. Respuesta Callogénica a partir de explantes de Hojas.

6.2.1. Biomasa

En cuanto a la generación de callo en los explantes, por efecto de los tratamientos se observó una respuesta significativa ($p= 0.001$), después de doce semanas de realizada la siembra. (Figura 16). Las concentraciones de 1 y 3 mg L⁻¹ de 2,4-D presentaron el mayor impacto en la producción de biomasa en los explantes, mientras que 2,4-D a razón de 10 mg L⁻¹ redujo significativamente esta variable. En cuanto a la región del tallo (basal, intermedia y apical) en el cual se tomaron los explantes de hojas, se observó una respuesta no significativa por efecto de este factor.

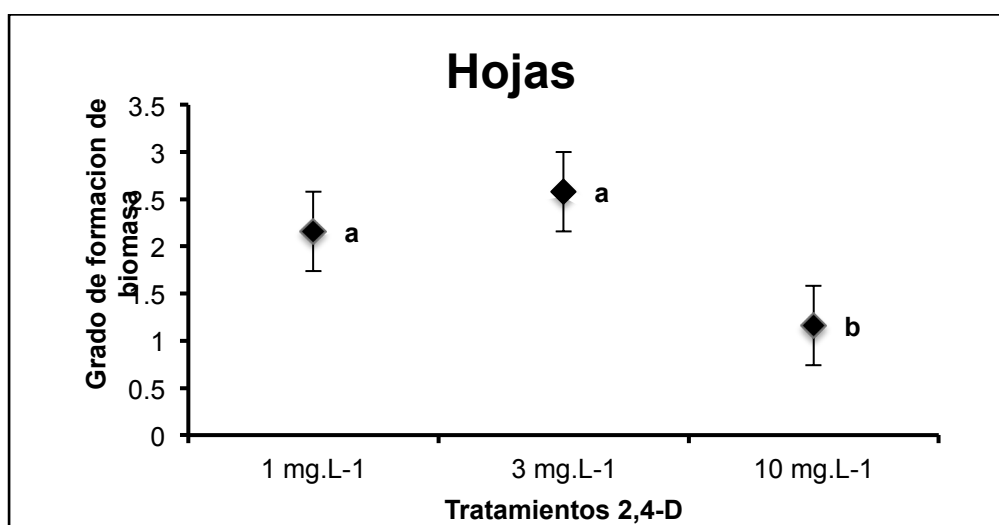


Figura 8. Grado de formación de biomasa (doce semanas después de la siembra) en explantes de hoja tratados con 2,4-D. Barras verticales representan el error típico de las medias (Medias, $n=12$, con letras desiguales son estadísticamente diferentes, (Tukey, 0.05).

Después de doce semanas de evaluación, las concentraciones de 1 y 3 mg L⁻¹ de 2,4-D indujeron en los explantes de hojas un 33 y 66% de callogénesis (referente al nivel 3: >60%) (Figura 17). Las respuestas en el incremento de callo, a las bajas concentraciones encontradas en este estudio, coinciden con lo reportado por Huang *et al*; 2002, quienes mencionaron que el 2,4-D a bajas concentraciones (0.9 y 4.5 µM) fue el más efectivo en la inducción de callos a partir de explantes de hojas de plántulas de *Citrus grandis* (L.).



Figura 17. Encallamiento en hojas (doce semanas después de la siembra) como respuesta a los tratamientos de 2,4-D.

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre el tipo de estructura ($p = 0,018$) y color del callo ($p = 0.005$). Las concentraciones de 1 y 3 mg L⁻¹ de 2,4-D indujeron una estructura de tipo friable (Figura 18), respuesta respaldada por un valor de chi cuadrada = 11,782^a y con nivel de significancia de 0.019 (Anexo 2). Este mismo tipo de estructura fue encontrada por Kryvenki *et al*; 2008, quien obtuvo callos friables de explantes de hoja de *Stevia rebaudiana* Bert, con estructuras nodulares o globulares en condición de oscuridad y bajo el efecto de la adición de 2.26 µM 2,4-D.

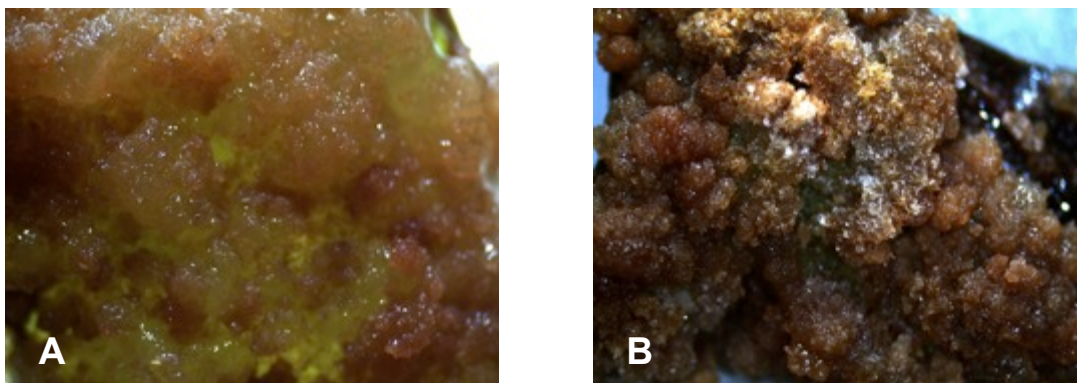


Figura 18. A) Estructura de tipo friable; B) Estructura de tipo compacta en callos producidos a partir de explantes de hojas tratados con 2,4-D a razón de 1, 3 y 10 mg L⁻¹.

Los callos presentaron tres colores, blanco, amarillo y café, lo cual no demostró efecto sobre los tratamientos. No obstante se observó una mayor incidencia de callos con color blanco (Figura 19), este resultado se soporta en un valor de chi cuadrada de 20.769, a una $p = 0.002$. El color variado observado concuerda con lo reportado por Kryvenki *et al.* (2008) al obtener callos en los cuales la coloración pasó de ser color pardo a presentar sectores del mismo con coloraciones más amarillas y blancas. Tavakkol *et al.* (2011), al evaluar los efectos de reguladores del crecimiento sobre el color de callo, encontraron que las auxinas tenían un efecto inhibitor sobre la formación de la clorofila. Por consiguiente, bajo ausencia de luz y con ausencia de pigmentos clorofílicos, otros colores pueden surgir debido a la manifestación de otro tipo de pigmento inducido bajo esta condición, como lo observado en este estudio, dado que solo se presentó de una escala color de blanco a café, debido a que el material vegetal se mantuvo en ausencia de luz.

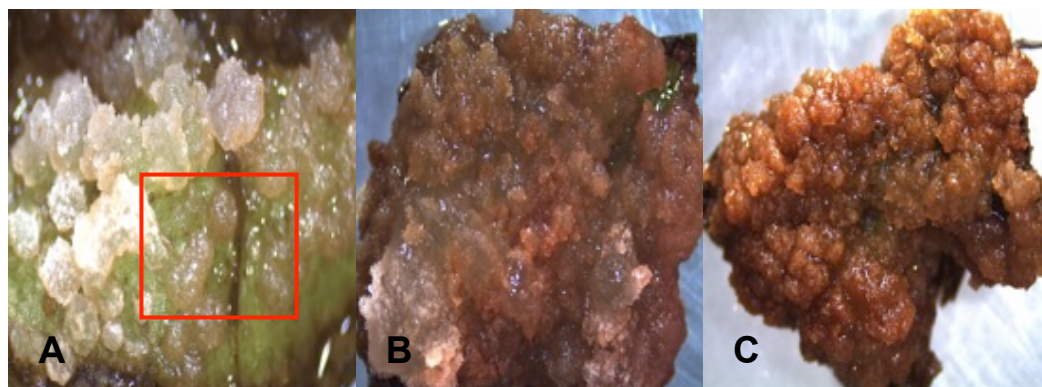


Figura 19. Biomasa con presencia de color Blanco (A); Amarillo (B) y Café (C). En callos producidos por explantes de hoja tratados con 2,4-D en dosis de 1, 3 y 10 mg L⁻¹ (doce semanas después de la siembra). Desarrollo de estructuras pre-embionarias o de tipo globular.

6.3. Respuesta Callogénica a partir de embriones

6.3.1 Biomasa

En cuanto a la producción de biomasa callogénica, los tratamientos de Tidiázurón tuvieron un efecto significativo con un valor de $p = 0.001$ (Figura 20). La mejor respuesta en el incremento de esta variable fue inducida por la concentración de 3 mg L^{-1} de TDZ considerando el nivel 3 que corresponde a un encallamiento definido como mayor de 60%, se observó que este tratamiento indujo al menos el 58% de explantes con este grado. A diferencia de 1 y 3 mg L^{-1} de TDZ los cuales mostraron menores niveles de callogénesis.

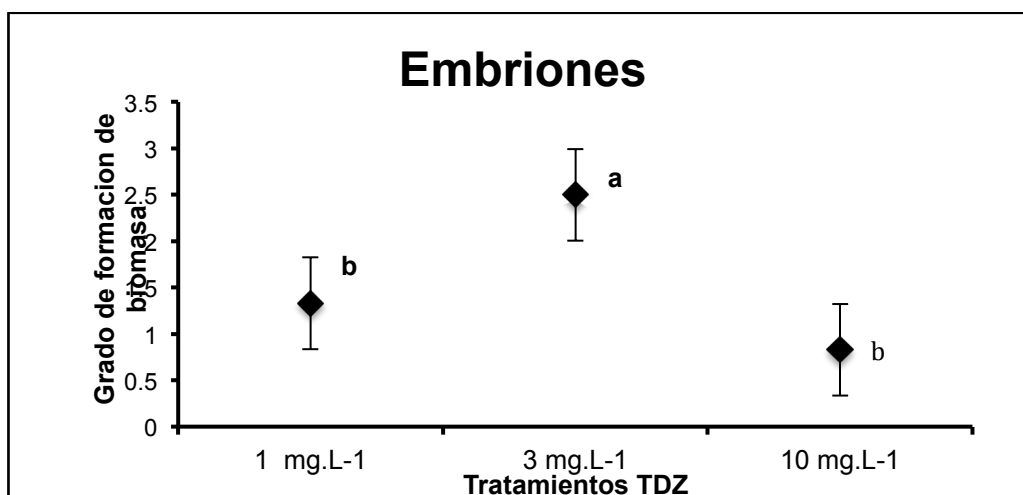


Figura 20. Grado de formación de biomasa (doce semanas después de la siembra) en explantes de hoja tratados con TDZ. Barras verticales representan el error típico de las medias (Medias, $n=12$, con letras desiguales son estadísticamente diferentes, (Tukey, 0.05).

En la figura 21 se muestra la estimulación de callo por tratamiento, en el cual la concentración de 3 mg L^{-1} de TDZ incrementó 3 veces más esta variable. Estos resultados no concuerdan con lo observado por Benega *et al.*

(2000) y Martínez *et al.* (2004) quienes encontraron que la concentración de 0.1 a 1.5 mg L⁻¹ de TDZ estimuló mayor número de callo en piña Española roja y *Eucalyptus grandis*.

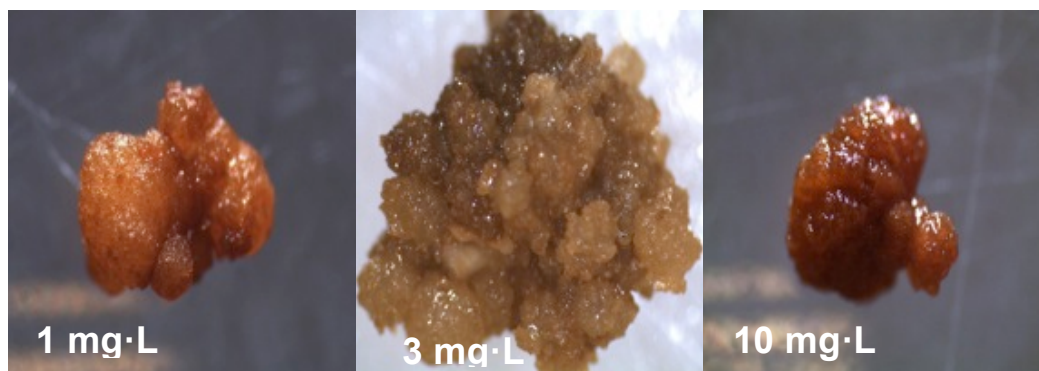


Figura 21. Encallamiento a partir de embriones (doce semanas después de la siembra) como respuesta a los tratamientos de TDZ.

Los tratamientos mostraron efecto significativo sobre la variable estructura ($p = 0.001$) pero no sobre la variable color ($p = 0.114$). Las concentraciones de 1 y 10 mg L⁻¹ de TDZ en el medio indujeron estructura de tipo compacta, respaldada por una chi cuadrada con valor de 17.386 y con nivel de significancia de 0.008 (Anexo 2) e igual presencia de estructura de tipo compacta y friable para el medio con concentración de 3 mg L⁻¹ de TDZ (Figura 22). Lo anterior coincide con lo reportado por Valderrama *et al.* (2008) en su estudio con *Fragaria virginiana*, donde mencionan que un callo de tipo compacto es de preferencia de color, café, cremoso, nodular, firme y organizado y no hay espacios intercelulares a su alrededor. Este es un callo no embriogénico que puede cambiarse a uno de tipo friable. Lo cual coincide con nuestros resultados respecto a los callos obtenidos con estructura compacta estos mostraron características similares a las ya mencionadas, así como el comportamiento no embriogénico, produciendo solo estructuras

nodulares sin desarrollo de estructuras pre-embriogenicas. Valderrama *et al*; 2008, también señalaron que en cambio el callo de tipo friable es blanco, blando, con alta capacidad de regeneración por un largo período de tiempo, contiene numerosos embrioides globulares embebidos en una sustancia mucilaginoso y muestran una fuerte tendencia a la diferenciación. El callo friable parece ser crucial para iniciar la suspensión embriogénica. Esto concuerda con lo reportado en nuestros resultados donde se mostraron callos friables con dichas características físicas y mismo comportamiento, el cual denoto una actividad embriogénica que produjo estructuras tanto de tipo nodular, torpedo y corazón.

Las características del callo van a estar influenciadas por la edad y su capacidad de proliferación y que la incubación durante los primeros 20 días en oscuridad ayuda a proteger al cultivo de los daños que puedan dar los exudados fenólicos del explante seguido de una oxidación de quininas (Amjad *et al*; 2008).

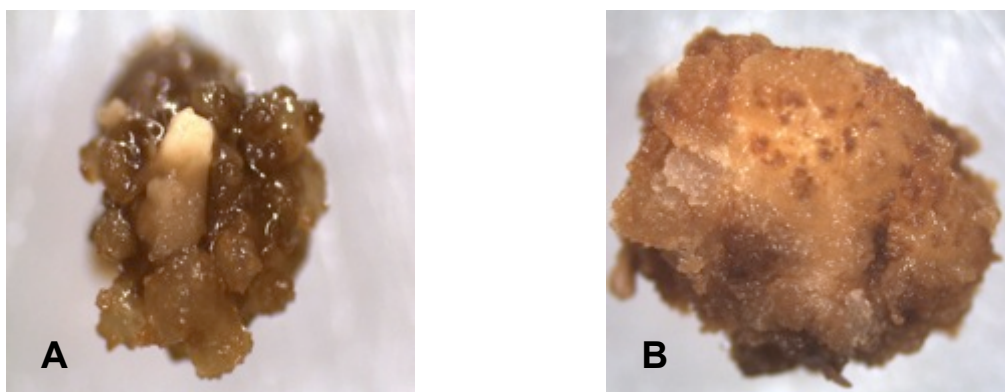


Figura 22. A) Estructura de tipo friable; B) Estructura de tipo compacta en callos a partir de embriones tratados con 1, 3 y 10 mg L⁻¹ de TDZ después de doce semanas de la siembra.

Una mayor presencia de color amarillo se obtuvo con las concentraciones de 3 y 10 mg L⁻¹ de TDZ y color blanco en la concentración de 1 mg L⁻¹ de TDZ (Figura 23). Los resultados se soportan en un valor de chi cuadrada = 15.377^a significativo a p = 0.018. De manera similar a nuestros resultados Valderrama *et al*; 2008 mencionan en su estudio con *Fragaria virginiana*, que el color del callo puede variar de acuerdo al explante y al tiempo. Puede presentarse de color blanco, verde o pigmentado hasta café; es importante en algunos cultivos tomar en cuenta el color del callo, pues está en relación con el tipo de callo o la consistencia del mismo.

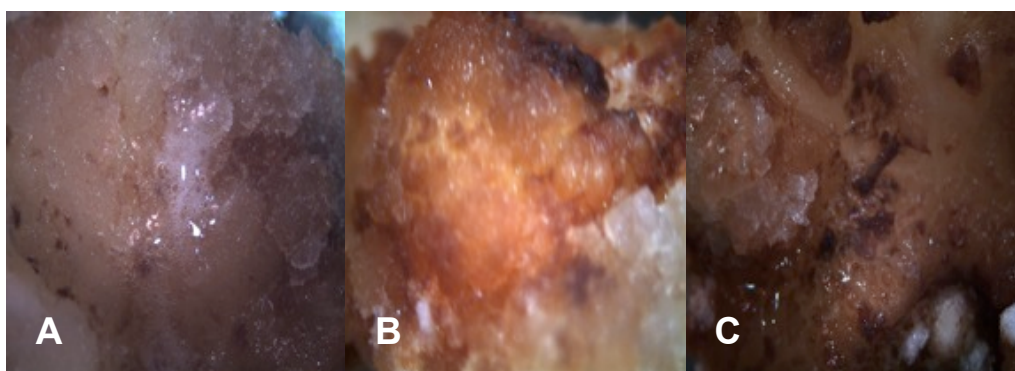


Figura 23. Biomasa con presencia de color blanco (A); Amarillo (B) y Café (C). En callos producidos a partir de embriones tratados con TDZ en dosis de 1, 3 y 10 mg L⁻¹ (doce semanas después de la siembra).

Tanto los resultados de estructura y color fueron similares a los encontrados por Velázquez *et al.* (2006), quienes obtuvieron a partir de un medio adicionado con TDZ (solo que a una concentración de 1 mg L⁻¹) callos con poco brillo, de color blanquecino y apariencia friable.

- Estructuras pre-embrionarias

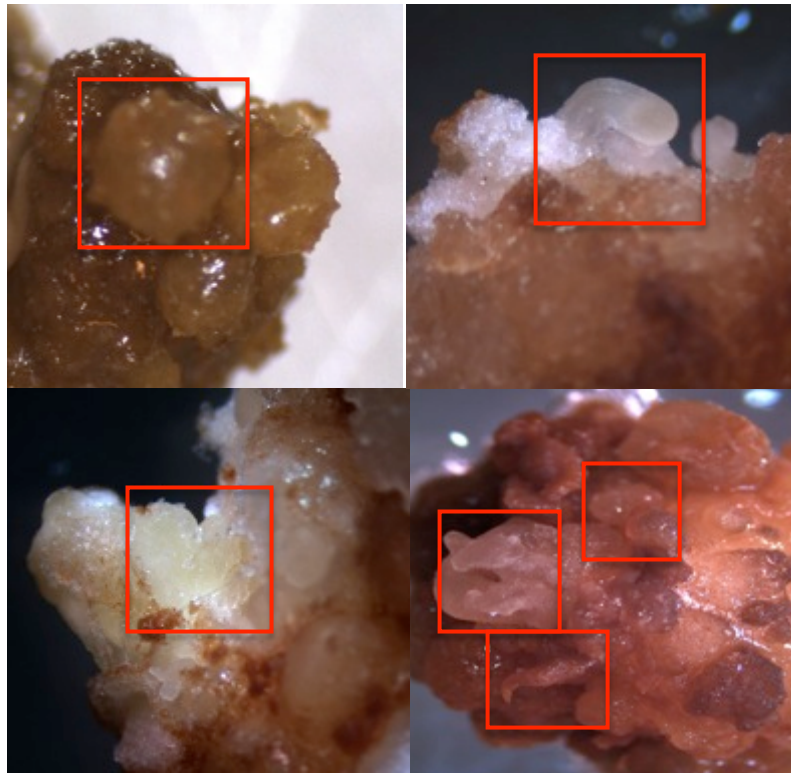


Figura 24. Estructura de tipo A) Globular; B) Torpedo; C) Corazón; D) Callo con estructuras: Globular, Torpedo y Corazón.

Este tipo de estructuras (Figura 24) fueron producidas en el medio de cultivo que fue adicionado con TDZ en concentración de 3 mg L^{-1} . La formación de callos con estructuras embriónicas es un indicador importante, por cuanto tiene que ver con la futura respuesta del material cultivado al proceso de embriogénesis somática (Gonzales *et al*; 2007).

6.4. Cultivo *in vitro* de yemas axilares del tallo.

Se obtuvo una respuesta estadísticamente significativa en la comparación de tratamientos, para respuesta organogénica a partir de explantes de yemas ($p = 0.005$), después de doce semanas de la siembra. La combinación de Kinetina 3.0, Benciladenina 1.0 y Ácido Indolbutírico 0.3 μM . Indujeron un mayor número de brotes (media de 3 brotes por explante), número de hojas (media de 9 hojas por explante) y mayor crecimiento de plántulas (6.4 cm mayor longitud alcanzada) (Figura 25).

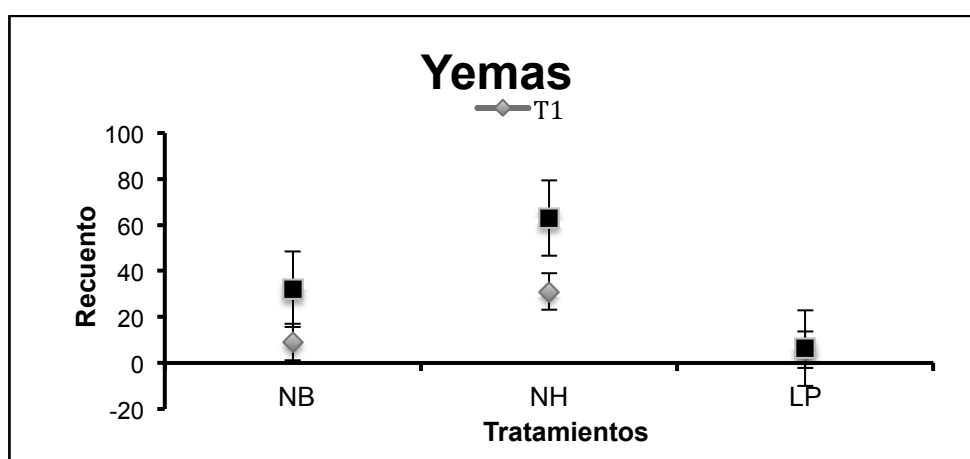


Figura 25. Porcentaje de brotación, número de hojas y longitud de plántulas, como respuesta a los tratamientos T1: BA 3, KIN 1, ANA 0.3 μM y T2: KIN 3.0, BA 1.0, AIB 0.3 μM , después de doce semanas de la siembra.

A diferencia de nuestros resultados Espinal *et al.* (2006) obtuvieron una mayor cantidad de brotes por explante de *Stevia rebaudiana* B. en un medio complementado con 6 μM de kinetina. Scaltsoyiannes *et al.* (1998) observaron en sus resultados similares a los aquí presentados sobre los efectos de la citocinina (BA) y la auxina (IBA) en explantes de *Juglans regia* procedentes de árboles élite, el desarrollo de los brotes se mejoró con BA 2.22 μM , mientras que la formación de nuevos brotes axilares se ve

favorecida por BA μM 4.44 y 0.005 μM IBA. A sí mismo, Ollero *et al*; 2010, en su estudio con *Nerium oleander* L. observaron que el desarrollo de los brotes axilares fue encontrado sólo en los medios de cultivo adicionados con la combinación de BA y Kinetina, obteniendo un 99% de brotación. Por su parte Uribe y Cifuentes (2004), establecieron in vitro *Legrandia concinna* utilizando segmentos nodales con yemas axilares de plantas juveniles (tres años). En un medio MS y la combinación hormonal 0.1/0.5 mg L^{-1} de AIB y BAP, respectivamente.

- **Brotos**

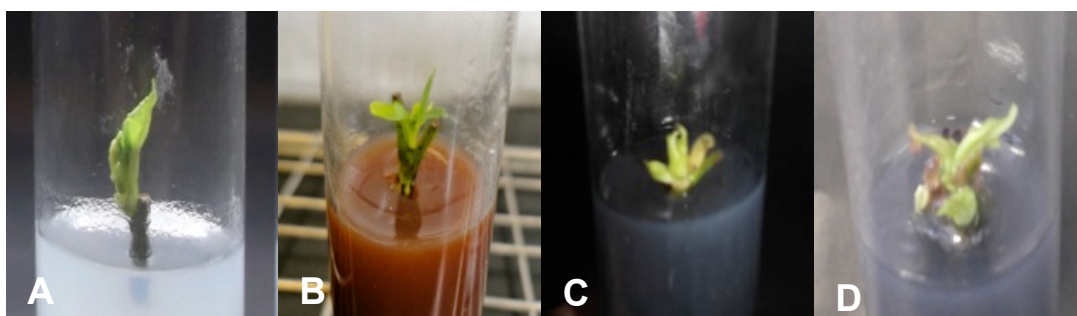


Figura 26. Efecto de tratamientos: Brotación normal A) T1: BA 3, KIN 1, ANA 0.3 μM . B) T2 KIN 3.0, BA 1.0, AIB 0.3. μM . Brotación múltiple C) T1. D) T2.

- **Formación de hojas**

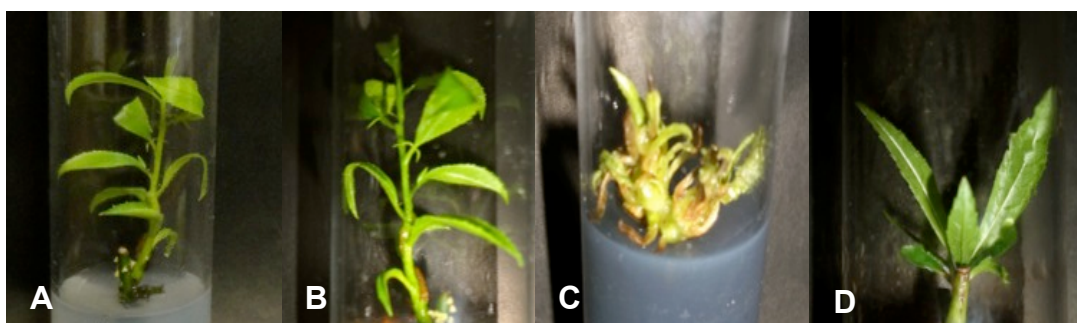


Figura 27. Efecto de tratamientos en formación de hojas: Normal A) T1. BA 3, KIN1, ANA 0.3 μM . B) T2. KIN 3.0, BA 1.0, AIB 0.3 μM . Múltiple C) T1. D) T2.

V.II. CONCLUSIONES

En los tratamientos correspondientes a los Antioxidantes, el Carbón activado al 1.0% y Nitrato de plata al 1.0% indujeron el menor porcentaje de necrosamiento en los explantes de hojas y yemas, a diferencia de los otros tratamientos con PVP al 1% y Ac. Cítrico más Ac. Ascórbico en dosis de 100 y 150 mg L⁻¹ respectivamente, cuyo grado de necrosamiento fue similar al testigo (>60% de necrosamiento). El factor luz obtuvo un efecto no significativo sobre el grado de necrosamiento en los explantes tratados.

Las concentraciones de 1 y 3 mg L⁻¹ de 2,4-D indujeron la mayor producción de callogénesis en explantes de hojas; observándose una mayor presencia de estructura de tipo friable y una mayor presencia de callos con color blanco. Solo fueron obtenidas estructuras de tipo globular.

La mayor respuesta callogénica en embriones, fue obtenida bajo el tratamiento TDZ a una concentración de 3 mg L⁻¹; encontrándose una mayor presencia de callo con estructura compacta, siendo en su mayoría de color amarillo. En los callos obtenidos a partir de embriones fueron encontradas estructuras en forma globular, de torpedo y corazón.

La combinación de tres reguladores de crecimiento, KIN 3.0, BA 1.0, AIB 0.3 µM. indujeron mayor número de brotes, número de hojas y mayor crecimiento de plántulas.

V.III. RECOMENDACIONES

El menor grado de necrosamiento observado en los tratamientos Nitrato de plata y Carbón Activado, así como los mejores resultados observados por el efecto de reguladores de crecimiento utilizados tanto en la organogénesis como en la embriogénesis somática, permiten probar otros niveles de concentración, los cuales podrían mejorar aún estas respuestas.

I.X. LITERATURA CITADA

Aliyu, O. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: an appraisal. African Journal of Biotechnology 4(13): 1485-1489.

Amiling, H. & Amiling, K. 1980. Onset, intensity, and dissipation of rest in several pecans cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105(4): 536-540.

Amjad. M. Bhat, B. Qadri, T. Kamaluddin, L. Abdin, A. 2008. A High-Efficiency Direct Somatic Embryogenesis System for Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Cultivar Chandler J Crop SciBiotech; 11(2): 100-107

Anaya, J. Ochoa, A. Martínez, H. Moreno, S. 2011. Organogénesis indirecta de *agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. <http://www.dictus.uson.mx/florazonasaridas/CD%20in%20Extensos/Biotecnologia/Anaya%20Dick%20Agave%20parviflora%20in%20extenso%20final.pdf>

Avilés, F. Ríos D. González, R. Sánchez, Manuel. 2009. Efecto del Medio de Cultivo en callogénesis de nogal (*Juglans regia* L.) a partir de hojas adultas. Universidad de Concepción. Chilean Journal of Agricultural. 69(3): 460-467

Azcón & Aguilar. 2009. Micorrizas en micropropagación y sus aplicaciones potenciales. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. <http://www.ivia.es/secivtv/documentos/Resumenes%20VIII%20Reunion%20SECIVTV.pdf>.

Benega, R. Martínez, J. Daquinta, M. Arias, E. Higalco, M. González, M. Isidron, M. 2000. Efecto del Thidiazuron sobre la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras de piña. Cultivos Tropicales, 4(3): 0258-5936.

Castellanos, O. Rodríguez, A. Rodríguez, J. Rodríguez, B. 2006. Organogénesis indirecta y enraizamiento in vitro de *Paulownia elongata*. e-Gnosis. 4(15): 1665-5745.

Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Las Brujas). http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382

Comité Mexicano del Sistema producto Nuez, A.C (COMENUEZ). 2012. Aspectos técnicos del nogal. Programa de Desarrollo de Capacidades, Innovación Tecnológica y Extensionismo Rural. <http://www.comenuez.org/xoo/modules/tinycontent/index.php?id=2>.

Dirección Nacional de Información Científica, Dirección Nacional de Estudios y Subsecretaría de Estudios y Prospectiva. 2010. Biotecnología. Boletín Estadístico Tecnológico. 1852-3110. <http://www.mincyt.gov>.

Dolce, N. Scocchi, A. Mroginski, E. Mroginski, L. 2004. Organogénesis directa a partir de segmentos de hojas cotiledonares de *Citrus sinensis*. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

Espinal, D. Delvalle, W. Cifuentes, E. Ramia, N. 2006. Propagación in vitro de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Scientific and Technical Journal, 47(1-2): 0008-8692.

Estopa M. 2005. El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Departamento I+D Cultius Roig. Revista EXTRA 2005. <http://www.umoar.edu>.

Freire, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Cuba. Biotecnología Vegetal. 3(4): 195.

Gago, J. Martínez, L. Landin, M. Gallego, P. 2009. Utilización de redes neuronales artificiales en cultivo in vitro de plantas. Applied Plant and Soil Biology. [http://www.ivia.es/secivtv/documentos/Resumenes%20VIII%20Reunion%20 SECIVTV.pdf](http://www.ivia.es/secivtv/documentos/Resumenes%20VIII%20Reunion%20SECIVTV.pdf)

González, M. Hernández, A. Hernández, M. 2007. Comportamiento de diferentes genotipos de cafeto frente al empleo de un biopreparado bacteriano en la callogénesis. Cultivos Tropicales 28(3): 39-45.

Grant, D. 2000. Pecan food potential in prehistoric North America. Economic Botany. Biomedical and life Sciences. 54(1): 0013-0001.

González, P. Ojeda, D, Hernández, A. Martínez, J. Núñez, A. 2009. Ectomicorrizas en nogal pecanero Ectomycorrhitic on pecan. Medio ambiente y desarrollo sustentable. 3(3): 139-145.

Huang, T.; P. Shaolin; D. Gaofeng; Z. Lanying; L. Gengguang. 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69(2): 141-146.

Ipekci, Z. Nermin, G. 2004. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 79(3): 341.

Kryvenki, M. Kosky G. Guerrero, D. Dominguez, M. Reyes, M. 2008, Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. Biotecnología Vegetal. 8(2): 1609-1841.

Lemus S. G. 2004. Cultivo del pecano (*Carya illinoensis*). Ministerio de Agricultura INIA-LATINA. p5-7. [http://www.indap.gob.cl/Docs/Documentos/Fructicultura/Pecano/Cultivo_del_Pecano_\(INIA\).pdf](http://www.indap.gob.cl/Docs/Documentos/Fructicultura/Pecano/Cultivo_del_Pecano_(INIA).pdf)

León, S; Arenas, L & Vilorio, Z. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guayaba* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad de Zulia. Venezuela. http://www.revfacagronluz.org.ve/v14_1/v141z_005.html

Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hopp, E. Mroginski, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio. http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Indice_e_introduccion.pdf

López, G. Mateo, J. 2008. . Manual para la clonación de coníferas ornamentales. Instituto De Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo. http://www.uaeh.edu.mx/sistema_investigacion/funciones/bajarArchivo_web.php?producto=2945&archivo=2.pdf

Martínez, R. Ruiz, H. Azpiroz, G. Martínez, E. Rodríguez, J. Ramírez, B. 2010. Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales. Libros Técnicos: Serie Foresta. <http://redesus.files.wordpress.com/2010/03/biotecnologia.pdf>

Martínez, R. Azpiroz, H. Rodríguez, J. Alcalá, C. Gutiérrez, M. 2004. Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* hill ex maiden y *Eucalyptus urophylla* s. T. Blake. Revista Chapingo, serie ciencias forestales y del medio ambiente. 10(2): 83-92.

Manoj, R, Akhtar, N. Jaiswal, V. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Lab of Morphogenesis. Scientia Horticulturae. 113(2): 129–133

Manjkhola S, Dhar U, Joshi M (2005). Organogenesis, embryogenesis and synthetic seed production in *Arnebia euchroma* – A critically endangered medicinal plant of the Himalaya. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 41(3): 244-248.

Miyamoto, S., T. Riley, G. Gobran, and G. Petticrew. 1986. Effects of saline water irrigation on soil salinity, pecan tree growth and nut production. Irrig. Sci. 7(2): 83-95.

Miyamoto, S. 2005. Diagnosis and management of salinity problems in irrigated pecan production. In: 9o. Día del Nogalero. México. Asociación de Nogaleros de Delicias. sp. <http://texaseden.org/disaster-resources/wp-content/uploads/2011/05/Diagnosis-and-Management-of-Salinity-Problems-pecan-production.pdf>

Mroginski, L. A. y Roca, W. M. 1981. Establecimiento de Cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo2.pdf.

Muñoz, M. 2011. Biotecnología. Consejo Argentino para la conservación y el desarrollo de la biotecnología. ArgenBio. <http://www.argenbio.org>

Ollero, J. Muñoz, J. Segura, J. Arrillaga, I. 2010. Micropropagation of Oleander (*Nerium oleander* L.). HortScience 45(1): 98-102.

Ojeda *et al.* 2010. Análisis FODA y Perspectivas del cultivo del Nogal Pecanero en Chihuahua. Revista Mexicana de Agronegocios, vol. XIV. p.348. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=1411>

Poornima y Ravishankar 2007. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). Journal of Biotechnology 6(20): 2348-2352.

Ramírez, M y Salazar, E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. 19(1): 0378-7818 .

Ramírez, C. J. 2003. Estudio de algunos factores que influyen en la micropropagación del nogal (*Carya illinoensis koch*), Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas, en el área de horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, México p82.

Renukdas, N. Manoharan, M. Garner, J. 2010. In vitro propagation of pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). Department of Agriculture. 27: 211–215

Rovira, M y Aleta, N. 2007. Comportamiento productivo de planta auto-enraizada y de planta injertada en nogal. XI Congreso Nacional De Ciencias Hortícolas. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. p406. <http://www.sech07.uclm.es/gestion/pdf/3B02.pdf>

Sánchez, C. Valladares, S. Vielba, J. Covelo, P. Rico, S. Vieitez, A. 2009. Caracterización y análisis del patrón de expresión de genes asociados con la embriogénesis somática de roble. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas. <http://www.ivia.es/secivtv/documentos/Resumenes%20VIII%20Reunion%20SECIVTV.pdf>

Sánchez, M. Sánchez, C. Villanueva, C. Vázquez, I. Jiménez, M. Sánchez, I. 2009. Multiplicación *in vitro* vía Organogénesis en Calabaza. Agronomía mesoamericana. 20(1): 1021-7444.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2002. Tecnología de Producción en Nogal pecanero. Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental La Laguna. Pag: 1,2,10, 27, 28.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2005. Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera.

Scaltsoyiannes, A. Tsoulpha, P. Panetsos, K. Moulalis, D. 1998. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). Journal Silvae Genetica. 46(6) :326-332

Sebastián, J. 2004. Frutos secos en Cantabria: La nuez y la avellana. Investigación y Experimentación. Centro de Investigación y Formación Agraria. www.cifacantabria.com

Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2011. La Nuez Pecanera Mexicana. <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/productodetemporada/Paginas/Nuez.aspx>

Valderrama, S. Chico, J. Tejada, J. y Vega, A. 2008. Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa, *Fragaria virginiana*, utilizando ANA y BAP. REBIOL. 28(2): 11.

Tarango R., S.H.; B.C. Macías L.; A. Alarcón y J. Pérez M. 2004. Colonización micorrízica, crecimiento y concentración foliar de nutrimentos en nogal pecanero y pistachero. Agric. Téc. Méx. 30(2): 191-203.

Tavakkol, R. Angoshtari, R. Kalantari, S. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omic Jurnal. 4(2): 60-67.

Toosi, S. Dilmagani, K. 2010. Proliferation of *Juglans regia* L. by *in vitro* embryo culture. Journal of Cell Biology and Genetics Vol. 1(1): 1990-9233.

Uribe, M. & Cifuentes, L. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. Bosque (Valdivia). 25(1): 0717-9200

USDA NRCS National Plant Data Center. 2001. Pecan *Carya Illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. Plant Guide.. Fire Effects Information System. [Http://Www.Fs.Fed.Us/Database/Feis/Plants/Tree/Carill/In Dex.Html](http://Www.Fs.Fed.Us/Database/Feis/Plants/Tree/Carill/In Dex.Html).

Velásquez S. Colmenares, J. Chirinos, M. Noguera, A. Pérez. M. 2006. Embriogénesis somática en samán. Agronomía Trop. 56(4): 0002-192

Villarreal, E. Lombardini, L. Cisneros, L. 2006. Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. Food Chemistry 102(4): 1241–1249.

Wood, B. 2006. Maximizing tree energy reserves: a key role for non metals. The Pecan Grower 16(4): 22-25.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados estadísticos de Antioxidantes (Carbón activado, Polivinilpirrolidona, Nitrato de plata y Ac. Cítrico mas Ac. Ascórbico).

1. Resultados de análisis de varianza

a) Diseño factorial (FACTOR 1: Luz, FACTOR 2: Oscuridad) de múltiples niveles para tratamientos de Antioxidantes.

Factores	2	Replicas	6
Corridas base	8	Total de corridas	48
Bloques base	1	Total de bloques	1

Número de niveles: 2; 4

b) Modelo lineal general: TN (Tejido necrosado) vs. F. Luz; Tratamientos

Factor	Tipo	Niveles	Valores
F. Luz	Fijo	2	Luz, Oscuridad
Tratamientos	Fijo	4	T1; T ₂ ; T3; T4

Análisis de varianza para TN, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
F. Luz	1	0,0208	0,0208	0,0208	0,03	0,862
Tratamientos	3	6.5625	6.5625	21,875	3,22	0,033
F. Luz*Tratamientos	3	0,7292	0,7292	0,2431	0,36	0,784
Error	40	271,667	271,667	0,6792		
Total	47	344,792				

S = 0,824116 R-cuad. = 21,21% R-cuad.(ajustado) = 7,42%

Observaciones inusuales de TN

Obs	TN	Ajuste	Ajuste	SE	Residuo estándar
10	3,00000	1,33333	0,33644	1,66667	2,22 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

2. Tablas de resultados de prueba de Tukey (Factor luz, Tejido necrosado y Antioxidantes).

a) Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
FLuz	1,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	2,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	3,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	4,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	5,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	6,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	7,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	8,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	9,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	10,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	Total	60	1,5000	,50422	,06509	1,3697	1,6303	1,00	2,00
TN	1,00	6	2,8333	,40825	,16667	2,4049	3,2618	2,00	3,00
	2,00	6	2,6667	,51640	,21082	2,1247	3,2086	2,00	3,00
	3,00	6	1,3333	,51640	,21082	,7914	1,8753	1,00	2,00
	4,00	6	1,1667	,40825	,16667	,7382	1,5951	1,00	2,00
	5,00	6	2,6667	,51640	,21082	2,1247	3,2086	2,00	3,00
	6,00	6	2,3333	,81650	,33333	1,4765	3,1902	1,00	3,00
	7,00	6	1,3333	,51640	,21082	,7914	1,8753	1,00	2,00
	8,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	9,00	6	2,6667	,51640	,21082	2,1247	3,2086	2,00	3,00
	10,00	6	2,6667	,51640	,21082	2,1247	3,2086	2,00	3,00
	Total	60	2,0667	,86095	,11115	1,8443	2,2891	1,00	3,00
FAnt	1,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	2,00	6	1,0000	,00000	,00000	1,0000	1,0000	1,00	1,00
	3,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	4,00	6	2,0000	,00000	,00000	2,0000	2,0000	2,00	2,00
	5,00	6	3,0000	,00000	,00000	3,0000	3,0000	3,00	3,00
	6,00	6	3,0000	,00000	,00000	3,0000	3,0000	3,00	3,00
	7,00	6	4,0000	,00000	,00000	4,0000	4,0000	4,00	4,00
	8,00	6	4,0000	,00000	,00000	4,0000	4,0000	4,00	4,00
	9,00	6	5,0000	,00000	,00000	5,0000	5,0000	5,00	5,00
	10,00	6	5,0000	,00000	,00000	5,0000	5,0000	5,00	5,00
	Total	60	3,0000	1,42615	,18411	2,6316	3,3684	1,00	5,00

b) Tabla de análisis de varianza

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
FLuz	Inter-grupos	15,000	9	1,667		
	Intra-grupos	,000	50	,000		
	Total	15,000	59			
TN	Inter-grupos	30,733	9	3,415	13,134	,000
	Intra-grupos	13,000	50	,260		
	Total	43,733	59			
FAnt	Inter-grupos	120,000	9	13,333		
	Intra-grupos	,000	50	,000		
	Total	120,000	59			

b) Tabla de comparación múltiple de tratamientos

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
TN	1,00	2,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
		3,00	1,50000 ⁺	,29439	,000	,5255	2,4745
		4,00	1,66667 ⁺	,29439	,000	,6921	2,6412
		5,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
		6,00	,50000	,29439	,791	-,4745	1,4745
		7,00	1,50000 ⁺	,29439	,000	,5255	2,4745
		8,00	1,83333 ⁺	,29439	,000	,8588	2,8079
		9,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
		10,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
	2,00	1,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
		3,00	1,33333 ⁺	,29439	,001	,3588	2,3079
		4,00	1,50000 ⁺	,29439	,000	,5255	2,4745
		5,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
		6,00	,33333	,29439	,979	-,6412	1,3079
		7,00	1,33333 ⁺	,29439	,001	,3588	2,3079
		8,00	1,66667 ⁺	,29439	,000	,6921	2,6412
		9,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
		10,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	3,00	1,00	-1,50000 ⁺	,29439	,000	-2,4745	-,5255

	2,00	-1,33333 ⁺	,29439	,001	-2,3079	-,3588
	4,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
	5,00	-1,33333 ⁺	,29439	,001	-2,3079	-,3588
	6,00	-1,00000 ⁺	,29439	,040	-1,9745	-,0255
	7,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	8,00	,33333	,29439	,979	-,6412	1,3079
	9,00	-1,33333 ⁺	,29439	,001	-2,3079	-,3588
	10,00	-1,33333 ⁺	,29439	,001	-2,3079	-,3588
4,00	1,00	-1,66667 ⁺	,29439	,000	-2,6412	-,6921
	2,00	-1,50000 ⁺	,29439	,000	-2,4745	-,5255
	3,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
dimens	5,00	-1,50000 ⁺	,29439	,000	-2,4745	-,5255
ion3	6,00	-1,16667 ⁺	,29439	,008	-2,1412	-,1921
	7,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
	8,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
	9,00	-1,50000 ⁺	,29439	,000	-2,4745	-,5255
	10,00	-1,50000 ⁺	,29439	,000	-2,4745	-,5255
5,00	1,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
	2,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	3,00	1,33333 ⁺	,29439	,001	,3588	2,3079
dimens	4,00	1,50000 ⁺	,29439	,000	,5255	2,4745
ion3	6,00	,33333	,29439	,979	-,6412	1,3079
	7,00	1,33333 ⁺	,29439	,001	,3588	2,3079
	8,00	1,66667 ⁺	,29439	,000	,6921	2,6412
	9,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	10,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
6,00	1,00	-,50000	,29439	,791	-1,4745	,4745
	2,00	-,33333	,29439	,979	-1,3079	,6412
	3,00	1,00000 ⁺	,29439	,040	,0255	1,9745
dimens	4,00	1,16667 ⁺	,29439	,008	,1921	2,1412
ion3	5,00	-,33333	,29439	,979	-1,3079	,6412
	7,00	1,00000 ⁺	,29439	,040	,0255	1,9745
	8,00	1,33333 ⁺	,29439	,001	,3588	2,3079
	9,00	-,33333	,29439	,979	-1,3079	,6412
	10,00	-,33333	,29439	,979	-1,3079	,6412
7,00	1,00	-1,50000 ⁺	,29439	,000	-2,4745	-,5255
dimens	2,00	-1,33333 ⁺	,29439	,001	-2,3079	-,3588
ion3	3,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745

	4,00	,16667	,29439	1,000	-,8079	1,1412
	5,00	-1,33333	,29439	,001	-2,3079	-,3588
	6,00	-1,00000	,29439	,040	-1,9745	-,0255
	8,00	,33333	,29439	,979	-,6412	1,3079
	9,00	-1,33333	,29439	,001	-2,3079	-,3588
	10,00	-1,33333	,29439	,001	-2,3079	-,3588
8,00	1,00	-1,83333	,29439	,000	-2,8079	-,8588
	2,00	-1,66667	,29439	,000	-2,6412	-,6921
	3,00	-,33333	,29439	,979	-1,3079	,6412
dimens	4,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
ion3	5,00	-1,66667	,29439	,000	-2,6412	-,6921
	6,00	-1,33333	,29439	,001	-2,3079	-,3588
	7,00	-,33333	,29439	,979	-1,3079	,6412
	9,00	-1,66667	,29439	,000	-2,6412	-,6921
	10,00	-1,66667	,29439	,000	-2,6412	-,6921
9,00	1,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
	2,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	3,00	1,33333	,29439	,001	,3588	2,3079
dimens	4,00	1,50000	,29439	,000	,5255	2,4745
ion3	5,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	6,00	,33333	,29439	,979	-,6412	1,3079
	7,00	1,33333	,29439	,001	,3588	2,3079
	8,00	1,66667	,29439	,000	,6921	2,6412
	10,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
10,00	1,00	-,16667	,29439	1,000	-1,1412	,8079
	2,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	3,00	1,33333	,29439	,001	,3588	2,3079
dimens	4,00	1,50000	,29439	,000	,5255	2,4745
ion3	5,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745
	6,00	,33333	,29439	,979	-,6412	1,3079
	7,00	1,33333	,29439	,001	,3588	2,3079
	8,00	1,66667	,29439	,000	,6921	2,6412
	9,00	,00000	,29439	1,000	-,9745	,9745

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

d) Tabla de subconjuntos homogéneos generados por tratamientos de antioxidantes.

HSD de Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8,00	6	1,0000	
4,00	6	1,1667	
3,00	6	1,3333	
7,00	6	1,3333	
6,00	6		2,3333
2,00	6		2,6667
5,00	6		2,6667
9,00	6		2,6667
10,00	6		2,6667
1,00	6		2,8333
Sig.		,979	,791

* Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

Anexo 2. Resultados estadísticos de Tratamientos implementados en Hojas. (2,4-D a razón de 1, 3 y 10 mg L⁻¹).

1. Tablas de resultados de análisis de varianza

a) Diseño factorial de múltiples niveles

Factores	2	Replicas	4
Corridas base	9	Total de corridas	36
Bloques base	1	Total de bloques	1

Numero de niveles: 3, 3

b) Modelo lineal general: respuesta vs. Región, Tratamientos

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Región	Fijo	3	H1; H2; H3
Tratamientos	Fijo	3	T1; T2; T3

Análisis de varianza para respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
F. Luz	2	0.28626	0.28626	0.14313	2.7	0.085
Tratamientos	2	0.98386	0.98386	0.49193	9.28	0.001
F. Luz*Tratamientos	4	0.52827	0.52827	0.13207	2.49	0.067
Error	27	1.43070	1.43070	0.05299		
Total	35	3.22910				

S = 0.230193 R-cuad. = 55.69% R-cuad.(ajustado) = 42.57%

Observaciones inusuales de respuesta

		Residuo			
Obs	respuesta	Ajuste	Ajuste SE	Residuo	estandar
6	1.24550	1.70390	0.11510	-0.45840	-2.30 R
21	1.80900	2.22147	0.11510	-0.41247	-2.07 R
24	2.74200	2.22147	0.11510	0.52053	2.61 R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

2. Tablas de resultados de prueba de Tukey

a) Descriptivos

2,4-D	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1 m L ⁻¹	12	21,667	,71774	,20719	17,106	26,227	1,00	3,00
3 m L ⁻¹	12	25,833	,66856	,19300	21,586	30,081	1,00	3,00
10 m L ⁻¹	12	11,667	,38925	,11237	,9193	14,140	1,00	2,00
Total	36	19,722	,84468	,14078	16,864	22,580	1,00	3,00

c) Tabla de análisis de varianza

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12,722	2	6,361	17,136	,000
Intra-grupos	12,250	33	,371		
Total	24,972	35			

d) Tabla de comparación múltiple de tratamientos

(I) Tratamientos (J) Tratamientos		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1 m L ⁻¹	3 m L ⁻¹	-,41667	,24873	,230	-10,270	,1937
	10 m L ⁻¹	1,00000*	,24873	,001	,3897	16,103
3 m L ⁻¹	1 m L ⁻¹	,41667	,24873	,230	-,1937	10,270
	10 m L ⁻¹	1,41667*	,24873	,000	,8063	20,270
10 m L ⁻¹	1 m L ⁻¹	-1,00000*	,24873	,001	-16,103	-,3897
	3 m L ⁻¹	-1,41667*	,24873	,000	-20,270	-,8063

e) Tabla de subconjuntos homogéneos

Tratamientos 2,4-D mg L ⁻¹	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
10 m L ⁻¹	12	1,1667	
1 m L ⁻¹	12		2,1667
3 m L ⁻¹	12		2,5833
Sig.		1,000	,230

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000.

3. Prueba Kruskal-Wallis para las variables de color y estructura.

a) Tabla de Rangos

Tratamientos mg L ⁻¹ 2,4-D		N	Rango promedio
Estructura	1 m L ⁻¹	12	21,04
	3 m L ⁻¹	12	22,33
	10 m L ⁻¹	12	12,13
	Total	36	
Color	1 m L ⁻¹	12	18,42
	3 m L ⁻¹	12	25,17
	10 m L ⁻¹	12	11,92
	Total	36	

b) Prueba de Chi²

Estadísticos de contraste ^{a,b}		
	Estructura	Color
Chi-cuadrado	8,089	10,655
gl	2	2
Sig. asintót.	,018	,005

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Trat

4. Resultado de Tablas de contingencia para la variable estructura

a) Tabla de contingencia

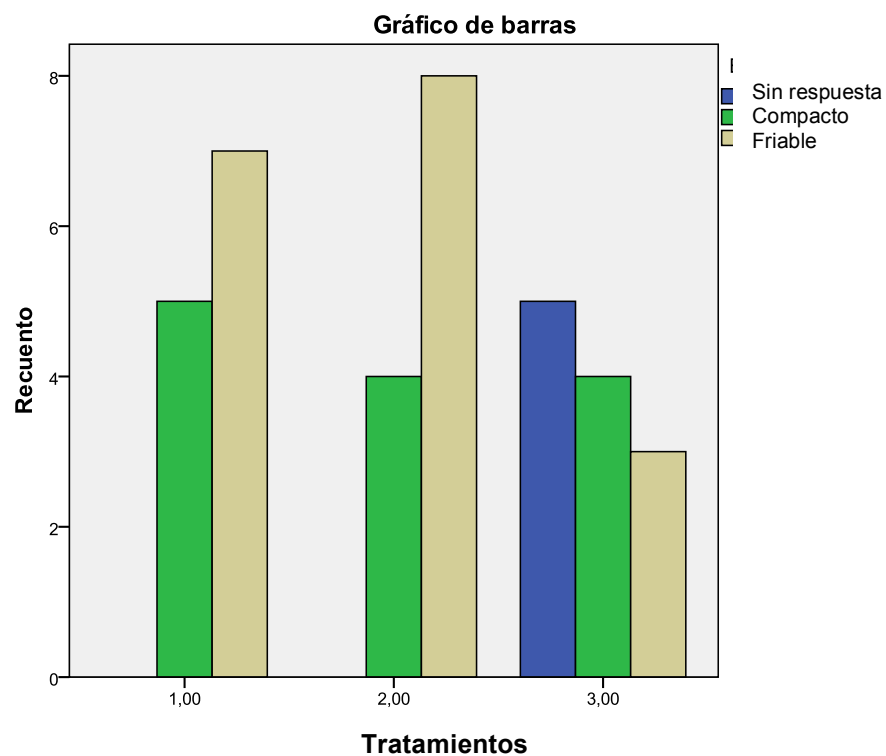
2,4-D		Estructura			Total
		,00	1,00	2,00	
Tratamientos	1 m L ⁻¹	0	5	7	12
	3 m L ⁻¹	0	4	8	12
	10 m L ⁻¹	5	4	3	12
Total		5	13	18	36

c) Prueba de Chi²

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,487 ^a	4	,014
Razón de verosimilitudes	13,739	4	,008
Asociación lineal por lineal	6,453	1	,011
N de casos válidos	36		

a. 6 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,67.

c) Grafica de resultados de variable estructura



5. Resultado de Tablas de contingencia para la variable color

a) Tabla de contingencia

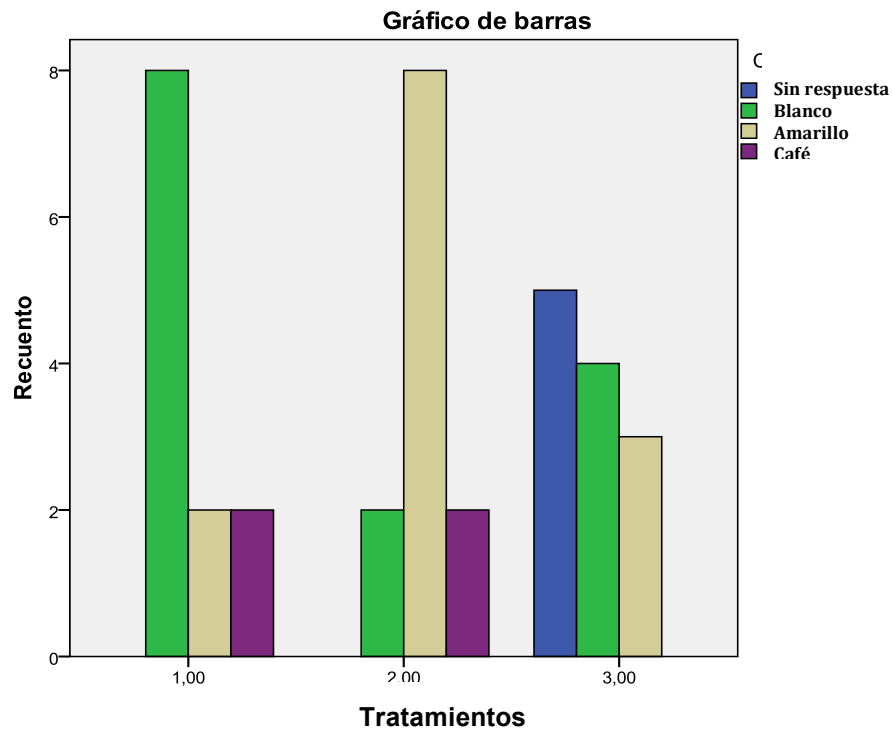
2,4-D		Color				Total
		,00	1,00	2,00	3,00	
Trat	1 m L ⁻¹	0	8	2	2	12
	3 m L ⁻¹	0	2	8	2	12
	10 m L ⁻¹	5	4	3	0	12
Total		5	14	13	4	36

b) Prueba de Chi²

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,769 ^a	6	,002
Razón de verosimilitudes	22,742	6	,001
Asociación lineal por lineal	3,471	1	,062
N de casos válidos	36		

a. 12 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,33.

c) Grafica de resultados de variable color



Anexo 3. Resultados estadísticos de Tratamientos implementados a Embriones (TDZ a razón de 1,3 y 10 mg L⁻¹).

1. Tablas de resultados de análisis de varianza

a) Diseño factorial de múltiples niveles

Factores	2	Replicas	4
Corridas base	9	Total de corridas	36
Bloques base	1	Total de bloques	1

Numero de niveles: 3, 3

b) Modelo lineal general: Respuesta vs. a1, Tratamientos

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Región	Fijo	3	1,2,3
Tratamientos	Fijo	3	T1; T ₂ ; T3

Análisis de varianza para Respuesta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC sec.	SC ajust.	MC ajust.	F	P
F. Luz	2	0.0745	0.0745	0.0372	0.11	0.9
Tratamientos	2	11.5807	11.5807	5.7904	16.53	0.001
F. Luz*Tratamientos	4	2.6446	2.6446	0.6611	1.89	0.142
Error	27	9.45760	9.45760	0.3503		
Total	35	23.75730				

S = 0.591845 R-cuad. = 60.19% R-cuad.(ajustado) = 48.40%

Observaciones inusuales de Respuesta

		Residuo				
Obs	Respuesta	Ajuste	SE	Residuo	estandar	
23	0.18730	1.34100	0.29592	-1.15370	-2.25	R
24	2.06900	0.95500	0.29592	1.11400	2.17	R

R denota una observación con un residuo estandarizado grande.

2. Tablas de resultados de prueba de Tukey

a) Descriptivos

TDZ	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1 m L ⁻¹	12	13,333	,65134	,18803	,9195	17,472	1,00	3,00
3 m L ⁻¹	12	25,000	,67420	,19462	20,716	29,284	1,00	3,00
10 m L ⁻¹	12	,8333	,83485	,24100	,3029	13,638	,00	2,00
Total	36	15,556	,99841	,16640	12,177	18,934	,00	3,00

b) Tabla de resultados de análisis de varianza

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17,556	2	8,778	16,712	,000
Intra-grupos	17,333	33	,525		
Total	34,889	35			

c) Tabla de comparación múltiple de tratamientos

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1 m L ⁻¹ TDZ	3 m L ⁻¹	-1,16667 [*]	,29588	,001	-18,927	-,4406
	10 m L ⁻¹	,50000	,29588	,224	-,2260	12,260
3 m L ⁻¹ TDZ	1 m L ⁻¹	1,16667 [*]	,29588	,001	,4406	18,927
	10 m L ⁻¹	1,66667 [*]	,29588	,000	,9406	23,927
10 m L ⁻¹ TDZ	1 m L ⁻¹	-,50000	,29588	,224	-12,260	,2260
	3 m L ⁻¹	-1,66667 [*]	,29588	,000	-23,927	-,9406

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

d) Tabla de subconjuntos homogéneos

Tratamientos TDZ	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
10 m L ⁻¹	12	,8333	
1 m L ⁻¹	12	1,3333	
3 m L ⁻¹	12		2,5000
Sig.		,224	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12,000.

3. Prueba Kruskal-Wallis para las variables de color y estructura.

a) Tabla de rangos

Tratamientos TDZ		N	Rango promedio
Estructura	1 m L ⁻¹	12	16,50
	3 m L ⁻¹	12	26,25
	10 m L ⁻¹	12	12,75
	Total	36	
Color	1 m L ⁻¹	12	19,67
	3 m L ⁻¹	12	22,08
	10 m L ⁻¹	12	13,75
	Total	36	

b) Prueba Chi²

	Estructura	Color
Chi-cuadrado	14,366	4,336
gl	2	2
Sig. asintót.	,001	,114

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Trat

4. Resultado de Tablas de contingencia para la variable estructura

a) Tabla de contingencia

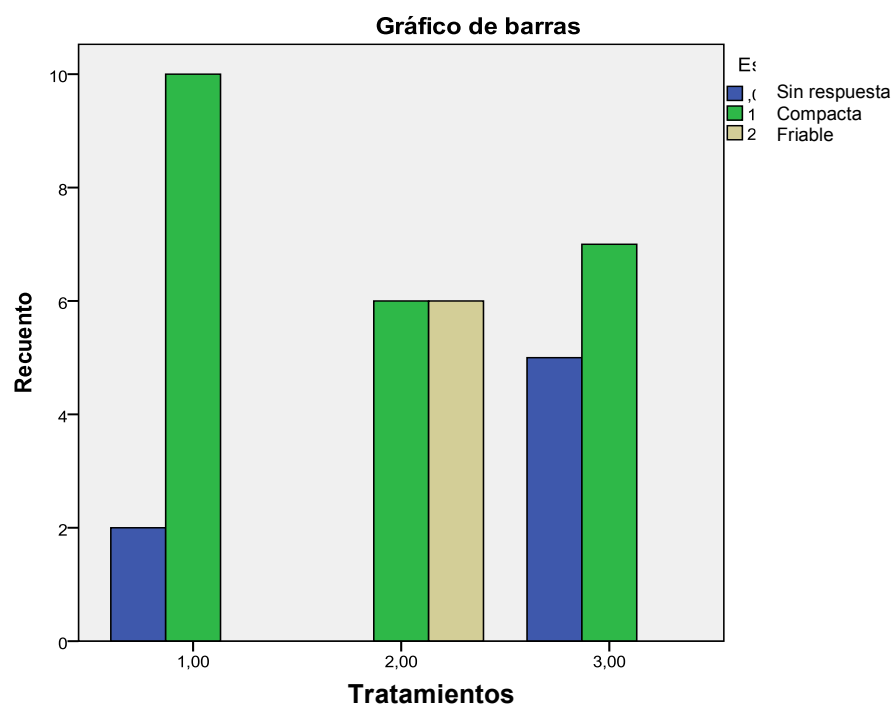
TDZ		Estructura			Total
		,00	1,00	2,00	
Tratamientos	1 m L ⁻¹	2	10	0	12
	3 m L ⁻¹	0	6	6	12
	10 m L ⁻¹	5	7	0	12
Total		7	23	6	36

b) Prueba de Chi²

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	18,559 ^a	4	,001
Razón de verosimilitudes	21,287	4	,000
Asociación lineal por lineal	1,012	1	,314
N de casos válidos	36		

a. 6 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,00.

c) Grafica de resultados de variable estructura



5. Resultado de Tablas de contingencia para la variable color

a) Tabla de contingencia

TDZ	Color				Total
	,00	1,00	2,00	3,00	
Tratamientos 1 m L ⁻¹	0	7	1	4	12
3 m L ⁻¹	0	3	7	2	12
10 m L ⁻¹	5	2	4	1	12
Total	5	12	12	7	36

b) Prueba Chi²

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,000 ^a	6	,003
Razón de verosimilitudes	21,385	6	,002
Asociación lineal por lineal	2,850	1	,091
N de casos válidos	36		

a. 12 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,67.

c) Grafica de resultados de variable color

