

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA



**“INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE
EXPLANTES FOLIARES EN TRES VARIEDADES DE CAFÉ”**

Presentada por:

KIARA JULISSA SÁNCHEZ JHONG

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

Lima- Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE AGRONOMIA

**“INDUCCION DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE
EXPLANTES FOLIARES EN TRES VARIEDADES DE CAFÉ”**

Presentada por:

KIARA JULISSA SÁNCHEZ JHONG

Tesis para optar el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Sustentada y Aprobada ante el siguiente jurado:

.....
Ing. Mg. Sc. Julio Nazario Ríos
PRESIDENTE

.....
Dr. Jorge Jiménez Dávalos
ASESOR

.....
Biol. Rosa Cabrera Pintado
CO-ASESORA

.....
Ing. Mg. Sc. María de Lourdes
Tapia y Figueroa
MIEMBRO

.....
Dr. Alberto Julca Otiniano
MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis padres, Fidel y Julissa,

A mi hermana Alessa,

A mis abuelos Mamá Teresa, Papapa y Mamá María,

A mis tías Ruth y María.

Gracias por su amor incondicional y por permitirme lograr cada una de mis metas personales y profesionales.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Jiménez Dávalos, por lo enseñado y por su orientación durante el desarrollo de mi tesis.

A la Blga. Rosa Cabrera Pintado, por la oportunidad brindada para la realización de la investigación como parte del proyecto PIP N° 321778.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del INIA: Sra. Luz, Liliana, Melissa, Jerica, Sebastián, Carlos, Jean Carlo, Renzo y Julieta, por su amistad y experiencias compartidas en el laboratorio.

A mis amigos Milca y Diego, por sus recomendaciones en la elaboración de mi tesis.

A Dieguis, por su apoyo y compañía incondicional, por sus consejos y motivación desde nuestra etapa universitaria.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CAFÉ.....	5
2.1.1.	TAXONOMÍA	5
2.1.2.	CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	6
2.2.	CULTIVO DE TEJIDOS EN CAFÉ	9
2.3.	MICROESTACAS.....	9
2.4.	EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	10
2.4.1.	EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA.....	10
2.4.2.	EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA.....	11
2.4.3.	FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	11
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	17
3.2.	MATERIALES	17
3.2.1.	MATERIAL VEGETAL	17
3.2.2.	EQUIPOS DE LABORATORIO	18
3.2.3.	INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	18
3.2.4.	REACTIVOS E INSUMOS	19
3.3.	PROCEDIMIENTOS.....	20
3.3.1.	ENSAYO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL	20
3.3.2.	ENSAYO DE INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	23
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
4.1.	ENSAYO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL.....	28
4.1.1.	TASA DE CONTAMINACIÓN	28
4.1.2.	TASA DE OXIDACIÓN.....	29
4.2.	ENSAYO DE INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	30
4.2.1.	TASA DE CALLOGÉNESIS E INICIO DE FORMACIÓN DE CALLOS	30
4.2.2.	NIVEL DE INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS	32
4.2.3.	TAMAÑO DE CALLOS.....	34
4.2.4.	TASA DE EMBRIOGÉNESIS E INICIO DE FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS	36

4.2.5. NÚMERO DE EMBRIONES SOMÁTICOS	41
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. RECOMENDACIONES	44
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
VIII. ANEXOS	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación taxonómica del café	5
Cuadro 2: Tratamientos de desinfección superficial de hojas de café.....	21
Cuadro 3: Tratamientos para inducción de embriogénesis somática en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95.	23
Cuadro 4: Escala de nivel de inducción de callogénesis	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procedimiento del ensayo de desinfección superficial	22
Figura 2: Escala de nivel de inducción de callogénesis.....	25
Figura 3: Procedimiento del ensayo de inducción de embriogénesis somática.....	27
Figura 4: Agentes contaminantes en hojas de café.....	29
Figura 5: Tasa de callogénesis en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95	30
Figura 6: Tipos de callo	32
Figura 7: Porcentaje de explantes de la variedad Castillo según nivel de callogénesis.....	32
Figura 8: Porcentaje de explantes de la variedad Catuaí según nivel de callogénesis	33
Figura 9: Porcentaje de explantes de la variedad Costa Rica 95 según nivel de callogénesis	34
Figura 10: Tamaño de callos en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95.....	34
Figura 11: Tasa de embriogénesis en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95.....	36
Figura 12: Tipos de embriones somáticos	40
Figura 13: Número de embriones en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95	41
Figura 14: Estados de los embriones somáticos	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Composición de medio Murashige y Skoog (1962).....	57
ANEXO 2: Análisis estadístico del ensayo de desinfección superficial de hojas de café...	58
ANEXO 3: Resultados y análisis estadístico de tasa de callogénesis en la variedad Castillo	59
ANEXO 4: Resultados y análisis estadístico de tasa de callogénesis en la variedad Catuaí	61
ANEXO 5: Resultados y análisis estadístico de tasa de callogénesis en la variedad Costa Rica 95	63
ANEXO 6: Resultados y análisis estadístico de nivel de inducción callogénesis en la variedad Castillo	65
ANEXO 7: Resultados y análisis estadístico de nivel de inducción callogénesis en la variedad Catuaí	66
ANEXO 8: Resultados y análisis estadístico de nivel de inducción callogénesis en la variedad Costa Rica 95	67
ANEXO 9: Resultados y análisis estadístico de tamaño de callos en la variedad Castillo .	68
ANEXO 10: Resultados y análisis estadístico de tamaño de callos en la variedad Catuaí .	72
ANEXO 11: Resultados y análisis estadístico de tamaño de callos en la variedad Costa Rica 95.....	76
ANEXO 12: Resultados y análisis estadístico de tasa embriogénesis en la variedad Castillo	80
ANEXO 13: Resultados y análisis estadístico de tasa embriogénesis en la variedad Catuaí	82
ANEXO 14: Resultados y análisis estadístico de tasa embriogénesis en la variedad Costa Rica 95.....	84
ANEXO 15: Resultados y análisis estadístico de número de embriones en la variedad Castillo	86
ANEXO 16: Resultados y análisis estadístico de número de embriones en la variedad Catuaí	90
ANEXO 17: Resultados y análisis estadístico de número de embriones en la variedad Costa Rica 95	94

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue establecer un procedimiento de inducción de embriogénesis somática de café a partir de explantes foliares. Se instalaron dos ensayos, uno de desinfección superficial y otro para la inducción de embriogénesis somática. En el ensayo de desinfección superficial de hojas de café, provenientes de campo e invernadero, se evaluó diferentes concentraciones de NaClO, tiempo de inmersión y el uso de solución antioxidante. El tratamiento de desinfección superficial con mejores resultados fue 2% de NaClO por 5 minutos. En el ensayo de inducción de embriogénesis somática en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95, se evaluó el efecto de diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento; las citoquininas BAP y KIN (2.0, 4.0 y 6.0 mg/L) y la auxina 2,4-D (0.1, 0.5 y 1.0 mg/L) sola, y en combinación con KIN (1.5 mg/L). Las variables de estudio fueron tasa de callogénesis, inicio de formación de callos, nivel de inducción de callogénesis, tamaño de callos, tasa de embriogénesis, inicio de embriogénesis y número de embriones/explante. Se logró inducir embriogénesis somática, directa e indirecta, en un solo medio de cultivo y a partir de la semana 7 de iniciado el ensayo. La variedad Castillo, presentó valores de 32% a 100% de explantes con embriogénesis somática y 12.62 embriones/explante; la variedad Catuaí, presentó tasas de embriogénesis somática de 52% a 100% y llegando a producir un promedio de 26.84 embriones/explante; en la variedad Costa Rica 95, se obtuvo 98% a 100% de tasa de embriogénesis y 7.4 embriones somáticos/explante. De los resultados, se concluyó que BAP y 2,4-D, solo y en combinación con KIN, inducen callogénesis y embriogénesis según la variedad de café; para Castillo, en los tres tratamientos de BAP y de 2,4-D en combinación con KIN; para Catuaí, en todos los tratamientos de 2,4-D solo y en combinación con KIN; y para Costa Rica 95, en las tres concentraciones de BAP y en el tratamiento conformado por 0.5 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L KIN.

PALABRAS CLAVE: café, embriogénesis somática, callogénesis, cultivo de tejidos

ABSTRACT

The objective of the research was to establish a procedure of somatic embryogenesis induction in coffee from leaf explants. Two trials were installed, one for surface disinfection and other for somatic embryogenesis induction. In the surface disinfection trial of coffee leaves, coming from field and greenhouse, different concentrations of NaClO, immersion times and use of antioxidant solution were evaluated. The best surface disinfection treatment was 2% NaClO for 5 minutes. In the somatic embryogenesis induction in Castillo, Catuaí and Costa Rica 95 leaves, different types and concentrations of growth regulators was evaluated; BAP and KIN cytokinins (2.0, 4.0 and 6.0 mg / L) and auxin 2,4-D (0.1, 0.5 and 1.0 mg / L) alone, and in combination with KIN (1.5 mg / L). Study variables were callogenesis rate, beginning of callus formation, level of callogenesis induction, size of callus, embriogenesis rate, beginning of embryos formation and number of embryos. It was possible to induce somatic embryogenesis, direct and indirect, in only one culture medium and from seventh week. Castillo variety presented values of 32% to 100% of explants with somatic embryogenesis and 12.62 embryos / explant; Catuaí variety, presented rates of somatic embryogenesis from 52% to 100% and reaching an average of 26.84 embryos / explant; in Costa Rica 95 variety, 98% to 100% of embryogenesis rate were obtained and 7.4 somatic embryos / explant. From the results, it was concluded that BAP and 2,4-D, alone and in combination with KIN, induce callogenesis and embryogenesis according to coffee variety; for Castillo, in the three treatments of BAP and 2,4-D in combination with KIN; for Catuaí, in all 2,4-D treatments alone and in combination with KIN; and for Costa Rica 95, in the three concentrations of BAP and in the treatment conformed by 0.5 mg / L 2,4-D + 1.5 mg / L KIN.

KEY WORDS: coffee, somatic embryogenesis, callogenesis, tissue culture

I. INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea* spp.) se originó en las alturas de Kaffa, provincia de Etiopía (Cinza-Borrelli *et al.*, 2002; Clay, 2004; Fundes y Cruz, 2011). En el siglo XV fue introducido a Arabia, Yemen y Egipto, donde empezó a adquirir importancia. En 1690 comenzó a cultivarse en la isla de Java (Indonesia) y a partir de ese momento su cultivo empezó a expandirse rápidamente por América, llegando posteriormente hasta la India y Sri Lanka (Arvy *et al.*, 2007; Small, 2009).

Actualmente, la planta de café es cultivada en casi 80 países tropicales y subtropicales (Clay, 2004) de las cuales *C. arabica* y *C. canephora* abarcan el 60 y 40 por ciento de la producción mundial, respectivamente. *C. canephora* se cultiva en África Central y Occidental, sudeste de Asia y un poco en Brasil donde se le conoce como “conillón” (Waller *et al.*, 2007) mientras que *C. arabica* se cultiva en África Central y Oriental, en la India, en Indonesia y en toda Latinoamérica (Small, 2009; Waller *et al.*, 2007). Ambas especies tienen diferentes características, plantas de *C. canephora* son más rústicas, resistentes a plagas y enfermedades pero de baja calidad organoléptica a comparación de *C. arabica* que destaca por su aroma y sabor.

A partir de las semillas de café se elabora la bebida estimulante del mismo nombre, el cual se considerada uno de los productos primarios más valiosos a nivel mundial, solo superado por el petróleo. Entre los países productores líderes se encuentra Brasil, con 2 594 100 kg; seguido de Vietnam, con 1 650 000 kg y Colombia con, 831 000 kg. El Perú ocupa el puesto once en el ranking mundial con 192 000 kg, que representa el 2.23 por ciento de la producción mundial (ICO, 2015).

En el Perú, el café no solo tiene importancia agraria, también tiene importancia económica y social. Es el principal cultivo nacional por extensión y el principal cultivo agrícola de la selva (Julca *et al.*, 2010). Hasta el año 2012, el IV Censo Nacional Agropecuario indica que existen 425 400 hectáreas con plantas de café (INEI, 2012) las cuales representan el

seis por ciento del área agrícola nacional y se encuentran distribuidas en 17 regiones, 67 provincias y 338 distritos. El potencial de crecimiento del café en el país es alrededor de dos millones de hectáreas (MINAGRI, 2015).

El café en el Perú se encuentra dentro de los diez principales productos de exportación, después de algunos minerales, petróleo, gas natural, harina de pescado, entre otros (MINAGRI, 2015) y es el principal producto de agroexportación (Julca *et al.*, 2010). Perú es el séptimo país exportador de café a nivel mundial (MINAGRI, 2015), sus exportaciones representaron el 25 por ciento del total de su sector en el 2012 (APN, 2013). Asimismo, Del Pilar (2011), menciona que el grano de café se ha exportado a más de 45 países siendo Alemania, EE.UU. y Bélgica los principales importadores.

Existen alrededor de 160 000 familias productoras que dependen de este cultivo (Schuller, 2010), de los cuales el 95 por ciento de ellas son agricultores con menos de cinco hectáreas. Un tercio del empleo agrícola está relacionado al mercado del café, dos millones de peruanos están relacionados con la cadena de producción. (MINAGRI, 2015). Además, el café es considerado un cultivo alternativo para contrarrestar los cultivos ilegales, como el de la coca (Schuller, 2010).

A pesar de su importancia en el país, existen limitaciones para el desarrollo de la caficultura debido a la falta o bajo nivel de tecnología en el manejo del cultivo, resultando bajos rendimientos. A ello se suma la falta de infraestructura, medios de transporte, políticas de gobierno y organización del gremio para acceso a mercados, entre otros.

Se ha evidenciado la necesidad de renovar los cafetales del país. Según MINAGRI (2014), el 70 por ciento de las plantaciones cafetaleras son mayores de 20 años, con rendimientos promedios que oscilan entre 12 a 15 q/ha encontrándose por debajo del promedio mundial (INIA, 2011). En el 2012 y 2015, la producción nacional de café en el Perú fue de 5775 quintales y de 4750 quintales, respectivamente; esta caída en la producción se debe principalmente al agotamiento de las plantaciones antiguas, la poca mano de obra disponible y los problemas fitosanitarios como el de la roya amarilla (MINAGRI, 2014).

Los principales problemas sanitarios de los últimos años se debieron a la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*). La broca del café

es un insecto de la familia Curculionidae que afecta los frutos ocasionando pérdidas del 10 al 40 por ciento de la producción, con fuertes impactos negativos en la baja calidad del grano, pérdida del rendimiento, incremento en el uso de plaguicidas tóxicos, y aumento de los costos de sanidad del cultivo (INIA, 2011). Las variaciones extremas del clima, el deficiente manejo agronómico del cultivo y el predominio en el país de variedades susceptibles a la roya amarilla favorecieron la difusión e incidencia en la campaña 2012-2013 produciendo la caída prematura de las hojas; por los efectos del daño, 210 000 hectáreas deben ser rehabilitadas y 80 000 hectáreas renovadas (MINAGRI, 2014).

El rendimiento, la calidad organoléptica y la resistencia a plagas y enfermedades son características que pueden presentar variedades mejoradas. Ante la necesidad de renovar las plantaciones de café; el cultivo de tejidos vegetales se presenta como una técnica útil en los programas de mejoramiento, debido al potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Domínguez *et al.*, 2008).

El cultivo *in vitro* de café se puede llevar a cabo por dos vías: la micropropagación por microestacas y la regeneración por embriogénesis somática (Berthouly, 1997). Sin embargo, la embriogénesis somática a partir de hojas juveniles es la mejor opción para la propagación masiva de clones de café superiores debido a la mayor tasa de multiplicación y por la abundancia y fácil desinfección de las hojas.

La embriogénesis somática es un proceso biológico por el cual se obtienen embriones asexuales a partir de células somáticas que pueden regenerarse en plantas genéticamente iguales al material parental. La técnica no solo permite la multiplicación masiva de plantas seleccionadas, sino también se pueden realizar estudios posteriores relacionados al mejoramiento genético. Al ser el café una planta semi perenne, tomaría más de 30 años obtener cultivares tolerantes a estrés biótico y abiótico mediante el mejoramiento clásico (Barry- Etienne *et al.*, 2002); por esta razón, con la embriogénesis somática, se liberarían variedades en menor tiempo que por el método convencional.

Los trabajos realizados por Staritsky (1970), Hermann y Haas (1975), Dublin (1981), Pierson *et al.* (1983), Yasuda *et al.* (1985), Hatanaka *et al.* (1991), Sondhal *et al.* (1991), Paz-Ramírez (2000), Gatica-Arias (2002), Moncada *et al.* (2004), Teixeira *et al.* (2004),

López-Gómez *et al.* (2010), entre otros, demostraron que es posible la inducción y producción de embriones somáticos; sin embargo, es necesario mejorar la eficiencia de la inducción de embriogénesis somática. Por ello, el presente trabajo de investigación tiene como finalidad establecer un procedimiento de inducción de embriogénesis somática mediante una desinfección superficial de hojas de café que permita el óptimo establecimiento *in vitro* y mediante la determinación del tipo y concentración de reguladores de crecimiento para inducir embriogénesis somática en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CAFÉ

2.1.1. TAXONOMÍA

El café pertenece al género *Coffea* de la familia Rubiaceae. Según León (2000) y Alvarado y Rojas (2007), solo cuatro de las cien especies son cultivadas comercialmente: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* y *C. dewevrei*, siendo las más importantes *C. canephora* y *C. arabica*. Esta última especie mencionada, es alotetraploide ($2n=4x=44$ cromosomas) por un cruce interespecífico natural entre dos especies diferentes con un número básico de cromosomas $x=11$ (Regalado, 2006).

Cuadro 1: Clasificación taxonómica del café

Clado	Eudicotiledóneas
Clado	Astéridas
Clado	Euastéridas
Orden	Gentianales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Coffea</i>
Especie	<i>arabica</i>
Nombre científico	<i>Coffea arabica</i>

FUENTE: APG (2009)

2.1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

a) PORTE

La planta de café arábico es un arbusto perenne cuyo ciclo de vida en condiciones comerciales alcanza entre 20 a 25 años dependiendo de las condiciones o del sistema de cultivo (Arcila *et al.*, 2007); pueden llegar a medir hasta 20 metros de altura, en plantaciones comerciales con podadas entre los 2 y 4 metros de altura (Coronel, 2010).

Las ramas laterales se alargan y la parte superior del eje vertical continua creciendo, así se producen nuevas ramas en diversos ángulos, por lo que la planta adquiere una forma cónica (Delgado, 2007). Los ejes verticales u ortotrópicos tienen yemas vegetativas en los nudos, de los que se desarrollan ramas laterales donde muy rara vez se forman inflorescencias; en cambio, los ejes horizontales o plagiotrópicos llevan yemas floríferas en las axilas de las hojas (León, 2000).

b) SISTEMA RADICULAR

Presenta una raíz pivotante (Figuroa, 1990), que alcanza una profundidad máxima de 50 a 60 cm de longitud en una planta adulta (Sotomayor, 1993). De ella crecen dos tipos de raíces: axiales y horizontales. Arcila *et al.* (2007) afirma que las raíces de sostén o axiales se ramifican en todas las direcciones a diferentes profundidades; las raíces horizontales o laterales pueden ser superficiales, sub-superficiales, raíces portadoras de raíces absorbentes y raíces absorbentes, estas últimas crecen de manera uniforme y son más numerosas en la parte superficial del suelo (Alvarado y Rojas, 2007). Los pelos absorbentes sirven para la absorción del agua y nutrientes y se encuentran en los 30 cm superiores del suelo, en un radio a partir del tronco que en la planta fluctúa entre 2.0 y 2.5 m (León, 2000).

c) TALLO

El color y la forma del tallo cambian conforme a su desarrollo. En una planta adulta la parte inferior es más o menos cilíndrica, de superficie grisácea y áspera, mientras que hacia el ápice el tallo es cuadrangular y verde, con las esquinas redondeadas y salientes (León, 1987).

El tallo vertical forma yemas laterales de las que brotan las hojas. De la axila superior de éstas salen otras yemas que se desarrollan en ramas plagiotrópicas o laterales llamadas primarias o de primer orden. De ellas brotan ramas secundarias o de segundo orden, de las que a su vez pueden salir ramillas terciarias o de tercer orden (León, 1987).

La base del nudo posee 6 yemas a ambos lados. La cabeza yema de serie origina la rama lateral y la yema seriada forma los chupones, este a su vez, origina a los frutos. Los chupones forman nuevos tallos y estos reemplazan a los tallos viejos. Cada yema seriada, crece, desarrolla y se transforma en 4 frutos. Las yemas crecen en la etapa de descanso y en la etapa de floración se transforman en botones florales, flores y posteriormente frutos (Arcila *et al.*, 2007).

d) HOJA

Aparece en ramas plagiotrópicas en un mismo plano y en posición opuesta, rodeadas por estipulas agudas. La lamina de la hoja mide de 12 a 24 cm de largo por 5 a 12 cm, variando su forma de elíptica a lanceolada (León, 2000).

La cara superior es verde oscuro, brillante, con los nervios hundidos; la inferior verde clara, mate con los nervios prominentes. En la cara inferior de las hojas, en el ángulo formado por el nervio central y los laterales, aparecen pequeños agujeros de forma irregular, que se abren a cámaras diminutas. Son las llamadas domacias, que se observan en la cara superior como protuberancias pequeñas y redondas en la inserción de los nervios laterales. Las domacias tienen por lo común pelos finos y forman un repliegue interno de la epidermis. No se conoce función; con frecuencia viven en ellas ácaros muy pequeños (León, 1987).

e) FLOR

Las flores del cafeto son de color blanco, aromáticas, y se encuentran en la axila de cada pareja de hojas (Alvarado y Rojas, 2007). Se forman en las yemas ubicadas en las axilas foliares, en los nudos de las ramas. Cada nudo de una rama tiene dos axilas foliares opuestas, en cada axila se forman de 3 a 4 yemas o inflorescencias y cada una de ellas tiene entre 4 y 5 flores. Es decir, en un nudo existen potencialmente entre 24 a 32 botones florales (12 a 16 botones florales por axila) (Arcila *et al.*, 2007).

La corola es un largo tubo que se expande en cinco lóbulos estrechos. Por otro lado, los cinco estambres se encuentran adnatos a los pétalos. El estilo es largo y el estigma es bilobulado (Alvarado y Rojas, 2007).

El gineceo está constituido por el ovario súpero, con dos celdas de un óvulo cada una; el estilo es fino y largo, y termina en ramas estigmáticas (León, 1987).

Ocurre autopolinización; sin embargo, el porcentaje de polinización cruzada no es superior al 6 por ciento y se debe primero al viento y en segundo lugar a los insectos (León, 1987).

f) FRUTO

El fruto maduro es una drupa elipsoidal en los cultivares comerciales, ligeramente aplanada, cuyo tres ejes principales miden entre 12 y 18 mm de longitud, 8 y 14 mm de ancho y 7 y 10 mm de espesor (Alvarado y Rojas, 2007). Es de color verde durante los primeros meses para pasar en la maduración por distintas tonalidades que van de amarillo a rojo, según la especie y zona de cultivo (Bolívar, 2009).

El pericarpo comprende tres secciones de diferentes características; las dos más externas, epicarpo y mesocarpo, se llaman por lo común pulpa; la interna o endocarpo es el pergamino, que al madurar se separa y cubre la semillas (León, 1987).

g) SEMILLA

La semilla de café está constituida principalmente por el endospermo. El endospermo es coriáceo, verdoso o amarillento y forma un repliegue que se inicia en el surco de la cara plana. Está protegido por una cubierta muy delgada conocida como película plateada y a esta a su vez protegida por el pergamino (Alvarado y Rojas, 2007). En uno de los extremos y de manera superficial se encuentra un embrión de 3.5 a 4.5 mm de largo, de radícula cónica y cotiledones cordiformes (Arcila, 1990).

León (1987), afirma que la drupa contiene 2 semillas planoconvexas, separadas por el tabique interno del ovario. Además, en la semilla de café el lado externo es convexo y liso y el interno plano, con un surco longitudinal. Mide los tipos comerciales de 9 a 18 mm de largo por 6 a 10 mm de ancho y 4 a 8 mm de grosor.

El endospermo se caracteriza por ser coriáceo, verdoso o algunas veces amarillento y forma un repliegue que se inicia en el surco 6 de la cara plana, además, se encuentra protegido por una cubierta muy delgada conocida como pelicular plateada y esta a su vez por el pergamino.

El embrión se encuentra en la parte basa y es reducido; puede medir de 1 a 2 mm, posee un hipocotilo y dos cotiledones yuxtapuestos y mide de 2 a 5 mm de largo (Alvarado y Rojas, 2007).

2.2. CULTIVO DE TEJIDOS EN CAFÉ

Es el conjunto de técnicas que permiten que un explante, con potencial de diferenciación, se desarrolle al estar en contacto con un medio de cultivo de composición química definida, bajo condiciones de asepsia y condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991; Abdelnour y Escalant, 1994). Por este método, se puede aumentar la tasa de multiplicación de genotipos élite de café en un tiempo relativamente corto (Solano, 2001)

La propagación de café por técnicas de cultivo *in vitro* es por dos vías: organogénesis (microestacas) o embriogénesis somática (Dublin, 1984; García y Rafael, 1989; Berthouly, 1997).

2.3. MICROESTACAS

La propagación *in vitro* por microestacas, consiste en el cultivo de un nudo o entrenudo proveniente de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas, idénticas a la planta madre (García y Rafael, 1989; Solano, 2001).

Comprende tres fases: instalación del material vegetal *in vitro*, obtención de microtallos provenientes de la inducción de yemas axilares, multiplicación de los microtallos y enraizamiento *in vitro* de los microtallos y su aclimatación a condiciones de invernadero (Etienne *et al.*, 1999).

2.4. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es el proceso de formación de embriones asexuales o adventicios a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979); esto puede ocurrir debido a la totipotencia de las células vegetales, capacidad para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico a la célula madre (Berthouly, 1997).

Los embriones somáticos producidos son estructuras bipolares, con un eje radical y apical, sin conexión vascular con el tejido materno y con bandas procambiales entre los ápices (Zimmerman, 1993). Se desarrollan al pasar por las fases globular, corazón, torpedo y cotiledonal, idénticas a la del embrión cigótico (Ammirato, 1983). Además, tienen la capacidad de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret, 1991; Von Arnold *et al.*, 2002); por su naturaleza bipolar, es posible la alta velocidad de multiplicación (Escalant y Teissont, 1989; Zimmerman, 1993).

El sistema para la regeneración de plantas vía embriogénesis somáticas incluye las etapas de inducción de embriones somáticos, desarrollo de embriones somáticos, proliferación, maduración, germinación y conversión a plantas (Freire, 2003).

La inducción de embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo reemplazado por un programa de expresión del gen o genes de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante donde se dio lugar a la aparición de embriones (Gómez, 1998).

La embriogénesis somática se puede obtener por dos medios: embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta.

2.4.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA

En la embriogénesis somática directa o de baja frecuencia se obtiene embriones a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo (Sondahl *et al.*, 1991; Denchev *et al.*, 1992; Berthouly y Etienne, 1999; Quiroz *et al.*, 2002) o por una escasa formación de callo en los bordes de los explantes.

Para llevarse a cabo, se requiere de la síntesis de una sustancia inductora o la eliminación de una sustancia inhibidora para que estas células reanuden su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico (Sondahl *et al.*, 1991; Quiroz *et al.*, 2002).

Berthouly (1997) afirma que los embriones somáticos obtenidos por embriogénesis somática directa son limitados en comparación con la embriogénesis somática indirecta; sin embargo, reduce la variación somaclonal obteniendo una mayor uniformidad genética (Molina y Figueroa, 1996; Vicient y Martínez, 1998; Berthouly y Etienne, 1999).

2.4.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA

Según Denchev *et al.* (1992), Berthouly y Etienne (1999), los embriones se forman a partir de callos mediante el uso de un primer medio de cultivo de inducción de callos embriogénicos y un segundo medio para la regeneración de embriones.

La embriogénesis somática indirecta requiere de la redeterminación de células diferenciadas de la proliferación de callo y de la inducción de células embriogénicas determinadas con una sustancia mitogénica o estar expuestas a concentraciones específicas de reguladores de crecimiento para entrar de nuevo al ciclo mitótico (Sondahl *et al.*, 1991).

2.4.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

a) GENOTIPO

Litz (1984) afirma que la respuesta callogénica y embriogénica depende del genotipo de la planta evidenciado en las diferentes reacciones a un medio determinado entre diferentes cultivares o variedades; es decir, algunos cultivares o variedades se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio.

El éxito de la embriogénesis somática en el café varía de acuerdo a los genotipos cultivados (Sondahl *et al.*, 1991); Berthouly y Etienne (1999) al inducir callos embriogénicos en café, observaron un efecto del genotipo entre las especies *C. arabica* y *C. canephora* y entre las variedades de cada una de estas.

b) EXPLANTE

Se denomina explante a la parte de un tejido u órgano que se aísla del resto de la planta y que se utiliza como material inicial para el cultivo *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991). Cualquier parte de la planta se puede utilizar pero, lo recomendable en café son los tallos, hojas, óvulos, anteras y protoplastos (Berthouly, 1997; Etienne *et al.*, 1999); siendo las hojas la mejor fuente de explante para la inducción de embriogénesis somática por su disponibilidad y fácil desinfección (Dublin, 1991).

La respuesta de los explantes al cultivo *in vitro* varía notablemente de acuerdo con el estado de desarrollo y edad ontogénica de la planta madre (Mroginski y Roca, 1991; Tisserat, 1991). Cuanto más joven sea el tejido utilizado (estadio juvenil poco diferenciado) más fácil será desviarlo de su programa genético y así obtener la desdiferenciación hacia la forma de embriogénesis somática (Abdelnour y Escalant, 1994).

García y Menéndez (1987) realizaron experimentos exitosos con café usando explantes foliares jóvenes de los tres nudos superiores de tallos ortotrópicos y plagiotrópicos. También López-Gómez *et al.* (2010) indican que los explantes provenientes de hojas inmaduras y hojas jóvenes de *Coffea canephora* y *Coffea arabica* presentan mejor capacidad de respuesta embriogénica.

También es importante el estado fisiológico de la planta; según Berthouly *et al.* (1987), si la planta presenta deficiencia de algunos elementos puede perjudicar la inducción de embriogénesis somática.

c) MEDIO DE CULTIVO

En la mayoría de especies se ha utilizado el medio Murashige y Skoog (1962), ya que es beneficioso para la embriogénesis somática por su alta concentración de sales (Ammirato, 1983), o sus modificaciones (Evans *et al.*, 1981; Litz y Jarret, 1991). Estas modificaciones consisten en reducir la proporción de macro y micro nutrientes, como el caso del medio de cultivo propuesto por Yasuda *et al.* (1985) y Hatanaka *et al.* (1991) para embriogénesis somática en café.

Barry-Etienne *et al.* (2002) afirman que la inducción de embriogénesis somática se puede realizar en medios sólidos y líquidos; sin embargo, en los medios líquidos ocurren anomalías morfológicas, desarrollo asincronizado y tamaño heterogéneo, aunque es controlado con el uso de recipientes de inmersión temporal automatizada.

Existen varios componentes que puede suministrar el medio de cultivo para estimular la embriogénesis somática, estos son: el hierro, nitrógeno como amonio o nitrato, glutamina, alanina, caseína hidrolizada (Litz y Jarret, 1991; Berthouly, 1997; Halperin y Wetherell, 1964; Wetherell y Dougal, 1976; Ammirato y Steward, 1971; Havránek y Vagera, 1979). Además, altas dosis de sacarosa favorece la embriogénesis somática (Abdelnour y Escalant, 1994).

d) REGULADORES DE CRECIMIENTO

La embriogénesis somática directa se induce en medios provistos solo de citoquininas como regulador de crecimiento, mientras que la embriogénesis somática indirecta se induce en medios ricos en auxinas en la primera etapa y ricos en citoquininas en las etapas posteriores. También se puede inducir la embriogénesis somática en café en una sola etapa, en un medio que solo contenga una citoquinina (Dublin, 1981) o en una mezcla de citoquinina y de auxina (Pierson *et al.*, 1983).

Las citoquininas pueden inducir la formación de embriones somáticos sin necesidad de callogénesis o con una mínima formación de callo. Además, son esenciales en la etapa de maduración y la germinación de embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991). En el café se ha utilizado bencilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2-iP) y 6-furfurilaminopurina (KIN).

Las auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), actúan en el agrandamiento y alargamiento celular pero, también son usadas en la división celular (Krikorian, 1991). Se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de callo embriogénico; 2,4-D inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo. Sin embargo, la maduración y germinación no ocurre en presencia de 2,4-D (Halperin y Wetherell, 1964); por eso se debe remover o usar concentraciones bajas.

Según Evans *et al.* (1981), la inducción de embriones somáticos requiere de una concentración alta de auxinas en el medio como 2,4-D, ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA). También otras auxinas sintéticas tales como el picloram, el ácido 2,4,5- triclofenoxiacético (2,4,5-T), el ácido 2-benzothiazol acético y el ácido paraclorofenoxiacético han demostrado ser efectivas (Litz y Jarret, 1991).

e) CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La luz, temperatura, humedad y medio gaseoso son parámetros físicos importantes para tener en cuenta para la inducción de embriogénesis somática.

Litz y Jarret (1991) afirman que una alta intensidad lumínica es esencial para la inducción de embriogénesis somática en *Nicotiana tabacum*, mientras que la oscuridad se recomienda para el desarrollo y maduración normal de los embriones somáticos en *Daucus carota* y *Carum* sp. Sin embargo; en café, se ha obtenido embriones somáticos en luz continua, en oscuridad o en un régimen luz-oscuridad (Sondhal *et al.*, 1991).

La temperatura y humedad relativa en la cual se ha obtenido embriones somáticos es de 26-27°C y 70%, respectivamente.

El medio gaseoso en el recipiente del cultivo ejerce cierta influencia sobre el proceso embriogénico (Rodríguez y Preil, 1999). En *Coffea arabica* cv. Caturra roja a medida que aumenta la concentración de CO₂ hasta 5% favorece la embriogénesis somática; mientras que, con una concentración de 10% de CO₂ en la mezcla gaseosa se observa una inhibición del proceso embriogénico (Rodríguez y Preil, 1999).

f) MANEJO DE LA CONTAMINACIÓN

El éxito de la embriogénesis somática y del cultivo de tejido en general depende del desarrollo libre de contaminación.

Abdelnour y Escalant (1994) mencionan que el medio de cultivo provisto de nutrientes y hormonas motivan el crecimiento y proliferación de microorganismos contaminantes llamados vitropatógenos.

La contaminación puede tener dos orígenes: los microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y los microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio (Debergh y Zimmerman, 1991). Por ello, es importante la desinfección superficial de explantes, esterilización de los medios de cultivo, desinfección de los instrumentos, de la cámara de flujo laminar y limpieza de los cuarto de trabajo (Abdelnour y Escalant, 1994).

Para la desinfección superficial de hojas se han usado soluciones de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio a diferentes concentraciones y tiempo de inmersión, además de cloruro de mercurio y etanol al 70%; sin embargo, Sondahl *et al.* (1991) indican que los dos últimos agentes desinfectantes son tóxicos para las hojas del café.

Previo a la desinfección superficial, las hojas se pueden lavar con una solución de detergente comercial. Además, agregar detergente Tween 20 a la solución desinfectante para romper la tensión superficial y permitir que el explante este en mejor contacto con el químico (Abdelnour y Escalant 1994).

Se debe tener en cuenta ciertas características del material vegetal a elegir como explante para que se presente la menor tasa de contaminación posible. Los brotes nuevos son más limpios que los viejos y los materiales que crecen en invernadero son más limpios que los que se mantienen en campo (Abdelnour y Escalant, 1994).

g) MANEJO DE LA OXIDACIÓN

El establecimiento del cultivo *in vitro* se ve impedido por la aparición de oscurecimiento y necrosis de los tejidos (Dalal *et al.*, 1992; Marks y Simpson, 1990; Yu y Meredith, 1986).

El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y, en consecuencia, inhiben el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Read y Economou, 1987).

Los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante y la composición del medio de cultivo (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006 y Abdelwahd *et al.*, 2008).

Azofeifa (2009) menciona diferentes estrategias para disminuir la oxidación: (1) usar explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo, (2) crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad, (3) crecimiento del explante a una temperatura baja, (4) subcultivos frecuentes, (5) cultivo en medio líquido, (6) uso de adsorbentes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo y (7) uso de antioxidantes previa desinfección de explantes. Para la última estrategia mencionada, Abdelnour y Escalant (1994) recomiendan la inmersión en solución esterilizada de 100 mg/L de ácido ascórbico y 150 mg/L de ácido cítrico. También se podría reducir la duración del proceso de escisión y de esterilización del explante o con la sustitución del agente desinfectante.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (Av. La Molina N°1981, La Molina, Lima).

3.2. MATERIALES

3.2.1. MATERIAL VEGETAL

a) PLANTAS DE CAFÉ PROVENIENTES DE CAMPO

Plantas de café de cuatro años de edad, ubicadas en el fundo “Aroma de Montaña” (Villa Rica, Coordenadas UTM: X: 470212 y Y: 8814827).

b) PLANTAS DE CAFÉ MANTENIDAS EN INVERNADERO

Plantones de café de las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95, de seis meses de edad, provenientes del vivero “Aroma de Montaña” (Jr. Oxapampa 333-Villa Rica, WGS84 UTM 18 S, X: 470212 y Y: 8814827). Estas plantas se mantuvieron en el Invernadero de Plantas Madre de la Subdirección de Biotecnología del INIA.

La variedad Castillo se obtuvo por el cruce de la variedad Caturra y el Híbrido de Timor (Alvarado *et al.*, 2005). Entre sus características más importantes está la resistencia a la roya del café, el tamaño de sus granos es superior a 80% de café supremo y su calidad en taza es similar a la obtenida en las variedades Típica, Tabi, Borbón. Caturra y Colombia (Alvarado *et al.*, 2005).

La variedad Catuaí tiene como progenitores a las variedades Mundo Novo y Caturra amarillo, resultado de la selección pedigree. Las plantas de esta variedad son compactas, con brotes de las hojas color verde y con buen potencial de rendimiento y calidad, pero susceptible a roya (World Coffe Research, 2016).

La variedad Costa Rica 95 es el resultado de cruces entre las variedades Caturra Roja y el Híbrido de Timor (ICAFE, 1995) por una selección de plantas individuales a través de generaciones sucesivas. Esta variedad es de porte menor que Caturra, forma cónica, ramas cortas, frutos rojos, brotes bronce intenso y resistente a la roya. Produce entre 25 y 35% más que las variedades Caturra o Catuaí según la zona (CENICAFE, 2010). Además, tiene un potencial de rendimiento alto pero bajo potencial de calidad mostrado en altura (World Coffee Research, 2016).

3.2.2. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Agitador orbital
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar horizontal
- Estereoscopio
- Destilador

3.2.3. INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- Jarra 2000ml
- Matraz de Erlenmeyer 500ml
- Pipetas serológicas 1ml, 10ml
- Micropipeta
- Probeta graduada 2000ml, 1000ml, 500ml
- Frascos y placas petri autoclavables
- Placas petri estériles descartables
- Pinzas
- Mango de bisturí N°7
- Hojas de bisturí N°10
- Mechero de alcohol
- Algodón y papel toalla
- Parafilm

3.2.4. REACTIVOS E INSUMOS

- Sales
 - Sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962).
- Vitaminas
 - Tiamina.HCl
 - Ácido nicotínico
 - Piridoxina.HCl
- Carbohidratos
 - Sacarosa
- Reguladores de crecimiento
 - 2,4-D
 - KIN
 - BAP
- Antioxidantes
 - Ácido ascórbico
- Agente gelificante
 - Agar
- Otros
 - Detergente
 - Benomyl
 - Myo-inositol
 - Alcohol 70%
 - Alcohol 90%
 - Tween 20
 - Agua destilada

3.3. PROCEDIMIENTOS

3.3.1. ENSAYO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL

a) PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado estuvo compuesto por las sales inorgánicas MS (Anexo 1) diluído a la mitad, sacarosa (30g/L), agar Sigma (7g/L) y a un pH ajustado a 5.6 ± 0.1 con KOH o HCl. Esterilizado en autoclave a 121°C y 15 lb por 15 minutos.

En condiciones estériles de cámara de flujo laminar, el medio autoclavado se distribuyó en placas petri estériles (20ml/placa).

b) SELECCIÓN DE HOJAS DE CAFÉ PARA EXPLANTE

En el ensayo de desinfección se evaluó el uso de hojas de café provenientes de campo y de invernadero (Figura 1a). Las hojas jóvenes colectadas pertenecían al primer o segundo par cercano a las yemas apicales de la planta, libres de síntomas o signos de plagas y enfermedades.

Las hojas provenientes de campo se conservaron en papel toalla humedecido con agua destilada.

c) DESINFECCIÓN SUPERFICIAL

Las hojas se lavaron con detergente comercial (Figura 1b) y se enjuagaron con agua de grifo. Luego, se remojaron en fungicida Benomyl (2g/L) (Figura 1c) por una hora y se enjuagaron de tres a cuatro veces con agua destilada.

En condiciones estériles, se distribuyeron las hojas para ser desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) a diferentes concentraciones y tiempo de inmersión (Cuadro 2). A todos los tratamientos de desinfección se agregó dos gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución desinfectante. Al finalizar el tiempo de desinfección de cada tratamiento, las hojas se enjuagaron tres a cuatro veces con agua destilada estéril (Figura 1d).

En el caso de los tratamientos T4 y T5, se preparó una solución antioxidante con ácido ascórbico (0.01 g/L) y se aplicó por inmersión durante 10 minutos previo a la desinfección superficial con hipoclorito de sodio.

Cuadro 2: Tratamientos de desinfección superficial de hojas de café

Tratamiento	Descripción
T0	0% NaClO
T1	2.6% NaClO por 30 minutos
T2	1% NaClO por 10 minutos
T3	2% NaClO por 5 minutos
T4	Solución antioxidante + 1% NaClO por 10 minutos
T5	Solución antioxidante + 2% NaClO por 5 minutos

FUENTE: Elaboración propia, 2018

d) SIEMBRA Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Las hojas desinfectadas se diseccionaron, descartando nervadura central, en explantes de 1 cm². Luego, se sembraron cinco explantes en una placa Petri (Figura 1e). Después de sellar las placas con parafilm y rotularlas, se incubaron a 26°C, fotoperiodo de 16 horas luz y 70% de humedad relativa, por 15 días (Figura 1f).

e) VARIABLES EVALUADAS

– Tasa de contaminación

Se calculó al dividir el número de explantes contaminados, ya sea por hongos y/o bacterias, entre el total de explantes en una placa, por 100.

Se reconoció la presencia de hongos y bacterias al observar micelio y secreción de mucílago, respectivamente.

– Tasa de oxidación

Se calculó al dividir el número de explantes que cambiaron de color verde a negro total o parcialmente, entre el total de explantes multiplicado por 100.

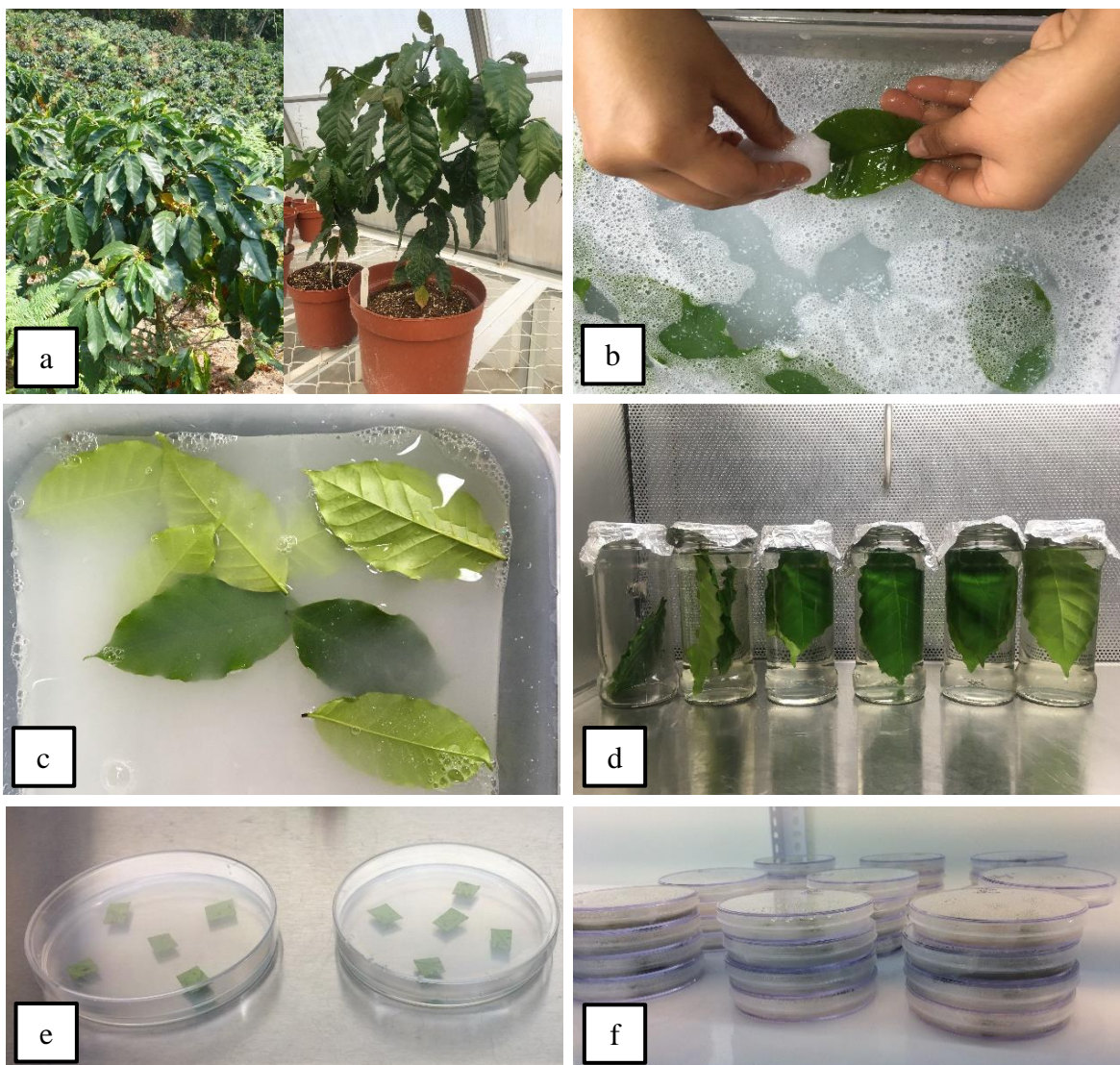


Figura 1: Procedimiento del ensayo de desinfección superficial a) Plantas de café de campo e invernadero; b) Lavado de hojas con detergente comercial; c) Hojas remojadas en Benomyl; d) Hojas sometidas a los tratamientos con NaClO; e) Siembra de explantes en medio de cultivo; f) Incubación a 26°C, 70% humedad y fotoperiodo 16h luz.

f) DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental estuvo compuesto por seis tratamientos (incluyendo testigo) y 10 repeticiones; siendo una repetición, una placa con cinco explantes (cada explante fue una unidad experimental).

Al analizar estadísticamente los datos, estos no cumplían los supuestos que exige un DCA (normalidad de errores y homogeneidad de varianzas); por ello, se realizó la

prueba no paramétrica Kruskal Wallis utilizando la función *kruskal.test* y para las comparaciones múltiples se utilizó la función *pairwise.wilcox.test*, ambas funciones pertenecen al paquete *stats*. Se empleó el *software* R versión 3.5.0, a un nivel de significación de 0.05.

3.3.2. ENSAYO DE INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El ensayo consistió en evaluar diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, citoquininas y auxinas en el medio de cultivo, para la inducción de embriogénesis somática en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95.

Cuadro 3: Tratamientos para inducción de embriogénesis somática en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95

Tratamiento	Regulador de crecimiento	Concentración (mg/L)
T0	-	-
T1	BAP	2
T2	BAP	4
T3	BAP	6
T4	KIN	2
T5	KIN	4
T6	KIN	6
T7	2,4-D	0.1
T8	2,4-D	0.5
T9	2,4-D	1.0
T10	2,4-D + KIN	0.1 + 1.5
T11	2,4-D + KIN	0.5 + 1.5
T12	2,4-D + KIN	1.0 + 1.5

FUENTE: *Elaboración propia, 2018*

a) PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Los medios de cultivo estuvieron compuestos por sales MS (Anexo 1) a la mitad de concentración; vitaminas usadas por Yasuda *et al.* (1985) para la inducción de embriogénesis somática en café: piridoxina (1mg/L), ácido nicotínico (1mg/L) y

tiamina (1mg/L); myo-inositol (100mg/L), sacarosa (30g/L), agar (7g/L) y por el regulador de crecimiento correspondiente para cada tratamiento (Cuadro 3).

Después de ajustar el pH a 5.6 ± 0.1 y autoclavar el medio a 120°C y 121kPa; en condiciones *in vitro*, los medios de cultivo se distribuyeron en placas petri estériles (20ml/placa) (Figura 3a).

b) SELECCIÓN DE HOJAS DE CAFÉ PARA EXPLANTE

Se colectó el primer par de hojas jóvenes de plantas de seis meses (Figura 3b), de las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95, provenientes de invernadero. Estas hojas estaban libre de síntomas o signos de plagas y enfermedades.

c) DESINFECCIÓN SUPERFICIAL

Las hojas de las tres variedades de café se lavaron con detergente comercial y se enjuagaron con agua de grifo. Luego, se remojaron en fungicida Benomyl (2g/L) por una hora y se enjuagaron de tres a cuatro veces con agua destilada (Figura 3c).

En condiciones estériles, se realizó la desinfección superficial (Figura 3d) con la concentración y tiempo de inmersión de hipoclorito de sodio correspondiente al tratamiento del ensayo previo con mejores resultados (T3: 2% NaClO por 5 minutos). Se enjuagó tres a cuatro veces con agua destilada estéril.

d) SIEMBRA Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Las hojas desinfectadas se diseccionaron, descartando nervadura central, en explantes de 1 cm² (Figura 3e). Luego, se sembraron cinco explantes en una placa petri (Figura 3f). Después de sellar las placas con parafilm y rotularlas, se incubaron a 26°C, oscuridad y 70% de humedad relativa (Figura 3g).

e) VARIABLES EVALUADAS

- Tasa de callogénesis

Se calculó al dividir el número de explantes con presencia de callos entre el total de explantes en una placa, por 100, al transcurrir cuatro semanas de establecido el ensayo.

- Inicio de callogénesis
En semanas después de siembra (SDS), al observar en los explantes la aparición de los primeros callos.
- Nivel de inducción de callogénesis
Se entiende como nivel de inducción de callogénesis a la cobertura del explante por la presencia de callos. Para ello, se elaboró una escala (Cuadro 4, Figura 2).

Cuadro 4: Escala de nivel de inducción de callogénesis

Nivel de inducción	Descripción
0	0% del borde del explante con presencia de callos.
1	$\geq 0\%$ - $\leq 25\%$ del borde del explante con presencia de callos.
2	$>25\%$ - $\leq 50\%$ del borde del explante con presencia de callos.
3	$>50\%$ - $\leq 75\%$ del borde del explante con presencia de callos.
4	$>75\%$ - $\leq 100\%$ del borde del explante con presencia de callos.

FUENTE: Elaboración propia, 2018

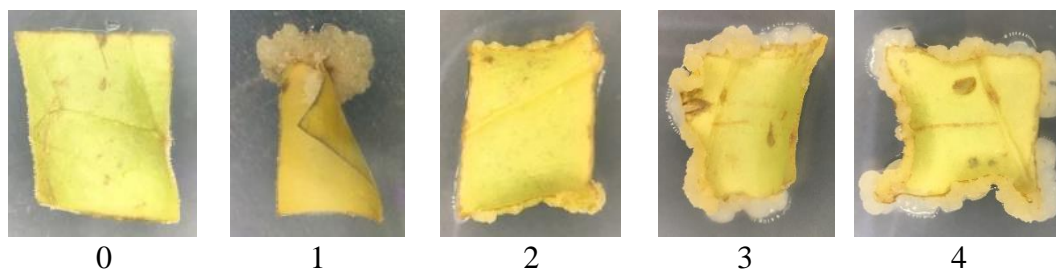


Figura 2: Escala de nivel de inducción de callogénesis

FUENTE: Elaboración propia, 2018

- Tamaño de callos
Se obtuvo al medir la masa de callo más grande de un explante a las cuatro semanas de establecido el ensayo o al notar la aparición de formación de embriones somáticos; para ello, se utilizó el estereoscopio Nikon modelo SMZ 800N y su *software* NIS-Element (versión 4.40).

- Tasa de embriogénesis

Se calculó al dividir el número de explantes con presencia de callos embriogénicos y/o embriones somáticos entre el total de explantes en una placa, por 100.

- Inicio de embriogénesis somática

En semana después de siembra (SDS), al observar en los explantes la aparición de callo embriogénico y/o embriones somáticos.

- Número total de embriones somáticos

Se calculó el aproximado de embriones somáticos que estén presentes en un explante en sus diferentes estados de desarrollo. Para llevar a cabo esta evaluación, se usó el estereoscopio Nikon modelo SMZ 800N bajo condiciones estériles.

f) DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental estuvo compuesto por 13 tratamientos (incluyendo testigo) y 10 repeticiones del ensayo; siendo una repetición, una placa con cinco explantes (cada explante fue una unidad experimental).

Al analizar estadísticamente los datos, estos no cumplían los supuestos que exige un DCA (normalidad de errores y homogeneidad de varianzas); por ello, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis utilizando la función *kruskal.test*. Para las comparaciones múltiples; se utilizó la función *pairwise.wilcox.test* y *kruskal* del paquete *stats* y *agricolae*, respectivamente. Se empleó el *software* R versión 3.5.0, a un nivel de significación de 0.05.

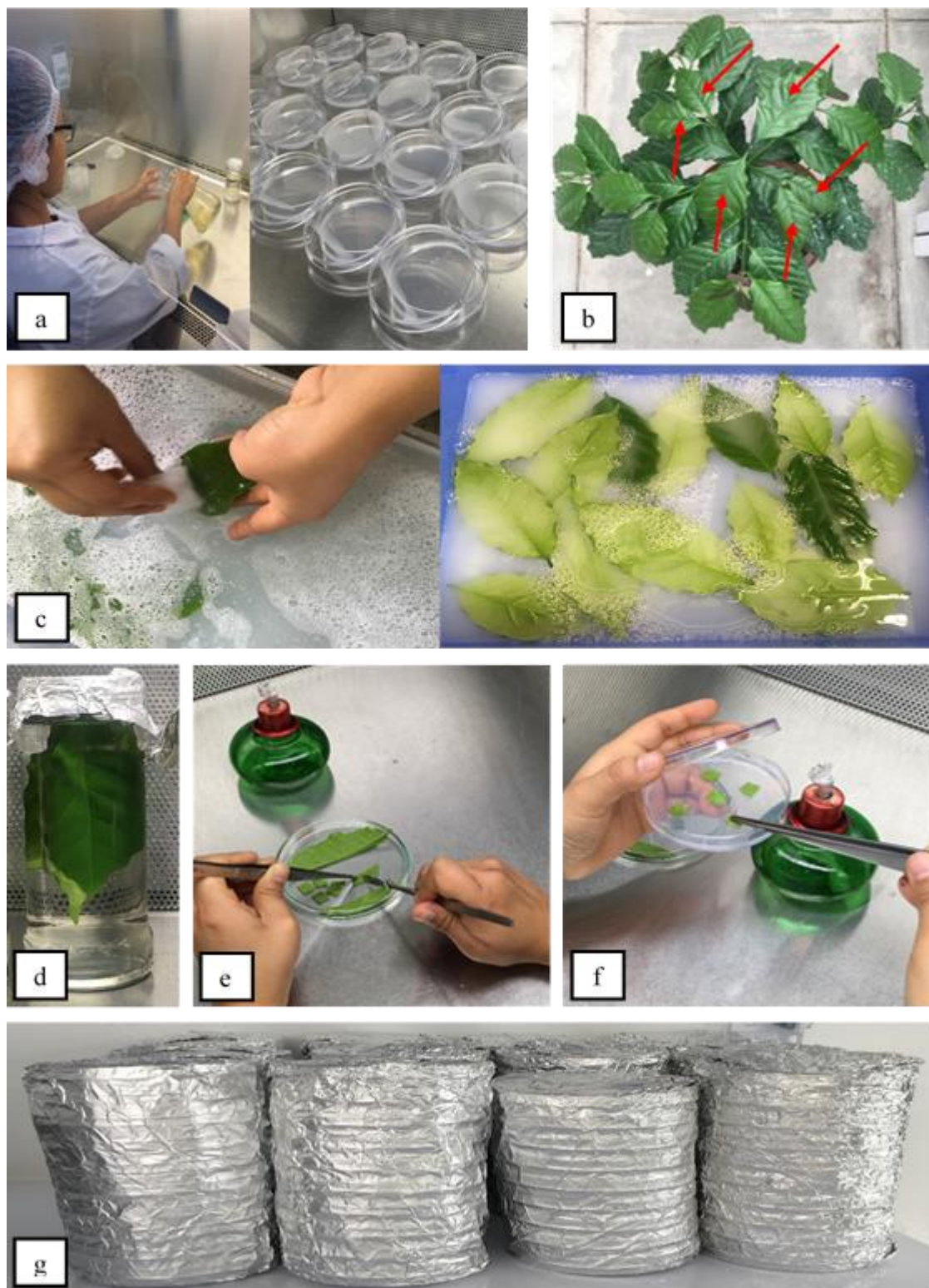


Figura 3: Procedimiento del ensayo de inducción de embriogénesis somática a) Plaqueo de los medios de cultivo; b) Hojas de café utilizadas para embriogénesis; c) Lavado en detergente y remojo en Benomyl; d) Hojas sometidas a desinfección con NaClO; e) Disección de hoja para obtener explantes; f) Siembra de explantes en medio de cultivo; g) Incubación a 26°C, 70% humedad y oscuridad total.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. ENSAYO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL

Cuadro 5: Porcentaje de contaminación y oxidación de explantes foliares

Procedencia hojas	Variables	Tratamientos					
		T0	T1	T2	T3	T4	T5
Campo	Contaminación (%)	100	80	90	100	100	100
	Oxidación (%)	0	0	0	0	0	0
Invernadero	Contaminación (%)	34	0	6	0	6	0
	Oxidación (%)	0	0	0	0	0	0

4.1.1. TASA DE CONTAMINACIÓN

Según los resultados expuestos en el Cuadro 5, los explantes de hojas provenientes de campo presentaron alta tasa de contaminación (80-100%) en todos los tratamientos de desinfección superficial. Respecto a los explantes de hojas provenientes de invernadero, presentaron baja tasa de contaminación (0-6%), sin diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de desinfección superficial con NaClO. La contaminación fue causada por hongos y bacterias (Figura 4).

A pesar que se seleccionó hojas libres de daños por patógenos, se presentó contaminación por hongos y bacterias. Las plantas situadas en campo sin ningún nivel de control ambiental conviven con microorganismos endófitos que no se presentan como patógenos en el campo; sin embargo, sí son perjudiciales cuando el material vegetal se introduce *in vitro*. A estos microorganismos perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro* son denominados vitropatógenos (Granados, 1995). Por esta razón, los explantes de

las plantas crecen en invernadero son más fáciles de desinfectar que las provenientes de plantas que crecen en el campo (Mroginski y Roca, 1991).

Resultados de López-Gómez *et al.* (2010) demuestran niveles de contaminación de cero a 54% en hojas jóvenes de café; asimismo, Gatica-Arias (2002) obtuvo de 30 a 80% de contaminación de explantes foliares de café con concentraciones y tiempos de inmersión mayores a los realizados en este ensayo.

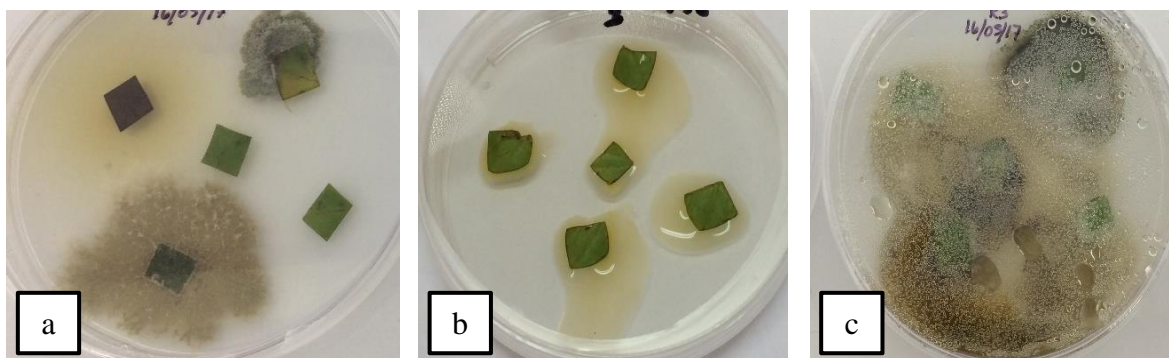


Figura 4. Agentes contaminantes en hojas de café a) Explantes contaminados por hongos; b) Explantes contaminados por bacteria; c) Explantes contaminados por hongos y bacterias.

4.1.2. TASA DE OXIDACIÓN

No se presentó oxidación en los explantes de hojas provenientes de campo ni en los de invernadero para todos los tratamientos, a los quince días de establecido el ensayo.

Los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo y la edad del material vegetal utilizado (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006; Abdelwahd *et al.*, 2008).

Los resultados favorables podrían deberse al uso de hipoclorito de sodio a una baja concentración y tiempo de inmersión, a comparación de otros procedimientos utilizados en hojas de café como el de López-Gómez *et al.* (2010) cuyos explantes presentaron valores de oxidación mayores al 50% al usar hasta 3.5% de hipoclorito de sodio. Según Sondahl *et al.* (1991), las soluciones de hipoclorito de sodio o de calcio son efectivas y no son tóxicas para las hojas de café a comparación del cloruro de mercurio y etanol al 70%. También se

tuvo en cuenta la edad del explante al usar hojas en estado juvenil, ya que presentan menor contenido de compuestos fenólicos que hojas maduras. Además; se utilizó las sales MS a la mitad de su concentración, Cassells y Curry (2001) mencionaron que el oscurecimiento del explante puede ser menor en un medio diluído que en uno alto en sales.

Estos resultados demuestran que para introducción *in vitro* se debe utilizar material vegetal proveniente de invernadero y que es necesario el uso de un agente desinfectante, como el hipoclorito de sodio. El procedimiento de desinfección superficial más eficiente respecto al uso de insumos y tiempo de inmersión fue el tratamiento T3 (2% NaClO por 5 minutos).

4.2. ENSAYO DE INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

4.2.1. TASA DE CALLOGÉNESIS E INICIO DE FORMACIÓN DE CALLOS

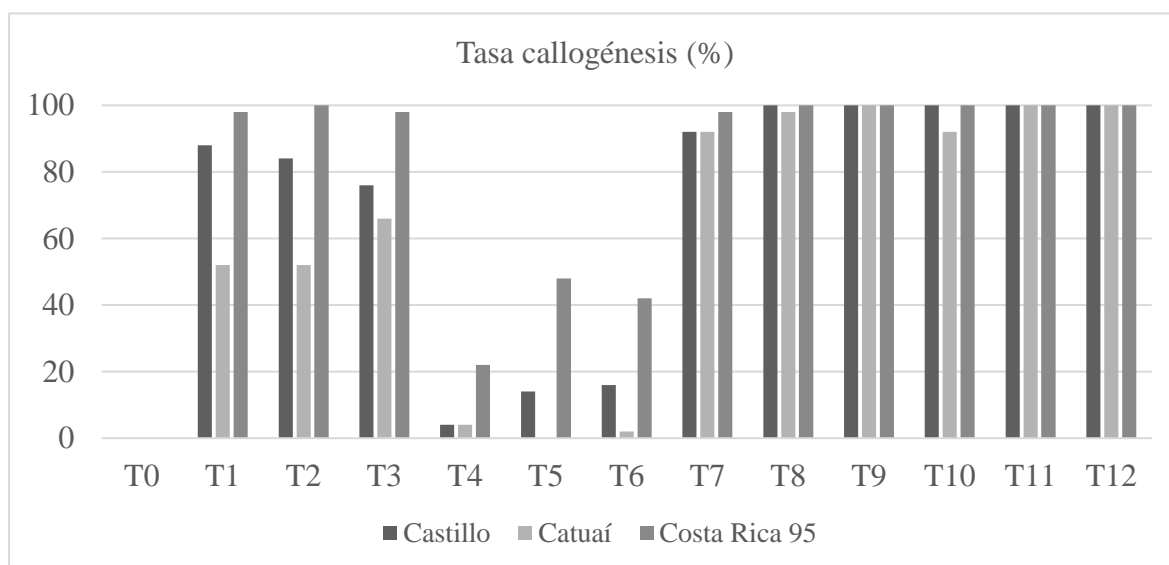


Figura 5. Tasa de callogénesis en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95

En la variedad Castillo; todos los explantes de los tratamientos T8, T9, T10, T11 y T12 presentaron formación de callos, seguido por los tratamientos T7, T1, T2 y T3 con 92%, 88%, 84% y 76% de los explantes con presencia de callos, respectivamente. Entre los tratamientos de mayor tasa de callogénesis y el resto de tratamientos mencionados no hay diferencias estadísticas significativas, excepto con el tratamiento T3. Además, no existen diferencias significativas entre los tratamientos de menor tasa de callogénesis (T6, T5, T4 y T0).

En la variedad Catuaí; a pesar que los tratamientos con mayor tasa de callogénesis fueron T9, T11 y T12, no existen diferencias estadísticas significativas con los tratamientos T8, T7 y T10. Los tratamientos T3, T2 y T1 presentaron una tasa de callogénesis de 66%, 52% y 52%, respectivamente; sin embargo, fueron estadísticamente iguales. Entre los tratamientos T4, T6 y T5 que tuvieron las menores tasas de callogénesis y con el testigo, no existen diferencias estadísticas significativas.

En la variedad Costa Rica 95, todos los tratamientos presentaron explantes con formación de callos. Los de más alta tasa de callogénesis fueron T2, T8, T9, T10, T11 y T12, seguidos por T1, T3 y T7, pero sin diferencias estadísticas significativas. Asimismo, los tratamientos con baja tasa de callogénesis (T5, T6 y T4) resultaron diferentes de manera significativa con los tratamientos antes mencionados.

Las tasas de callogénesis más altas (92-100%) en las tres variedades evaluadas resultaron en los tratamientos con 2,4-D en el medio de cultivo, ya sea solo (T7, T8 y T9) o en combinación con KIN (T10, T11 y T12). La adición de la auxina 2,4-D permite la inducción de callo, así lo reportaron Moncada *et al.* (2004), Paredes *et al.* (2013) y Morales (2017), al usar diferentes concentraciones de 2,4-D, solo o con una citoquinina, para obtener el 100% de explantes con presencia de callo en diferentes variedades de café.

Es importante recalcar que la tasa de embriogénesis abarca tanto los callos embriogénicos (Figura 6a) como los no embriogénicos (Figura 6b) ya que en un mismo explante se observa los dos tipos de callos.

En los tratamientos con citoquininas como reguladores de crecimiento (T1-T6) se obtuvo una tasa de callogénesis que varía de 0 a 100% según la concentración y tipo de citoquinina, siendo BAP el que mayor porcentaje de explantes con callo presentó. Estos callos eran pequeños y no diferenciados con el borde del explante, por lo que se les denomina callos de cicatrización (Figura 6c), observado también por Paz-Ramírez (2000), Gatica-Arias (2002) y López-Gómez (2010).

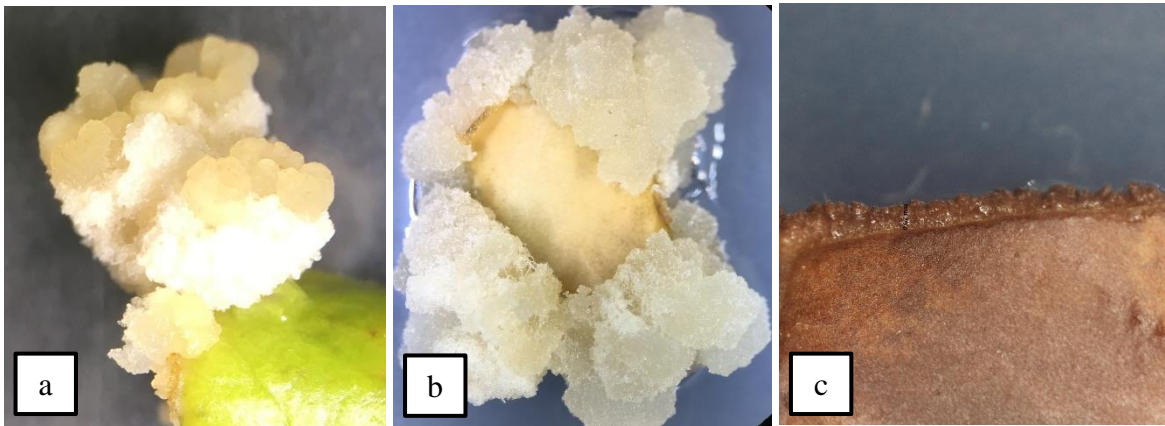


Figura 6. Tipos de callos a) Callos embriogénicos; b) Callos no embriogénicos; c) Callos de cicatrización

El inicio de formación de callos coincidió con los resultados obtenidos por Gatica-Arias (2002) y Morales (2017) en las variedades Caturra, Catuaí y Geisha. En el presente ensayo se observó callos a la primera semana en la variedad Catuaí, y entre la primera y segunda semana en la variedad Castillo y Costa Rica 95.

4.2.2. NIVEL DE INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS

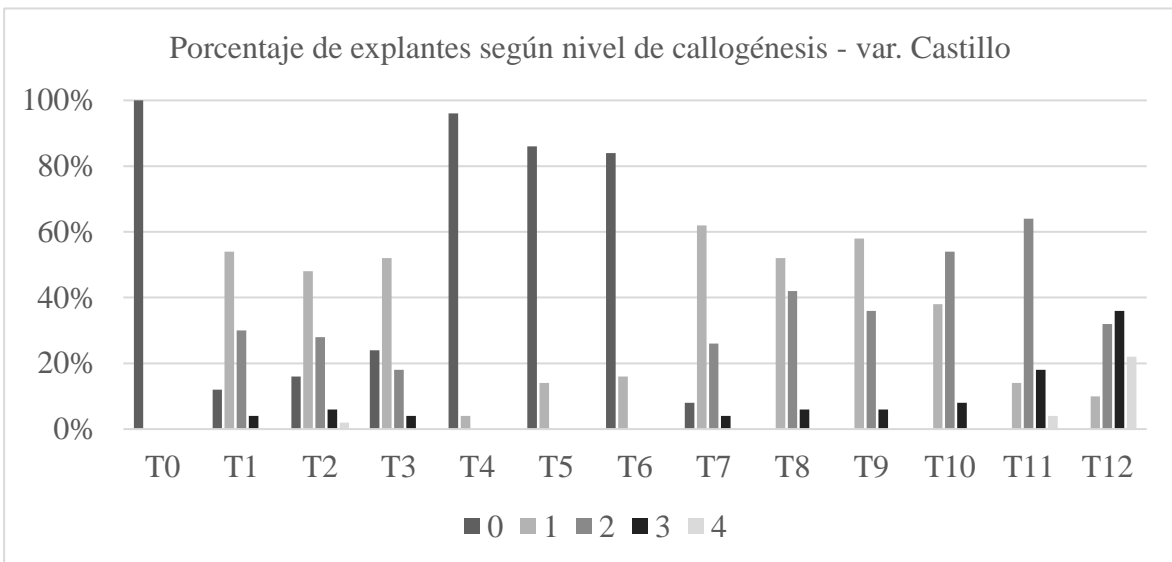


Figura 7. Porcentaje de explantes de la variedad Castillo según nivel de callogénesis

En la variedad Castillo, la mayoría de los explantes con callogénesis presentan un nivel de inducción de 1 y 2, según la escala elaborada (Cuadro 4). El tratamiento T12 presentó más

del 50% de explantes con nivel de inducción de callogénesis 3 y 4, siendo diferente estadísticamente con los demás tratamientos.

En la variedad Catuaí, los explantes con callogénesis de los tratamientos T1, T2 y T3 presentaron un nivel 1 de inducción, siendo iguales estadísticamente; mientras que, los explantes de los tratamientos T7 al T12 presentaron niveles de 1, 2 y 3 en la mayoría de los explantes. Además, los tratamientos T9 y T12 tuvieron explantes con hasta el 100% del borde con presencia de callos (nivel de inducción 4), sin diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos.

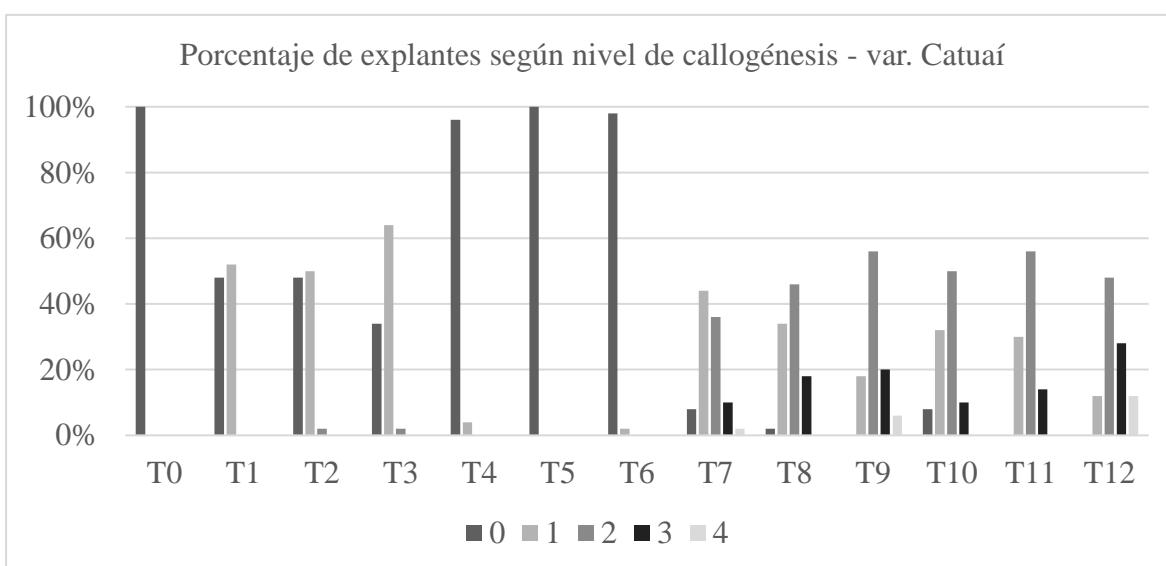


Figura 8. Porcentaje de explantes de la variedad Catuaí según nivel de callogénesis

En la variedad Costa Rica 95, los tratamientos T1, T2, T3, T7 y T9 presentaron los cuatro niveles de inducción de callogénesis. La mayoría de los explantes con callogénesis de los tratamientos T8, T9, T10, T11 y T12 presentaron los niveles de inducción más altos (3 y 4).

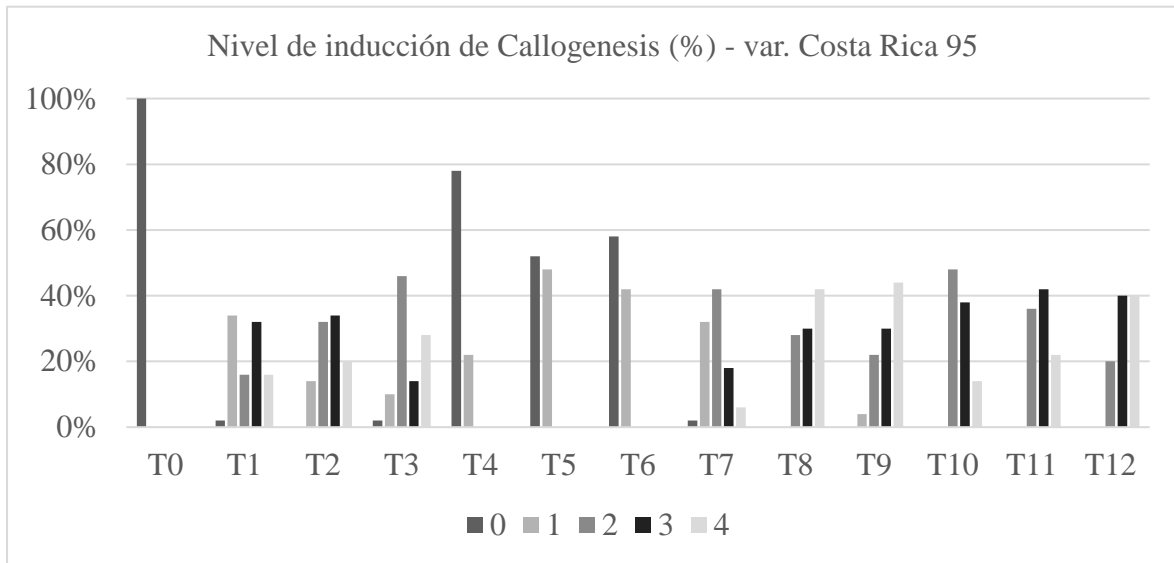


Figura 9. Porcentaje de explantes de la variedad Costa Rica 95 según nivel de callogénesis

En las tres variedades, no existe una relación entre el nivel de inducción de callogénesis y la presencia de callos embriogénicos. En otras palabras, los callos embriogénicos se observaron tanto en explantes con nivel 1 de inducción de callogénesis (hasta el 25% del borde del explante con presencia de callos), como en explantes con nivel 4 de inducción de callogénesis (hasta el 100% del borde del explante con presencia de callos).

4.2.3. TAMAÑO DE CALLOS

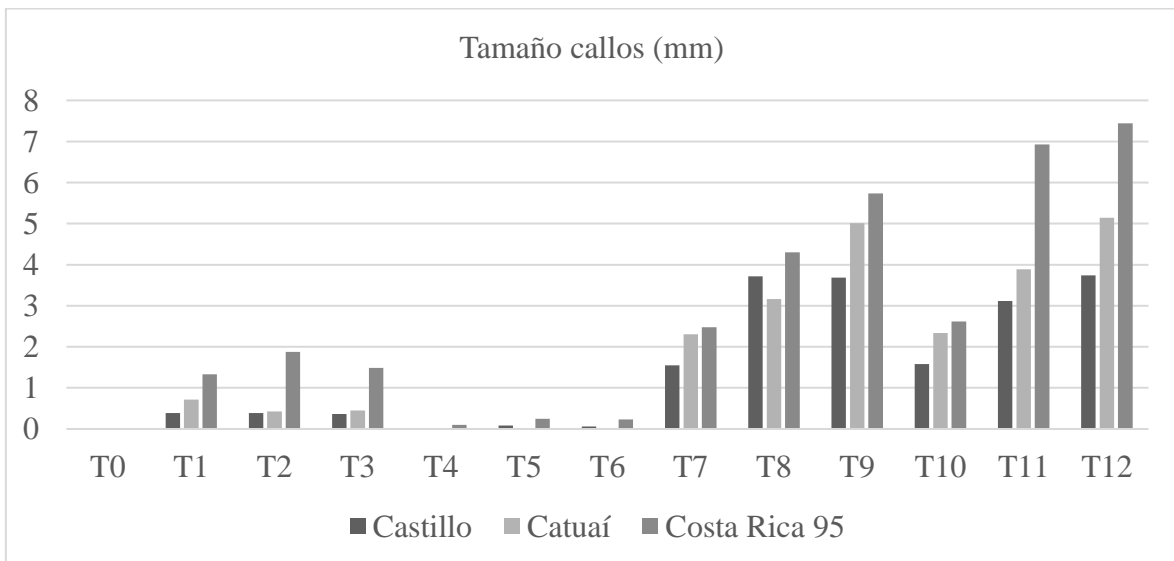


Figura 10. Tamaño de callos en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95

En la Figura 10 se presenta los resultados para tamaño de callos por tratamiento y variedad. Los explantes sometidos al tratamiento T12 fueron los que tuvieron mayor tamaño de callo en las tres variedades evaluadas. No obstante; otros tratamientos presentaron buenos resultados sin diferencias estadísticas significativas con el mejor tratamiento pero, sí con el resto de tratamientos, estos difirieron entre variedad: para Castillo, T8, T9 y T11; para Catuaí, T9; para Costa Rica 95, T11 y T9.

Los tratamientos con menor tamaño de callo promedio para las tres variedades fueron T4, T5 y T6. Estos fueron iguales estadísticamente entre ellos y con el tratamiento testigo pero, con diferencias significativas con los demás tratamientos.

Los medios de cultivo provistos de solo 2,4-D o en combinación con KIN estimularon la aparición de callos más vigorosos que en medios con solo citoquininas, esto guarda relación con lo evaluado por Moncada *et al.* (2004) al observar callos poco vigorosos en medios con solo 5.3 mg/L BAP.

El tamaño promedio de los callos de cicatrización fueron desde 0.3682 mm hasta 1.8756 mm en los tratamientos T1, T2 y T3; estos resultados fueron menores a los obtenidos por Gatica-Arias (2002) que al usar en el medio de cultivo 1mg/L BAP, los callos de la variedad Catuaí y Caturra tuvieron un tamaño de 2 mm pero, en esta investigación se observó que muchos explantes, principalmente de la variedad Catuaí, superaron los resultados anteriormente reportados.

Teixeira *et al.* (2004), obtuvieron callos embriogénicos que llegaron a 10 mm de longitud en un medio con auxinas y citoquinas (4.42 mg/L 2,4-D y 2 mg/L 2-iP) después de 24 semanas de cultivo; sin embargo, entre los callos embriogénicos y no embriogénicos de los tratamientos con 2,4-D (como T9) y la combinación de 2,4-D con KIN (como T12) llegaron a un tamaño promedio de 7.445 mm en alrededor de diez semanas de cultivo. Entonces, se puede afirmar que con una baja concentración de 2,4-D (1mg/L) y con la adición de KIN (1.5mg/L) se pueden desarrollar callos que pueden ser embriogénicos y no embriogénicos en menor tiempo que otros medios de cultivo anteriormente reportados para café.

Además, se observó que los callos embriogénicos fueron más pequeños que los callos no embriogénicos.

4.2.4. TASA DE EMBRIOGÉNESIS E INICIO DE FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

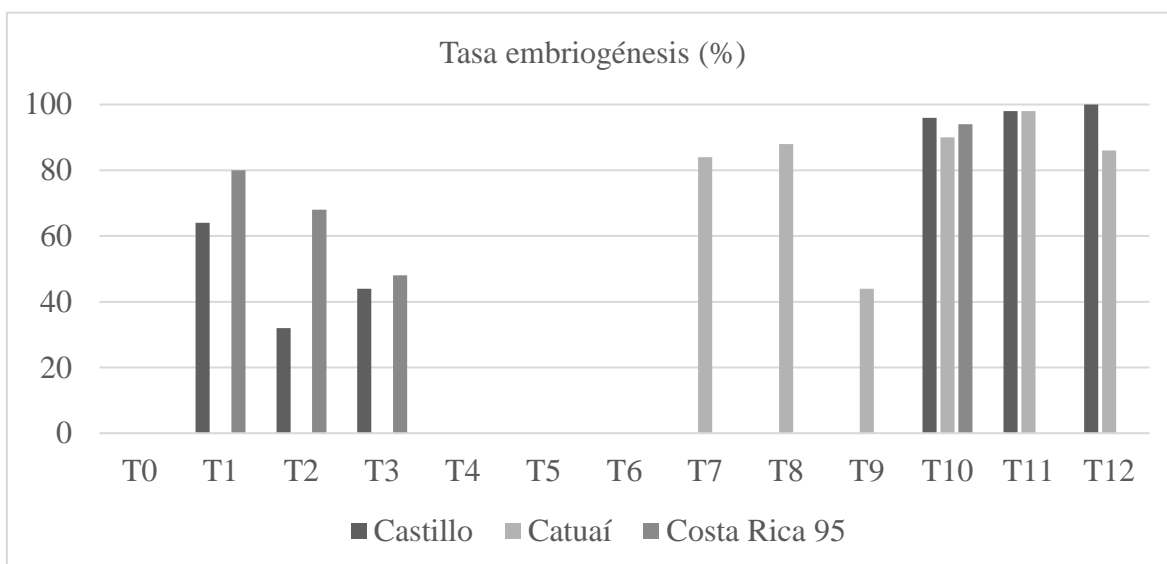


Figura 11. Tasa de embriogénesis en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95

En las tres variedades evaluadas, no todos los callos observados fueron del tipo embriogénico, por eso la tasa de embriogénesis fue menor a la tasa de calogénesis. Los resultados indican diferentes efectos de los tratamientos para cada variedad respecto a los sectores embriogénicos.

En la variedad Castillo, todos los explantes del tratamiento T12 presentaron sectores embriogénicos, seguido por T11 y T10, sin haber diferencias estadísticas significativas entre estos tres tratamientos. Los tratamientos T1 y T3 fueron diferentes significativamente con el mejor tratamiento pero, no con los tratamientos T11 y T10. El tratamiento T2 fue el que presentó el menor promedio de explantes con sectores embriogénicos, siendo diferente estadísticamente con el resto de tratamientos mencionados.

Los explantes de los tratamientos T7 al T12 de la variedad Catuaí presentaron sectores embriogénicos. Los tratamientos T11 y T10 tuvieron mayor tasa promedio de embriogénesis, seguidos por T8, T12 y T7, sin presentarse diferencias estadísticas significativas entre ellos. El tratamiento T9 presentó el menor número de explantes con

sectores embriogénicos, teniendo diferencias significativas con el tratamiento de mayor tasa promedio (T11).

En la variedad Costa Rica 95, hubo presencia de sectores embriogénicos en los tratamientos T1, T2, T3 y T10, sin haber diferencias estadísticas significativas entre ellos. El tratamiento de mayor tasa de embriogénesis fue T10 y el de menor fue T3.

Se indujo embriones somáticos en medios de cultivo suplementados con la citoquinina BAP como único regulador de crecimiento y con una mínima formación de callos (callos de cicatrización), propio de la inducción de embriogénesis somática del tipo directa (Figura 12a). Dublin (1981) afirma que la embriogénesis puede ser inducida en un medio con solo citoquinina; sin embargo, no se obtuvo embriones somáticos en los tratamientos con la citoquinina KIN, probablemente debido a que junto a otras adenilcitosininas solo tienen actividad en presencia de una auxina (Krikorian, 1991).

La inducción de embriogénesis somática directa se observó en las variedades Castillo y Costa Rica 95, excepto en la variedad Catuaí, esto también fue reportado por Gatica-Arias (2002). Gatica-Arias (2002) y López-Gómez (2010) obtuvieron tasas de embriogénesis de 40% al usar 1 mg/L BAP y 1.12 mg/L BAP, respectivamente. Asimismo, Paz-Ramírez (2000) indujo embriogénesis somática directa con 9 mg/L BAP. Sin embargo; los resultados de este ensayo evidenciaron la posibilidad de obtener hasta 80% de explantes inducidos a embriogénesis somática directa con una concentración de 2mg/L BAP.

En los tratamientos T1 (2mg/L BAP), T2 (4mg/L BAP) y T3 (6mg/L BAP), los embriones somáticos se formaron sobre el callo de cicatrización, reportado también por Dublin (1981), Peña (1983), García y Menéndez (1987), Gatica-Arias (2002).

Los explantes y sus callos de cicatrización se oscurecieron a las cinco semanas de iniciado el cultivo, previa formación de embriones. Gatica-Arias (2002) al usar el medio de Yasuda *et al.* (1985), provisto de 1 mg/L BAP, notó el oscurecimiento del callo de cicatrización a las cuatro semanas de cultivo; Morales (2017), observó el cambio a color marrón del callo al estar en contacto con 6.75 mg/L BAP.

El oscurecimiento del explante y callo de cicatrización no fue impedimento para la inducción de embriones somáticos. Dublin *et al.* (1991), mencionan que los embriones somáticos aparecen en que tejidos envejecidos. Quiroz-Figueroa *et al.* (2001), afirman que los compuestos fenólicos pueden actuar como sustancias inductoras o inactivar sustancia inhibitorias de la embriogénesis somática.

La mayoría de embriones somáticos generados por la vía directa se observaron después de 13 semanas de iniciado el cultivo. Mientras que Yasuda *et al.* (1985) y Etienne *et al.* (1999) reportaron embriogénesis somática directa a las 13 y 20 semanas, respectivamente.

Denchev *et al.* (1992) y Berthouly y Etienne (1999) afirman que la obtención de embriones somáticos a partir de callos se logra con el uso de dos medios de cultivo, uno de inducción de callo embriogénico y otro para la regeneración de embriones; el primero, con altas concentraciones de auxinas, solo o en combinación con citoquininas; y el segundo, disminuyendo la concentración de auxinas o eliminándolas del medio de cultivo. Muchos investigadores, entre ellos Teixeira *et al.* (2004), Moncada *et al.* (2004), Paredes *et al.* (2013) y Morales (2017), utilizaron dos medios en sucesión para producir embriones somáticos de café. Sin embargo, en la presente investigación se logró obtener embriones somáticos en un solo medio de cultivo, el resultado coincide con lo mencionado por Pierson *et al.* (1983) sobre la inducción de embriogénesis somática en café en una sola etapa, con una mezcla de citoquinina y auxina.

En el caso de la variedad Catuaí, se observaron embriones somáticos en los medios de cultivo con solo 2,4-D como regulador de crecimiento (T7, T8 y T9), probablemente se debió a que las hojas jóvenes de esta variedad presentan alta concentración de citoquininas endógenas. Sondahl *et al.* (1991), mencionan que las hojas jóvenes son ricas en citoquininas que inducen el desarrollo embriogénico. Además, Halperin (1966) indica que la inducción de embriones ocurre en presencia de auxina y el 2,4-D estimula o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo (Litz y Jarret, 1991).

Se indujo embriogénesis somática indirecta es decir, a partir de callos embriogénicos (Figura 12b), en las tres variedades evaluadas y con los medios de cultivo correspondientes a los tratamientos T7 al T12. El tratamiento T12 (1.0 mg/L 2,4-D y 1.5 mg/L KIN) presentó 86% a 100% de explantes con embriones somáticos según la variedad, a

comparación de otras investigaciones que arrojaron menor porcentaje de tasa de embriogénesis con similar combinación de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Moncada *et al.* (2004), con 1.0 mg/L 2,4-D y 2,7 mg/L BAP lograron un 17.3% de embriogénesis en la variedad Catuaí; Paredes *et al.* (2013), usaron 0.5 mg/L 2,4-D y 2 mg/L KIN y obtuvo el 10% de explantes de la variedad Robusta con embriones somáticos; Teixeira *et al.* (2004), al usar 4.42 mg/L 2,4-D y 2 mg/L 2-iP indujeron embriogénesis somática en solo 8% de explantes de la variedad Mundo Novo; Quiroz-Figueroa (2002), con 1.0 mg/L 2,4-D y 2 mg/L KIN obtuvo 68% de tasa de embriogénesis.

Los primeros embriones somáticos obtenidos a partir de callos se observaron a las 7 semanas de iniciado el cultivo en la variedad Catuaí; a las 11 semanas, en la variedad Castillo y a las 10 semanas, en la variedad Costa Rica 95. Mientras que otras investigaciones en café obtuvieron embriones somáticos después de 12.5 semanas (Teixeira *et al.*, 2004); Sondahl *et al.* (1991) a las 16-19 semanas de iniciado el cultivo y Moncada *et al.* (2004), a las 20 semanas al usar 0.3 mg/L 2,4-D y 2.7 mg/L BAP. De esta manera, con las concentraciones de 2,4-D (0.1, 0.5 y 1.0 mg/L) y KIN (1.5 mg/L) en el medio de cultivo, se puede inducir embriogénesis somática indirecta en menor tiempo que otros protocolos.

La inducción de embriogénesis somática está influenciado por la interacción de los reguladores de crecimiento y el genotipo del explante. Las frecuencias más altas de los callos embriogénicos ocurre cuando la auxina, como 2,4-D, estuvo presente en un cultivo primario asociado con KIN (Cevallos *et al.*, 2002)

En la variedad Castillo, se indujo embriogénesis somática directa e indirecta en la tres concentraciones de BAP (2,4 y 6 mg/L) y las tres combinaciones de 2,4-D y KIN (0.1, 0.5 y 1.0 mg/L 2,4-D más 1.5 mg/L KIN; en la variedad Catuaí, solo embriogénesis somática indirecta en los tratamientos con 2,4-D (0.1, 0.5 y 1.0 mg/L) y en combinación con KIN; y en la variedad Costa Rica 95, se observaron embriones somáticos inducidos directa e indirectamente en los tratamientos con BAP y solo en el tratamiento T10 (0.5 mg/L 2,4-D y 1.5 mg/L KIN), respectivamente. Estas diferencias en el efecto de concentraciones y/o combinaciones de BAP, 2,4-D y KIN por variedad permiten afirmar que para cada variedad se debe contar con un medio de cultivo específico. Es frecuente observar que un medio de cultivo induzca diferentes respuestas en la inducción de embriogénesis en

diversos genotipos (Zamarripa y Pétiard, 2004; Cueto *et al.*, 2007) y entre variedades de una misma especie (Berthouly y Etienne, 1999), debido a que puede existir un control genético en el comportamiento *in vitro* (Santana, 1993).

A pesar que se obtuvo embriones somáticos en menor tiempo y en un solo medio de cultivo, se observó a la semana 20 el oscurecimiento de los embriones por lo que, se considera necesario el subcultivo o el cambio de composición del medio de cultivo a la semana 16-18 de instalado el ensayo, con la finalidad de continuar con las siguientes etapas de la embriogénesis somática.

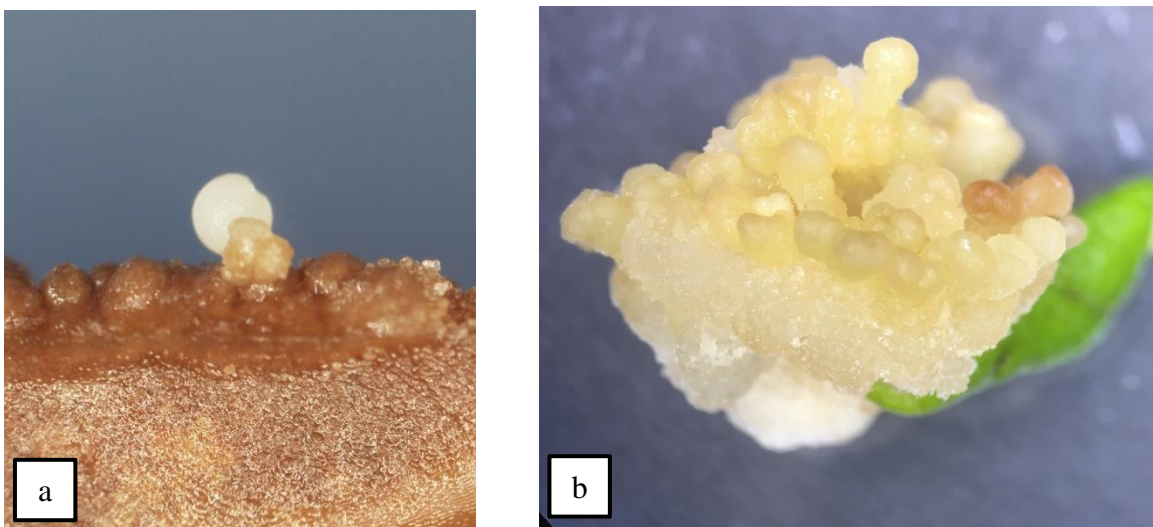


Figura 12. Tipos de embriones somáticos a) Embriones somáticos obtenidos por la vía directa; b) Embriones somáticos obtenidos por la vía indirecta.

4.2.5. NÚMERO DE EMBRIONES SOMÁTICOS

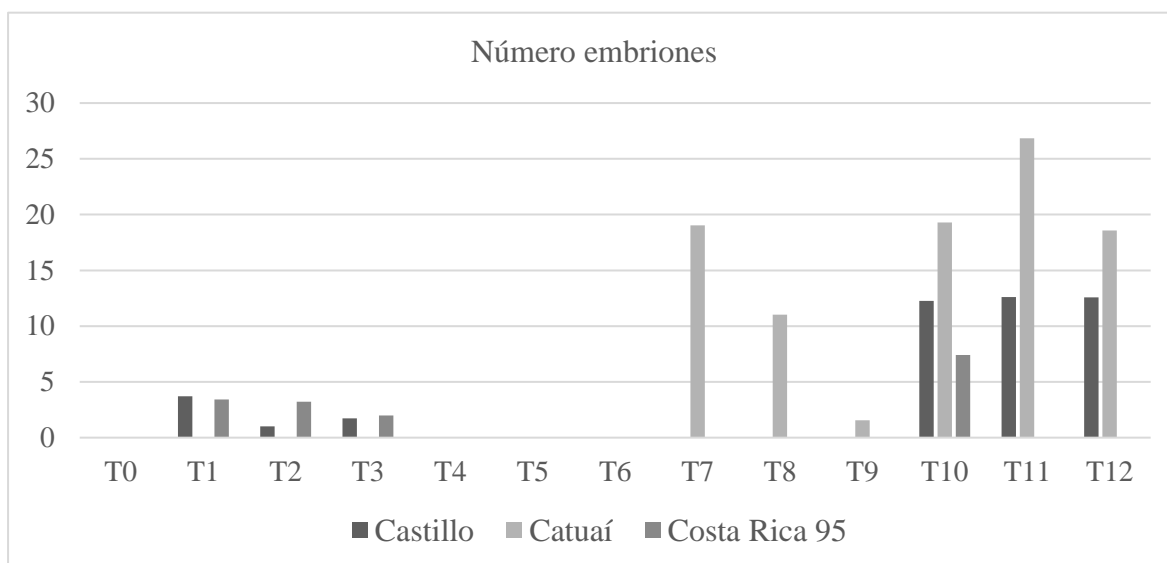


Figura 13. Número de embriones somáticos en las variedades Castillo, Catuaí y Costa Rica 95

En la variedad Castillo, el tratamiento con mayor número promedio de embriones fue T11 seguido por T12, T10 y T1, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos. Los tratamientos con menor número promedio de embriones fueron T3 y T2, siendo iguales estadísticamente.

En la variedad Catuaí, el tratamiento con mayor número promedio de embriones fue T11, sin diferencias estadísticas significativas con los tratamientos T10, T7, T12 y T8. El tratamiento T9 fue el que tuvo menor número promedio de embriones, siendo diferente estadísticamente con los otros tratamientos con mejor resultado.

No existen diferencias estadísticas entre los tratamientos con presencia de embriones somáticos de la variedad Costa Rica 95. El tratamiento con mayor y menor número promedio de embriones fue T10 y T3, respectivamente.

Los embriones inducidos directamente se encontraban en la fase globular; mientras que, los que se obtuvieron por la formación previa de callo se observaron en la fase globular, acorazonada y torpedo (Figura 14). La formación de embriones somáticos es un proceso continuo y no simultáneo, por ello es posible observar en un mismo explante todas las

etapas de desarrollo del embrión (Yasuda *et al.*, 1985; García y Menéndez, 1987; Bieysse *et al.*, 1993).

Los embriones somáticos inducidos por la vía directa tuvieron promedios de 1.98 a 3.75 según la concentración y variedad, siendo el tratamiento T1 (2mg/L BAP) el que presentó mejores resultados, esto coincide con lo mencionado por Berthouly (1997) sobre la cantidad limitada de embriones inducidos por embriogénesis somática directa (1-10 embriones/explante). Sin embargo, se observaron explantes con más de 10 embriones al exponerse a una de las tres concentraciones de BAP.

El mejor tratamiento para el número de embriones inducidos por embriogénesis somática indirecta fue T11 (0.5 mg/L 2,4-D y 1.5 mg/L KIN), con un promedio de 12.62-26.84 embriones/explante, superando a los 25.69 embriones/explante obtenidos por Moncada *et al.* (2004) en un medio con 0.3 mg/L 2,4-D y 2.7 mg/L BAP. Además, se observaron explantes que superaron el número promedio por tratamiento, llegando a tener 43 y 65 embriones en las variedades Castillo y Catuaí, respectivamente.

Sondahl *et al.* (1991) mencionan que los callos embriogénicos pueden alcanzar a producir 100-200 embriones al terminar la etapa del uso de un medio de acondicionamiento pero, se debe tener en cuenta que en la presente investigación se realizó la evaluación al observar los primeros sectores embriogénicos generados sin cambiar la composición de los diferentes medios de cultivo.

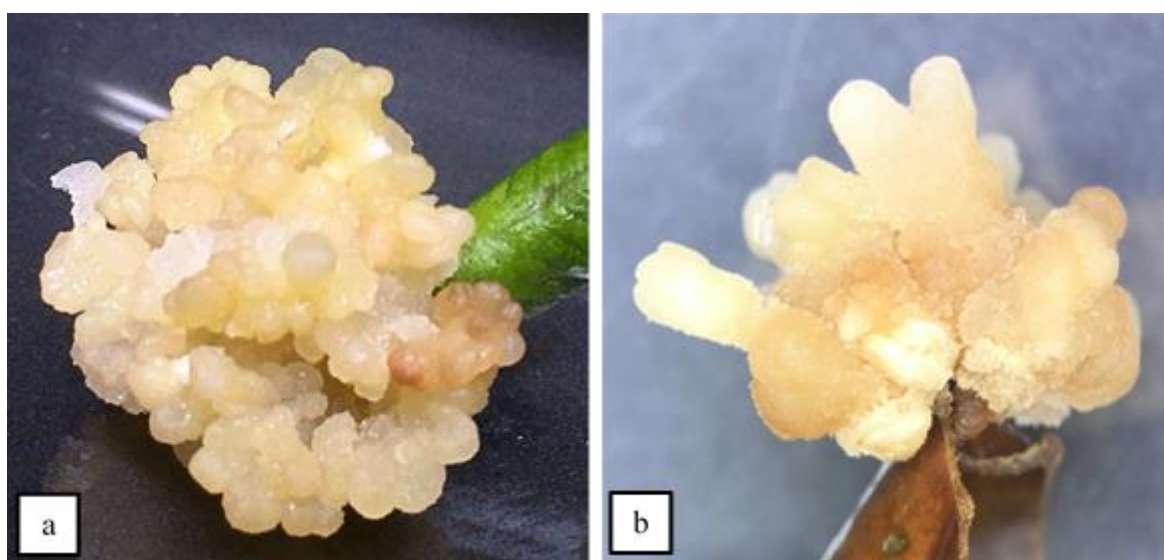


Figura 14. Estados de los embriones somáticos a) Masa embriogénica con embriones globulares y acorazonados; b) Masa embriogénica con embriones en estado torpedo.

V. CONCLUSIONES

- El procedimiento de desinfección superficial que permitió un óptimo establecimiento *in vitro* de los explantes foliares, provenientes de invernadero, fue al usar hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos.
- La oxidación de explantes y callos no representa un problema en el establecimiento *in vitro* ni en la inducción de embriogénesis somática.
- Los tratamientos con citoquininas (BAP) y 2,4-D (solo o en combinación con KIN) indujeron alta tasa de callogénesis a las 1-2 semanas de cultivo.
- La inducción de callogénesis y embriogénesis somática se dio en un solo medio de cultivo, sin la necesidad de subcultivar ni cambiar la composición del medio. Por la vía directa, a las 13 semanas y por la vía indirecta, a partir de la semana 7 de iniciado el cultivo.
- En la variedad Castillo y Costa Rica 95, se indujo embriones somáticos directa e indirectamente, en un medio de cultivo con la citoquinina BAP y con la combinación de 2,4-D y KIN, respectivamente.
- En la variedad Catuaí, se indujo embriogénesis somática en un medio de cultivo provisto de 2,4-D solo y en combinación con KIN.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de otras citoquininas, como zeatina y 2-iP, como único regulador de crecimiento o en combinación con 2,4-D para la inducción de embriogénesis somática.
- Realizar ensayos de inducción de embriogénesis somática en otras variedades de café (*C. arabica*) de interés comercial, usando los tratamientos que obtuvieron mejores resultados en esta investigación.
- Realizar un estudio histológico con la finalidad de determinar el potencial de un callo para ser embriogénico.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelnour, A. y Escalant, J. 1994. Conceptos básicos de cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 38 p.

Abdelwahd, R.; Hakam, N.; Labhilili, M.; UduPA, S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology 7(8): 997-1002.

Alvarado, G.; Posada, H.; Cortina, H. 2005. Castillo: Nueva variedad de café con resistencia a la roya. Cenicafé. Avances técnicos N°337. 8 p.

Agencia Peruana de Noticias. APN. 2013. Perú: Junta del café revela que exportaciones del grano sumarán US\$650M este año.

Disponible en:

<http://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/peru-junta-del-cafe-revelaque-exportaciones-del-grano-sumaran-us650m-este-año>.

Alvarado, M. y Rojas, G. 2007. Tema II. Características botánicas del cultivo. En: El cultivo y beneficiado del café. Editorial Universidad Estatal a Distancia San José. pp 11-21.

Ammirato, P. 1983. Embryogenesis. En: Handbook of plant cell culture. Evans, D.; Sharp, W.; Ammirato, P.; Yamada, Y. (eds.). MacMillan Publishing, Nueva York. V.1. pp 82-123.

Ammirato, P. y Steward, F. 1971. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. Bot. Gaz. 132: 149-158.

Arcila, J. 1990. Capítulo 2: La semilla del cafeto y proceso germinativo. En: VIII Curso Regional sobre fundamentos de la caficultura moderna. IICA. Costa Rica.

Arcila, P; Farfán, V; Moreno, B; Salazar, L; Hincapié, E. 2007. Sistemas de producción de café en Colombia. Capítulo 2. Crecimiento y desarrollo de la planta de café. Cenicafé. pp 21-60.

Arvy, M.; Gallouin, F.; Ubillos, M.; Montalbán, J. 2007. Especias, aromatizantes y condimentos. Mundi-Prensa, 77.

Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 20(1): 153-175.

Barry-Etienne, D.; Bertrand, B.; Vasquez, N.; Etienne, H. 2002. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. Annals of Botany 90(1): 77-85.

Berthouly, M.; Guzman, N.; Chatelet, P. 1987. Micropropagation *in vitro* of different lineages of *Coffea arabica* V. catimor. En: 12^{eme} Colloque Scientifique International sur le Café. ASIC, Paris. pp 462-467.

Berthouly, M. 1997. Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. En: Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica. pp 25-49.

Berthouly, M. y Etienne, H. 1999. Somatic embryogenesis in coffee. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Gupta, P. and Newton, R.J. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands (In Press).

Bieysse, D.; Gofflet, A.; Michaux-Ferrière, N. 1993. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Can. J. Bot. 71(11): 1496-1502.

Bolívar, C. 2009. Monografía sobre el galactomanano del grano de café y su importancia en el procesamiento para la obtención de café soluble. Pereira, Colombia. 112 p.

Cassells, A. y Curry, R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plan tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157.

Centro Nacional de Investigación del café. CENICAFE. 2010. *Roya del cafeto en Colombia*. 55 p.

Cevallos, M.; Sánchez, I.; Montes, S. 2002. Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* var. Robusta. *Protección Vegetal* 17(1): 14-19.

Cinza-Borrelli, R.; Visconti, A.; Mennella, C.; Anese, M.; Pogliano, V. 2002. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22): 6527-6533.

Clay, J. 2004. *World agriculture and the environment: a commodity-by-commodity guide to impacts and practices*. Island Press. pp 69 -91.

Coronel, M.A. 2010. *Estudio del café especial ecuatoriano*. Quito, Ecuador. 65 p.

Cronquist, A. 1981. *An integrated System of the Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press.

Cueto, J.; Aguirre-Medina, J.F.; Iracheta-Donjuan, L.; Zamarripa-Colmenero, A.; Olivera-De los Santos, A.; Grajales-Solís, M. 2007. Propagación. En: *El mejoramiento del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.) en México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa. Tuxtla Chico, Chiapas, México. Libro técnico. pp 103-132.

Dalal, M.A.; Sharma, B.B. y Srinivasa, M. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in *in vitro* cultures of grapevine. *Scientia Hort.* 51: 35-41.

Debergh, P. y Zimmerman, R. 1991. Micropropagation technology and application. Ed. Kluwer Academic Publishers. 484 p.

Delgado, L. 2007. Agrocadena de café sostenible. Ministerio de agricultura y ganadería DRCS. Puriscal, Costa Rica. 8 p.

Del Pilar, M. 2011. Participación peruana en la de cafés especiales SCAA. PROMPERÚ. pp 1-9.

Denchev, P.; Kuklin, A.; Scragg, A. 1992. Somatic embryo production in bioreactor. *Journal of Biotechnology* 26: 99-109.

Domínguez, M.; Gonzáles, L.; Rosales, C.; Quiñones, C.; Delgadillo, S.; Mireles, J.; Péres, E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de aguas Calientes* 41: 53-62.

Dublin, P. 1981. Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabust. *Café Cacao Thé* 25(4): 237-242.

Dublin, P. 1984. Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé* 28(4): 231-244.

Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W. M y Mroginski L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 578- 619.

Escalant, J. y Teisson, C. 1989. Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7(8): 665-668.

Etienne, H.; Solano, W.; Pereira, A.; Barry-Etienne, D.; Bertrand, B.; Anthony, F.; Cote, F.; Berthouly, M. 1997. Utilización de embriogénesis somática e medio líquido para la

propagación masal de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. En: Memorias XVIII Simposio Lationamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica. pp 253-261.

Etienne, H.; Barry-Etienne, D.; Vasquéz, N.; Berthouly, M. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café. En: Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA. San José, Costa Rica. pp 457-495.

Evans, D.; Sharp, W.; Flick, C. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Tissue culture: Methods and applications in agriculture. Thorpe, T.A (ed.). Academic Press, Nueva York. pp 45-113.

Figueroa, R. 1990. Caficultura en el Perú. Editorial Fiessa. Lima, Perú. pp 34.

Flores, D. y Abdelnour, A. 2000. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. 50 p.

Freire, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biotecnología vegetal. 3(4): 195-209.

Fundes, G. y Cruz, H. 2011. Manual del café. Central de Organizaciones Productoras de Café y Cacao del Perú-CAFÉ PERÚ. pp 11-24.

George, E.1993. Plant propagation by tissue culture; part I. The technology. Segunda edición. Exegetics Limited. England. 574 p.

García, E. y Menéndez, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto Catimor. Café Cacao The 31(1): 15-22.

García, E. y Rafael, M. 1989. Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. Catimor) a partir de microesquejes cultivados *in vitro*. Agronomía Tropical 39(4-6): 249-268.

Gatica-Arias, A. 2015. Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Gómez, R. 1998. Generalidades sobre la embriogénesis somática. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva *in vitro* de especies vegetales. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 134 p.

Granados, L. C. 1995. Algunas selecciones nuevas de zapote (*Pouteria sapota*) en Guatemala. Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 39: 115-118.

Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Amer. J. Bot. 53(5): 443-453.

Halperin, W. y Wetherell, D. 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Amer. J. Bot. 51(3): 274-283.

Hatanaka, T.; Arakawa, O.; Yasuda, T.; Uchida, N.; Yamaguchi, T. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. Plant Cell Reports 10(4):179-182.

Havránek, P. y Vagera, J. 1979. Regulation of *in vitro* androgenesis in tobacco through iron-free media. Biol. Plant. 21(6):412-417.

Hermann, E. y Haas, G. 1975. Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture. HortScience 10: 588-589.

Instituto del Café de Costa Rica. ICAFE. 1995. Costa Rica 95, nueva variedad de café resistente a la roya. Boletín de PROMOCAFE-Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Instituto Nacional de Innovación Agraria. INIA. 2011. Tecnología en café.

Disponible en:

<http://www.inia.gob.pe/tecnologias/cultivos/132-cat-tecnologias/cultivos/393-tecnologia-en-cafe>

Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. 2013. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Resultados definitivos. Lima, Perú. 62 p.

International Coffee Organization. 2015. Estadística.

Disponible en:

<http://www.ico.org/coffee-trade-statistics-infographics.asp?section=Estad%EDstica>

Julca, A.; Blas, R.; Borjas, R.; Bello, S. 2010. Informe de colecta de germoplasma de café en el Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima, Perú. 38p.

Krikorian, A.D. 1991 Cap. 3 Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginski L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 42-77.

León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Costa Rica. IICA. 445 p.

León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. Costa Rica. IICA. Tercera edición. pp 350-364.

Litz, R.; Knight, R.; Gazit, S. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. Sci. Hort. 22(3):233-240.

Litz, R. y Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski L. (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 143-173.

López-Gómez, P.; Iracheta-Donjuan, L.; Castellanos-Juaréz, M.; Méndez-López, I.; Sandoval-Esquivel, A.; Aguirre-Medina, J.; Ojeda-Zacarías, Gutiérrez-Díez, A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. Revista Fitotecnia Mexicana 33(3): 205-213.

Marks, T.R. y Simpson, S.E. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. Hort Science 65(2): 103-111.

Ministerio de Agricultura y Riego. MINAGRI. 2012. IV Censo Nacional Agropecuario. Resultados definitivos. Lima, Perú. 9 p.

Ministerio de Agricultura y Riego, Dirección General de Competitividad Agraria. MINAGRI. 2014. Plan Nacional de Renovación de cafetales. Lima, Perú. 23p.

Ministerio de Agricultura y Riego. MINAGRI. 2015. Situación actual del café en el país.

Disponible en:

<http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/485-feria-scaa/10775-el-cafe-peruano>

Molina, A y Figueroa, P. 1996. Propagación por microestacas y por embriogénesis somática en el cultivo *in vitro* del café. En: I Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (memorias) (1996, Guatemala). pp 97-102.

Moncada, E.; Vielma, M.; Mora, A. 2004. Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arabica* L. variedad Catuaí amarillo. Universidad de los Andes Venezuela 3(6): 23-28.

Mroginski, L. y Roca, W. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 20-40.

Morales, R. 2017. Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.)-variedades Geisha y Sarchimor- a partir de láminas foliares y meristemos axilares. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 17 p.

Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15(3): 473-497.

Paredes, G.; Peña, C.; Jadán, M. 2013. Obtención de embriones en fase cotiledonar de café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. ESPE. Sansolquí, Ecuador. 21 p.

Paz-Ramírez, A. 2000. Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras. 42 p.

Peña, M. 1983. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. En: Simpósio sobre Ferrugens do Cafeiro. Oeiras, Portugal. pp 485-507.

Pierson, E.; Van Lammeren, A.; Shel, J.; Starisky, G. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. Protoplasma 115(2-3): 208-216.

Quiroz-Figueroa, F.; Méndez-Zeel, M.; Larqué-Saavedra, A.; Loyola-Vargas, V.M. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce celular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. Plant Cell Rep. 20(8): 679-684.

Quiroz-Figueroa, F.; Fuentes-Cerda, C.F.J.; Rojas-Herrera, R.; Loyola-Vargas, V.M. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Rep. 20(12): 1141-1149.

Read, P. y Economou, A. 1987. Stock plant influence on tissue culture success. Acta Hort. 212(16): 111.

Regalado, O. 2006. ¿Qué es la calidad del café? Chapingo, ME. Universidad Autónoma de Chapingo. 309 p.

Rodriguez, R. y Preil, W. 1999. Influencia del gas dióxido de carbono (CO₂) sobre la embriogénesis somática del café (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo). 1999. En: Quinto Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal (1999, Villa Clara, Cuba). Biotecnología Vegetal: Libro de reportes cortos. Villa Clara, Cuba. pp 120-122.

Santana, N. 1993. Embriogénesis somática en el cultivo de cafeto (*Coffea* sp.). Tesis de doctorado en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencia Agrícola (INCA). San José de las Lajas, Cuba.

Schuller, S. 2010. Propuesta de incremento de productividad para la caficultura peruana. Junta Nacional del café. pp 1-15.

Small, E. 2009. Top 100 Food Plants. NRC Research Press. pp 187-197.

Solano, W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* por embriogénesis somática. Tesis licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Fitotecnia. Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. 87 p.

Sondahl, M.; Nakamura, T.; Sharp, W. 1991. Propagación *in vitro* del café. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginski L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 622- 642.

Sotomayor, I. 1993. Manual del cultivo del café. INIAP, Fundagro y GTZ. Quevedo, Ecuador. 223 p.

Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neerlandica 19(4): 509-514.

Tabiyeh, D.; Bernard, F.; Shacker, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. Acta Hort. 726: 201-204.

Teixeira, J.; Salgado, C.; Prozil da Costa, A.; Soriano, R.; Domingos, A.; Alves, D. 2004. Multiplicación clonal de café (*Coffea arabica* L.) vía embriogénesis somática. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología. 39 p.

Tisserat, B. 1991. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. EN: Plant Cell Culture: A Practical Approach. Dixon, R.A (ed). Oxford University Press. Oxford, England. pp 79-105.

Tisserat, B.; Esan, E.; Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1: 1-78.

Van Staden, J.; Fennell, C.; Taylor, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. Acta Hort. 725(2): 55-62.

Vicient, C y Martínez, F. 1998. The potential use of somatic embryogenesis in agro forestry are not limited to synthetic seed technology. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal 10 (1): 1-12.

Villalobos, V. y Thorpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 128-141.

Von Arnold, S.; Sabala, I.; Bozhkov, P.; Dyachok, J.; Ilonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69 (3): 233-249.

Waller, J.; Bigger, M.; Hillocks, R. 2007. Coffee Pests, Diseases and Their Management. CABI. 437 p.

Wetherell, D. y Dougall, D. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant. 37(2): 97-103.

World Coffee Research. 2016. Variedades *Coffea arabica*, Catuai.

Disponible en:

<https://varieties.worldcoffeeresearch.org/es/varieties/catuai>

Yasuda, T.; Fujii, Y.; Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explant by Benziladenine. Plant Cell Physiol 26(3): 595-597.

Yu, D. y Meredith, C.P. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. Hort Science 11(6): 972-975.

Zamarripa, C.A.y Pétiard, V. 2004. Biotechnologies applied to coffee. En: Coffee: growing, process, sustainable production. J. N. Wintgens (ed). Wiley-VCH Verlag Gmbtl and Co. KGaA. pp 137-163.

Zimmerman, J. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell* 5(10): 1411–1423.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

COMPOSICIÓN DE MEDIO MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Compuesto	Fórmula	Concentración (mg/L)
Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650
Nitrato de potasio	KNO_3	1900
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	170
Micronutrientes		
Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de cobre dihidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Na Fe-EDTA		
EDTA de Sodio Férrico	Na Fe-EDTA	43

FUENTE: Murashige y Skoog (1962)

ANEXO 2

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE HOJAS DE CAFÉ

Análisis de varianza de Tasa de contaminación- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el porcentaje de contaminación.

H_1 : El porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Contaminación by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
44.059	5	2.253e – 08

Pvalue = 2.253e – 08 < $\alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos dos de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test					
Data: Contaminación and Tratamiento					
	Trat0	Trat1	Trat2	Trat3	Trat4
Trat1	0.00061	-	-	-	-
Trat2	0.01584	1.00000	-	-	-
Trat3	0.00061	-	1.00000	-	-
Trat4	0.01584	1.00000	1.00000	1.00000	-
Trat5	0.00061	-	1.00000	-	1.00000

P-value adjustment method: bonferroni (< $\alpha = 0.05$)

ANEXO 3

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TASA DE CALLOGÉNESIS EN LA VARIEDAD CASTILLO

TASA CALLOGÉNESIS (%)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	80	100	80	0	0	60	100	100	100	100	100	100
R2	0	100	80	60	0	0	80	100	100	100	100	100	100
R3	0	100	100	80	0	0	0	100	100	100	100	100	100
R4	0	60	100	80	0	20	20	100	100	100	100	100	100
R5	0	80	60	100	0	60	0	80	100	100	100	100	100
R6	0	80	80	40	0	60	0	80	100	100	100	100	100
R7	0	100	40	100	0	0	0	80	100	100	100	100	100
R8	0	100	100	60	20	0	0	80	100	100	100	100	100
R9	0	80	80	80	20	0	0	100	100	100	100	100	100
R10	0	100	100	80	0	0	0	100	100	100	100	100	100
PROMEDIO	0	88	84	76	4	14	16	92	100	100	100	100	100

Análisis de varianza de la tasa de callogénesis variedad Castillo - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H₀: Los tratamientos no difieren en la tasa de callogénesis.

H₁: La tasa de callogénesis difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

ANEXO 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TASA DE CALLOGÉNESIS EN LA VARIEDAD CATUAÍ

TASA CALLOGÉNESIS (%)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	100	40	0	0	0	0	80	100	100	100	100	100
R2	0	20	80	60	0	0	0	80	100	100	100	100	100
R3	0	40	80	100	0	0	0	80	100	100	100	100	100
R4	0	60	20	100	0	0	0	80	100	100	40	100	100
R5	0	40	40	40	0	0	0	100	100	100	100	100	100
R6	0	20	100	80	0	0	0	100	100	100	80	100	100
R7	0	80	80	60	0	0	0	100	100	100	100	100	100
R8	0	60	20	100	40	0	20	100	100	100	100	100	100
R9	0	0	40	40	0	0	0	100	80	100	100	100	100
R10	0	100	20	80	0	0	0	100	100	100	100	100	100
PROMEDIO	0	52	52	66	4	0	2	92	98	100	92	100	100

Análisis de varianza de la tasa de callogénesis variedad Catuaí - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H₀: Los tratamientos no difieren en la tasa de callogénesis.

H₁: La tasa de callogénesis difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Catuaí by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
110.27	12	2.2e – 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 76.41												
Data: Catuaí and Tratamiento sd = 44.55												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	0.0167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.0025	0.5556	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.0012	0.0546	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.0012	0.0546	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	0.0043	1.0000	0.1985	0.0158	0.0158	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	0.0163	1.0000	1.0000	0.1611	0.1611	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	1.0000	0.0663	0.0042	0.0018	0.0018	0.0242	0.0360	-	-	-	-	-
Trat5	-	0.0167	0.0025	0.0012	0.0012	0.0043	0.0163	1.0000	-	-	-	-
Trat6	1.0000	0.0366	0.0035	0.0018	0.0018	0.0094	0.0270	1.0000	1.0000	-	-	-
Trat7	0.0034	0.6120	1.0000	1.0000	1.0000	0.2826	1.0000	0.0047	0.0034	0.0047	-	-
Trat8	0.0018	0.1208	1.0000	1.0000	1.0000	0.0400	0.4572	0.0026	0.0018	0.0026	1.0000	-
Trat9	0.0012	0.0546	1.0000	-	-	0.0158	0.1611	0.0018	0.0012	0.0018	1.0000	1.0000

P-value adjustment method: bonferroni ($< \alpha = 0.05$)

ANEXO 5

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TASA DE CALLOGÉNESIS EN LA VARIEDAD COSTA RICA 95

TASA CALLOGÉNESIS (%)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	100	100	100	40	100	0	100	100	100	100	100	100
R2	0	100	100	100	60	100	0	100	100	100	100	100	100
R3	0	100	100	100	0	0	80	100	100	100	100	100	100
R4	0	100	100	100	80	100	40	100	100	100	100	100	100
R5	0	100	100	100	20	20	60	100	100	100	100	100	100
R6	0	100	100	100	20	20	40	80	100	100	100	100	100
R7	0	100	100	100	0	60	80	100	100	100	100	100	100
R8	0	100	100	80	0	40	0	100	100	100	100	100	100
R9	0	80	100	100	0	40	40	100	100	100	100	100	100
R10	0	100	100	100	0	0	80	100	100	100	100	100	100
PROMEDIO	0	98	100	98	22	48	42	98	100	100	100	100	100

Análisis de varianza de la tasa de callogénesis variedad Costa Rica 95- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H₀: Los tratamientos no difieren en la tasa de callogénesis.

H₁: La tasa de callogénesis difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Costa Rica 95 by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
114.83	12	2.2e - 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 83.63												
Data: Costa Rica 95 and Tratamiento sd = 46.70												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.0011	0.0016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.0011	0.0016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.0011	0.0016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	-	1.0000	0.0011	0.0011	0.0011	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	1.0000	1.0000	0.0016	0.0016	0.0016	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	0.9960	1.0000	0.0037	0.0037	0.0037	0.9960	1.0000	-	-	-	-	-
Trat5	0.0486	0.3648	0.1459	0.1459	0.1459	0.0486	0.3648	1.0000	-	-	-	-
Trat6	0.1421	1.0000	0.0039	0.0039	0.0039	0.1421	1.0000	1.0000	1.0000	-	-	-
Trat7	0.0016	0.0028	1.0000	1.0000	1.0000	0.0016	0.0028	0.0060	0.3221	0.0085	-	-
Trat8	0.0011	0.0016	-	-	-	0.0011	0.0016	0.0037	0.1459	0.0039	1.0000	-
Trat9	0.0011	0.0016	-	-	-	0.0011	0.0016	0.0037	0.1459	0.0039	1.0000	-

P-value adjustment method: bonferroni ($< \alpha = 0.05$)

ANEXO 6

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NIVEL DE INDUCCIÓN CALLOGÉNESIS EN LA VARIEDAD CASTILLO

NÚMERO DE EXPLANTES SEGÚN NIVEL DE INDUCCIÓN					
Nivel	0	1	2	3	4
T0	50	0	0	0	0
T1	6	27	15	2	0
T2	8	24	14	3	1
T3	12	27	9	2	0
T4	48	2	0	0	0
T5	43	7	0	0	0
T6	42	8	0	0	0
T7	4	31	13	2	0
T8	0	26	21	3	0
T9	0	29	18	3	0
T10	0	19	27	4	0
T11	0	7	32	9	2
T12	0	5	16	18	11

Análisis de varianza de la tasa de callogénesis variedad Castillo - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test Data: Castillo by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
465.91	12	2.2e – 16

Comparaciones múltiples

cv=121.5; sd=1.06	
Tratamientos	Grupos
T12	A
T11	B
T10	C
T8	C
T9	C
T7	D
T1	D
T2	D
T3	E
T6	F
T5	F
T4	F
T0	F

ANEXO 7

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NIVEL DE INDUCCIÓN CALLOGÉNESIS EN LA VARIEDAD CATUAÍ

NÚMERO DE EXPLANTES SEGÚN NIVEL DE INDUCCIÓN					
Inducción	0	1	2	3	4
T0	50	0	0	0	0
T1	24	26	0	0	0
T2	24	25	1	0	0
T3	17	32	1	0	0
T4	48	2	0	0	0
T5	50	0	0	0	0
T6	49	1	0	0	0
T7	4	22	18	5	1
T8	1	17	23	9	0
T9	0	9	28	10	3
T10	4	16	25	5	0
T11	0	15	28	7	0
T12	0	6	24	14	6

Análisis de varianza de la tasa de callogénesis variedad Catuaí - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Catuaí by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
481.14	12	2.2e - 16

Comparaciones múltiples

cv=103.40; sd=1.04	
Tratamientos	Grupos
T12	A
T9	AB
T11	BC
T8	CD
T10	DE
T7	E
T3	F
T2	F
T1	E
T4	G
T6	G
T0	G
T5	G

ANEXO 8

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NIVEL DE INDUCCIÓN CALLOGÉNESIS EN LA VARIEDAD COSTA RICA 95

NÚMERO DE EXPLANTES SEGÚN NIVEL DE INDUCCIÓN					
Inducción	0	1	2	3	4
T0	50	0	0	0	0
T1	1	17	8	16	8
T2	0	7	16	17	10
T3	1	5	23	7	14
T4	39	11	0	0	0
T5	26	24	0	0	0
T6	29	21	0	0	0
T7	1	16	21	9	3
T8	0	0	14	15	21
T9	0	2	11	15	22
T10	0	0	24	19	7
T11	0	0	18	21	11
T12	0	0	10	20	20

Análisis de varianza de la tasa de callogénesis variedad Costa Rica 95 - Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Catuaí by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
442.05	12	2.2e - 16

Comparaciones múltiples

cv=72.01; sd=1.41	
Tratamientos	Grupos
T12	A
T9	AB
T8	AB
T11	BC
T10	C
T2	C
T3	CD
T1	D
T7	E
T5	F
T6	F
T4	FG
T0	G

ANEXO 9

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TAMAÑO DE CALLOS EN LA VARIEDAD CASTILLO

TAMAÑO CALLOS (mm)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	0.56	0.31	0.26	0	0	0.45	2.26	2.74	3.36	1.66	3.02	4.01
	0	0	0.44	0.41	0	0	0.39	3.76	2.01	4.37	1.79	8.02	6.5
	0	0.44	0.39	0.35	0	0	0	2.35	3.47	1.02	1.16	2.32	2.11
	0	0.39	0	0.48	0	0	0	2.56	2.45	6.98	1.2	4.15	4.54
	0	0.33	0.45	0	0	0	0.43	2.35	2.18	1.45	2.34	3.89	6.94
R2	0	0.4	0.24	0.36	0	0	0.42	0.69	5.23	3.98	0.58	2.86	2.35
	0	0.45	0.53	0	0	0	0.28	2.16	5.33	3.84	1.5	1.88	2.71
	0	0.37	0.42	0.37	0	0	0.54	3.07	3.65	3.9	1.35	2.9	4.75
	0	0.39	0.43	0	0	0	0	2.82	6.56	3.5	1.35	2.19	3.43
	0	0.36	0.47	0.52	0	0	0	0.85	3.08	3.82	1.6	2.73	4.49
R3	0	0.37	0.62	0.4	0	0	0	2.07	5.3	4.16	1.45	2.4	2.57
	0	0.55	0.52	1.1	0	0	0	1.45	0.88	2	0.74	2.1	1.29
	0	0.47	0.56	0	0	0	0	0.81	3.13	3.1	0.92	3.37	2.7
	0	0.52	0.3	0.37	0	0	0	1.8	2.62	4.41	1.41	2.76	1.9
	0	0.45	0.61	0	0	0	0	1.54	4.09	2.12	0.76	3.63	3.7
R4	0	0.4	0.38	0.52	0	0	0	1.45	5.51	5.24	3.81	1.61	4.15
	0	0	0.52	0.38	0	0.4	0.4	1.57	10.3	5.55	1.74	3.27	4.3
	0	0	0.31	0.31	0	0	0	1.42	6.25	9.82	0.98	4.66	2.93
	0	0.38	0.24	0	0	0	0	1.42	6.34	8.89	2.68	3.35	3.05
	0	0.48	0.36	0.37	0	0	0	1.85	4.13	1.45	0.8	4.32	4.88

R5	0	0.33	0	0.56	0	0	0	0	3.78	5.98	1.02	1.73	5.87
	0	0.36	0.52	0.78	0	0	0	1.08	3.37	3.57	1.2	4.73	4.76
	0	0.5	0	0.39	0	0.42	0	4.55	4.21	0.37	1.57	1.59	4.59
	0	0.42	0.4	0.77	0	0.5	0	3.53	4.8	5.85	1.13	1.11	5.75
	0	0	0.43	0.75	0	0.45	0	2.33	4.44	5.8	1.32	0.97	4.5
R6	0	0.3	0.29	0	0	1.1	0	0.67	3.81	2.86	1.96	1.22	2.67
	0	0.24	0.28	0	0	0	0	0.27	3.92	2.49	0.89	1.31	1.35
	0	0.35	0	0.51	0	0.8	0	1.9	2.35	2.07	1.21	1.39	5.81
	0	0.4	0.3	0.69	0	0	0	1.36	1.93	2.9	1.1	1.36	1.95
	0	0	0.3	0	0	0.65	0	0	2.6	4.06	0.84	2.55	2.76
R7	0	0.35	0	0.42	0	0	0	1.4	5.05	4.74	1.94	2.66	1.98
	0	0.55	0.35	0.46	0	0	0	2.2	4.74	3.58	2.37	2.92	3.09
	0	0.52	0	0.51	0	0	0	0	1.81	3.81	1.15	3.65	4.88
	0	0.36	0.57	0.36	0	0	0	1.57	2.3	4.33	1.48	3.55	4.73
	0	0.6	0	0.4	0	0	0	0.83	5.56	3.81	2.38	3.83	5.12
R8	0	0.84	0.37	0.38	0	0	0	0.31	4.25	2.08	2.19	4.02	3.3
	0	0.81	1.14	0.32	0	0	0	1.43	4.34	3.09	2.27	5.71	4.48
	0	0.63	0.46	0.25	0	0	0	1.83	4.29	2.12	1.08	4.01	3.28
	0	0.62	0.95	0	0	0	0	0.36	3.76	2.79	0.77	4.08	3.36
	0	0.5	0.36	0	0.28	0	0	0	4.19	2.51	1.41	3.59	3.15
R9	0	0	0.67	0.33	0	0	0	1.08	2.7	3.06	2.18	3.15	5.46
	0	0.34	1.08	0	0	0	0	1.93	2.16	2.17	2.28	3.83	4.05
	0	0.62	0	0.5	0	0	0	1.63	1.64	5.41	1.83	3.34	4.48
	0	0.36	0.45	0.38	0.3	0	0	1.44	3.57	1.62	2.08	2.83	3.63
	0	0.4	0.47	0.35	0	0	0	0.85	0.79	1.72	2.28	2.7	5.7
R10	0	0.3	0.49	1.15	0	0	0	1.92	2.98	3.98	2.17	1.72	2.09
	0	0.4	0.32	0	0	0	0	0.47	1.97	2.83	1.35	3.15	2.48
	0	0.31	0.34	0.68	0	0	0	0.78	3.82	3.56	1	5.36	2.51

	0	0.63	0.33	0.5	0	0	0.29	2.7	3.3	5.43	2.11	4.73	1.76
	0	0.21	0.28	0.77	0	0	0	0.76	2.17	2.64	2.54	3.39	3.98
PROMEDIO	0	0.3912	0.385	0.3682	0.0116	0.0864	0.064	1.5486	3.717	3.6838	1.5784	3.1122	3.7364

Análisis de varianza de tamaño de callos variedad Castillo- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el tamaño de callos.

H_1 : El tamaño de callos difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Castillo by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
119.08	12	2.2e - 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test $cv = 123.05$
 Data: Castillo and Tratamiento $sd = 1.77$

	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	0.00495	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.00498	0.01417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.00498	0.01417	0.02533	0.02533	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.00498	0.01417	0.00084	0.00084	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	0.00498	1.00000	0.00084	0.00084	0.00084	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	0.00498	1.00000	0.00084	0.00084	0.00084	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	1.00000	0.00858	0.00863	0.00863	0.00863	0.00863	0.00863	-	-	-	-	-
Trat5	1.00000	0.22870	0.01027	0.01027	0.01027	0.17800	0.22957	1.0000	-	-	-	-
Trat6	1.00000	0.01573	0.01165	0.01165	0.01165	0.03829	0.05085	1.0000	1.0000	-	-	-
Trat7	0.00498	0.01417	1.00000	0.02533	0.00338	0.00084	0.00084	0.0060	0.00863	0.01165	-	-
Trat8	0.00498	0.01417	0.00084	1.00000	1.00000	0.00084	0.00084	0.0037	0.00863	0.01165	0.00591	-
Trat9	0.00498	0.01417	0.00084	1.00000	1.00000	0.00084	0.00084	0.0037	0.00863	0.01165	0.00169	1.00000

P-value adjustment method: bonferroni ($< \alpha = 0.05$)

ANEXO 10

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TAMAÑO DE CALLOS EN LA VARIEDAD CATUAÍ

TAMAÑO CALLOS (mm)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	0.65	0.39	0	0	0	0	2.16	2.14	5.25	2.94	2.81	5.06
	0	0.8	0.88	0	0	0	0	2.25	1.37	2.94	1.24	2.81	4.1
	0	0.95	0	0	0	0	0	0	3.34	5.47	1.69	6.09	6.82
	0	0.6	0	0	0	0	0	2.2	4	4.69	1.05	5.74	3.26
	0	0.65	0	0	0	0	0	0.98	2.75	3.92	1.87	5.45	5.58
R2	0	3.96	0.8	0	0	0	0	1.07	2.5	5.68	1.79	2.48	6.05
	0	0	0.59	0.62	0	0	0	4.68	2.66	7.7	0.77	4.64	4.57
	0	0	0.57	0.46	0	0	0	2.39	2.83	2.72	1.43	2.84	5.03
	0	0	0	1.48	0	0	0	3.99	4.8	5	2.82	5.2	4.24
	0	0	0.5	0	0	0	0	0	2.34	2.33	1.42	4.6	6.6
R3	0	0.52	0.76	0.45	0	0	0	1.78	2.47	5.54	3.22	4.79	4.3
	0	0	1.1	0.53	0	0	0	2.96	4.76	6.58	1.45	3.05	5.6
	0	0	0.54	0.42	0	0	0	6.86	2.8	6.1	2.08	5.03	3.86
	0	1.05	0	0.48	0	0	0	3.1	2.44	5.11	2.05	5.36	4.36
	0	0	0.62	0.5	0	0	0	0	3.68	5.11	1.57	4.43	5.43
R4	0	2.33	0	0.43	0	0	0	2.15	2.13	4.62	0	2.05	5.9
	0	0	0	0.42	0	0	0	2.9	2.2	6.56	4.89	3.98	4.78
	0	2.2	0.46	0.47	0	0	0	2.42	1.95	4.88	3.82	5.03	5.5
	0	0	0	0.5	0	0	0	4.1	2.34	4.51	0	5	5.2
	0	1.12	0	0.53	0	0	0	0	3.2	5.75	0	5.16	4.9

R5	0	0.77	0	0	0	0	0	2.23	1.44	1.54	4.63	3.27	5.83
	0	2.35	0	0	0	0	0	2.26	3.47	4.16	4.67	3.21	3.41
	0	0	0	0.41	0	0	0	3.28	2.08	3.65	3.2	6.09	3.45
	0	0	0.74	0.62	0	0	0	1.17	2.89	3.5	1.97	4.11	6.09
	0	0	0.82	0	0	0	0	0.84	4	3.61	3.2	3.03	5.87
R6	0	0	1.31	1.24	0	0	0	0.82	2.82	3.5	0	2.18	6.15
	0	0	1.17	1.15	0	0	0	2.15	4.42	3.87	3.9	2.77	4.1
	0	0	1.21	0	0	0	0	2.85	4.17	5.91	4.13	3.28	4.25
	0	0.47	0.73	2.04	0	0	0	1.84	3.59	6.06	3	3.88	7.48
	0	0	1.11	1.14	0	0	0	1.64	2.84	4.52	3.8	2.31	4.58
R7	0	3.9	1.47	0.51	0	0	0	1.31	5.2	1.8	1.58	3.58	5.02
	0	0.45	0.5	0.45	0	0	0	2.69	2.45	4.8	4.39	4.02	6.92
	0	0	0.55	0	0	0	0	5.01	3.66	5.73	1.61	5.35	5.61
	0	1.61	0.4	0	0	0	0	1.92	2.02	7.83	1.64	3.85	6.46
	0	0.87	0	0.49	0	0	0	1.88	2.84	2.63	2.88	2.5	5.81
R8	0	0	0	0.59	0.53	0	0	1.49	4.79	4.97	1.48	1.83	3.77
	0	2.3	0	0.47	0.52	0	0	8.05	3.35	6.37	2.83	2.78	4.83
	0	2.65	0	0.73	0	0	1.04	3.03	6.32	5.07	1.87	3.61	4.44
	0	0	0	0.69	0	0	0	1.94	2.9	6.19	1.13	2.51	4.22
	0	1.23	0.63	0.58	0	0	0	1.5	2.14	6.23	2.39	4.01	4.04
R9	0	0	1.36	0	0	0	0	1.59	3.37	8.32	2.83	4.63	3.59
	0	0	0	1.13	0	0	0	2.23	2.71	7.22	4.18	3.15	6.26
	0	0	0	0	0	0	0	2.75	3.08	8.3	3.9	5.33	6.98
	0	0	0	0.89	0	0	0	2.11	0	6.58	1.93	5.35	6.23
	0	0	0.56	0	0	0	0	2.17	4.81	8.06	4.23	5.52	5.28
R10	0	1.17	0	0.42	0	0	0	1.79	2.8	4.69	2.4	4.24	4.41
	0	0.87	1.56	0.49	0	0	0	1.02	4.22	3.31	2.3	4.47	5.65
	0	0.78	0	0.51	0	0	0	3.62	4.26	2.22	0.69	3.31	5.36

	0	0.94	0	0	0	0	0	1.96	3.98	5.81	1.9	1.79	5.33
	0	0.77	0	0.54	0	0	0	1.97	4.75	3.44	2.18	1.96	4.51
PROMEDIO	0	0.7192	0.4266	0.4476	0.021	0	0.0208	2.302	3.1614	5.007	2.3388	3.8892	5.1414

Análisis de varianza de tamaño de callos (mm) variedad Catuaí- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el tamaño de callos.

H_1 : El tamaño de callos difiere en al menos uno de los tratamientos.

$$\alpha = 0.05$$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Catuaí by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
122.01	12	2.2e - 16

$$\mathbf{Pvalue} = 2.2e - 16 < \alpha = 0.05$$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

ANEXO 11

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TAMAÑO DE CALLOS EN LA VARIEDAD COSTA RICA 95

TAMAÑO CALLOS (mm)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	1.09	1.35	0.69	0	0.48	0	2.6	4.74	6.27	1.89	6.13	9.69
	0	2.03	0.72	1.65	0	0.32	0	3.78	6.31	6.72	1.72	5.81	6.49
	0	0.67	4.53	1.55	0.34	0.6	0	2.98	3.58	7.76	2.9	5.4	7.06
	0	1.03	0.62	0.92	0.34	0.6	0	3.56	5.61	8.58	2.92	9.73	5.63
	0	0.99	3.27	2.17	0	0.27	0	4.84	3.29	7.26	2.55	9.14	8.05
R2	0	0.46	0.41	0.62	0.56	0.38	0	1.99	4.61	6.36	1.25	7.54	8.36
	0	0.55	0.68	0.9	0.41	0.51	0	2.95	3.32	5.19	1.75	7.7	8.71
	0	0.61	0.45	1.55	0	0.69	0	4.49	6.85	6.1	2.63	8.17	7.35
	0	0.55	2.39	0.34	0.56	0.63	0	4.2	2.43	4.1	3.28	7.88	5.93
	0	0.67	0.74	1.32	0	0.45	0	2.4	2.79	5.87	2.04	8.94	7.16
R3	0	1.05	2.89	1.77	0	0	0.41	2.42	5.91	4.12	2.47	4.97	5.36
	0	2.97	4.37	3.45	0	0	0	3.67	3.39	5.68	1.95	6.43	3.59
	0	1.36	1.83	2.16	0	0	0.33	3.26	5.88	4.86	1.44	10	7.79
	0	0.72	5.14	3.9	0	0	0.42	2.58	5.12	4.16	2.42	11.22	7.74
	0	0.34	2.91	2.85	0	0	1.11	1.53	5.84	6.27	2.28	10.57	6.38
R4	0	0.81	2.44	2.42	0.48	0.27	0	2.17	2.97	7.69	3.04	5.71	8.73
	0	0.43	0.96	1.67	0.61	0.44	0.62	2.19	3.84	8.49	1.53	7.32	8.47
	0	0.45	0.37	2.95	0.32	1.12	0	3.1	3.47	5.16	3.55	6.31	10.34
	0	0.79	0.6	0.91	0.72	1.2	0	1.53	2.18	3.72	2.48	6.99	6.73
	0	0.83	1.38	1.09	0	0.42	0.34	1.77	3.56	7.8	3.94	8.49	9.42

R5	0	0.62	0.82	1.65	0	0	0	1.86	5.42	8.38	2.97	6.63	7.41
	0	1.54	2.08	0.8	0	0	0.73	3.24	4.5	6.99	2.57	7.32	7
	0	0.84	1.18	0.61	0	0.4	0.46	2.25	4.09	5.44	2.64	6.89	6.87
	0	1.75	1.3	1.34	0.38	0	0.51	3.22	4.27	4.95	1.95	7.93	7.63
	0	0.3	1.38	1.22	0	0	0	4.97	4.1	4.39	3.97	6.8	9.63
R6	0	0.42	2.59	1.72	0	0	0	0.56	3.06	9.5	1.23	4.83	7.61
	0	3.54	2.91	1.92	0	0	2.22	0.43	3.76	7.69	2.86	6.86	7.67
	0	1.95	1.98	2.12	0	0.56	0.28	3.24	4.92	5.65	2.32	7.77	7.78
	0	2.71	2.83	3.9	0.46	0	0	0	4.74	5.15	1.21	8.03	6.91
	0	1.68	2.75	3.34	0	0	0	1.49	4.59	8.59	3.06	6.07	6.18
R7	0	0.46	1.95	1.05	0	0.25	0.52	2.07	3.25	4.32	3.37	6.36	10.24
	0	1.52	1.49	0.78	0	0	0.35	2.59	3.2	5.08	3.82	7.08	6.81
	0	3.49	0.66	2.83	0	0.48	0.26	1.57	3.62	4.84	3.2	6.85	7.48
	0	1.74	2.42	0.81	0	0	0.36	3.14	4.15	4.31	2.14	7.03	10.83
	0	1.36	1.57	1.21	0	0.44	0	3.16	3.12	4.78	2.72	4.98	7.32
R8	0	2.65	2.81	0	0	0.39	0	2.48	6.79	4.35	3.83	7.88	5.15
	0	0.81	1.69	0.42	0	0.36	0	1.74	3.67	8.13	2.69	6.08	6.66
	0	0.9	2.3	0	0	0	0	3.97	4.84	5.22	2.34	5.45	5.33
	0	1.72	0.3	0.27	0	0	0	1.28	5.06	7.52	2.83	8.56	7.21
	0	2.75	4.2	0	0	0	0	1.29	4.56	3.89	1.88	5.38	6.4
R9	0	1.5	2.35	1.41	0	0.47	0	0.44	2.61	4.29	2.61	5.74	5.33
	0	0.43	2.05	2.7	0	0	0	2.76	3.59	5.48	4.47	6.69	5.98
	0	1.34	1.92	0.48	0	0	0	1.96	4.48	4.63	2.94	6.73	8.59
	0	0	2.7	0.9	0	0.56	0.34	3.15	4.37	5.53	3.67	5.93	7.14
	0	0.64	2.05	1.86	0	0	1.19	5.4	3.98	2.51	3.04	6.86	6.75
R10	0	0.94	1.59	1.68	0	0	0.22	1.27	2.7	3.9	2.87	5.15	8.39
	0	3.27	1.12	1.21	0	0	0.45	1.04	7.22	6.44	1.92	4.76	6.93
	0	2.39	0.43	0.59	0	0	0	2.2	6.11	5.26	2.03	3.75	7.34

	0	2.67	0.41	1.23	0	0	0.45	2.21	4.37	5.33	4.03	6.22	10.48
	0	2.16	1.9	1.28	0	0	0.23	1.04	4.3	1.99	1.65	5.29	8.22
PROMEDIO	0	1.3298	1.8756	1.4842	0.1036	0.2458	0.236	2.4806	4.3026	5.7338	2.6172	6.927	7.445

Análisis de varianza de tamaño de callos (mm) variedad Costa Rica 95- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el tamaño de callos.

H_1 : El tamaño de callos difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Costa Rica 95 by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
120.12	12	2.2e - 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 101.75												
Data: Costa Rica 95 and Tratamiento sd = 2.72												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	0.00498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.00498	0.00591	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.00498	0.00084	0.00084	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.00498	0.00084	0.00084	1.00000	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	0.00498	1.00000	1.00000	0.00084	0.00084	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	0.00498	1.00000	0.22460	0.00084	0.00084	1.00000	-	-	-	-	-	-
Trat4	1.00000	0.01272	0.01272	0.01272	0.01272	0.01272	0.02316	-	-	-	-	-
Trat5	0.05859	0.02559	0.01417	0.01417	0.01417	0.01417	0.07828	1.00000	-	-	-	-
Trat6	0.17258	0.01393	0.01393	0.01393	0.01393	0.01393	0.10085	1.00000	1.00000	-	-	-
Trat7	0.00495	0.35655	1.00000	0.01417	0.01417	1.00000	1.00000	0.01264	0.01409	0.01385	-	-
Trat8	0.00498	0.00084	0.00169	0.00169	0.00084	0.00169	0.00084	0.01272	0.01417	0.01393	0.03412	-
Trat9	0.00498	0.00084	0.00084	1.00000	0.11737	0.00084	0.00084	0.01272	0.01417	0.01393	0.01417	0.30312

P-value adjustment method: bonferroni ($< \alpha = 0.05$)

ANEXO 12

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TASA EMBRIOGÉNESIS EN LA VARIEDAD CASTILLO

TASA EMBRIOGÉNESIS (%)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	60	60	40	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R2	0	100	20	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R3	0	60	80	40	0	0	0	0	0	0	100	80	100
R4	0	60	0	60	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R5	0	60	40	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R6	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R7	0	60	0	20	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R8	0	100	20	100	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R9	0	60	60	20	0	0	0	0	0	0	100	100	100
R10	0	80	40	20	0	0	0	0	0	0	60	100	100
PROMEDIO	0	64	32	44	0	0	0	0	0	0	96	98	100

Análisis de varianza de tasa de embriogénesis variedad Castillo- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en la tasa de embriogénesis.

H_1 : La tasa de embriogénesis difiere en al menos uno de los tratamientos.

$$\alpha = 0.05$$

ANEXO 13

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TASA EMBRIOGÉNESIS EN LA VARIEDAD CATUAÍ

TASA EMBRIOGÉNESIS (%)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	0	0	0	0	0	0	60	40	40	100	100	100
R2	0	0	0	0	0	0	0	80	100	60	100	100	100
R3	0	0	0	0	0	0	0	80	100	0	100	100	100
R4	0	0	0	0	0	0	0	80	40	40	40	100	100
R5	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	100	80
R6	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	80	100	100
R7	0	0	0	0	0	0	0	100	100	60	100	100	100
R8	0	0	0	0	0	0	0	100	100	20	100	100	100
R9	0	0	0	0	0	0	0	80	100	40	100	100	20
R10	0	0	0	0	0	0	0	60	100	80	80	80	60
PROMEDIO	0	0	0	0	0	0	0	84	88	44	90	98	86

Análisis de varianza de tasa de embriogénesis variedad Catuaí- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H₀: Los tratamientos no difieren en la tasa de embriogénesis.

H₁: La tasa de embriogénesis difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Catuaí by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
110.27	12	2.2e – 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 119.41												
Data: Catuaí and Tratamiento sd = 44.83												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	0.0167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.0025	0.0546	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.0012	0.0546	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.0012	0.0546	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	0.0043	1.0000	0.1985	0.0158	0.0158	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	0.0163	1.0000	1.0000	0.1611	0.1611	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	1.0000	0.0663	0.0042	0.0018	0.0018	0.0242	0.0360	-	-	-	-	-
Trat5	-	0.0167	0.0025	0.0012	0.0012	0.0043	0.0163	1.0000	-	-	-	-
Trat6	1.0000	0.0366	0.0035	0.0018	0.0018	0.0094	0.0270	1.0000	1.0000	-	-	-
Trat7	0.0034	0.6120	1.0000	1.0000	1.0000	0.2826	1.0000	0.0047	0.0034	0.0047	-	-
Trat8	0.0018	0.1208	1.0000	1.0000	1.0000	0.0400	0.4572	0.0026	0.0018	0.0026	1.0000	-
Trat9	0.0012	0.0546	1.0000	-	-	0.0158	0.1611	0.0018	0.0012	0.0018	1.0000	1.0000

P-value adjustment method: bonferroni ($< \alpha = 0.05$)

ANEXO 14

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TASA EMBRIOGÉNESIS EN LA VARIEDAD COSTA RICA 95

TASA EMBRIOGÉNESIS (%)													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	80	80	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R2	0	80	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R3	0	80	80	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R4	0	80	100	60	0	0	0	0	0	0	60	0	0
R5	0	40	40	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R6	0	60	60	60	0	0	0	0	0	0	80	0	0
R7	0	100	20	60	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R8	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R9	0	80	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0
R10	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0
PROMEDIO	0	80	68	48	0	0	0	0	0	0	94	0	0

Análisis de varianza de tasa de embriogénesis variedad Costa Rica 95- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en la tasa de embriogénesis.

H_1 : La tasa de embriogénesis difiere en al menos uno de los tratamientos.

$$\alpha = 0.05$$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Costa Rica 95 by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
114.83	12	2.2e – 16

Pvalue = 2.2e – 16 < α = 0.05

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 172.81												
Data: Costa Rica 95 and Tratamiento sd = 38.56												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.0011	0.0016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.0011	0.0016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.0011	0.0016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	-	1.0000	0.0011	0.0011	0.0011	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	1.0000	1.0000	0.0016	0.0016	0.0016	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	0.9960	1.0000	0.0037	0.0037	0.0037	0.9960	1.0000	-	-	-	-	-
Trat5	0.0486	0.3648	0.1459	0.1459	0.1459	0.0486	0.3648	1.0000	-	-	-	-
Trat6	0.1421	1.0000	0.0039	0.0039	0.0039	0.1421	1.0000	1.0000	1.0000	-	-	-
Trat7	0.0016	0.0028	1.0000	1.0000	1.0000	0.0016	0.0028	0.0060	0.3221	0.0085	-	-
Trat8	0.0011	0.0016	-	-	-	0.0011	0.0016	0.0037	0.1459	0.0039	1.0000	-
Trat9	0.0011	0.0016	-	-	-	0.0011	0.0016	0.0037	0.1459	0.0039	1.0000	-

P-value adjustment method: bonferroni (< α = 0.05)

ANEXO 15

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NÚMERO DE EMBRIONES EN LA VARIEDAD CASTILLO

NÚMERO DE EMBRIONES													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	16	3	1	0	0	0	0	0	0	12	17	8
	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	9	22	25
	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	14	20	12
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	20	25
	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4	21	23
R2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	18	17	4
	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	6	22	2
	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	3
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	30	16	3
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	33	19	3
R3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	25	2	4
	0	6	8	7	0	0	0	0	0	0	11	2	2
	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5	2	4
	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	7	2	3
	0	10	2	0	0	0	0	0	0	0	21	2	2
R4	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	13	2	3
	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	43	2	3
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	3	4
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	32	2	4
	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	22	2	4

R5	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	18	4	2
	0	5	6	8	0	0	0	0	0	0	7	2	1
	0	4	0	7	0	0	0	0	0	0	4	8	3
	0	3	0	11	0	0	0	0	0	0	16	7	2
	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	10	8	2
R6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	23	18
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	18	8
	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	6	8	28
	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	15	10	30
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	12	23
R7	0	15	0	2	0	0	0	0	0	0	6	8	11
	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	10	14	12
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	17	10
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	6	20	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	32	15
R8	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	22	13	15
	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	4	35	23
	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	2	14	26
	0	12	1	0	0	0	0	0	0	0	16	14	16
	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	19	10	10
R9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	13	25	18
	0	5	3	0	0	0	0	0	0	0	12	20	18
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	12	20
	0	4	4	3	0	0	0	0	0	0	8	11	20
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	16	15	21
R10	0	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	12	24
	0	5	4	0	0	0	0	0	0	0	2	23	34
	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	23	26

	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	29
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	23
PROMEDIO	0	3.7	1	1.72	0	0	0	0	0	0	12.26	12.62	12.58

Análisis de varianza de número de embriones variedad Castillo- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el número de embriones.

H_1 : El número de embriones difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Castillo by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
112.88	12	2.2e - 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 206.27												
Data: Castillo and Tratamiento sd = 6.97												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	0.0131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.0036	0.2051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	0.0036	0.9789	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	0.0036	1.0000	1.0000	1.0000	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	0.1248	0.4986	0.0426	0.0181	0.0242	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	0.0418	1.0000	0.0562	0.0486	0.0486	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	-	0.0131	0.0036	0.0036	0.0036	0.1248	0.0418	-	-	-	-	-
Trat5	-	0.0131	0.0036	0.0036	0.0036	0.1248	0.0418	-	-	-	-	-
Trat6	-	0.0131	0.0036	0.0036	0.0036	0.1248	0.0418	-	-	-	-	-
Trat7	-	0.0131	0.0036	0.0036	0.0036	0.1248	0.0418	-	-	-	-	-
Trat8	-	0.0131	0.0036	0.0036	0.0036	0.1248	0.0418	-	-	-	-	-
Trat9	-	0.0131	0.0036	0.0036	0.0036	0.1248	0.0418	-	-	-	-	-

P-value adjustment method: bonferroni ($< \alpha = 0.05$)

ANEXO 16

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NÚMERO DE EMBRIONES EN LA VARIEDAD CATUAÍ

NÚMERO DE EMBRIONES													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	0	0	0	0	0	0	8	12	0	14	30	14
	0	0	0	0	0	0	0	19	0	2	18	40	18
	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	30	14	22
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	32	31
	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	1	27	24
R2	0	0	0	0	0	0	0	23	26	6	37	32	13
	0	0	0	0	0	0	0	22	27	0	8	35	18
	0	0	0	0	0	0	0	20	29	0	17	24	24
	0	0	0	0	0	0	0	18	20	4	18	24	23
	0	0	0	0	0	0	0	0	38	4	12	32	16
R3	0	0	0	0	0	0	0	49	1	0	10	41	7
	0	0	0	0	0	0	0	21	1	0	26	20	19
	0	0	0	0	0	0	0	11	1	0	31	20	21
	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	18	46	44
	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	18	32	28
R4	0	0	0	0	0	0	0	24	4	1	0	42	23
	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	7	10	36
	0	0	0	0	0	0	0	11	2	0	26	12	29
	0	0	0	0	0	0	0	12	15	0	0	15	25
	0	0	0	0	0	0	0	0	16	2	0	33	15

R5	0	0	0	0	0	0	0	29	10	0	39	44	0
	0	0	0	0	0	0	0	11	4	0	34	35	18
	0	0	0	0	0	0	0	13	4	0	22	28	18
	0	0	0	0	0	0	0	38	5	0	16	40	14
	0	0	0	0	0	0	0	55	3	0	26	6	23
R6	0	0	0	0	0	0	0	30	40	8	12	25	17
	0	0	0	0	0	0	0	37	16	2	6	22	8
	0	0	0	0	0	0	0	29	30	3	3	18	30
	0	0	0	0	0	0	0	17	33	3	0	26	22
	0	0	0	0	0	0	0	28	29	3	4	65	19
R7	0	0	0	0	0	0	0	6	22	4	34	22	26
	0	0	0	0	0	0	0	8	12	2	26	21	13
	0	0	0	0	0	0	0	11	8	0	18	33	10
	0	0	0	0	0	0	0	24	6	2	46	14	16
	0	0	0	0	0	0	0	14	10	0	28	16	24
R8	0	0	0	0	0	0	0	33	13	0	19	32	47
	0	0	0	0	0	0	0	45	11	0	33	27	25
	0	0	0	0	0	0	0	29	15	0	36	9	25
	0	0	0	0	0	0	0	17	1	3	23	18	33
	0	0	0	0	0	0	0	25	10	0	42	29	32
R9	0	0	0	0	0	0	0	10	3	0	21	18	0
	0	0	0	0	0	0	0	24	2	0	22	24	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	6	19	0
	0	0	0	0	0	0	0	49	3	3	40	25	21
	0	0	0	0	0	0	0	21	2	3	16	28	0
R10	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	34	11
	0	0	0	0	0	0	0	0	17	6	33	16	0
	0	0	0	0	0	0	0	20	18	5	0	37	14

	0	0	0	0	0	0	0	20	6	3	18	0	11
	0	0	0	0	0	0	0	10	9	8	12	53	0
PROMEDIO	0	0	0	0	0	0	0	19.04	11.02	1.56	19.3	26.84	18.58

Análisis de varianza de número de embriones variedad Catuaí- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el número de embriones.

H_1 : El número de embriones difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Catuaí by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
120.13	12	2.2e - 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

ANEXO 17

RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE NÚMERO DE EMBRIONES EN LA VARIEDAD COSTA RICA 95

NÚMERO DE EMBRIONES													
TRATAMIENTO REPETICIÓN	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
R1	0	5	8	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
	0	2	10	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
	0	10	12	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
R2	0	0	9	8	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	0	2	12	14	0	0	0	0	0	0	9	0	0
	0	4	9	15	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	0	5	6	1	0	0	0	0	0	0	7	0	0
	0	10	18	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0
R3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
R4	0	1	3	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	0	6	3	7	0	0	0	0	0	0	12	0	0
	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	6	0	0

R5	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0
R6	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
	0	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0
	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0
	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	11	0	0
R7	0	10	3	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
	0	7	0	5	0	0	0	0	0	0	7	0	0
	0	8	0	2	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	0	9	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0
R8	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0
	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0
	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0
	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
R9	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	18	0	0
	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	13	0	0
	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0
	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0
R10	0	3	2	3	0	0	0	0	0	0	12	0	0
	0	3	3	4	0	0	0	0	0	0	16	0	0
	0	3	3	4	0	0	0	0	0	0	12	0	0

	0	3	2	4	0	0	0	0	0	0	6	0	0
	0	4	2	2	0	0	0	0	0	0	8	0	0
PROMEDIO	0	3.42	3.22	1.98	0	0	0	0	0	0	7.4	0	0

Análisis de varianza de número de embriones variedad Costa Rica 95- Prueba no paramétrica Kruskal Wallis

H_0 : Los tratamientos no difieren en el número de embriones.

H_1 : El número de embriones difiere en al menos uno de los tratamientos.

$\alpha = 0.05$

Kruskal-Wallis rank sum test		
Data: Costa Rica 95 by Tratamiento		
Chi-squared	df	p-value
112.06	12	2.2e - 16

Pvalue = $2.2e - 16 < \alpha = 0.05$

Con un nivel de significación de 0.05, **se rechaza H_0** . Por lo tanto, no existe suficiente evidencia estadística para rechazar que el porcentaje de contaminación difiere en al menos uno de los tratamientos.

Comparaciones múltiples- Prueba de Wilcoxon

Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test cv = 243.76												
Data: Costa Rica 95 and Tratamiento sd = 3.00												
	Trat0	Trat1	Trat10	Trat11	Trat12	Trat2	Trat3	Trat4	Trat5	Trat6	Trat7	Trat8
Trat1	0.0027	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat10	0.0026	0.1907	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat11	-	0.0027	0.0026	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat12	-	0.0027	0.0026	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trat2	0.00094	1.0000	0.2664	0.0094	0.0094	-	-	-	-	-	-	-
Trat3	0.2496	1.0000	0.0680	0.2496	0.2496	1.0000	-	-	-	-	-	-
Trat4	-	0.0027	0.0026	-	-	0.0094	0.2496	-	-	-	-	-
Trat5	-	0.0027	0.0026	-	-	0.0094	0.2496	-	-	-	-	-
Trat6	-	0.0027	0.0026	-	-	0.0094	0.2496	-	-	-	-	-
Trat7	-	0.0027	0.0026	-	-	0.0094	0.2496	-	-	-	-	-
Trat8	-	0.0027	0.0026	-	-	0.0094	0.2496	-	-	-	-	-
Trat9	-	0.0027	0.0026	-	-	0.0094	0.2496	-	-	-	-	-

P-value adjustment method: bonferroni ($\alpha = 0.05$)