

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN FRÍO Y
REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA RESPUESTA
EMBRIOGÉNICA DE DOS CULTIVARES DE YUCA
(*Manihot esculenta* Crantz)**

Autor: Bach. Franclin Alva Zabaleta

Asesor: Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023

AUTORIZACIÓN DE LA PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Alva Zabaleta Franklin
DNI N°: 45216635
Correo electrónico: 4521663571@untrm.edu.pe
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Agrónoma

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Facultad: _____
Escuela Profesional: _____

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento en la respuesta embriónica de dos cultivares de yuca (Manihot esculenta Crantz)

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Millones Chanamé Carlos Eduardo
DNI, Pasaporte, C.E N°: 16702744
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): 0000-0001-7236-6341

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: _____
DNI, Pasaporte, C.E N°: _____
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>): _____

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
4.00.00 Ciencias agrícolas 4.04.00 Biotecnología agrícola

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

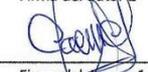
El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 20 de marzo de 2023



Firma del autor 1

Firma del autor 2



Firma del Asesor 1

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis queridos padres, quienes son el pilar fundamental de mis logros, a pesar de las adversidades que la vida les presenta ellos muestran su apoyo incondicional, esperando solamente que el fruto de su trabajo se refleje en los éxitos venideros, también dedico este trabajo a mis cuatro hermanos menores en muestra de agradecimiento a su apoyo continuo, por último, pero no por ello menos importante, dedico este trabajo a todas las personas que de una u otra manera aportaron con su tiempo y conocimiento en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Alva Zabaleta Franclin

AGRADECIMIENTO

Agradezco de una manera muy cordial y especial a todos las personas e instituciones involucradas de forma directa e indirecta en el desarrollo del presente proyecto de investigación, a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) y en particular a la escuela profesional de Ingeniería Agrónoma de la Facultad de Ingeniería y Ciencias agrarias (FICA), por la formación como profesional, agradezco al Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé quien desempeño el papel de asesor, agradezco a mis padres y familiares más cercanos por mostrarme su apoyo incondicional, y sobre todo agradezco a Dios por permitirme la vida y la salud para seguir con paso firme el camino con destino al éxito.

Alva Zabaleta Franclin

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

Vicerrectora de Investigación

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento en la respuesta embriogénica de dos cultivares de yuca (Manihot esculenta Crantz); del egresado Franklin Alva Zabaleta de la Facultad de Ingeniería y Ciencias agrarias Escuela Profesional de Ingeniería agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

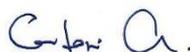
El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 20 de febrero de 2023

Firma y nombre completo del Asesor
Dr. Carlos Eduardo Millones Chavacú

JURADO EVALUADOR DE TESIS



Dr. Jorge Alberto Condori Apfata

Presidente



Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Secretario



Ph. D. Ligia Magali García Rosero

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento
en la respuesta embriogénica de dos cultivares de Yuca (Manihot esculenta Crantz)

presentada por el estudiante ()/egresado (x) Franklin Alva Zabaleta

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma

con correo electrónico institucional 7521663571@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 21 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 03 de Marzo del 2023

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 16 de marzo del año 2023, siendo las 16 horas, el aspirante: Franklin Alva Zabaleta, asesorado por Dr. Carlos Eduardo Millones Chuanamé defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia () la Tesis titulada: Efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento en la respuesta embriogénica de dos Cultivares de Yuca (Manihot esculenta Crantz), para obtener el Título Profesional de Ingeniero agrónomo, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Dr. Jorge Alberto Condoni Apfata

Secretario: Dr. Segundo Manuel Oliva Cruz

Vocal: Ph. D. Ligia Magali García Rosero

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

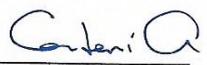
Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:
.....

ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL

AUTORIZACIÓN DE LA PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1. Mapa de ubicación del área de extracción del material biológico	18
2.2. Material de estudio.....	19
2.3. Procedimiento metodológico	19
2.4. Análisis de datos	24
III. RESULTADOS	27
3.1. Inducción de callos.....	27
3.2. Diámetro de callo	30
3.3. Regeneración de organogénesis y callos embriogénicos	33
IV. DISCUSIÓN	36
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. RECOMENDACIONES.....	44
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción morfológica del cultivar “Extranjera” .	19
Tabla 2. Descripción morfológica del cultivar “Tallo blanco”.	21
Tabla 3. Arreglo experimental para determinar el efecto de los tratamientos en frío. ..	24
Tabla 4. Arreglo experimental para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración de callos embriogénicos en un medio basal MS.	25
Tabla 5. Arreglo experimental sin diseño estadístico para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración de callos embriogénicos en un medio de basal WPM.	25
Tabla 6. Análisis de varianza de la inducción de callos a partir de anteras de cultivares de yuca.	28
Tabla 7. Comparación de medias de los efectos principales en cultivares de yuca referente a la inducción de callo obtenidos a partir de anteras.	29
Tabla 8. Análisis de varianza de los efectos simples en cultivares de yuca referente a la inducción de callo a partir de anteras.	29
Tabla 9. Análisis de varianza del diámetro de callo a partir de anteras de cultivares de yuca.	31
Tabla 10. Comparación de medias de los efectos principales en cultivares de yuca referente al diámetro de callo obtenidos a partir de anteras.	31
Tabla 11. Análisis de varianza de los efectos simples en cultivares de yuca referente al diámetro de callo a partir de anteras.	32
Tabla 12. Respuesta <i>in vitro</i> de raíces adventicias y callo embriogénico a partir de callos inducidos a partir de anteras de yuca.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de extracción del material biológico.....	18
Figura 2. Cultivo de anteras de <i>Manihot esculenta</i> . a) Inflorescencia de yuca, b) cápsula con 10 anteras, c) Tétrada con microsporas viables, d) microsporas en el estado uninucleado, e) Inducción de callo a partir de anteras, f) callo embriogénico sin diferenciación en embriones somáticos, g) respuesta organogénica en la inducción de raíces adventicias a partir de los callos inducidos.	27
Figura 3. Interacción de los cultivares de yuca y tratamiento en frío en la inducción de callo a partir de anteras.	30
Figura 4. Interacción de los cultivares de yuca y tratamiento en frío en el diámetro de callo a partir de anteras.	33

RESUMEN

El cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz.) representa un cultivo de importancia económica por sus notables propiedades benéficas, utilizando herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, se ha desarrollado una metodología útil de micropropagación, la embriogénesis somática a partir de anteras (Androgénesis). Se consideró como objetivo principal evaluar el efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento en la respuesta embriogénica de dos cultivares de yuca, para ello se desarrolló los siguientes procesos: Extracción y desinfección de los botones florales, instalación de las anteras en medio de inducción de callo e instalación de los callos producidos en medio de regeneración. Se logró registrar que la exposición de las anteras a condiciones de frío a 4°C durante 3 días y el uso de Bencilaminopurina (BAP) a la dosis de 1 mg/L resultan los más adecuados para obtener una mayor inducción de callo en ambos cultivares, además que en el cultivar “Extranjera” el empleo de un medio basal Murashige & Skoog (MS) solo o combinado con los reguladores de crecimiento Ácido naftalenacético (ANA) 1 mg/L y BAP 1 mg/L genero una respuesta organogénica formando raíces adventicias y en el cultivar tallo blanco con el uso de los siguientes medios: medio Woody plant medium (WPM) + ANA + Kinetina (KIN), medio WPM + Zeatine trans + ANA y medio WPM + Zeatine trans + KIN + ANA se logró obtener respuesta organogénica como raíces adventicias. Por otro lado, el empleo del medio basal WPM + ANA + KIN permitió obtener callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático.

Palabras claves: Yuca, antera, inducción de callo, embriogénesis somática, tratamiento en frío y reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

The cultivation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) represents a crop of economic importance due to its remarkable beneficial properties, using biotechnological tools such as *in vitro* plant tissue culture, a useful methodology of micropropagation, somatic embryogenesis from anthers (Androgenesis), has been developed. The main objective was to evaluate the effect of cold exposure time and growth regulators on the embryogenic response of two cassava cultivars, for which the following processes were developed: extraction and disinfection of flower buds, installation of anthers in callus induction medium and installation of the callus produced in regeneration medium. It was recorded that the exposure of anthers to cold conditions at 4°C for 3 days and the use of Benzylaminopurine (BAP) at a dose of 1 mg/L are the most appropriate to obtain a greater callus induction in both cultivars, in addition, in the cultivar "Extranjera" the use of a Murashige and Skoog (MS) basal medium alone or combined with the growth regulators naphthaleneacetic acid (ANA) 1 mg/L and BAP 1 mg/L generated an organogenic response forming adventitious roots and in the white stem cultivar with the use of the following media: Woody plant medium (WPM) + ANA + Kinetin (KIN), WPM medium + Zeatine trans + ANA and WPM medium + Zeatine trans + KIN + ANA it was possible to obtain organogenic response as adventitious roots. On the other hand, the use of the basal medium WPM + ANA + KIN allowed obtaining embryogenic callus without differentiation into somatic embryo.

Key words: Cassava, anther, callus induction, somatic embryogenesis, cold treatment and growth regulators.

I. INTRODUCCIÓN

Países en vías de desarrollo reconocen la real importancia de la yuca (*M. esculenta*) en la canasta familiar, para las familias de escasos recursos económicos la yuca es un alimento básico y muy esencial, este producto ha sido visto como un alimento valioso desde épocas muy antiguas, la parte comestible se caracteriza por su alto contenido en almidón el cual también tiene una diversidad de usos en derivados industriales. Estas características hacen que la yuca sea un cultivo de interés para mejorar, haciendo uso de las herramientas biotecnológicas (Suárez & Mederos, 2011a; Sautter et al., 1996; Florez et al., 2014).

La propagación de yuca a través del cultivo *in vitro* de explantes cobra mayor importancia en el momento justo en el que los problemas fitosanitarios sobrepasan los umbrales y parámetros controlables por el hombre, las constantes pérdidas y reducción de ingresos económicos implicaron la toma de decisiones al respecto, hoy por hoy la propagación vegetativa tradicional de yuca utilizando plantines obtenidos en laboratorio son en cierto modo necesarios si es que como fin se tiene la obtención de mayores rendimientos y menores problemas fitosanitarios (Fregene et al., 2005). La necesidad de producir plantación de alta calidad y en cantidad, disponible y al alcance de los pequeños y grandes productores, ha requerido la búsqueda de posibles alternativas de solución, que permitan el incremento de la efectividad, sobre todo en los distintos métodos de propagación *in vitro* y su completa automatización (Basail et al., 2007a).

Las múltiples investigaciones y su respectiva aplicación pueden promover nuevas mejoras y mayores rendimientos en el cultivo de la yuca, con la aplicación de tecnologías modernas acompañado de la ingeniería genética, la yuca podría tener excelentes propiedades para la industria actual, como: mejorar los rendimientos, generar mayor resistencia al ataque de plagas o enfermedades y mejorar la adaptabilidad a climas adversos, factores como estos podrían ser incentivos suficientes para trabajar en ello (Aristizábal & Sánchez, 2007; Cock, 1982). Para garantizar excelentes resultados es de vital importancia seleccionar material vegetal de plantaciones de calidad en perfectas condiciones agronómicas, una vez obtenido el embrión somático como resultado final es indispensable disponer de tecnologías que ayuda e incrementan en gran medida la producción y multiplicaciones de plántulas *in vitro* de yuca, para ello el uso de un sistema de inmersión temporal (RITA) resulta muy eficiente (Basail et al., 2007b). Las plantas producidas *in vitro* resultan ser de buena calidad (sin mezcla varietal y sanas), eso sí, son poco utilizadas para producción por sus altos costos, en comparación las plantas

producidas en invernaderos que son menos costosas. La selección del material a utilizar como semilla depende de la condición económica de los productores, algunos productores optan por la elección de material *in vitro* debido a que en cierto modo resulta costoso al principio, pero los beneficios que aporta luego son aceptables (Pérez & Rodríguez, 2019). Desde una perspectiva genética, las diferentes variedades de yuca con las que contamos en la actualidad son el resultado del cruce de dos variedades parentales diferentes, por la misma condición de tener una polinización cruzada, los resultados obtenidos a través de mejoramiento genético con intervención del hombre y múltiples cruzamientos a través de los procesos naturales permiten la obtención de especies con determinadas características de interés (Ospina & Ceballos, 2002). El tan solo hecho de obtener plantas completamente sanas en laboratorio a través del cultivo *in vitro*, no resulta suficiente debido a los nuevos intereses con los que se cuenta en la actualidad, es por ello que se hace necesario la obtención de plantas puras con determinados caracteres potenciales de interés, esto nos conduce a la utilización de técnicas auxiliares como la androgénesis, una alternativa es la implementación del cultivo *in vitro* de anteras (Chico & Gonzales, 2018). La obtención de una línea pura de forma natural o por cruces sucesivos, demanda de mucho tiempo y trabajo, la embriogénesis somática a partir de anteras (Androgénesis) es considerado el método más común para la obtención de plantas doble haploides a corto plazo, la inducción de líneas doble haploides (líneas homocigóticas) en lo que concierne al proceso de mejoramiento únicamente puede resultar factible con un protocolo eficiente en la producción de plantas haploides con la ayuda de insumos que permitan la duplicación de cromosomas como la colchicina (Peña, 2017). Desde una perspectiva fitomejoradora, la técnica de DH reduce en gran forma las generaciones de consanguinidad requeridas para logra estabilizar un determinado genotipo híbrido a solo una, por tal hecho resulta mucho más rápido y económico, la obtención de una planta pura haciendo uso de la tecnología de DH (Simarro, 2010). La obtención de una planta doble haploide permite una alta gama de selección para los programas de mejora, debido a que los genotipos gaméticos logran expresarse en su totalidad a nivel de planta, se tarda aproximadamente 9 años en obtener una línea homocigótica a partir de una yuca heterocigótica por los medios convencionales, sin embargo con la técnica de obtención de doble haploides partir del cultivo *in vitro* de anteras (Androgénesis), se logra producir una línea 100% homocigóticas en tan solo una generación (Perera et al., 2012a). Para lograr obtener embriones a partir de anteras es indispensable considerar previo a la instalación de las anteras en medio de inducción de callo, someter las mismas a un choque térmico

(pretratamiento en frío), además de instalar los callos formados en un medio de regeneración de embriones con los reguladores de crecimiento adecuados (Pineda & Rodríguez, 2019).

Por lo antes vertido, en la presente investigación se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento en la embriogénesis somática a partir de anteras en dos cultivares de yuca (*M. esculenta*).

Objetivos específicos

Determinar el tiempo de exposición en frío a 4 °C adecuado para una mayor inducción de callos a partir de anteras en dos cultivares de yuca (*M. esculenta*).

Determinar el medio y los reguladores de crecimiento adecuados para una mayor respuesta organogénica de los callos inducidos a partir de anteras de yuca.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Mapa de ubicación del área de extracción del material biológico

Anexo: La unión

Distrito: Ocumal

Provincia: Luya

Departamento: Amazonas

Coordenadas UTM: 813314.351E – 9304116.128N 17M

Latitud: 6° 17' 16.62" S

Longitud: 78° 10' 6.7" W

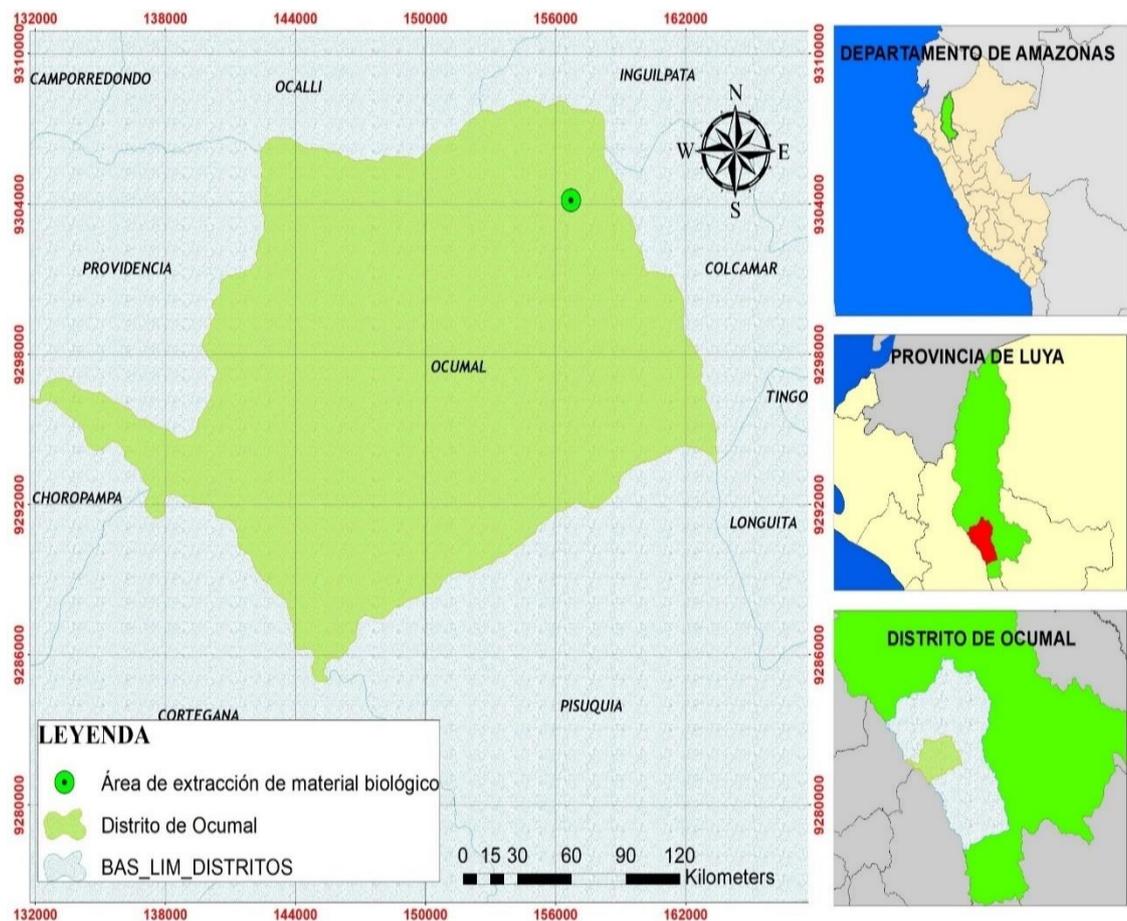
Altitud: 1700 msnm

MGRS:17MRP 13325 04097

Clasificación según INEI: Rural

Figura 1

Área de extracción del material biológico.



2.2. Material de estudio

En la presente investigación el material de estudio estuvo conformado por plantas de yuca de los cultivares “Tallo blanco” y “Extranjera” de aproximadamente 8 a 12 meses de edad, instalados en 0.1 hectáreas en el Anexo de Unión, distrito de Ocumal, provincia de Luya, región Amazonas. A partir de estas plantas fueron extraídas las inflorescencias con botones florales de 1 a 2 mm de longitud polar, tamaño que nos aseguró el mayor número de microsporas en el estado uninucleado.

2.3. Procedimiento metodológico

Los cultivares de yuca en estudio fueron caracterizadas morfológicamente empleando un descriptor de caracterización y evaluación para la utilización de la yuca, elaborado por un grupo de expertos en la materia, dirigidos por el Dr. Daniel Debouck del CIAT (2008).

2.3.1. Cultivar Extranjera

Tabla 1

Descripción morfológica del cultivar “Extranjera”.

Característica	Descripción	Figura
Forma de la raíz reservante	Cónica cilíndrica	
Textura de la superficie de la raíz reservante	Rugosa	
Color de la pulpa de la raíz de almacenamiento	Blanco	
Color de la superficie exterior de la corteza de la raíz de almacenamiento	Plateado a gris	
Color del tallo	Café verde	
Color de la colénquima del tallo	Crema purpura	
Color de la superficie interna de epidermis en el tallo	Verde oscuro	
Color de tallo maduro	Plateado	
Longitud de entrenudos	Largo (Mayor de 15 cm)	

Color de la primera hoja completamente expandida	Verde oscuro	
Color de la nervadura de las hojas	Verde ligero	
Color de las hojas apicales no expandidas	Verde claro	
Pubescencia de las hojas jóvenes	Moderada	
Numero de lóbulos	Cinco	
Forma del lóbulo central	Ovoide	
Longitud del lóbulo central	10 a 20 cm	
Ancho del lóbulo central	4 a 6 cm	
Color del peciolo	Rojo claro con poco verde	
Longitud del peciolo	15 a 25 cm	
Color de sépalos	Verde ligero	
Color de estigma	Naranja	
Color de anteras	Verde claro	
Forma de la planta	Paraguas o sombrilla	
Habito de crecimiento del tallo	Recto	
Habito de ramificación	Tricotómico	
Altura de planta (hasta la copa)	1.5 a 2.5 metros	
Altura de la primera ramificación	0.5 a 1.5 metros	
Peso fresco total de las raíces de almacenamiento por planta (FW kg)	1.5 a 3 kg/planta	
Sabor de pulpa	Dulce	
Contenido de fibra	Fibrosa	
Calidad culinaria	Excelente	
Deterioro post cosecha	Baja	
Reacción a la sequia	Bastante tolerante	
Reacción a la alta humedad del suelo	Sensible al ataque de plagas	

2.3.2. Cultivar Tallo blanco

Tabla 2

Descripción morfológica del cultivar “Tallo blanco”.

Característica	Descripción	Figura
Forma de la raíz reservante	Cónica cilíndrica	
Textura de la superficie de la raíz reservante	Liza	
Color de la pulpa de la raíz de almacenamiento	Blanco	
Color de la superficie exterior de la corteza de la raíz de almacenamiento	Café oscuro	
Color del tallo	Blanco	
Color de la colénquima del tallo	Blanco	
Color de la superficie interna de epidermis en el tallo	Verde oscuro	
Color de tallo maduro	Plomizo	
Longitud de entrenudos	Medio (8 a 15 cm)	
Color de la primera hoja completamente expandida	Verde oscuro	
Color de la nervadura de las hojas	Verde claro	
Numero de lóbulos	Siete	
Forma del lóbulo central	Elíptica	
Longitud del lóbulo central	10 a 25 cm	
Ancho del lóbulo central	2 a 3 cm	
Color del peciolo	Rojo claro con poco verde	
Longitud del peciolo	10 a 25 cm	
Color de las hojas apicales no expandidas	Verde purpura	
Pubescencia de las hojas jóvenes	Moderado	

Color de sépalos	Verde ligero	
Color de estigma	Blanco	
Color de anteras	Verde rojizo	
Forma de la planta	Erecta	
Habito de crecimiento del tallo	Recto	
Habito de ramificación	Tricotómico	
Altura de planta (hasta la copa)	1 a 2,5 metros	
Altura de la primera ramificación	0.4 a 1.5 metros	
Peso fresco total de las raíces de almacenamiento por planta (FW kg)	2 a 3 kg/planta	
Sabor de pulpa	Dulce	
Contenido de fibra	Fibrosa	
Calidad culinaria	Buena	
Deterioro post cosecha	Baja	
Reacción a la sequia	Bastante tolerante	
Reacción a la alta humedad del suelo	Aumenta la susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades.	

La recolección de los botones florales se realizó en una parcela ubicada en el anexo la Unión, distrito Ocumal. Los botones fueron colocados en una solución de lejía comercial clorox al 1%, y trasladados en un cooler más gelpack al laboratorio de Biología de la UNTRM. Se determinó el estadio unicelular de las microsporas en las anteras empleando orceína acética 5% y las muestras fueron visualizadas empleando un microscopio bilocular marca Leica DM500, siendo las cápsulas con diámetro entre 1 a 2 mm las que contenían mayor porcentaje de las microsporas en el estado uninucleado.

Los botones florales con diámetro polar entre 1 a 2 mm fueron separados de las inflorescencias y colocados en una solución de lejía comercial Clorox (5% v/v), además se adicionó el fungicida sistémico BENLATE® 50 WP por un periodo de 30 minutos. Posteriormente fueron enjuagados con agua corriente para su posterior desinfección en cámara de flujo laminar.

2.3.3. Efecto del tratamiento en frío

Desinfección y acondicionamiento de los botones florales

En una cámara de flujo laminar se realizó la desinfección de los botones florales empleando alcohol 70% y posterior enjuague con agua destilada estéril. Luego se adicionó la solución desinfectante a base cloruro de mercurio (HgCl_2) al 0.1% más 2 gotas de Tween-20 por 15 minutos y se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril. Los botones desinfectados se colocaron en placas Petri con agua destilada estéril, selladas con plástico adherente. Las placas se llevaron a refrigeración a 4 °C envueltos con papel aluminio. El tiempo de refrigeración estuvo en función del diseño experimental correspondiente.

Formulación y preparación del medio de cultivo de inducción

Para la inducción de callo a partir de anteras de cultivares de *M. esculenta in vitro* se formuló un medio empleando las sales basales Nitsch & Nitsch modificado por Lichter (NLN), Mioinositol 100 mg/L, sacarosa 3% y phytigel 0,15%.

Inducción de callo a partir de anteras

Culminado el tratamiento de frío correspondiente, se extrajo las anteras de cada botón floral con ayuda de pinza fina y bisturí en estereoscopio y seguido colocadas en medio de inducción en número de 50 anteras por placa. Las placas se incubaron en una estufa a 28 °C por 3 a 4 semanas. Transcurrido el periodo de incubación se realizó el conteo minucioso de anteras que indujeron o no callo en los tratamientos respectivos.

2.3.4. Efecto de los reguladores de crecimiento

Formulación y preparación del medio de regeneración

Para evaluar la respuesta organogénica a partir de los callos de anteras en las dos variedades de yuca se formularon medios de cultivo con sales basales MS + vitaminas y WPM + vitaminas Tucker; ambos medios basales suplementados con mioinositol 1000 mg/L, sacarosa 3% y phytigel 0,15%. Asimismo, en estos medios basales se adicionaron diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento como auxinas (ANA) y citocininas (BAP, KIN, 2-iP, Zeatine trans).

Efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración de embriones somáticos

Las anteras que lograron inducir callo, se seleccionaron y fueron colocadas en medio de regeneración, posteriormente fueron incubadas en estufa a 28 ± 1 °C por 5 a 6 semanas. Transcurrido el periodo de incubación se realizó la revisión visual de callos embriogénicos y callos que lograron la formación de raíz (Rizogenesis).

2.4. Análisis de datos

a. Efecto del tratamiento en frío

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo trifactorial 2A x 3B x 3C, donde Factor A: cultivares de yuca (a1: Extranjera; a2: Tallo blanco), Factor B: Tiempo de exposición en frío (b1: 3 días, b2: 5 días, b3: 7 días) y Factor C: Tipo de citocinina (BAP 1 mg/L, KIN 1 mg/L, TDZ 1 mg/L), se empleó tres repeticiones, donde cada repetición estuvo constituida por una placa con 50 anteras cuyo arreglo se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Arreglo experimental para determinar el efecto de los tratamientos en frío.

Factor A	Cultivares de yuca	a1	Extranjera
		a2	Tallo blanco
Factor B	Tiempo de exposición en frío a 4 °C	b1	3 días
		b2	5 días
		b3	7 días
Factor C	Tipo de citocinina	c1	BAP 1mg/L
		c2	KIN 1mg/L
		c3	TDZ 1mg/L

Porcentaje de inducción de callos: para evaluar la presente variable, se desarrolló un conteo visual minucioso del número de anteras por unidad experimental (placa Petri con 50 anteras) que lograron la formación de callo. Con los datos obtenidos, se estimó el porcentaje de inducción de callo por unidad experimental empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inducción de callo} = \frac{N^{\circ} \text{ de anteras que indujeron callo}}{N^{\circ} \text{ total de anteras por placa}} \times 100$$

Diámetro de callo: Para la medición del diámetro de callo se tomaron fotos a las placas con anteras que habían inducido callo, y empleando una regla milimétrica se realizaron las mediciones respectivas.

b. Efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración de callos embriogénicos.

Se empleó un diseño completamente al azar con tres tratamientos más un testigo. Asimismo, se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento, donde cada repetición estuvo conformado por una placa de Petri con 10 callos embriogénicos. El arreglo experimental se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Arreglo experimental para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración de callos embriogénicos en un medio basal MS.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento
Testigo	Sin regulador
T1	ANA 1 mg/L
T2	BAP 1 mg/L
T3	1 mg/L ANA + 1 mg/L BAP

Tabla 5

Arreglo experimental sin diseño estadístico para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración de callos embriogénicos en un medio basal WPM.

Medio	Reguladores de crecimiento
Medio basal WPM	ANA 0,5 mg/L + KIN 5 mg/L
	Zeatine trans 0,5 mg/L + ANA 0,5 mg/L
	Zeatine trans 1,0 mg/L + ANA 0,5 mg/L
	Zeatine trans 0,5 mg/L + KIN 5 mg/L + ANA 0,5 mg/L
	Zeatine trans 1,0 mg/L + KIN 5 mg/L + ANA 0,5 mg/L
	ANA 2 mg/L + 2,4-D 5 mg/L + 2iP 1 mg/L
	ANA 0,5 mg/L + KIN 7,5 mg/L

Diferenciación de órganos a partir de callos embriogénicos: Se identificaron callos que prosperaron en la inducción de organogénesis, logrando obtener solo la inducción de raíces adventicias, registrando el medio de cultivo con los reguladores de crecimiento empleados.

Los datos obtenidos pasaron a ser tabulados. Previa evaluación del cumplimiento de los supuestos del modelo estadístico, se realizó la prueba de normalidad de Kolgomorov – Smirnov, seguido se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA). Finalmente se realizaron pruebas de comparaciones múltiples (Prueba de Tukey, para comparar las medias de los tratamientos).

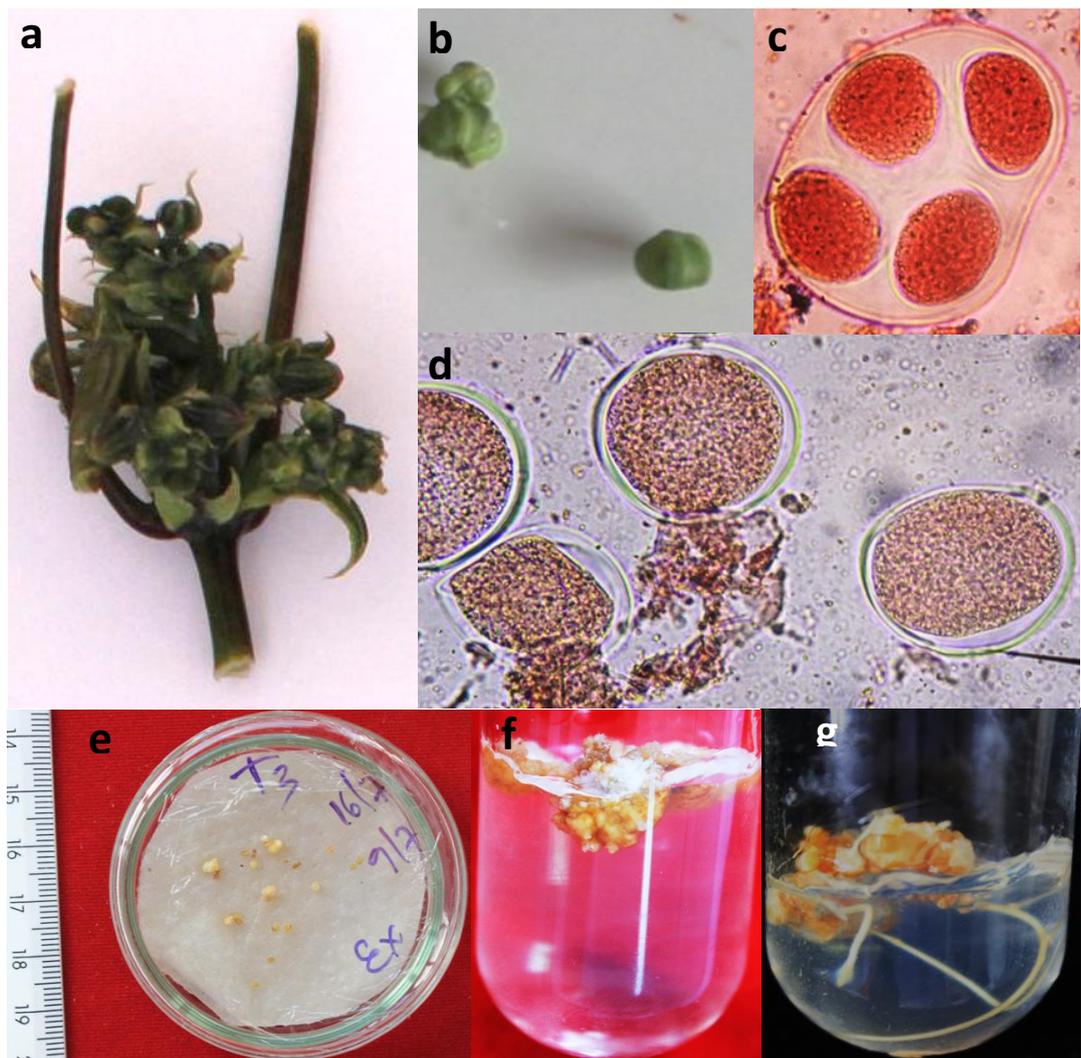
III. RESULTADOS

3.1. Inducción de callos

Empleando un tamaño de cápsula con un rango longitudinal de 1 a 2 mm (Figura 2a y b) se registraron microsporas viables (Figura 2c) y con un mayor porcentaje de microsporas en el estado uninucleado (Figura 2d), las cuales a los 21 días de cultivo *in vitro* indujeron callos (Figura 2e).

Figura 2

Cultivo de anteras de Manihot esculenta. a) Inflorescencia de yuca, b) cápsula con 10 anteras, c) Tétrada con microsporas viables, d) microsporas en el estado uninucleado, e) Inducción de callo a partir de anteras, f) callo embriogénico sin diferenciación en embriones somáticos, g) respuesta organogénica en la inducción de raíces adventicias a partir de los callos inducidos.



En la Tabla 6 se muestra en Análisis de varianza de la inducción de callos a los 21 días de cultivo *in vitro*. El Factor B: tratamiento en frío y el Factor C: tipo de citocinina registraron alta significación estadística, indicando que al menos algunos de los niveles de los factores mostraron mayor efecto en la inducción de callo. En la interacción cultivar x tipo de citocinina se registró significación estadística, indicando que ambos factores actuaron con dependencia uno a otro.

Tabla 6

Análisis de varianza de la inducción de callos a partir de anteras de cultivares de yuca.

Fuentes de variación¹	GL	SC	CM	FC	Pr > F	
C	1	0,0001	0,0001	0.01	0.9142	n.s
TF	2	0,1422	0,0711	7.96	0.0008	***
C x TF	2	0,0577	0.0288	3.23	0.0455	*
TC	2	0,1348	0.0674	7.54	0.0011	**
C x TC	2	0,0003	0.0015	0.17	0.8455	n.s
TF x TC	4	0,0479	0.0120	1.34	0.2631	n.s
C x TF x TC	4	0,0550	0.0014	1.54	0.1999	n.s
Error	72	0,6435	0.0089			
Total	89	1,0843				

¹: Cultivar = C, Tratamiento en frío = TF, Tipo de citocinina = TC, No significativo = n.s, Significativo (*p*-valor <0.05) = *, Significativo (*p*-valor <0.01) = **, Significativo (*p*-valor <0.001) = ***.

En la Tabla 7 se muestra los efectos principales. Referente a la inducción de callo, el Factor B: tratamiento en frío de las anteras, donde los 3 días de tratamiento en frío influyó en la mayor inducción de callo, siendo la prueba significativa. De igual manera, el Factor C: tipo de citocinina, donde el empleo de BAP 1 mg/L registró el mayor porcentaje de inducción de callo en las anteras.

Tabla 7

Comparación de medias de los efectos principales en cultivares de yuca referente a la inducción de callo obtenidos a partir de anteras.

Factores	N	Media inducción de callo (%)
Factor A: Cultivar		
Extranjera	45	37,8 a
Tallo Blanco	45	38,4 a
Factor B: Tratamiento en frío		
3 días	30	48,3 a
5 días	30	33,4 b
7 días	30	32,6 b
Factor C: Tipo de citocinina		
BAP 1mg/L	30	48,3 a
KIN 1 mg/L	30	33,6 b
TDZ 0,25 mg/L	30	32,4 b

Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un $P \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba Tukey.

En la Tabla 8 se muestra el análisis de varianza de los efectos simples de la inducción de callo en las anteras, cuando se combina el Factor A con los niveles del Factor B, no se registró diferencias significativas, en tanto, cuando se combina el Factor B con niveles del Factor A se registran diferencias significativas.

Tabla 8

Análisis de varianza de los efectos simples en cultivares de yuca referente a la inducción de callo a partir de anteras.

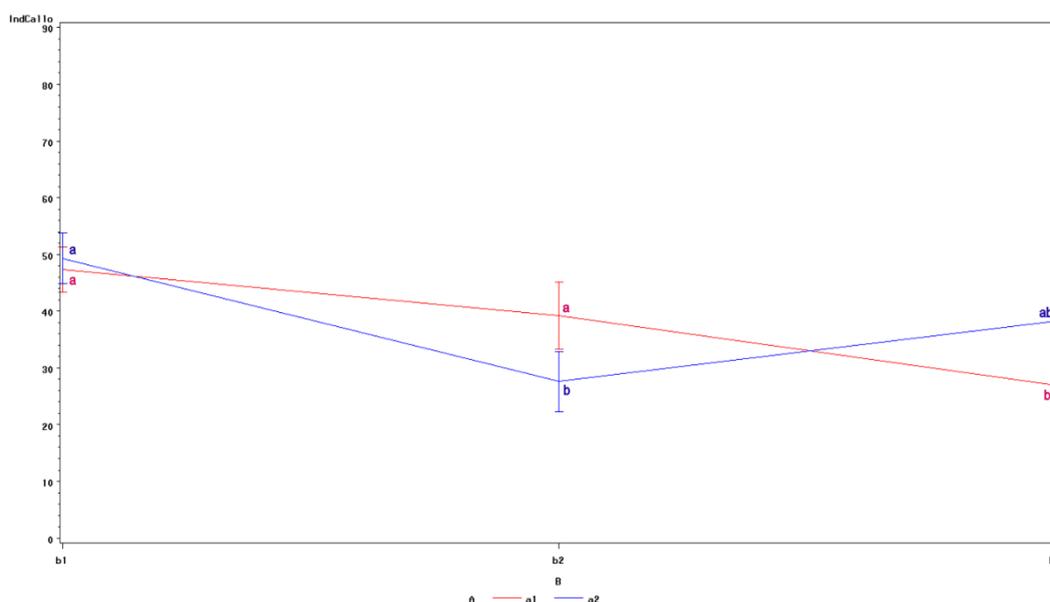
Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal.	Pr > F	
A en b1	1	0.0007	0.0007	0.07	0.7877	n.s
A en b2	1	0.0299	0.0299	3.34	0.0716	n.s
A en b3	1	0.0272	0.0272	3.05	0.0851	n.s
B en a1	2	0.0939	0.0470	5.26	0.0074	**
B en a2	2	0.1059	0.0530	5.93	0.0041	**
Error	72	0.6435	0.0089			

No significativo = n.s, Significativo (p -valor < 0.05) = *, Significativo (p -valor < 0.01) = **, Significativo (p -valor < 0.001) = ***.

En la Figura 3 se muestra la inducción de callo, donde la interacción de cultivar x tratamiento en frío indica que el nivel b1 (3 días) tiene mayor efecto combinado con los dos cultivares, destacando el cultivar extranjera. Por tanto, el empleo de 3 días de tratamiento en frío y el uso de BAP 1 mg/L los adecuados para obtener una mayor inducción de callo en las anteras de yuca en cualquier de los cultivares en estudio.

Figura 3

Interacción de los cultivares de yuca y tratamiento en frío en la inducción de callo a partir de anteras.



3.2. Diámetro de callo

En la Tabla 9 se muestra en Análisis de varianza del diámetro de callo a los 21 días de cultivo *in vitro*. El Factor A: cultivar de yuca y el Factor C: tipo de citocinina registraron alta significación estadística, indicando que al menos algunos de los niveles de los factores mostraron mayor efecto en el diámetro de callo. En la interacción cultivar x medio de cultivo de inducción con citocinina se registró significación estadística, indicando que ambos factores actuaron con dependencia uno a otro.

En la Tabla 9 se muestra los efectos principales. Referente al diámetro de callo, el Factor A: cultivar, siendo el cultivar extranjera la que registró mayor diámetro de callo, siendo la prueba significativa. De igual manera, el Factor C: tipo de citocinina, donde el empleo de BAP 1 mg/L registró el mayor diámetro de callo en las anteras.

Tabla 9

Análisis de varianza del diámetro de callo a partir de anteras de cultivares de yuca.

Fuentes de variación¹	GL	SC	CM	FC	Pr > F	
C	1	2.2721	2.2721	29.26	<0.0001	***
TF	2	0.0807	0.0403	0.52	0.5970	n.s
C x TF	2	1.2620	0.6310	8.13	0.0007	**
TC	2	5.3344	2.6672	34.35	<0.0001	***
C x TC	2	0.1221	0.0611	0.79	0.4593	n.s
TF x TC	4	0.1301	0.0325	0.42	0.7946	n.s
C x TF x TC	4	0.4304	0.1076	1.39	0.2475	n.s
Error	72	5.5910	0.0777			
Total	89	15.223				

¹: Cultivar = C, Tratamiento en frío = TF, Tipo de citocinina = TC, No significativo = n.s, Significativo (p -valor <0.05) = *, Significativo (p -valor <0.01) = **, Significativo (p -valor <0.001) = ***.

En la tabla 10 se muestra los efectos principales. Referente al diámetro de callo, el Factor A: cultivar, donde el cultivar extranjera tuvo una mayor respuesta sobre el diámetro de callo, siendo la prueba significativa. De igual manera, el Factor C: tipo de citocinina, donde el empleo de BAP 1 mg/L registró el mayor diámetro de callo en las anteras.

Tabla 10

Comparación de medias de los efectos principales en cultivares de yuca referente al diámetro de callo obtenidos a partir de anteras.

Factores	N	Media diámetro de callo (mm)
Factor A: Cultivar		
Extranjera	45	19,0 a
Tallo Blanco	45	15,8 b
Factor B: Tratamiento en frío		
3 días	30	17,6 a
5 días	30	17,6 a
7 días	30	17,0 a
Factor C: Tipo de citocinina		
BAP 1mg/L	30	20,8 a
KIN 1 mg/L	30	16,2 b
TDZ 0,25 mg/L	30	15,2 b

Datos presentados con medias, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un $P \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba Tukey.

En la Tabla 11 se muestra el análisis de varianza de los efectos simples del diámetro de callo en las anteras, cuando se combina el Factor A con los niveles del Factor B, se registró diferencias significativas en los niveles b2 y b3, en tanto, cuando se combina el Factor B con niveles del Factor A se registran diferencias significativas en el nivel b2.

Tabla 11

Análisis de varianza de los efectos simples en cultivares de yuca referente al diámetro de callo a partir de anteras.

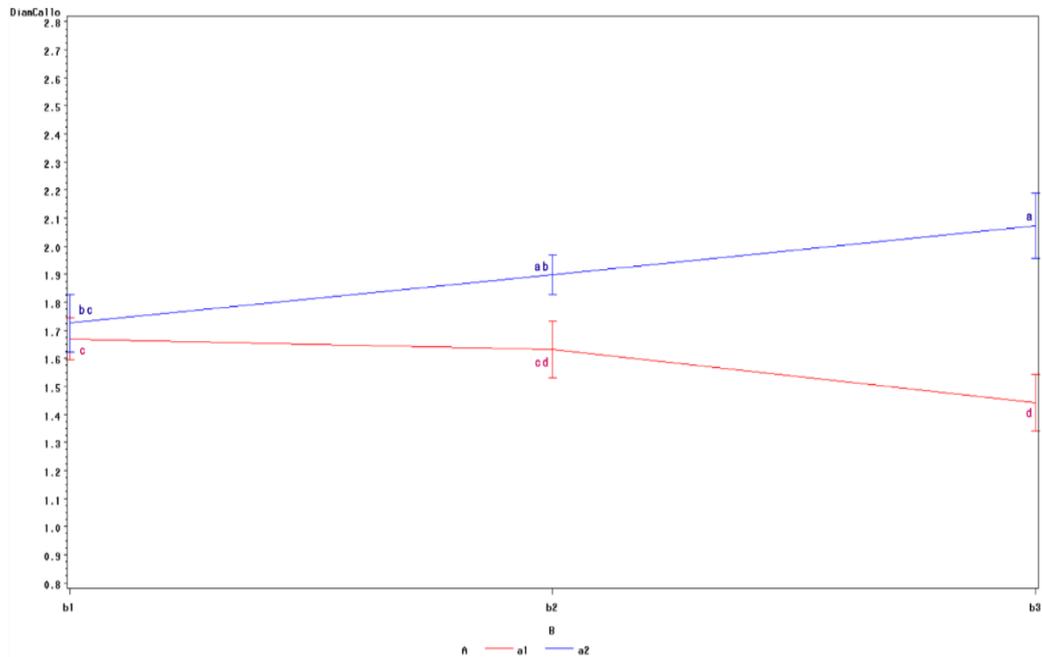
Fuente de variación	GL	SC	CM	Fcal.	Pr > F	
A en b1	1	0.0241	0.0241	0.31	0.5793	n.s
A en b2	1	0.5333	0.5333	6.87	0.0107	**
A en b3	1	2.9768	2.9768	38.33	<0.0001	***
B en a1	2	0.4449	0.2224	2.86	0.0635	n.s
B en a2	2	0.8979	0.4489	5.78	0.0047	**
Error	72	0.6435	0.0089			

No significativo = n.s, Significativo (p -valor <0.05) = *, Significativo (p -valor <0.01) = **, Significativo (p -valor <0.001) = ***.

En la Figura 4 se muestra el diámetro de callo, donde la interacción de cultivar x tratamiento en frío indica que el nivel b2 y b3 (5 y 7 días) tiene mayor efecto combinado con los dos cultivares, destacando el cultivar blanca. Por tanto, el empleo de BAP 1 mg/L resulta adecuado para obtener una mayor inducción de callo en las anteras de yuca, siendo el cultivar tallo blanco el que presentó mayor diámetro de callo.

Figura 4

Interacción de los cultivares de yuca y tratamiento en frío en el diámetro de callo a partir de anteras.

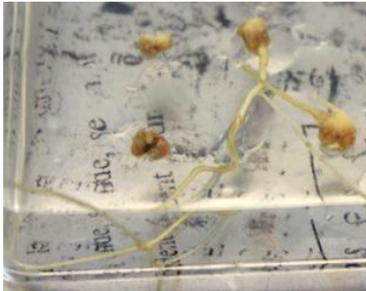


3.3. Regeneración de organogénesis y callos embriogénicos

En la Tabla 12 se muestra las respuestas obtenidas en los callos inducidos en los dos cultivares de yuca. En el cultivar Extranjera el empleo del medio basal MS solo o combinado con los reguladores de crecimiento ANA + BAP se logró obtener respuesta organogénica como raíces adventicias. Por otro lado, el empleo del medio basal WPM + ANA + 2,4-D + 2iP permitió obtener callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático. En el cultivar Blanca el empleo de medio WPM + ANA + KIN, medio WPM + Zeatine trans + ANA y medio WPM + Zeatine trans + KIN + ANA se logró obtener respuesta organogénica como raíces adventicias. Por otro lado, el empleo del medio basal WPM + ANA + KIN permitió obtener callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático.

Tabla 12

Respuesta in vitro de raíces adventicias y callo embriogénico a partir de callos inducidos a partir de anteras de yuca.

Composición medio de regeneración	Respuesta <i>in vitro</i>	Figura
Cultivar Extranjera: <ul style="list-style-type: none">▪ MS + ANA 1 mg/L + BAP 1 mg/L	<ul style="list-style-type: none">▪ Raíz adventicia	
<ul style="list-style-type: none">▪ MS sin reguladores▪ MS + ANA 1mg/L▪ MS + BAP 1mg/L	<ul style="list-style-type: none">▪ Sin respuesta (ambos cultivares)	
Cultivar Blanca: <ul style="list-style-type: none">▪ Medio WPM + ANA 0,5 mg/L + KIN 5 mg/L▪ Medio WPM + Zeatine trans 0,5 mg/L + ANA 0,5 mg/L▪ Medio WPM + Zeatine trans 1,0 mg/L + ANA 0,5 mg/L▪ Medio WPM + Zeatine trans 0,5 mg/L + KIN 5 mg/L + ANA 0,5 mg/L▪ Medio WPM + Zeatine trans 1,0 mg/L + KIN 5 mg/L + ANA 0,5 mg/L	<ul style="list-style-type: none">▪ Raíz adventicia	
Cultivar Extranjera: <ul style="list-style-type: none">▪ Medio WPM + ANA 2 mg/L + 2,4-D 5 mg/L + 2iP 1 mg/L	<ul style="list-style-type: none">▪ Callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático	

Cultivar Blanca:

- Medio WPM + ANA
0,5 mg/L + KIN 7,5
mg/L

- Callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático



IV. DISCUSIÓN

La propagación de yuca en perfecto estado fitosanitario, utilizando las técnicas convencionales (a partir de esquejes), resultó tener cierto grado de dificultad, por el mismo hecho de que requirió de mayores cuidados, a pesar de haber utilizado plantas en perfecto estado fitosanitario, se experimentó cierto grado de dificultad en el proceso de desinfección de los botones florales. Los métodos tradicionales de propagación vegetativa de yuca permiten un rápido proceso de obtención de una planta completa (Pérez & Rodríguez, 2018; Quevedo et al., 2015), solo que dicho proceso no garantiza la no propagación de enfermedades (Fregene et al., 2005; Suárez & Mederos, 2011b)

En el presente trabajo se realizó la caracterización morfológica de los dos cultivares utilizados, con la finalidad de conocer sus características representativas. Beovides et al. (2002) menciona que este tipo de estudios resultan de gran interés e importancia para tener conocimiento de los especímenes a utilizar en el presente y posterior uso en análisis futuros en la validación de posibles metodologías del cultivo *in vitro* de yuca implementados.

Shtereva et al. (1998) logró determinar que las plantas cultivadas en condiciones controladas de temperatura, humedad bajo invernadero, a diferencia de las plantas cultivadas en campo libre, poseían mayor capacidad androgénica en anteras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), asimismo, la edad de planta, estado fisiológico, genotipo influyen en la respuesta androgénica (Viviana, 2009; Pineda & Rodríguez, 2019; Sánchez et al., 2019; García, 2020). Al respecto, en la presente investigación se colectaron inflorescencias en dos cultivares de yuca entre 8 a 12 meses de edad cultivadas a campo libre, lo cual probablemente haya influenciado en no registrar una respuesta embriogénica de los callos inducidos de las anteras.

Tanto el cultivar Tallo blanco como el cultivar Extranjera presentan alto grado de floración, destacando el cultivar Extranjera. Ospina & Ceballos, (2002) no todas los cultivares de yuca logran florecer en las mismas condiciones ambientales, entre los cultivares que lo logran existe cierto grado de diferencia en cuanto a la cantidad de flores que producen y tiempo de floración, por lo que se puede decir que la inducción de floración está considerablemente influenciada por las condiciones ambientales. Gracias a la facilidad de aislamiento y naturaleza heterocigótica de la yuca, los explantes derivados de plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero y cultivadas *in vitro*, se han

convertido en el material perfecto para evaluar distintos factores relacionados con la embriogénesis somática (Raemakers, et al., 1997).

Se logró registrar en ambos cultivares que el tamaño adecuado de botón floral estaba entre 1 a 2 mm de longitud polar, rango en el cual se observó mayor número de microsporas viables en estado uninucleado, estado óptimo para poder desviar la ruta de diferenciación y por consiguiente lograr la formación de callo embriogénico y posterior regeneración. Perera et al., (2012b) observó que el mayor porcentaje de microcallos provenía de las microsporas aisladas de anteras de categoría longitudinal (2.3 y 2.6 mm), además logró la formación de microcallos en tétradas, granos de polen maduros y microsporas. Peña, (2017) detalla tamaños de cápsulas entre 1 a 1.5 mm, y 2.1 a 2.6 mm resultan ser óptimos, además concluye que las diferencias de rangos están mediadas por el cultivar o variedad utilizados. Chirinos et al., (2006) utilizó botones florales de tamaño 1 a 1.55 mm logrando la formación de callo en anteras derivadas de yuca.

Previo a la instalación de anteras en medio de inducción con citocininas estas fueron sometidas a un pretratamiento en frío, logrando registrar cierto grado de influencia sobre la variable dependiente porcentaje de inducción de callo. Evaluando la interacción cultivar y tipo de citocinina (Factor A y Factor C) para la variable dependiente inducción de callo, se logró determinar que ambos factores actuaron con dependencia uno de otro, es decir, el porcentaje de inducción estuvo influenciado por el tipo de citocinina utilizado. Medina et al., (2007) registro que la adición de citocininas y auxinas resulta necesaria para lograr la inducción de callo y posterior regeneración *in vitro* de raíces de almacenamiento en yuca. El número medio de embriones somáticos y la frecuencia de embriogénesis somática, está influenciada de forma considerable por el tipo de auxina utilizado, cultivar y la dosis del regulador, utilizando lóbulos inmaduros y meristemas apicales de brotes de yuca como explantes (Mongomake et al., 2015).

En lo concerniente a la variable independiente tratamiento en frío se logró determinar que la exposición de las anteras por un periodo de 3 días a una temperatura de 4 °C influyó de mayor manera en la inducción de callo, esto aplica para ambos cultivares (Extranjera y Tallo blanco). Estudios múltiples comparativos registraron los siguientes resultados: Duncann & Heverle, (1976) realizó la comparación de anteras sometidas y no sometidas en tratamiento en frío sobre su desarrollo, logro observar que, en las unidades sometidas a tratamiento en frío, la fase de desarrollo de las anteras se retrasaba con respecto a los controles comparables. Estudiando técnicas con el fin de mejorar la recuperación de plantas a partir de embriones somáticos de yuca, se sometieron los embriones a

exposición a la corriente de aire de la cabina de flujo laminar (deseccación rápida), logrando como resultado un 92% de germinación y un 83% de regeneración completa de las plantas (Mathews et al., 1993).

Para los tres niveles del Factor C, se utilizó la auxina 2,4-D 8 mg/L en combinación con una citocinina BAP, KIN y TDZ respectivamente, logrando registrar que la combinación auxina y citocinina (2,4-D 8 mg/L y BAP 1 mg/L) resultó ser la más adecuada para inducción de callo. Konan et al., (1994) menciona que en la inducción de embriones somáticos a partir de explantes maduros de cotiledones de yuca, la auxina 2,4-D, influye notablemente en el desarrollo embrionario. Szabados et al., (1987) lograron la inducción de embriogénesis somática a partir de hojas inmaduras y puntas de brotes de cultivo *in vitro* de 15 genotipos de yuca, además formar embriones somáticos directamente de los explantes cultivados en un medio que contenía 4-16 mg/L de 2,4-D, también se logró registrar que la capacidad embriogénica de estaba influenciada por el genotipo. Mussio et al., (1998) lograron desarrollar un protocolo para la regeneración de brotes adventicios utilizando lóbulos foliares inmaduros de plantines *in vitro* de yuca, la inducción se produjo con el uso de 2,4-D en un periodo de 10 días, también se logró registrar que la inducción de los explantes por un periodo superior a 10 días, provocó una regeneración reducida y retraso en la formación de brotes. Stamp, (1987) logró demostrar a través de estudios morfológicos y anatómicos que los embriones somáticos se desarrollan de igual forma en explantes clonales de hoja y semillas maduras de yuca, estos cultivados por un periodo de 20 a 24 días en un medio basal MS suplementado con 40 mg/L de 2,4-D. Las auxinas estimularon la embriogénesis somática, mientras que las citoquininas indujeron la organogénesis de brotes de yuca, la efectividad sobre la organogénesis resultó diferente en función a las distintas citoquininas y en combinación de auxinas, el tidiazuron y benciladenina estimularon más la organogénesis de brotes que la N-isopenteniladenina y kinetina (Guohua, 1998).

En cuanto a la comparación de medias de los efectos principales sobre las dos variables dependientes del experimento N°1 (Tratamiento en frío) para el Factor A (Cultivares), se registró significancia estadística en lo que concierne a diámetro de callo, mostrando mejor respuesta el cultivar extranjera (19 mm), en cuanto a la variable dependiente porcentaje de inducción de callo no se registró significancia estadística. Para el factor B (Tratamiento en frío), se registró significancia estadística en el porcentaje de inducción de callos, presentando mejores resultados el pretratamiento en frío por un periodo de 3 días (48.3%), y en cuanto a la variable dependiente diámetro de callo no registro significancia

estadística. Para el Factor C (tipo de citocinina), se registró significancia estadística para ambas variables dependientes, en cuanto al porcentaje de inducción de callo se obtuvo mejor resultado en las unidades experimentales tratada con la citocinina BAP 1 mg/L (48.3%), en lo concerniente a la variable diámetro de callo también se obtuvo mejores resultados en las unidades experimentales tratadas con la citocinina BAP 1 mg/L (20.8 mm). Pacheco et al., (2003) determinó que el efecto factor tratamiento en frío y factor regulador de crecimiento en la inducción de callo a partir de anteras de *Solanum iopetalum*, resulta altamente determinante y significativo, por lo que se hace necesario la utilización de ambos factores para lograr estimular la respuesta callogénica en las anteras. Obtener 100 % de inducción de callo a partir de anteras resulta poco probable, en el presente experimento utilizando tres diferentes citocininas, se obtuvo un % de inducción de callo 48.3 %, 33.6 y 32.4 %, sin embargo, utilizando otros tipos de explantes a parte de las anteras es más probable la obtención de un mayor porcentaje como lo que obtuvo. Ballesteros et al., (2019) en el cultivar venezolana obtuvo un porcentaje perfecto de callogénesis (100 %) a partir de explantes de peciolo de yuca y un 26% en el cultivar negrita, además logro registrar que el porcentaje de inducción de callo está determinada por el tipo de explante, regulador de crecimiento, el contenido endógeno del regulador de crecimiento y del genotipo, también menciona que en algunos casos resulta necesario la adición de determinadas auxinas y citocininas o ambas al mismo tiempo. Eskes et al., (1974) tanto las citocininas como auxinas promueven el crecimiento y desarrollo de callo en yuca, las citocininas son obligatorias para el crecimiento de callo, la Zeatina y 2iP ambas citocininas naturales producen tejidos verdes más no desarrollo de órganos, la auxina (NAA) resulta necesario para el inicio de formación y crecimiento de las raíces en el callo.

En cuanto a los efectos simples referente a la inducción de callo, se registró significancia estadística cuando se combina el tratamiento en frío (Factor B) con los niveles del Factor A, más no se muestra significancia estadística cuando se combina los cultivares (Factor A) con los niveles del Factor B. Evaluando la interacción de cultivar x tratamiento en frío, sobre la inducción de callo se registró que el Nivel b1(3 días) tiene mayor efecto combinado con los dos cultivares. Por tanto, el empleo de un pretratamiento en frío de 3 días y uso de BAP 1 mg/L generan mejores resultados en cuanto a inducción de callo, aemos inferencia. Trejo et al., (2002) estudio el efecto de la exposición en frío y reguladores de crecimiento sobre la regeneración de plantas verdes a partir de anteras en arroz, los resultados mostraron que la exposición a una temperatura de 4 °C por 7 días

estimuló la inducción de callo, además la mayor formación de brotes y raíces se obtuvo con la combinación de la auxina 2,4-D (1.5 mg L⁻¹) y la citocinina BAP (0.5 mg L⁻¹). Los efectos principales referente al diámetro de callo, para el Factor A (Cultivar) muestran que el cultivar extranjera responde de mejor manera, de igual forma las unidades experimentales tratadas con la Citocinina BAP 1 mg/L, registraron mayor diámetro de callo de las anteras inducidas. El análisis de varianza de los efectos simples de diámetro de callo, combinado el Cultivar con los días de tratamiento en frío (Factor A x Factor B), se encontró diferencias significativas en los 5 días y 7 días (niveles b₂ y b₃), por otro lado, cuando se combina el tratamiento en frío (Factor B) con los cultivares extranjera y tallo blanco (niveles del factor A) se registra significancia en el cultivar tallo blanco. En la interacción cultivar x tratamiento en frío indica que en los niveles b₂ y b₃(5 y 7 días) tienen mayor efecto combinado con los dos cultivares, destacando el cultivar tallo blanco. Motallebi & Panahandeh, (2010) evaluó el pretratamiento en frío y concentraciones de colchicina en la inducción y desarrollo de callo en tomate (*Solanum lycopersicum*) a partir de anteras, logrando registrar, un máximo porcentaje de callos inducidos en las anteras pretratadas en condiciones de frío por 3 días y 250 mg/L de colchicina. Gaillard et al., (1996) comprobó que el factor pretratamiento en frío y el estadio de desarrollo de las microsporas, influyeron significativamente en la formación de embriones a partir de las microsporas de polen de maíz (*Zea mays* L.) registrando que las anteras pretratadas durante 18 días promueven una frecuencia de inducción y desarrollo de callo óptimo y posterior desarrollo de embriones androgenéticos.

El medio líquido permitió que los componentes nutricionales del medio de inducción logren estar más al alcance de las unidades experimentales, logrando de este modo ampliar el área de disposición nutricional de la unidad experimental, lo cual comparte también George et al., (1993) quien encontró como resultado que la producción de embriones en medio líquido es claramente mayor, más sincronizada y más rápida que en medio sólido, además la densidad y fragmentación de los embriones influye significativamente en la producción de embriones.

Raemakers et al., (1993) a partir de lóbulos de hojas jóvenes se logró desarrollar embriones somáticos en cuatro genotipos indonesios y dos latinoamericanos de yuca, todos los genotipos utilizados lograron la formación de embriones somáticos, pero la frecuencia de formación de los embriones fue diferente, los genotipos M. Col 22 y Tjurug lograron la mejor producción de embriones germinativos (GE) en un 81%. Schopke et al., (1996) estableció un protocolo que permitió la introducción de ADN de interés en tejidos

embriogénicos de yuca mediante el bombardeo con micropartículas, con la finalidad de seleccionar células genéticamente transformadas y posterior uso para la regeneración de plantas totalmente transgénicas a partir de estas células. Es posible la multiplicación de los brotes axilares en distintos cultivares utilizando la meta-topolina un componente de las plantas, el cual logra estimular la regeneración de brotes a partir de explantes de cotiledones y embriones somáticos (Chauhan & Taylor, 2018). Stamp & Henshaw, (1987) aislaron lóbulos foliares de hojas palmeadas de material clonal de yuca que crecía en laboratorio en condiciones controladas, como resultado logro mostrar una competencia embriogénica óptima.

En la regeneración de organogénesis y callos embriogénicos, se logró encontrar y registrar que en el cultivar extranjera el empleo de medio basal MS solo o combinado con los reguladores de crecimiento ANA + BAP lograron obtener respuesta organogénica como la formación de raíces adventicias, estudios comparativos múltiples similares a partir de diferentes explantes además de anteras detallan los siguientes resultados, Acosta, (2019) logro el establecimiento *in vitro* de diferentes explantes de yuca utilizando diferentes dosis de dos fitorreguladores: Acido naftalenacético (ANA) y 6-Benzilaminopurina (6-BAP), con 6-BAP (0.20 mg/L) + ANA (0.025 mg/L) obtuvo un mayor número con una media de 2.60 nudos por explante, de igual modo se obtuvieron explantes con mayor altura utilizando los mismos fitorreguladores. Albarran et al., (2019) utilizando diferentes explantes provenientes de vitroplantas conservadas *in vitro* como ápices caulinares, yemas axilares y hojas jóvenes, se logró inducir embriones somáticos en los cultivares PER-183, cubana y Criolla, de forma indirecta, además de que la embriogénesis estuvo influenciada por el tipo de auxina utilizada, el cultivar PER-183 independientemente del tipo de explante utilizado mostró mayor respuesta inductiva. Arciniegas vega, (2019) sugiere desarrollar cultivos con protoplastos embebidos con agarosa en un medio suplementado con 1 mg/L de NAA, 1 mg/L BAP y 2 mg/L de kinetina. Por otro lado, el empleo de un medio basal WPM +ANA +2,4-D +2iP permitió obtener callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático. El logro del cultivo de tejidos esta influenciado en gran manera por el medio de cultivo utilizado (Roca & Mroginski, 1991).

En el cultivar tallo blanco el empleo de un medio basal WPM + ANA + KIN, medio basal WPM + Zeatine trans + ANA y medio basal WPM + Zeatine trans +KIN + ANA se logró obtener respuesta organogénica y formación de raíces adventicias. Además, el uso de un medio basal WPM + ANA + KIN permitió obtener callo embriogénico sin lograr obtener

la diferenciación en embrión somático. Estudios múltiples comparativos lograron la regeneración de plantas completas a partir de diferentes explantes, mas no se logró encontrar registro alguno de haber logrado a partir de anteras. Liu & Chen, (1978) encontro que en los callos expuestos a un medio MS modificado (MSB) con BAP 4.44 – 8.88 pM solo logro la formación de raíces, mientras que el empleo de BAP (8.88 pM) combinado con ANA (10.74 pM) facilito la formación de clorofila en los callos. El empleo de BA, GA3 y NAA, en medio Murashigue – Skoog (MS) suplementado con vitaminas B5, dio como resultado el desarrollo completo de una planta de yuca, NAA en combinación con GA3 logro la formación de raíces y NAA con BA dio lugar a la inducción de callo y raíces de almacenamiento (Kantha et al., 1974). Guo et al., (1998) utilizando maltosa en lugar de sacarosa en el medio de cultivo y combinando 2,4-D con paclobutrazol, logro una regeneración vegetal altamente eficiente de planta de yuca mediante organogénesis de brotes. Fotoperíodos prolongados incrementa considerablemente el número de explantes que logran la formación de embriones somáticos, El BAP no resulto fundamental en la formación de embriones somáticos, mientras que el AG3 fue fundamental en la germinación de embriones y su transformación en plantas (Manrique & Roca, 1987). María & Cavallero, (2010) registro que la adición de la citocinina BAP 1 mg/L en un medio basal MS favoreció la morfogénesis caulinar y radical de mandioca en la obtención de múltiples vástagos, mientras tanto KIN y 2iP lograron promover en un menor tiempo la regeneración de plantas.

Marín et al., (2009) evaluaron el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la regeneración *in vitro* de 5 cultivares provenientes de Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), el medio (AG3 0,05 mg/L + ANA 0,02 mg/L) género mayor respuesta inductiva para la regeneración en la mayoría de los cultivares utilizados, presentando un buen desarrollo de raíces y brotes. Nair et al., (1979) en la regeneración de brotes a partir meristemas de yuca, se registró que BA resulto ser el más adecuado para la regeneración de plantas, seguido por Zeatine, kinesina y 2iP respectivamente. En un medio basal MS suplementado con varias dosis de BAP y 2,4-D, los explantes de cotiledón de semillas maduras de yuca, lograron la formación de embriones somáticos y desarrollados cuando se transfirieron a un medio MS suplementado con 0,01 mg/L 2,4-D y 0,1 mg/L BAP (James A. Stamp & Henshaw, 1982).

V. CONCLUSIONES

La exposición de las anteras a condiciones de frío a 4°C por un periodo de tres días y el uso de BAP 1 mg/L resultan los más adecuados para obtener una mayor inducción y diámetro de callo en las anteras de yuca en los cultivares “Extranjera” y “Tallo blanco”.

Los reguladores de crecimiento a las dosis utilizadas no registraron una respuesta embriogénica a partir de callos inducidos a partir de anteras de yuca.

En el cultivar extranjera el empleo de un medio basal MS solo o combinado con los reguladores de crecimiento ANA 1mg/ L y BAP 1mg/L generó una respuesta organogénica formando raíces adventicias, adicional a esto se logró obtener callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático empleando un medio basal WPM + ANA + 2,4-D + 2iP.

En el cultivar tallo blanco con el uso de los siguientes medios: medio WPM + ANA + KIN, medio WPM + Zeatine trans + ANA y medio WPM + Zeatine trans + KIN + ANA se logró obtener respuesta organogénica como raíces adventicias. Por otro lado, el empleo del medio basal WPM + ANA + KIN permitió obtener callo embriogénico sin diferenciación en embrión somático.

VI. RECOMENDACIONES

Al momento de seleccionar el material biológico a utilizar tener en consideración un estricto proceso de recolección de botones florales: seleccionar una planta en perfecto estado fitosanitario y buenas condiciones agronómicas, hora de recolección de preferencia a primeras horas de la madrugada, seleccionar anteras de plantas jóvenes en sus primeros periodos de floración, llevar consigo un Cooler refrigerante, etc.

La desinfección del material biológico a utilizar, importante tomar en cuenta como indispensable, ya que de esto dependerá el porcentaje de unidades contaminadas y por ende el éxito de la investigación.

Previo a la instalación del proyecto oficial, desarrollar planes piloto con el fin de descartar posibles inconvenientes posteriores, permitiendo de este modo ir moldeando el proyecto e ir descartando efectos negativos encontrados en el transcurso del desarrollo del plan piloto.

Evaluar más intervalos de tiempo de exposición de anteras en frío, otros cultivares y diferentes tipos de citocininas, para ver si existe mayor dependencia de dichos factores sobre las variables dependientes evaluadas.

Desarrollar proyectos de investigación que tengan como objetivo principal la estimación de costos y veneficios de la propagación *in vitro* en comparación a la propagación convencional de yuca.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, M. (2019). *Establecimiento in vitro de yuca mediante la técnica de aislamiento de meristemo y uso de fitoreguladores*. Universidad de el Salvador Facultad Multidisciplinaria de Occidente.
- Albarran, J., ; Trujillo, I.; Fuenmayor, F.; Fernandez, H., ; Torrealba, M.; Marin, C., & y Dias, A. (2019). Embriogénesis somática en tres cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a partir de diferentes explantes. *Revista Pittieria*, (42)1, 32–51.
- Arciniegas vega, J. P. (2019). *Desarrollo de un protocolo para la regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas de yuca (Manihot esculenta Crantz)*. Universidad de los Llanos.
- Aristizábal, J., & Sánchez, T. (1987). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical International. Apartado Aéreo 6713 Cali (Ed.), *Boletín de servicios agrícolas de la FAO* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/9253056770-9789253056774>
- Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. In *Fao* (Vol. 163). *Boletín de servicios agrícolas de la FAO*. <https://doi.org/9253056770-9789253056774>
- Ballesteros, E. D., Milena, A., Gómez, S., & Perez, Y. P. (2019). Formación de callos y embriones somáticos en dos variedades de yuca. *SENA*, 29–33. <http://creativecommons.org/licenses/by-ncnd/4.0/>
- Basail, M., Kosky, R. G., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., García, M., Santos, A., Rayas, A., Ventura, C., Bauta, M., Álvarez, M., Páz, E., Boevidez, Y., Llerena, J., Ortega, A., Espinosa, A., & Garcia, J. (2007). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la propagación *in vitro* del cultivar híbrido ‘ FHIA-21 ’ (AAAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal Vol.*, 7(1), 53–56.
- Beovides, Y., Medero, V., González, C., Xiqués, X., Román, M. I., & Milián, M. (2002). Caracterización morfoagronómica de clones de (*Manihot esculenta* Crantz) obtenidos por cultivo *in vitro*. *Bioteología Vegetal*, 2(2), 83–88.

- Biggs, B. J., Smith, M. K., & Scott, K. J. (1986). The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6(3), 229–234. <https://doi.org/10.1007/BF00040008>
- Chauhan, R. D., & Taylor, N. J. (2018). Meta-topolin stimulates de novo shoot organogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1), 219–224. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1315-3>
- Chico, J., & Gonzales, O. (2018). Efecto del ácido naftalenacético y 6-bencilaminopurina en la inducción de callos embriogénicos en anteras de *Carica papaya* L. variedad criolla. 20(4), 401–408.
- Cock, J. H. (1982). La yuca: Una fuente básica de energía en los trópicos. *Science*, 218(4574), 755–762. <http://www.sciencemag.org/content/218/4574/755>
- Duncann, E. J., & Heverle, E. (1976). Effect of Temperature Shock on Nuclear Phenomena in Microspores of *Nicotiana tabacum* and Consequently on Plantlet Production. *Springer-Verlag* 173–177. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01276486>
- Eskes, A. B., Varga, A., Staritsky, G., & Bruinsma, J. (1974). Callus Growth and Rooting of Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) Stem Segments Cultured *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica*, 23(3), 315–320. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1974.tb00946.x>
- Florez, M., Rojas, C., & Delgado, G. (2014). Propagación clonal, conservación y transferencia internacional de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) *in vitro*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 10(2), 32–44.
- Fregene, M., Tohme, J., Roca, W., Chavarriaga, P., Escobar, R., & Ceballos, H. (2005). Biotecnología para la Yuca. *CIAT, Cali, Colombia.*, 377–405. <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/55253/capitulo21.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gaillard, A., Vergne, P., & Beckert, M. (1996). Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 12, 233–236.

- García, J. (2020). Androgénesis y producción de doble haploides en pimiento. *Universidad de Almería*. Departamento de Biología y Geología, Área de Genética.
- George, P. S., Ravishankar, G. A., & Venkataraman, L. V. (1993). Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Reports*, 226–229.
- Guo, J. Y., Li, H. Q., Huang, Y. W., Liang, C. Y., Liu, H. X., Potrykus, I., & Puonti-Kaerlas, J. (1998). Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports*, 17(5), 410–414. <https://doi.org/10.1007/s002990050416>
- Guohua, M. (1998). Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(1), 1–7. <https://doi.org/10.1023/A:1006065120629>
- Jennings, D. L. (1963). Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava, and the effect of interspecific crossing on fertility. *Euphytica*, 12(1), 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00033595>
- Kartha, K. K., Gamborg, O. L., & Constabel, F. (1974). Regeneration of cassava plants from apical meristems. *Plant Science Letters*, 2(1), 107–113.
- Konan, N. K., Sangwan, R. S., & Sangwan, B. S. (1994). Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/bf00043602>
- Liu, M.-C., & Chen, W.-H. (1978). Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers. *Canadian Journal of Botany*, 56(10), 1287–1290. <https://doi.org/10.1139/b78-144>
- Manrique S, L., & Roca, W. (1987). *Efecto del fotoperiodo y del medio de cultivo en la embriogenesis somatica y analisis histologico del proceso en la yuca (Manihot esculenta Crantz)* (p. 18). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali. Colombia. 37(2)
- María, B., & Cavallero, I. (2010). *Micropropagación de cultivares de mandioca de interés para Argentina*. Universidad Nacional del Nordeste.

- Marín, A., Albarrán, J. G., Fuenmayor, F., & Perdomo, D. (2009). Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élitos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(3), 556–562.
- Mathews, H., Schopke, C., Carcamo, R., Chavarriaga, P., Fauquet, C., & Beachy, R. N. (1993). Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports*, 12(6), 328–333. <https://doi.org/10.1007/BF00237429>
- Medero Ruíz, M., Rodríguez Tamayo, Y., & Bravo Franco, S. M. (2021). Determinación del método de propagación por genotipo de yuca para incrementar su rendimiento. *Hombre, Ciencia y Tecnología*, 25(1), 65–74.
- Medero, V. R., Escobar, R., Gallego, G., Tohme, J., Beovidez, Y., & Rodríguez, S. (2002). Determinación por AFLP de la estabilidad genética de plantas de yuca obtenidas por embriogenesis somática y organogenesis. *Biotecnología Vegetal*, 2(4), 245–247.
- Medina, R. D., Faloci, M. M., Gonzalez, A. M., & Mroginski, L. A. (2007). *In vitro* cultured primary roots derived from stem segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. *Annals of Botany*, 99(3), 409–423. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl272>
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., & Fondong, V. N. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1272-4>
- Mora Moreno, R., Soto, J. C., & López, C. (2015). Identificación de qtls asociados a caracteres de arquitectura vegetal en yuca (*Manihot esculenta*). *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 99–109. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1.49251>
- Motallebi Azar, A., & Panahandeh, J. (2010). Effects of colchicine and cold duration pretreatments on androgenesis responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) via anther culture. *Russian Agricultural Sciences*, 36(5), 338–341. <https://doi.org/10.3103/s106836741005006x>

- Mussio, I., Chaput, M. H., Serraf, I., Ducreux, G., & Sihachakr, D. (1998). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(3), 205–211. <https://doi.org/10.1023/A:1006083514209>
- Nair, N. G., Kartha, K. K., & Gamborg, O. L. (1979). Effect of Growth Regulators on Plant Regeneration from Shoot Apical Meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and on the Culture of Internodes *in vitro*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 95(1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(79\)80027-6](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(79)80027-6)
- Ospina, B., & Ceballos, H. (2002). La yuca en el Tercer Milenio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Apartado Aéreo 6713 Cali (Ed.)
- Pacheco Sánchez, M., Lozoya Saldaña, H., & Colinas Leon, M. T. (2003). Reguladores de crecimiento y pretratamiento con frío en la androgénesis *in vitro* de (*Solanum iopetalum* L.). *Agrociancia*, 37, 257–265. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30237305%0ACómo>
- Peña, C. A. O. (2017). Evaluación del efecto de Picloramo aplicado en el medio de cultivo a la inducción androgénica *in vitro* en el cultivo de anteras de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira – Valle del Cauca. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Perera, P. I. P., Dedicova, B., Ordonez, C., Kularatne, J. D. J. S., Quintero, M., & Ceballos, H. (2012). Recent advances in androgenesis induction of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Acta Horticulturae*, 961, 319–325. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.961.42>
- Pérez Iglesias, H., & Rodríguez Delgado, I. (2018). Cultivos tropicales de importancia económica en Ecuador (arroz, yuca, caña de azúcar y maíz). In *Journal of Chemical Information and Modeling: Vol. Ira Edicio* (Issue 9). <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiq8caGzODwAhVKc98KHXIrBDcQFjAAegQIAhAD&url=http%3A%2F%2Frepositorio.utmachala.edu.ec%2F&usg=AOvVa>

- Pineda, P., & Rodríguez, M. (2019). *Cultivo in vitro de anteras y granos de polen de plantas de Hemerocallis spp.* Universidad de la Laguna.
- Quevedo, I. A., Filipia, R., Rodríguez Morales, S., & Santos, A. (2015). Producción de material de plantación de alta calidad genética y fitosanitaria en yuca. *ResearchGate*, 1(1), 22–32. <https://www.researchgate.net/publication/312190167>
- Raemakers, C. J. J. M., Bessembinder, J. J. E., Staritsky, G., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. (1993). Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(2), 151–156. <https://doi.org/10.1007/BF01983228>
- Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. (1997). Micropropagation of *Manihot esculenta* Crantz (Cassava). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 39, 77–102. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07774-0_6
- Roca M., W., & Mroginski A., L. (1991). *Cultivo de tejidos en la Agricultura.* Publicacion. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Sánchez Jhong, K., Cabrera Pintado, R., & Jiménez D, J. (2019). Induction of somatic embryogenesis from foliar explants in three varieties of coffee. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259–264. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>
- Sautter, C., Li, H. Q., Potrykus, I., & Puonti-Kaerlas, J. (1996). Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14(6), 736–740. <https://doi.org/10.1038/nbt0696-736>
- Schopke, C., Taylor, N., Carcamo, R., Konan, K., Marmey, P., Henshay, G., Beachy, R., & Fauquet, C. (1996). Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. *Nature Biotechnology*, 14, 731–735. <http://www.nature.com/naturebiotechnology>
- Simarro, J. M. (2010). Androgenesis Revisited. *Botanical Review*, 76(3), 377–404. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9056-6>

- Shtereva, L. A., Zagorska, N. A., Dimitrov, B. D., Kruleva, M. M., & Oanh, H. K. (1998). Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Reports*, 18(3–4), 312–317. <https://doi.org/10.1007/s002990050578>
- Stamp, J. A. (1987). Somatic embryogenesis in cassava: The anatomy and morphology of the regeneration process. *Annals of Botany*, 59(4), 451–459. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087334>
- Stamp, J. A., & Henshaw, G. G. (1987). Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava. *Annals of Botany*, 59(4), 445–450. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087333>
- Stamp, James A., & Henshaw, G. G. (1982). Somatic Embryogenesis in Cassava. *Pflanzenphysiol*, 105(2), 183–187. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(82\)80011-1](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(82)80011-1)
- Stamp, James A., & Henshaw, G. G. (1987). Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10(3), 227–233. <https://doi.org/10.1007/BF00037307>
- Suárez Guerra, L., & Hernández Espinosa, M. M. (2015). Efecto del pectimorfo en el cultivo de ápices de plantas *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), Clones 'CMC-40' Y 'SEÑORITA'. *Cultivos Tropicales*, 36(4), 55–62.
- Suárez, L., & Mederos, V. R. (2011). Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) tendencias actuales. *Cultivos Tropicales*, 32(3), 27–35.
- Szabados, L., Narváez, J., & Roca, W. M. (1987). Técnicas para el Aislamiento y Cultivo de Protoplastos de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In *CIAT*.
- Szabados, László, Hoyos, R., & Roca, W. (1987). *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports*, 6(3), 248–251. <https://doi.org/10.1007/BF00268492>
- Trejo Tapia, G., Maldonado Amaya, U., Jiménez Aparicio, A., Blanqueto Illescas, M., Salcedo Morales, G., Marínez Bonfil, B. P., & De Jesús Sánchez, A. (2002). Effect of time at low temperature treatment and growth regulators on regeneration of plants from anthers of rice *Oryza sativa* L. (japónica h2005

cultivar). *Agrociencia*, 36(4), 441–449.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30236405>

Vega, V. R. M., Rayas, A., Rodríguez, S., López, J., Cabrera, M., Basail, M., Rodríguez, G., Martínez, M., Torres, M., & Arce, D. (1999). Metodología Para La Regeneración De Plantas Por Embriogénesis Somática Del Clon De Yuca ‘ Inivit Y 93-4 ’. *INIVIT*, 1962, 3.

Viviana, P. G. P. (2009). Evaluacion de la capacidad androgenica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la tecnica de cultivo *in vitro* de anteras. *INIAP*, 25. <http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>

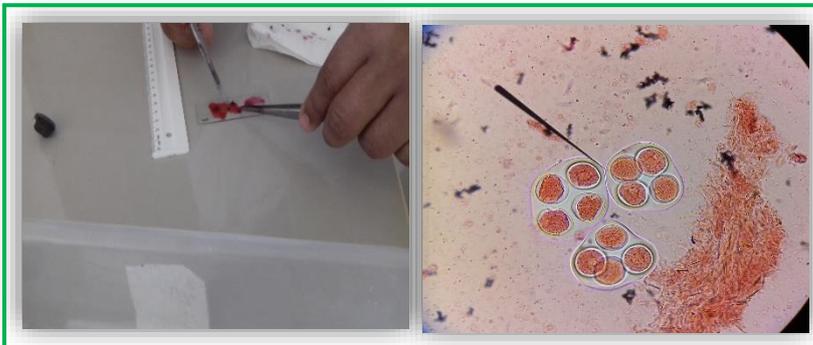
ANEXOS

8.1. Galería fotográfica del proceso de desarrollo de la investigación.

Recolección de los botones florales



Determinación del tamaño de botón floral óptimo.



Selección y desinfección de los botones florales



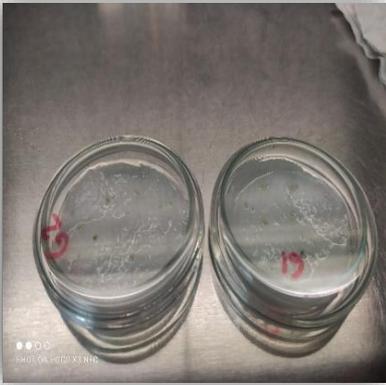
Instalación de los botones en tratamiento en frío





Preparación del medio de inducción de callo y regeneración de callo

Extracción de anteras de los botones florales con ayuda de un estereoscopio

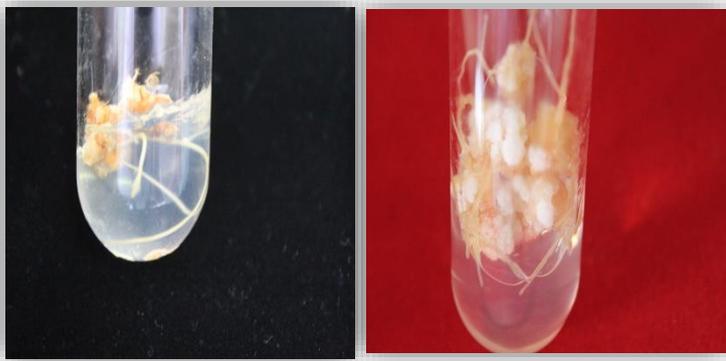
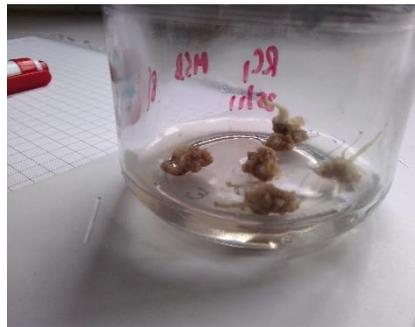


Instalación de anteras en medio de inducción de callo



Selección de callos e
instalación de los mismos en
medio de regeneración

Evaluación de la
respuesta
embriónica de los
tratamientos
instalados



Visualizar la presencia o
ausencia de raíz, tallo o
embrión de las unidades
experimentales

8.2. Procesamiento estadístico

Variable dependiente: Inducción de callos

The GLM Procedure

Dependent Variable: IndCallo

Source	Sum of		Mean Square	F Value	Pr > F
	DF	Squares			
Model	17	0.44080806	0.02592989	2.90	0.0009
Error	72	0.64351800	0.00893775		
Corrected Total	89	1.08432606			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	IndCallo Mean
0.406527	10.14072	0.094540	0.932278

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	0.00010454	0.00010454	0.01	0.9142
B	2	0.14223696	0.07111848	7.96	0.0008
A*B	2	0.05768296	0.02884148	3.23	0.0455
C	2	0.13478549	0.06739274	7.54	0.0011
A*C	2	0.00300802	0.00150401	0.17	0.8455
B*C	4	0.04794651	0.01198663	1.34	0.2631
A*B*C	4	0.05504358	0.01376089	1.54	0.1999

The GLM Procedure

Scheffe's Test for IndCallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	72
Error Mean Square	0.008938
Critical Value of F	3.97390
Minimum Significant Difference	0.0397

Means with the same letter are not significantly different.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	0.93336	45	a2
A			
A	0.93120	45	a1

The SAS System 21:38 Saturday, January 3, 2023 15

The GLM Procedure

Scheffe's Test for IndCallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 72
Error Mean Square 0.008938
Critical Value of F 3.12391
Minimum Significant Difference 0.061

Means with the same letter are not significantly different.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	0.98847	30	b1
B	0.90583	30	b2
B	0.90253	30	b3

The SAS System 21:38 Saturday, January 3, 2023 16

The GLM Procedure

Scheffe's Test for IndCallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 72
Error Mean Square 0.008938
Critical Value of F 3.12391
Minimum Significant Difference 0.061

Means with the same letter are not significantly different.

Scheffe Grouping	Mean	N	C
A	0.98693	30	c1
B	0.90740	30	c2
B	0.90250	30	c3

The GLM Procedure

Least Squares Means

A*B Effect Sliced by A for IndCallo

A	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
a1	2	0.093940	0.046970	5.26	0.0074
a2	2	0.105980	0.052990	5.93	0.0041

The GLM Procedure

Least Squares Means

			IndCallo	LSMEAN
A	B	C	LSMEAN	Number
a1	b1	c1	1.01000000	1
a1	b1	c2	1.00160000	2
a1	b1	c3	0.93980000	3
a1	b2	c1	1.01020000	4
a1	b2	c2	0.88920000	5
a1	b2	c3	0.91280000	6
a1	b3	c1	0.95780000	7
a1	b3	c2	0.80620000	8
a1	b3	c3	0.85320000	9
a2	b1	c1	1.05540000	10
a2	b1	c2	0.96840000	11
a2	b1	c3	0.95560000	12
a2	b2	c1	0.95280000	13
a2	b2	c2	0.89040000	14
a2	b2	c3	0.77960000	15
a2	b3	c1	0.93540000	16
a2	b3	c2	0.88860000	17
a2	b3	c3	0.97400000	18

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: IndCallo

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0.8887	0.2442	0.9973	0.0471	0.1084	0.3856	0.0011	0.0106
2	0.8887		0.3048	0.8860	0.0642	0.1419	0.4662	0.0017	0.0154
3	0.2442	0.3048		0.2429	0.4002	0.6529	0.7642	0.0286	0.1519
4	0.9973	0.8860	0.2429		0.0467	0.1077	0.3837	0.0011	0.0106
5	0.0471	0.0642	0.4002	0.0467		0.6942	0.2551	0.1694	0.5490
6	0.1084	0.1419	0.6529	0.1077	0.6942		0.4541	0.0788	0.3222
7	0.3856	0.4662	0.7642	0.3837	0.2551	0.4541		0.0134	0.0845
8	0.0011	0.0017	0.0286	0.0011	0.1694	0.0788	0.0134		0.4344
9	0.0106	0.0154	0.1519	0.0106	0.5490	0.3222	0.0845	0.4344	
10	0.4502	0.3712	0.0571	0.4521	0.0069	0.0197	0.1070	<.0001	0.0012

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: IndCallo

i/j	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.4502	0.4888	0.3660	0.3419	0.0492	0.0003	0.2162	0.0460	0.5490
2	0.3712	0.5804	0.4442	0.4171	0.0670	0.0004	0.2719	0.0628	0.6458
3	0.0571	0.6339	0.7923	0.8285	0.4114	0.0091	0.9415	0.3947	0.5691
4	0.4521	0.4867	0.3642	0.3403	0.0489	0.0002	0.2150	0.0457	0.5468
5	0.0069	0.1895	0.2705	0.2910	0.9840	0.0709	0.4422	0.9920	0.1604
6	0.0197	0.3555	0.4764	0.5056	0.7090	0.0290	0.7066	0.6869	0.3095
7	0.1070	0.8598	0.9708	0.9336	0.2634	0.0039	0.7090	0.2510	0.7872
8	<.0001	0.0083	0.0147	0.0166	0.1634	0.6577	0.0340	0.1724	0.0064
9	0.0012	0.0580	0.0911	0.1001	0.5358	0.2224	0.1735	0.5557	0.0471
10		0.1500	0.0994	0.0905	0.0073	<.0001	0.0485	0.0067	0.1776

The GLM Procedure

Least Squares Means

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: IndCallo

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
11	0.4888	0.5804	0.6339	0.4867	0.1895	0.3555	0.8598	0.0083	0.0580
12	0.3660	0.4442	0.7923	0.3642	0.2705	0.4764	0.9708	0.0147	0.0911
13	0.3419	0.4171	0.8285	0.3403	0.2910	0.5056	0.9336	0.0166	0.1001
14	0.0492	0.0670	0.4114	0.0489	0.9840	0.7090	0.2634	0.1634	0.5358
15	0.0003	0.0004	0.0091	0.0002	0.0709	0.0290	0.0039	0.6577	0.2224
16	0.2162	0.2719	0.9415	0.2150	0.4422	0.7066	0.7090	0.0340	0.1735
17	0.0460	0.0628	0.3947	0.0457	0.9920	0.6869	0.2510	0.1724	0.5557
18	0.5490	0.6458	0.5691	0.5468	0.1604	0.3095	0.7872	0.0064	0.0471

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: IndCallo

i/j	10	11	12	13	14	15	16	17	18
11	0.1500		0.8311	0.7949	0.1962	0.0023	0.5827	0.1862	0.9256
12	0.0994	0.8311		0.9628	0.2792	0.0044	0.7365	0.2662	0.7592
13	0.0905	0.7949	0.9628		0.3002	0.0050	0.7719	0.2865	0.7240
14	0.0073	0.1962	0.2792	0.3002		0.0680	0.4541	0.9761	0.1664
15	<.0001	0.0023	0.0044	0.0050	0.0680		0.0111	0.0725	0.0017
16	0.0485	0.5827	0.7365	0.7719	0.4541	0.0111		0.4364	0.5206
17	0.0067	0.1862	0.2662	0.2865	0.9761	0.0725	0.4364		0.1575
18	0.1776	0.9256	0.7592	0.7240	0.1664	0.0017	0.5206	0.1575	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

Variable dependiente: diámetro de callo

The GLM Procedure

Dependent Variable: DiamCallo

Source	Sum of		Mean Square	F Value	Pr > F
	DF	Squares			
Model	17	9.63188889	0.56658170	7.30	<.0001
Error	72	5.59104000	0.07765333		
Corrected Total	89	15.22292889			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	DiamCallo Mean
0.632722	16.02333	0.278663	1.739111

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	2.27211111	2.27211111	29.26	<.0001
B	2	0.08068222	0.04034111	0.52	0.5970
A*B	2	1.26205556	0.63102778	8.13	0.0007
C	2	5.33443556	2.66721778	34.35	<.0001
A*C	2	0.12214222	0.06107111	0.79	0.4593
B*C	4	0.13005111	0.03251278	0.42	0.7946
A*B*C	4	0.43041111	0.10760278	1.39	0.2475

The GLM Procedure

Scheffe's Test for DiamCallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	72
Error Mean Square	0.077653
Critical Value of F	3.97390
Minimum Significant Difference	0.1171

Means with the same letter are not significantly different.

Scheffe Grouping	Mean	N	A
A	1.89800	45	a2
B	1.58022	45	a1

The GLM Procedure

Scheffe's Test for DiamCallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 72
Error Mean Square 0.077653
Critical Value of F 3.12391
Minimum Significant Difference 0.1798

Means with the same letter are not significantly different.

Scheffe Grouping	Mean	N	B
A	1.76400	30	b2
A			
A	1.75633	30	b3
A			
A	1.69700	30	b1

The GLM Procedure

Scheffe's Test for DiamCallo

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 72
Error Mean Square 0.077653
Critical Value of F 3.12391
Minimum Significant Difference 0.1798

Means with the same letter are not significantly different.

Scheffe Grouping	Mean	N	C
A	2.07867	30	c1
B	1.61867	30	c3
B			
B	1.52000	30	c2

The GLM Procedure
Least Squares Means

A*B Effect Sliced by B for DiamCallo

B	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
b1	1	0.024083	0.024083	0.31	0.5793
b2	1	0.533333	0.533333	6.87	0.0107
b3	1	2.976750	2.976750	38.33	<.0001

The GLM Procedure

Least Squares Means

			DiamCallo	LSMEAN
A	B	C	LSMEAN	Number
a1	b1	c1	1.90000000	1
a1	b1	c2	1.51000000	2
a1	b1	c3	1.59600000	3
a1	b2	c1	1.89600000	4
a1	b2	c2	1.43400000	5
a1	b2	c3	1.56200000	6
a1	b3	c1	1.85200000	7
a1	b3	c2	1.29000000	8
a1	b3	c3	1.18200000	9
a2	b1	c1	2.15800000	10
a2	b1	c2	1.49400000	11
a2	b1	c3	1.52400000	12
a2	b2	c1	2.20600000	13
a2	b2	c2	1.73400000	14
a2	b2	c3	1.75200000	15
a2	b3	c1	2.46000000	16
a2	b3	c2	1.65800000	17
a2	b3	c3	2.09600000	18

Least Squares Means for effect A*B*C
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: DiamCallo

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0.0301	0.0888	0.9820	0.0100	0.0591	0.7861	0.0009	0.0001
2	0.0301		0.6271	0.0318	0.6676	0.7688	0.0562	0.2160	0.0668
3	0.0888	0.6271		0.0930	0.3611	0.8476	0.1507	0.0868	0.0216
4	0.9820	0.0318	0.0930		0.0107	0.0621	0.8036	0.0010	0.0001
5	0.0100	0.6676	0.3611	0.0107		0.4700	0.0204	0.4166	0.1571
6	0.0591	0.7688	0.8476	0.0621	0.4700		0.1042	0.1271	0.0344
7	0.7861	0.0562	0.1507	0.8036	0.0204	0.1042		0.0021	0.0003
8	0.0009	0.2160	0.0868	0.0010	0.4166	0.1271	0.0021		0.5419
9	0.0001	0.0668	0.0216	0.0001	0.1571	0.0344	0.0003	0.5419	
10	0.1476	0.0005	0.0021	0.1415	0.0001	0.0012	0.0868	<.0001	<.0001

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: DiamCallo

i/j	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.1476	0.0241	0.0363	0.0868	0.3494	0.4038	0.0022	0.1740	0.2698
2	0.0005	0.9279	0.9369	0.0002	0.2078	0.1740	<.0001	0.4038	0.0014
3	0.0021	0.5646	0.6841	0.0009	0.4362	0.3790	<.0001	0.7260	0.0059
4	0.1415	0.0255	0.0383	0.0828	0.3611	0.4166	0.0020	0.1811	0.2602
5	0.0001	0.7345	0.6112	<.0001	0.0930	0.0754	<.0001	0.2078	0.0003
6	0.0012	0.7008	0.8299	0.0005	0.3324	0.2846	<.0001	0.5876	0.0034
7	0.0868	0.0459	0.0668	0.0483	0.5053	0.5722	0.0009	0.2747	0.1705
8	<.0001	0.2509	0.1885	<.0001	0.0140	0.0107	<.0001	0.0403	<.0001
9	<.0001	0.0809	0.0562	<.0001	0.0025	0.0018	<.0001	0.0086	<.0001
10		0.0003	0.0006	0.7861	0.0187	0.0241	0.0909	0.0059	0.7260

The SAS System

09:17 Wednesday, January 7, 2023 11

The GLM Procedure
Least Squares Means

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: DiamCallo

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
11	0.0241	0.9279	0.5646	0.0255	0.7345	0.7008	0.0459	0.2509	0.0809
12	0.0363	0.9369	0.6841	0.0383	0.6112	0.8299	0.0668	0.1885	0.0562
13	0.0868	0.0002	0.0009	0.0828	<.0001	0.0005	0.0483	<.0001	<.0001
14	0.3494	0.2078	0.4362	0.3611	0.0930	0.3324	0.5053	0.0140	0.0025
15	0.4038	0.1740	0.3790	0.4166	0.0754	0.2846	0.5722	0.0107	0.0018
16	0.0022	<.0001	<.0001	0.0020	<.0001	<.0001	0.0009	<.0001	<.0001
17	0.1740	0.4038	0.7260	0.1811	0.2078	0.5876	0.2747	0.0403	0.0086
18	0.2698	0.0014	0.0059	0.2602	0.0003	0.0034	0.1705	<.0001	<.0001

Least Squares Means for effect A*B*C

Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: DiamCallo

i/j	10	11	12	13	14	15	16	17	18
11	0.0003		0.8653	0.0001	0.1775	0.1476	<.0001	0.3552	0.0010
12	0.0006	0.8653		0.0002	0.2374	0.1999	<.0001	0.4495	0.0018
13	0.7861	0.0001	0.0002		0.0092	0.0120	0.1539	0.0027	0.5345
14	0.0187	0.1775	0.2374	0.0092		0.9189	0.0001	0.6676	0.0436
15	0.0241	0.1476	0.1999	0.0120	0.9189		0.0001	0.5954	0.0548
16	0.0909	<.0001	<.0001	0.1539	0.0001	0.0001		<.0001	0.0425
17	0.0059	0.3552	0.4495	0.0027	0.6676	0.5954	<.0001		0.0153
18	0.7260	0.0010	0.0018	0.5345	0.0436	0.0548	0.0425	0.0153	