

# Instituto Tecnológico de Costa Rica

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Dirección de Proyectos

Escuela de Biología

## DOCUMENTO 1

Informe final de proyecto de investigación:

Desarrollo de estrategias eficientes para producción masiva de material vegetativo de pilón mediante técnicas biotecnológicas

CF: 1510164

Autores: M.Sc. Jason Pérez Chaves, coordinador

M.Sc. William Watson Guido

M.Sc. Vilma Jiménez Bonilla

Ph.D. Olman Murillo Gamboa

Cartago, Julio 2023



## Contenido

|   |    |
|---|----|
| Contenido .....   | 2  |
| Información general del proyecto:.....  | 3  |
| Código y Título del proyecto.....   | 3  |
| Autores y direcciones .....   | 3  |
| Resumen .....   | 4  |
| Introducción.....   | 5  |
| Marco Teórico .....   | 8  |
| Ensayos de establecimiento <i>in vitro</i> y multiplicación .....                               | 13 |
| Metodología.....  | 13 |
| Resultados.....   | 14 |
| Discusión y conclusiones .....  | 19 |
| Ensayos de inmersión temporal en sistemas RITAS .....   | 20 |
| Metodología.....  | 20 |
| Resultados.....   | 23 |
| Discusión y conclusiones .....  | 28 |
| Ensayos de Embriogénesis somática .....   | 32 |
| Metodología.....  | 32 |
| Resultados.....   | 35 |
| Discusión y conclusiones .....  | 48 |
| Ensayos de Crioconservación.....  | 53 |
| Metodología.....  | 53 |
| Resultados.....   | 60 |
| Discusión y conclusiones .....  | 66 |
| Ensayos de comparación de crecimiento de material <i>in vitro</i> y miniestacas enraizadas..... | 69 |
| Metodología.....  | 69 |
| Resultados.....   | 69 |
| Discusión y conclusiones .....  | 70 |
| Referencias .....   | 71 |
| Apéndices .....   | 81 |

## **Información general del proyecto:**

### **Código y Título del proyecto**

CF: 1510164

Desarrollo de estrategias eficientes para producción masiva de material vegetativo de pilón mediante técnicas biotecnológicas

### **Autores y direcciones**

Investigador(a) responsable:

M.Sc. Jason Pérez Chaves, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología

Otros investigadores:

M.Sc. William Watson Guido, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología

M.Sc. Vilma Jiménez Bonilla, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología

Ph.D. Olman Murillo Gamboa, Escuela de Ingeniería Forestal.

## Resumen

El presente informe contiene los resultados de la investigación cuyo objetivo principal fue el desarrollo de estrategias para la producción de material vegetativo de pilón mediante técnicas biotecnológicas. Los métodos para alcanzar este objetivo se basaron en el desarrollo del cultivo de tejidos por medio de embriogénesis somática de explante de hoja. Medios de cultivo fueron evaluados en el proceso y los callos embriogénicos fueron utilizados para la evaluación de su respuesta al sistema de inmersión temporal (RITA), evaluando tiempos y frecuencia de inmersión. Los mismos callos embriogénicos también fueron utilizados para el desarrollo de la crioconservación mediante el encapsulamiento y precultivo-vitrificación de estos. En el estudio, se encontró que la embriogénesis somática utilizando explante de hoja es posible, utilizando los reguladores de crecimiento TDZ y picloram. También se determinó que la vitrificación de callos embriogénicos encapsulados es una metodología viable para la crioconservación, pero más estudios son requeridos para terminar de afinar los resultados. La inmersión temporal de callos embriogénicos de pilón permitió la regeneración en menor tiempo de los callos embriogénicos que utilizando medio semisólido. Este es el primer estudio en el que se reporta la embriogénesis somática de la especie *H. alchorneoides* utilizando picloram y TDZ en explantes de hoja. Estos protocolos desarrollados constituyen un avance al ciclo de uso y conservación de los recursos fitogenéticos de la especie, al permitir desarrollar tejidos en el laboratorio que pueden ser utilizados en el establecimiento de criobancos y programas de mejoramiento y selección de genotipos por medio de biotecnología.

Palabras clave: *H. alchorneoides*, embriogénesis somática, crioconservación, cultivo *in vitro*, biotecnología forestal.

## Introducción

*Hieronyma alchorneoides* (pilón) es una especie nativa con gran valor comercial debido a la calidad de su madera. El árbol presenta una sobresaliente adaptación a diversas condiciones de suelos. Su madera muestra gran potencial para la industria, tanto para el sector de la construcción como en el sector de ebanistería. Es una especie con semilla recalcitrante, por lo que no puede conservarse por métodos convencionales como en bancos de semillas, presenta bajos porcentajes de germinación, sus frutos no presentan homogeneidad en la maduración y son dañados por varios insectos, comprometiendo la disponibilidad de este germoplasma.

Muchas especies tropicales presentan problemas de germinación que dificultan su reproducción y conservación. El comportamiento recalcitrante en las semillas de *H. alchorneoides* se da en dos sentidos: (1) pierde viabilidad al disminuirse su porcentaje de humedad y (2) pierde viabilidad al disminuirse su temperatura. El primer factor es de vital importancia a la hora del almacenamiento de semillas, ya que de esta forma se evita el daño a las membranas celulares por la expansión y cristalización del agua intracelular al disminuir la temperatura de esta.

A pesar de estos problemas relacionados con la germinación de *H. alchorneoides*, en el país se ha establecido la reproducción de árboles plus por medio de la multiplicación clonal por miniestacas en jardines clonales. Sin embargo, se tiene la limitante de producir una planta a partir de una miniestaca, lo que restringe la tasa de multiplicación en el tiempo. También, es necesario realizar una renovación de las plantas del jardín clonal cada dos años, con el fin de restaurar su juvenilidad y mantener una alta tasa de producción de nuevos brotes. Aunque la literatura muestra un protocolo de micropropagación de *H. alchorneoides* (Abdelnour-Esquivel *et al.* 2011), no se cuenta con protocolos rutinarios de propagación *in vitro*, ni de conservación en bancos o colecciones formales de germoplasma, que puedan apoyar sus programas de reproducción y conservación.

Una posible solución a esta problemática sería la multiplicación o propagación *in vitro*, en la cual, el embrión puede provenir de cualquier célula somática incluyendo tejido de raíz, dérmico, hojas, tallos, ápices, yemas, etc. El desarrollo de metodologías de cultivo de tejidos constituye el punto de partida para el aprovechamiento, producción a gran escala de plantas y desarrollo de metodologías biotecnológicas que apoyan la conservación y el mejoramiento genético no convencional como la inducción de mutaciones y la ingeniería genética. Adicionalmente, la implementación de técnicas de crioconservación de germoplasma requiere de técnicas de cultivo de tejidos optimizadas.

Como se ha indicado, diversos factores dificultan el aprovechamiento de la semilla, entonces es necesario disponer de protocolos para la clonación de los materiales mejorados y que

permitan avanzar en técnicas de mejoramiento modernas y la conservación en bancos para especies recalcitrantes. Asimismo, la propagación *in vitro* con tejidos somáticos conlleva a la expresión de una baja variabilidad genética. Al utilizar órganos como las hojas de las plantas de partida, se asegura que se copie el genoma del individuo del cual se toman, ya que sus células presentan la misma constitución genética.

Debido a que no se cuentan con protocolos eficientes para la reproducción de clones de *H. alchorneoides* por medio de propagación clonal, se planteó el desarrollo del presente trabajo. Debido a los problemas señalados, este germoplasma únicamente se podría conservar utilizando metodologías de crioconservación, que requieren del desarrollo previo de las técnicas para el cultivo de tejidos. Es importante tener en cuenta también que, con el paso del tiempo, aquellos materiales mejorados y en crecimiento activo van perdiendo su potencial de multiplicación y regeneración, por lo que el desarrollo de la metodología propuesta también apoyará los esfuerzos realizados en mejoramiento genético en la especie en el país.

La técnica de cultivo *in vitro* por micropropagación emplea pequeñas secciones de tejido para la multiplicación masiva de plantas en el medio de cultivo semisólido. De esta forma se obtiene una tasa de propagación mayor que al utilizar el enraizamiento de estacas. Las tasas de multiplicación se pueden aumentar al utilizar técnicas de cultivo de tejidos más especializadas como la embriogénesis somática.

La embriogénesis somática consiste en la producción de embriones generados a partir de células diferentes a las sexuales, por lo tanto, permite la producción de plantas genéticamente idénticas a la planta donadora del tejido utilizado, con tasas de multiplicación generalmente muy altas. La técnica consiste en colocar los explantes en un medio de cultivo con reguladores de crecimiento como el 2,4-D, picloram, bencilaminopurina o tidiazuron entre otros, que inducen la desdiferenciación celular para realizar una posterior modificación en las rutas metabólicas de las células que redirigirán el desarrollo de los tejidos para la producción de embriones somáticos, muy similares a los embriones cigóticos en su anatomía y fisiología, pero con una constitución genética idéntica a la del tejido madre a partir del cual fueron inducidos.

El potencial para la propagación masiva de plantas de la embriogénesis somática representa una técnica estratégica para incluir en programas de mejoramiento genético, conservación de germoplasma, mutagénesis y transformación genética para inducir resistencia a factores ambientales o mejorar la productividad en cultivos. La crioconservación de los genotipos mejorados y silvestres de *H. alchorneoides* no ha sido desarrollada, para esto es imperativo el desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos. Asimismo, el establecimiento de este tipo de protocolos permitiría el apoyo para el desarrollo de programas de mejoramiento existentes en la actualidad.

El objetivo del presente trabajo fue Desarrollar estrategias eficientes para la producción de material vegetativo de pilón mediante técnicas biotecnológicas

Objetivos específicos:

Desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* y multiplicación de microestacas de *H. alchorneoides*

Determinar las condiciones de cultivo para el escalamiento en el Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA ®

Establecer el protocolo para la producción de embriones somáticos de *H. alchorneoides* y la regeneración de plantas a partir de estos

Determinar las condiciones de pre acondicionamiento para la crioconservación de callos embriogénicos

Establecer las condiciones para la recuperación de los tejidos crioconservados mediante el análisis de metilación del ADN

Comparar el crecimiento y desarrollo de las plantas producidas *in vitro*, plantas provenientes de tejidos crioconservados y estacas enraizadas

## Marco Teórico

### *Hieronyma alchorneoides*

*Hieronyma alchorneoides* es una especie forestal nativa de Costa Rica y Centroamérica, que crece en condiciones de altas precipitaciones (de 2000 a 5000 mm) y en sitios con temperatura de 25°C la mayor parte del año, y en regiones con una altitud no mayor a 800 msnm (Montero, de los Santos Posadas y Kanninen 2007). Es una especie con un alto valor comercial y ecológico (Solís y Moya 2003) de rápido crecimiento, que pertenece a la familia Phyllantaceae, y llega a alcanzar alturas de 30 a 45 m y diámetro de hasta 1,7 m. Su fuste es recto y cilíndrico con gambas bien desarrolladas, libre de ramas hasta unos 20 m o más (Alvarado 2016), por esto el aprovechamiento de su madera es alto.

La madera es apreciada en el mercado por su valor estético y en la construcción (Solís y Moya 2003). Es de un color marrón a rojizo en el duramen y con una albura de un tono casi rosado o anaranjado tenue. Su olor o sabor no son característicos, presenta un lustre medio o bajo con textura fina y las fibras pueden rasgarse al cepillarse (Solís y Moya 2003). Es una madera bastante densa y pesada, de resistencia moderada a la pudrición y ataque de algunos insectos como las termitas (Tenorio *et al.* 2016). Puede presentar algunas torceduras y colapsos debidos al método de secado (Alvarado 2016). Por su resistencia, es comúnmente utilizada en construcción pesada como en durmientes de ferrovías, pilotes de fundación, puentes, horcones, vigas, carrocerías de camiones y construcción de embarcaciones (Montero, de los Santos Posadas y Kanninen 2007).

### Reforestación comercial

Dada la alta demanda por madera, fibra y biocombustibles, las plantaciones forestales han adquirido importancia económica y muchas empresas han mostrado interés por invertir en la producción de árboles (Siyag 2014). El gobierno de Costa Rica ha gestionado esfuerzos y compromisos para incentivar la producción sostenible de la madera y la restauración de los paisajes boscosos por medio de pagos por servicios ambientales y canje de deuda de carbono (Brancaion y Chazdon 2017). En este sentido, el rescate, conservación y uso de *H. alchorneoides* mejorada genéticamente ha venido en aumento, principalmente para la utilización en plantación de zonas de restauración o para la producción de madera bajo el modelo de silvicultura (Malkamaki *et al.* 2017).

Muchas iniciativas exitosas han contribuido para la transformación de zonas degradadas con la ayuda de plantaciones forestales (Vidal *et al.* 2016), que aunado a la explotación comercial controlada, se han alcanzado resultados notables en la restauración y protección de suelos (Siyag 2014). Sin embargo, las plantaciones forestales de monocultivo tienen algunas desventajas, entre las que destaca la pérdida de diversidad en especies de aves y abejas (Brancaion y Chazdon 2017) y bien el riesgo aumentado de propagación de plagas o

enfermedades (Mayoral *et al.* 2017). Las plantaciones forestales comerciales tienen varios impactos en la biodiversidad local, sin embargo, con el cultivo y uso de especies nativas en la producción de madera se pueden mitigar muchos de los efectos negativos del monocultivo forestal (Subiakto *et al.* 2016). De ahí la importancia que una especie nativa productora de madera como *H alchorneoides* pueda ser utilizada exitosamente en las plantaciones forestales de Costa Rica.

Un aspecto importante que destaca a nivel mundial es que se ha reportado que la plantación de especies forestales exóticas en los trópicos ha disminuido considerablemente la biodiversidad (Huettmann y Schmid 2015). La reforestación se ha enfocado principalmente en la restauración de la capacidad productiva maderera de los bosques como único objetivo, y en muchos casos no se ha considerado la recuperación de la biodiversidad y de los servicios ambientales que los bosques pueden proveer (Subiakto *et al.* 2016). Por esto, el uso de una mayor variedad de especies nativas como *H. alchorneoides* ha cobrado importancia en los programas de mejoramiento genético, reforestación y conservación (Ribozi *et al.* 2017; Lu *et al.* 2017).

#### Sistemas de producción de plántulas para la reforestación

La propagación de árboles de forma masiva aumenta considerablemente la cantidad individuos disponibles para la reforestación comercial o de restauración (Lamboll *et al.* 2017). En condiciones de bosque, la sobrevivencia de las plántulas producidas a partir de semillas hasta convertirse en un árbol es de alrededor de 1%, sin embargo, al multiplicar plantas en condiciones mejoradas para la propagación, como en un invernadero, el éxito aumenta de forma considerable (Lindgren 2016). Así es posible reducir los costos para la producción de una gran cantidad de plantas sanas y vigorosas que incluso pueden utilizarse para iniciar nuevos ciclos de propagación.

La propagación vegetativa de árboles como un método de reproducción de nuevos individuos, a través de la regeneración de tejidos somáticos, ha venido en aumento en los programas de mejoramiento genético (Varshney y Anis 2015). Este tipo de propagación fija los rasgos deseables que han sido mejorados, debido a que la progenie obtenida va a tener el mismo genotipo que el árbol donador, es decir, será su clon (Hazubska-Przybyt y Bojarczuk 2016). Por esto, es de gran importancia contar con protocolos para el mantenimiento y conservación de líneas resistentes a plagas, enfermedades, condiciones ambientales adversas y más productivas, que son de interés para los productores (Rajpal *et al.* 2016).

Entre las técnicas más utilizadas para la propagación clonal de especies forestales se encuentra la del enraizamiento de miniestacas (Yan *et al.* 2016). En esta técnica se toman pequeñas estacas a partir de una planta adulta, y son colocadas en condiciones ideales para la brotación de raíces laterales, por ejemplo alta humedad relativa, presencia de auxinas y temperatura entre 25 y 30 °C para especies tropicales (Varshney y Anis 2015). En este tipo

de propagación, se deben enfrentar problemas fisiológicos y falta de juvenilidad en el enraizamiento, además, el porcentaje de miniestacas que sobreviven desde la poda, el transporte y el trasplante final es frecuentemente bajo (Yan *et al.* 2016).

#### Problemas de la reproducción de *H. alchorneoides*

Los frutos de *H. alchorneoides* son drupas elipsoides indehiscentes, de 3-5 mm de diámetro, que van cambiando de color verde a rojo y púrpura en la madurez (Figura 1a; Solís y Moya, 2003). Cada fruto se compone de seis semillas, pero muy pocas suelen presentar viabilidad, debido al ataque de insectos de la familia Eurytomidae (Figura 1b), entre otras razones, por lo que su reproducción por medio de semillas se dificulta (Montero *et al.* 2007). Esta especie presenta alto valor ecológico en los hábitats donde se distribuye, debido a que la pulpa de sus frutos es carnosa y de sabor dulce, siendo muy atractivos y consumidos por varias especies de pájaros que diseminan sus semillas en el bosque (Montero *et al.* 2007).

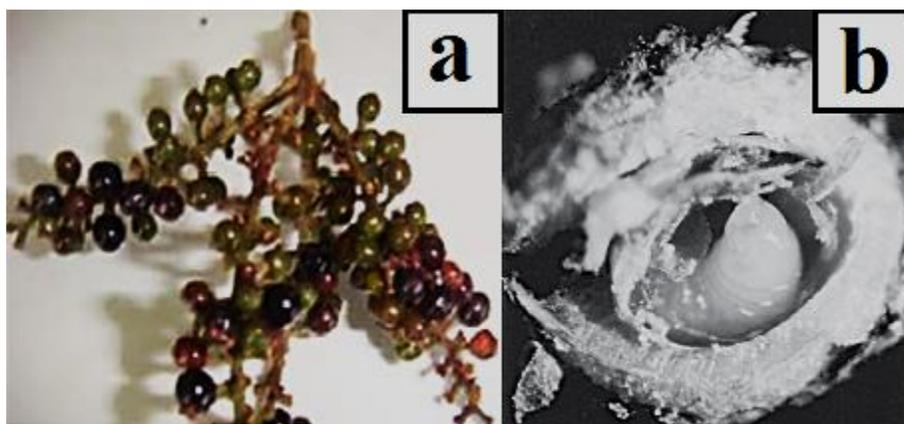


Figura 1. Frutos de *Hieronyma alchorneoides*: (a) en diferentes estadios de maduración; (b) fruto dañado por insectos de la familia Eurytomidae.

Fuente: Valverde-Cerdas *et al.* 2013; Abdelnour-Esquivel, Rojas y Alfaro 2007.

La biología de muchas de las especies tropicales y las condiciones climáticas en que crecen les permiten germinar sin tener que pasar por un periodo de latencia, i.e. alta temperatura y humedad todo o la mayor parte del año (Elzenga y Bekker 2017). *H. alchorneoides* es una especie dioica, de la cual no se conoce con certeza la frecuencia entre árboles masculinos y femeninos, por lo que es posible que exista un desbalance entre las poblaciones de árboles de uno u otro sexo (Solís y Moya 2003). La floración y fructificación de *H. alchorneoides* se ve fuertemente influenciada por factores climáticos como la precipitación y la temperatura (González-Jiménez y Fisher 1989; Lobo *et al.* 2008). Asimismo, sus semillas presentan un metabolismo persistentemente activo (Urrego y Valle 2001), por lo que la especie presenta un comportamiento recalcitrante cuando es almacenada y problemas de reproducción en forma natural en los bosques. Es así que la única opción para lograr una reproducción y

almacenamiento eficientes para especies problemáticas es la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos y la crioconservación.

### Cultivo de tejidos vegetales

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales fueron desarrolladas como un medio para analizar problemas experimentales en la biología y fisiología de plantas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo 2012). En la actualidad son utilizadas ampliamente en la micropropagación comercial de diferentes especies (Vives *et al.* 2017), producción de plantas libres de enfermedades (Carvalho *et al.* 2017), producción de plantas haploides y doble haploides (Hoveida *et al.* 2017), inducción de variación genética para la selección de variantes de interés (Braatz *et al.* 2017), producción de embriones somáticos (Georget *et al.* 2017), fusión de protoplastos (Del Bosco *et al.* 2017), entre otros múltiples usos. Estas herramientas biotecnológicas son esenciales para la investigación y la producción comercial de plantas o productos vegetales.

La propagación clonal *in vitro* provee plantas idénticas a la planta madre, utilizando técnicas de cultivo de tejidos (Shahzad *et al.* 2017). Por ejemplo, especies en peligro de extinción, amenazadas o raras (poco comunes o estudiadas) han sido propagadas exitosamente por micropropagación debido a la alta tasa de multiplicación utilizando un número mínimo de especímenes para el inicio del cultivo (Kane *et al.* 2016). La micropropagación de plantas puede darse en tres diferentes vías: (1) iniciando con yemas axilares, que generarán nuevos brotes; (2) regeneración directa de brotes apicales o embriones somáticos para la producción de nuevos brotes y plantas; y (3) regeneración indirecta de brotes o embriones somáticos a partir de callos (Singh 2015).

El cultivo de yemas o meristemos axilares para la producción de plantas ha sido la técnica de producción de vitroplantas más ampliamente utilizada (Shahzad *et al.* 2017). Este método provee alta estabilidad genética y es fácilmente adaptable a la mayoría de especies vegetales (Kane 2011). Consecuentemente, este método de cultivo ha jugado un rol de gran importancia para el desarrollo de una industria mundial que produce más de 250 millones de plantas anualmente (Kane 2011). Además de la propagación, los meristemos pueden cultivarse *in vitro* tanto para la producción de plantas libres de patógenos como para la conservación de germoplasma en condiciones asépticas (Rajasekharan y Sahijram 2015).

La organogénesis o embriogénesis de forma directa por su parte, es una técnica menos utilizada para la propagación vegetativa de plantas, debido a su bajo rendimiento en la producción de nuevos individuos y a la amplia disponibilidad de técnicas más sencillas u otras complejas, pero con una mayor producción de plantas como la organogénesis o embriogénesis de forma indirecta (Kane 2011). El cultivo inicia con un tejido somático del que se producen múltiples brotes o embriones somáticos, sin la necesidad de producir un callo (Kahia *et al.* 2016). Se prefiere la utilización de la organogénesis o embriogénesis

somática directa cuando es necesario mantener una alta estabilidad genética del material a propagar y no se requiere una alta frecuencia de producción de plantas (Loyola-Vargas 2016).

La embriogénesis somática es la reprogramación de las células de la planta para que desvíen su desarrollo ontogénico hacia la formación de embriones (Loyola-Vargas 2016). Estos embriones tienen una morfología y desarrollo igual al de los embriones sexuales, pero su genoma será idéntico al de las células que les dieron origen (Germanà y Lambardi 2016). La embriogénesis somática se da gracias a las características de totipotencia y plasticidad celular, es decir, todas las células de una planta poseen la capacidad y potencia genética para la formación de una planta completa y que será genéticamente idéntica a ella (Hand *et al.* 2016).

El presente trabajo se plantea con el objetivo de desarrollar un protocolo para la propagación masiva de embriones somáticos de *Hieronyma alchorneoides*. A largo plazo, se espera que este tipo de metodologías apoyen los programas de conservación y mejoramiento genético de la especie.

## Ensayos de establecimiento *in vitro* y multiplicación

### Metodología

#### Establecimiento *in vitro*

En esta etapa de la investigación, fue evaluado un protocolo previamente establecido en el laboratorio (Abdelnour et al., 2011) con algunas modificaciones descritas a continuación. El material vegetal consistió en plantas provenientes del jardín de clones superiores de *H. alchorneoides* del programa de mejoramiento genético del ITCR en el Campus Tecnológico Local de San Carlos. Las plántulas fueron trasladadas al invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología, donde se mantuvieron bajo fertilización, riego y aplicaciones preventivas de fungicidas.

Estacas de los últimos tres nudos de ramas jóvenes de plantas de *H. alchorneoides* mantenidas en el invernadero, fueron desinfectadas mediante la incubación de los explantes durante 60 min en la solución de 4g.L<sup>-1</sup> Afungil 50 WP (Methyl 1-(butylcarbamoil)-2-benzimidazolecarbamate) (Fabricante ALLCHEM Industries, Beijing, China) + 4g.L<sup>-1</sup> Agrygent (Sulfato de Gentamicina + Clorhidrato de Oxitetraciclina) (Fabricante: Químicas Agronómicas de México S.R.L.), posteriormente, los explantes fueron incubados en 3% (v.v<sup>-1</sup>) NaOCl durante 8 min. Adicionalmente, se evaluó la desinfección de un segundo grupo de estacas de igual estado de madurez utilizando la solución de 0,095% (m.v<sup>-1</sup>) HgCl<sub>2</sub> durante 10 min. Después de ambos procedimientos de desinfección, los explantes fueron enjuagados 3 veces con agua estéril en la cámara de flujo laminar. Después los explantes desinfectados fueron cultivados en el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS, 1962), con 50% de nutrientes minerales, 3% (m.v<sup>-1</sup>) sacarosa y una concentración de 0, 5, 10 o 20 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata. Posteriormente, el pH del medio fue ajustado a 5,6 y gelificado con Gelzan®, previo a la esterilización en autoclave a 121 C y 1.2 kg.cm<sup>-2</sup> por 25 min. Todos los reactivos previamente mencionados fueron suplidos por Phytotechnology Laboratories (Shawnee Mission, KS, USA) a menos que se indicara lo contrario. Cada explante fue cultivado individualmente en condiciones de oscuridad durante una semana, una semana en condiciones de 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidad lumínica y una semana adicional en 72 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> con fotoperiodo de 16h de luz en ambas intensidades, a 25 ± 3 C durante las tres semanas de cultivo.

La evaluación fue realizada cada semana durante tres semanas, contabilizando los explantes contaminados, asépticos, brotados y necróticos. Para continuar con la etapa de multiplicación, embriogénesis somática y escalamiento en RITAS® fueron utilizados los explantes asépticos. Los dos protocolos de desinfección con HgCl<sub>2</sub> y NaOCl, fueron analizados de forma independiente, en diseños completamente aleatorios, las variables de respuesta fueron analizadas mediante ajustes de modelo lineal general con distribución

binomial y función de enlace logit para determinar el efecto de las partículas de plata en esos tratamientos de desinfección. Después las medias fueron comparadas utilizando la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher, todos los análisis fueron realizados estableciendo un umbral de significancia de 0,05. Cada tratamiento fue repetido cuatro veces, con 10 unidades experimentales (explantes) cada repetición.

## Multiplicación

A partir de las plantas establecidas en la etapa anterior, se estableció un lote de material. Estas plantas fueron seccionadas en microestacas de un nudo y estos explantes fueron transferidos a medios de cultivo MS al 50% con concentraciones de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 1 mg.L<sup>-1</sup>, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), 1 mg.L<sup>-1</sup> o 1,5 mg.L<sup>-1</sup> 6-furfurilaminopurina (cinetina o KIN) que correspondieron a los tratamientos. Una vez obtenidas plantas de más de 3 nudos fueron transferidas a medio de cultivo fresco. Las condiciones de crecimiento en el laboratorio fueron de 25 ± 3 C y 72 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidad lumínica con fotoperiodo de 16h de luz. El efecto del regulador de crecimiento utilizado fue evaluado en un diseño completamente al azar, contabilizando el número de explantes en brotación y explantes necróticos de cada tratamiento durante 5 semanas. Los datos de estas variables de respuesta fueron utilizados para realizar ajustes de modelo lineal general con distribución binomial y función de enlace logit. Las medias de cada tratamiento fueron comparadas utilizando la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher, todos los análisis fueron realizados estableciendo un umbral de significancia de 0,05.

## Resultados

### Establecimiento *in vitro*

#### Desinfección con hipoclorito de sodio

Los explantes desinfectados con hipoclorito de sodio presentaron tasas de contaminación fúngica mayores al 56 % en todos los tratamientos con nanopartículas de plata evaluados (Figura 2A). Por otra parte, la contaminación bacteriana presentó tasas de contaminación menores, con un máximo de 20,8% de explantes contaminados en el tratamiento de 20 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata (Figura 2B). Adicionalmente, este mismo tratamiento de 20 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata fue el que presentó menores tasas de brotación, mientras que el tratamiento con mayor número de explantes brotados fue el de 10 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata (Figura 2C). Las tasas de establecimiento de explantes asépticos utilizando hipoclorito de sodio como agente desinfectante fueron de máximo de 25% de explantes establecidos con los tratamientos de 5 y 10 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata (Figura 2D). Se observó una tendencia al aumento del número de explantes necróticos

conforme aumentó la concentración de partículas de plata, obteniéndose un 50% de explantes necróticos en el tratamiento de 50 mg.L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata (Figura 2E).

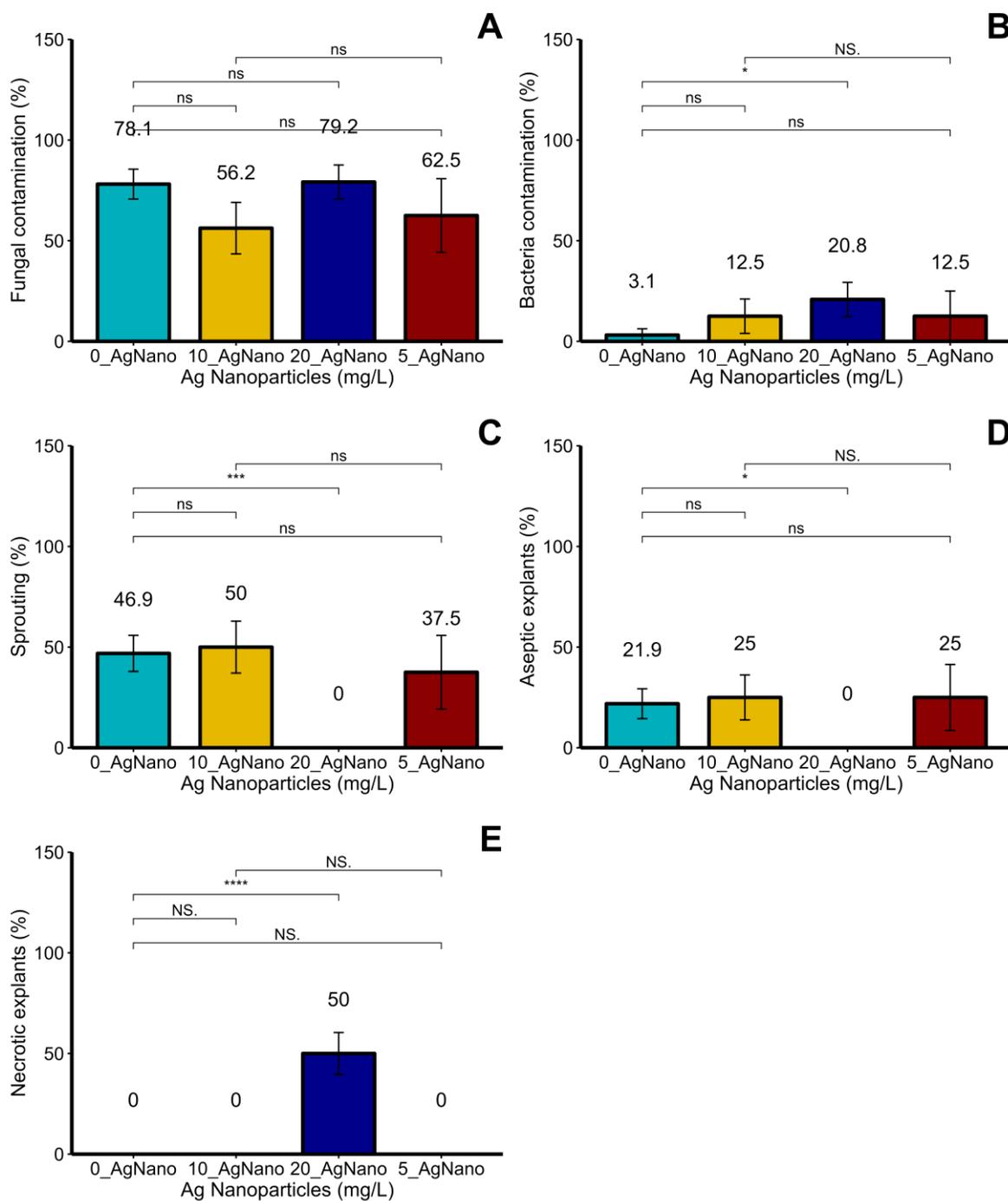


Figura 2. Respuesta de explantes de *H. alchorneoides* a la desinfección con 3% (v.v<sup>-1</sup>) NaOCl. Gráficos (A) Explantes contaminados por hongos, (B) Explantes contaminados por bacterias, (C) Explantes con presencia de brotes, (D) Explantes asépticos, (E) Explantes

necróticos. La evaluación fue realizada después de 3 semanas de su cultivo *in vitro* en el medio MS al 50% complementado con el respectivo tratamiento de nanopartículas de plata.

#### Desinfección con cloruro de mercurio

Los tratamientos con cloruro de mercurio presentaron tasas de contaminación más bajas que las obtenidas con hipoclorito de sodio, sin embargo, también aumentó la necrosis en los tratamientos evaluados (Figura 3). La contaminación fúngica fue eliminada utilizando el tratamiento de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de nanopartículas de plata (Figura 3A) y la contaminación por bacterias fue de 3,3 en las dos concentraciones de partículas de plata evaluadas (Figura 3B). A pesar de los buenos resultados obtenidos en cuanto a la contaminación, las tasas de brotación fueron bajas en comparación con la desinfección con hipoclorito de sodio, obteniéndose un máximo de 10% de brotación en  $0 \text{ mg.L}^{-1}$  de nanopartículas de plata cuando la desinfección fue realizada con cloruro de mercurio (Figura 3C). La cantidad de explantes establecidos fue significativamente mayor en el tratamiento sin partículas de plata, con un 86,7% de explantes asépticos (Figura 3D). Las tasas de necrosis fueron superiores al 90% sin diferencias significativas entre los dos tratamientos con partículas de plata evaluados (Figura 3E).

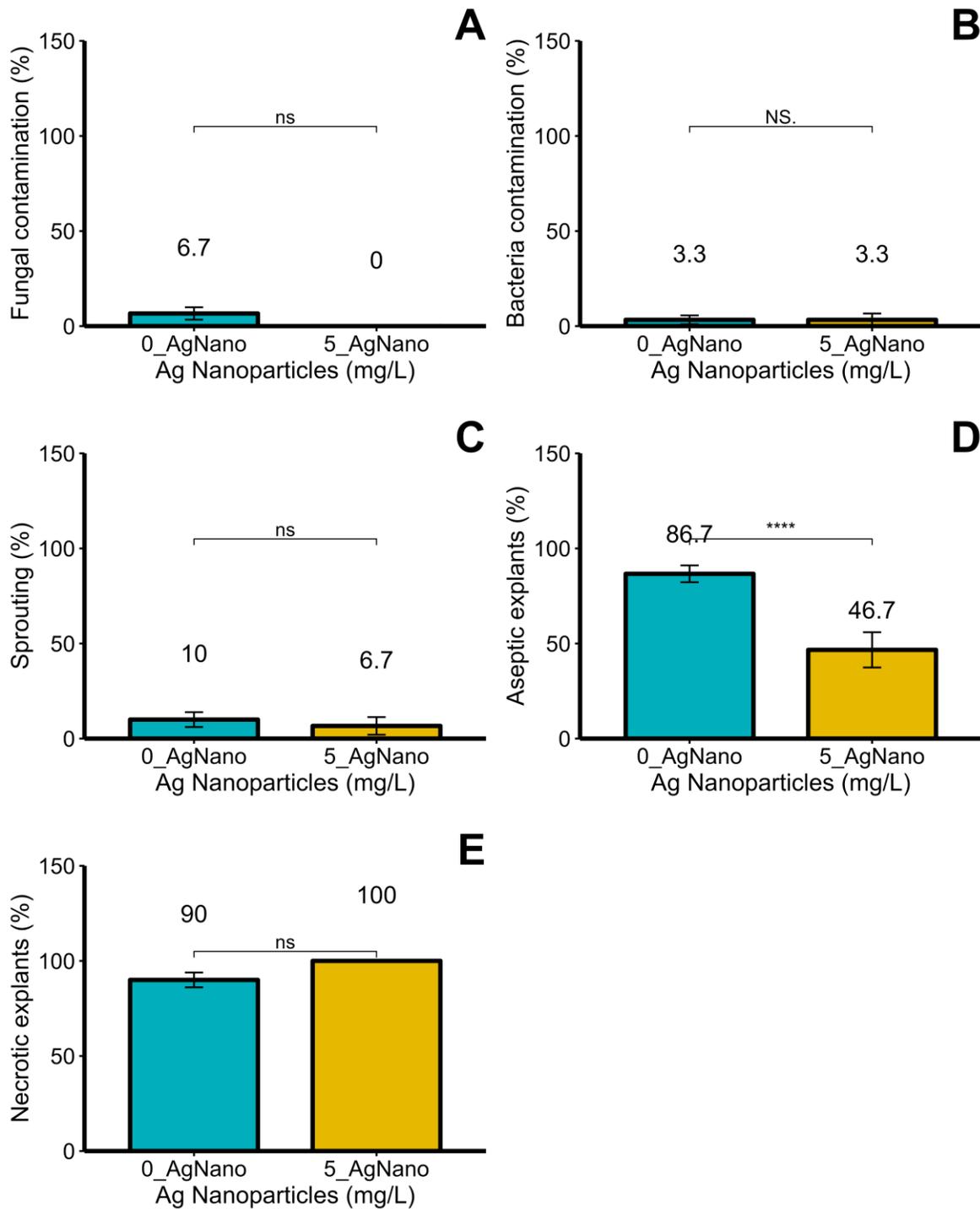


Figura 3. Respuesta de explantes de *H. alchorneoides* a la desinfección con 0,095% (m.v<sup>-1</sup>) HgCl<sub>2</sub>. Gráficos (A) Explantes contaminados por hongos, (B) Explantes contaminados por bacterias, (C) Explantes con presencia de brotes, (D) Explantes asepticos, (E) Explantes

necróticos. La evaluación fue realizada después de 3 semanas de su cultivo *in vitro* en el medio MS al 50% complementado con el respectivo tratamiento de nanopartículas de plata.

## Multiplicación

En la etapa de multiplicación, las vitroplantas previamente establecidas fueron evaluadas y se encontró que las concentraciones de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  permitieron más de un 50% de explantes en brotación y la concentración de  $1.5 \text{ mg.L}^{-1}$  produjo un 31,2% de explantes en brotación (Figura 4A). Por otra parte, las concentraciones de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  AG<sub>3</sub> y  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  cinetina produjeron porcentajes de más de 86,7% de explantes necrosados (Figura 4B).

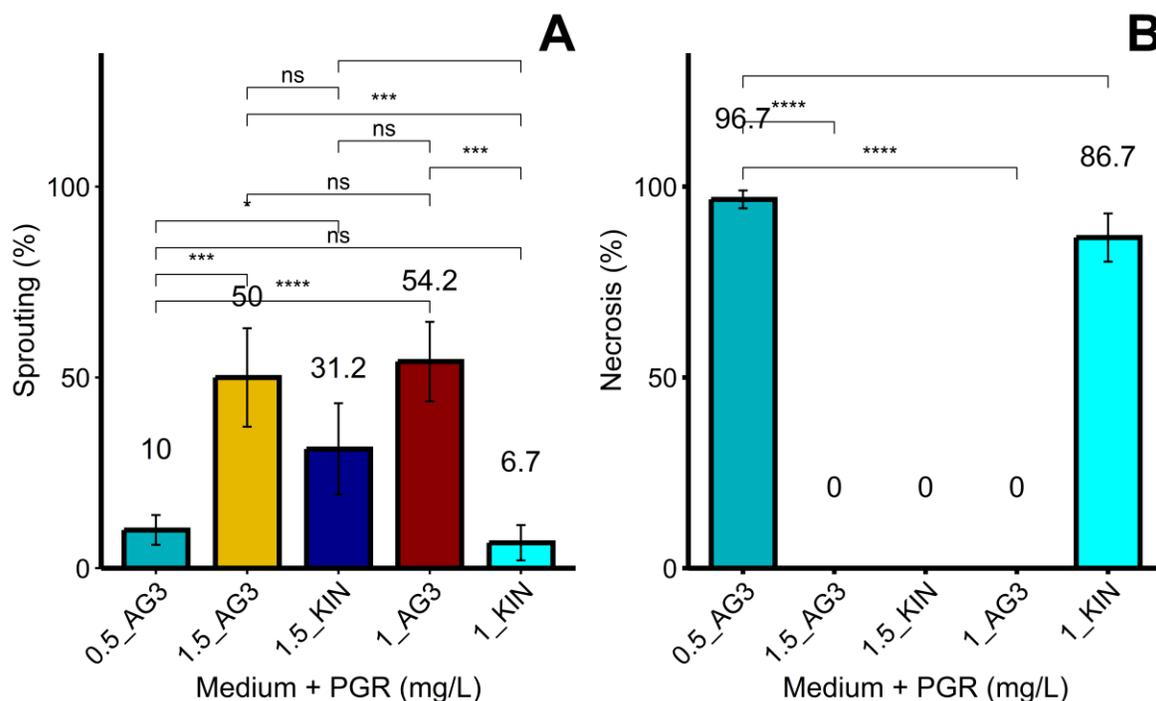


Figura 4. Respuesta de vitroplantas de *H. alchorneoides* a tratamientos de multiplicación con reguladores de crecimiento. Gráficos: (A) Porcentaje de explantes brotados y (B) Porcentaje de explantes necróticos. La evaluación fue realizada después de 5 semanas de cultivo *in vitro* en cada uno de los tratamientos indicados.

Las vitroplantas mostraron un crecimiento con un desarrollo morfológico normal de hojas y tallos, así como presencia de raíces desde el inicio de la segunda semana de cultivo (Figura 5A). Adicionalmente, se observó la aparición de nuevos brotes una vez concluidas 4 semanas de cultivo, manteniendo un tamaño similar al de las 2 semanas (Figura 5B). Después de 7 semanas de cultivo, las pantas comenzaron a mostrar una expansión foliar más prominente y un desarrollo general más robusto (Figura 5C).

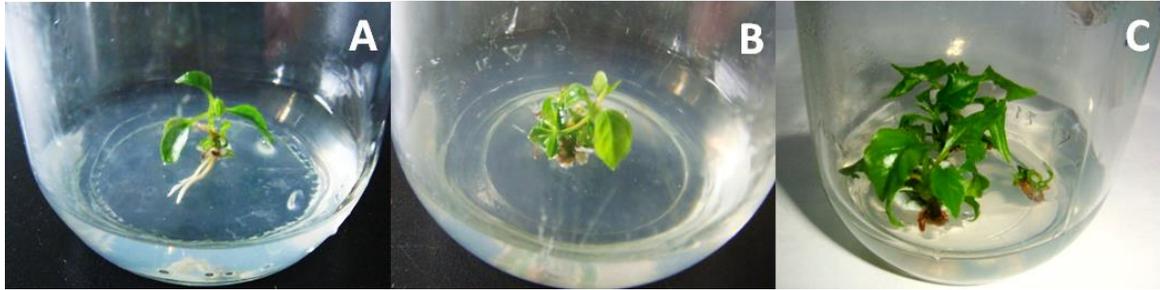


Figura 5. Crecimiento de vitroplantas de *H. alchorneoides* en etapa de multiplicación cultivadas en el tratamiento MS al 50% suplementado con  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  ácido giberélico. (A) 2 semanas de crecimiento, (B) 4 semanas de crecimiento y (C) 7 semanas de crecimiento.

### Discusión y conclusiones

En el cultivo *in vitro* de plantas, la eliminación de microorganismos para el establecimiento de los cultivos es el paso primordial para poder continuar con las siguientes etapas del proceso y poder contar con materiales con el mejor aprovechamiento de nutrientes y condiciones ambientales (Cartabia et al., 2022). Las especies forestales, al presentar ciclos de crecimiento largos en comparación con las especies herbáceas, suelen acumular una microbiota más diversa y abundante, tanto a nivel superficial como a endófito por lo que requieren procesos de desinfección especiales y mucho más rigurosos (Devi et al., 2014).

Algunos desinfectantes utilizados comúnmente para la eliminación de la contaminación superficial y endógena recomendados son el cloruro de mercurio y el hipoclorito de sodio. Ambos muestran efectividad en el control de bacterias y hongos, sin embargo, la efectividad de cada uno suele variar con el tiempo de exposición, la concentración y la especie a la que se aplique ese tratamiento (Álvarez et al., 2019). En el presente estudio, se observó que el cloruro de mercurio permitió mayor porcentaje de explantes limpios, aunque la cantidad de brotes obtenidos fue tan baja que no lo hacen un desinfectante recomendable para esta especie. Otros estudios recomiendan porcentajes de concentración y tiempo de incubación de este desinfectante similares a los utilizados en el presente estudio, con porcentajes de establecimiento exitoso bastante superiores a los obtenidos en este trabajo (Grea et al., 2021).

Por otra parte, las nanopartículas de plata son recomendadas y se han encontrado numerosos estudios que las recomiendan como inhibidores de la contaminación superficial y endógena durante el establecimiento *in vitro* de numerosas especies. Su efecto se basa en la adherencia a muchas proteínas y enzimas esenciales para los microorganismos, causando una coagulación de las mismas, evitando su proliferación (Álvarez et al., 2019; Tariq et al., 2020). Estudios previos recomiendan la utilización de hasta  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  de esta sustancia cuando es adicionada en el medio de cultivo y concentraciones aún mayores para la

incubación de los explantes como método de desinfección (Álvarez et al., 2019). En el presente estudio, se observó que existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad de partículas de plata presentes en el medio y la contaminación por bacterias y hongos obtenida, y estos resultados son muy similares a los obtenidos en diversas especies como melocotón (Arab et al., 2014).

Por su parte, en la etapa de multiplicación se recomienda el uso de diversos reguladores de crecimiento, pero principalmente de tipo citocinina. En las plantas, las sustancias endógenas de este grupo se relacionan con la división celular, regulando las fases G y S del ciclo, promoviendo el crecimiento y la expansión de muchos órganos, entre ellos brotes. Las citocininas tienen tanto efectos sinérgicos con el grupo de las auxinas como efectos antagónicos, y en la etapa de la multiplicación, la dominancia apical, regulada principalmente por las auxinas, es un proceso fisiológico que se desea disminuir o contrarrestar para promover la aparición de una mayor cantidad de brotes. De esta manera, las citocininas promueven un aumento exponencial en la cantidad de vitroplantas producidas en cada ciclo de multiplicación (Blázquez et al., 2020).

Adicionalmente, otros estudios también recomiendan el uso de otros grupos como las giberelinas, ya que aumentan la elongación de brotes, aumentando la velocidad de obtención de nuevas plantas en cada ciclo de cultivo (Camara et al., 2018). Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio son reportados por (Phillips & Garda, 2019) quienes encontraron que al aumentar la concentración de citocininas en el medio de cultivo de multiplicación, se aumentó la cantidad de explantes brotados y aumentando las tasas de multiplicación.

En esta etapa de la investigación se encontró que es más recomendable el uso de hipoclorito de sodio como desinfectante en el establecimiento in vitro de *H. alchorneoides*, así como suplementar el medio de introducción con  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de nanopartículas de plata, ya que permitió mayor número de plantas vivas y limpias, en comparación con el cloruro de mercurio, que aunque permitió mayor número de explantes asépticos, la mayoría presentó necrosis y no fue posible obtener vitroplantas a partir de estos. En cuanto a la etapa de multiplicación, en la presente investigación se concluye que tanto el uso de giberelinas como citocinas es adecuado para aumentar la cantidad de vitroplantas obtenidas. Se recomienda el la evaluación de una combinación de ambos reguladores en el medio de multiplicación.

## **Ensayos de inmersión temporal en sistemas RITAS**

### **Metodología**

Se plantearon dos ensayos para evaluar el uso de los biorreactores RITA® como sistema de inmersión temporal para la regeneración de callo embriogénico de *H. alchorneoides*. El

primer ensayo evaluó el tiempo y la frecuencia de inmersión de los callos en el medio de cultivo. A partir de lo obtenido en el ensayo anterior se planteó el segundo ensayo donde se evaluaron diferentes medios de cultivo en los cuales fueron inmersos los callos. Además se realizaron pruebas de viabilidad celular de los callos tras las pruebas en el sistema RITA ®. Para ambas pruebas en las RITA ® se utilizaron 20 callos embriogénicos de pilón con las características descritas arriba, provenientes de la etapa de proliferación de callo. Se agregaron 200 ml de medio de cultivo a cada RITA ®, de tal manera que para cada callo se tenía disponible 10 ml de medio de cultivo (densidad de inóculo).

#### Tiempo y frecuencia de inmersión

Se propuso la evaluación de tres frecuencias diferentes, basados en los utilizados por Sánchez (2014): la primera de un minuto cada ocho horas; la segunda de un minuto cada doce horas y finalmente una frecuencia de dos minutos cada ocho horas. Para los tres tratamientos las unidades experimentales se aplicaron por triplicado, cada réplica se constituyó de un sistema RITA. Las evaluaciones se realizaron con una periodicidad semanal en las que se evaluó mediante matriz binaria la oxidación, el crecimiento y la regeneración de los callos (presente o ausente en cada variable de respuesta). Para este ensayo se utilizó el medio de proliferación de callo al cual no se adiciona el gelificante para poder utilizarlo como medio líquido en el sistema de inmersión temporal.

Las evaluaciones fueron realizadas de forma semanal y se analizaron con R commander, realizando un análisis de varianzas mediante modelo lineal general, utilizando distribución de Poisson y función de enlace log. La comparación de medias se realizó mediante el método de Tukey, todos los análisis con una significancia menor al 0,05. Los resultados obtenidos fueron graficados en columnas con su desviación estándar y los grupos correspondientes.

#### Medios de Cultivo en el sistema de inmersión temporal

Para esto se planteó el uso del medio utilizado por Sánchez (2014) utilizado en *Coffea canephora*, basado en un medio utilizado por otros autores previamente, el cual está compuesto por las sales Murashige y Skoog diluidas a la mitad. Además está adicionado con

100 mg/l de mioinositol, 10 mg/l tiamina, 1 mg/l de piridoxina, 1mg/l de ácido nicotínico, 1 mg/l de glicina, 100 mg/l de caseína hidrolizada, 400 mg/l de extracto de malta y enriquecido con 30 g/l de sacarosa. El pH de este medio fue ajustado entre 5,7 y 5,8. Como complemento se utilizaron los reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (NAA) en una concentración de 0,5 mg/l y 6-Bencilaminopurina (6-BAP) donde se evaluarán 2 concentraciones diferentes del mismo, siguiendo las pruebas realizadas por Quiala *et al.* (2014) en *Tectona grandis* L. Donde se utilizaron concentraciones de 0,45; 0,9 mg/l. Además como control se utilizó el medio utilizado en el ensayo de tiempo y frecuencia. El pH fue ajustado a 5,8 y el medio fue gelificado con 5,4 g/l de Gelzan® previo a la esterilización en autoclave a 121 C por 30 min. Se utilizó el tiempo y frecuencia de inmersión seleccionado de la etapa anterior, el cual es de una frecuencia de 8 horas por un tiempo de 2 minutos de inmersión. A continuación se muestra un cuadro con los dos medios y sus componentes:

Cuadro 1. Componentes de los medios de cultivo a utilizar para la regeneración de callos embriogénicos de pílón en el sistema RITA.

| Componente                  | Medio 1 (mg/l) | Medio 2 (mg/l) |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Macronutrientes             | MS/2           | MS/2           |
| Micronutrientes             | MS/2           | MS/2           |
| Mioinositol                 | 100            | 100            |
| Tiamina                     | 10             | 10             |
| Piridoxina                  | 1              | 1              |
| Ácido nicotínico            | 1              | 1              |
| Glicina                     | 1              | 1              |
| Caseína hidrolizada         | 100            | 100            |
| Extracto de malta (Maltosa) | 400            | 400            |
| Sacarosa                    | 30             | 30             |
| NAA                         | 0,5            | 0,5            |
| 6-BAP                       | 0,45           | 0,9            |

Los conteos fueron semanales y se analizaron con R commander, realizando un análisis de varianzas mediante modelo lineal general, utilizando distribución de Poisson y función de enlace log. La comparación de medias se realizó mediante el método de Tukey, todos los análisis con una significancia menor al 0,05. Los resultados obtenidos fueron graficados en columnas con su desviación estándar y los grupos correspondientes.

#### Viabilidad celular:

Se utilizó cloruro de tetrazolio (TTC) para evidenciar la respiración celular de los callos y así comprobar la viabilidad de los callos tras su periodo dentro de las RITA. Para esto los callos de las RITA ® fueron transferidos a un nuevo recipiente que impida el paso de luz y fueron incubados con TTC al 100% m/v. Los mismos se mantuvieron por 4 días en ausencia de luz a 26 C. Tras el paso de los 4 días los callos fueron retirados del recipiente y se evaluó el color al que se tiñeron, dónde rojo evidencia la respiración celular.

### **Resultados**

#### Tiempo y Frecuencia de Inmersión:

Para este tratamiento se realizaron conteos de callos en estado de crecimiento, oxidación y regeneración (Figura 6). A partir de la Figura 5 se puede observar una importante oxidación de los callos en el sistema RITA, la cual está presente desde la primera semana de evaluación, para todos los tratamientos evaluados. A partir de la segunda semana de evaluación, se observa un importante porcentaje de callos en crecimiento en el tratamiento F8.T2 (Figura 6). En general la proliferación de los callos no tuvo éxito en los tratamientos F8.T1 y F12.T1. En esos mismos tratamientos se observó una alta tasa de oxidación de los callos, la cual fue en aumento desde la segunda semana y que a partir de la sexta semana llegó a niveles superiores al 80%. Por otra parte, el crecimiento disminuyó a partir de la quinta semana para los tratamientos F8.T1 y F12.T1 (Figura 6). Finalmente, se observa que el crecimiento y la oxidación se mantuvo similar para el tratamiento F8.T2, y que para este tratamiento la regeneración estuvo presente hasta la séptima semana. A partir de la octava

semana el tratamiento F8.T2 presentó contaminación por lo que tanto el crecimiento como la regeneración presentaron un valor de cero (Figura 6).

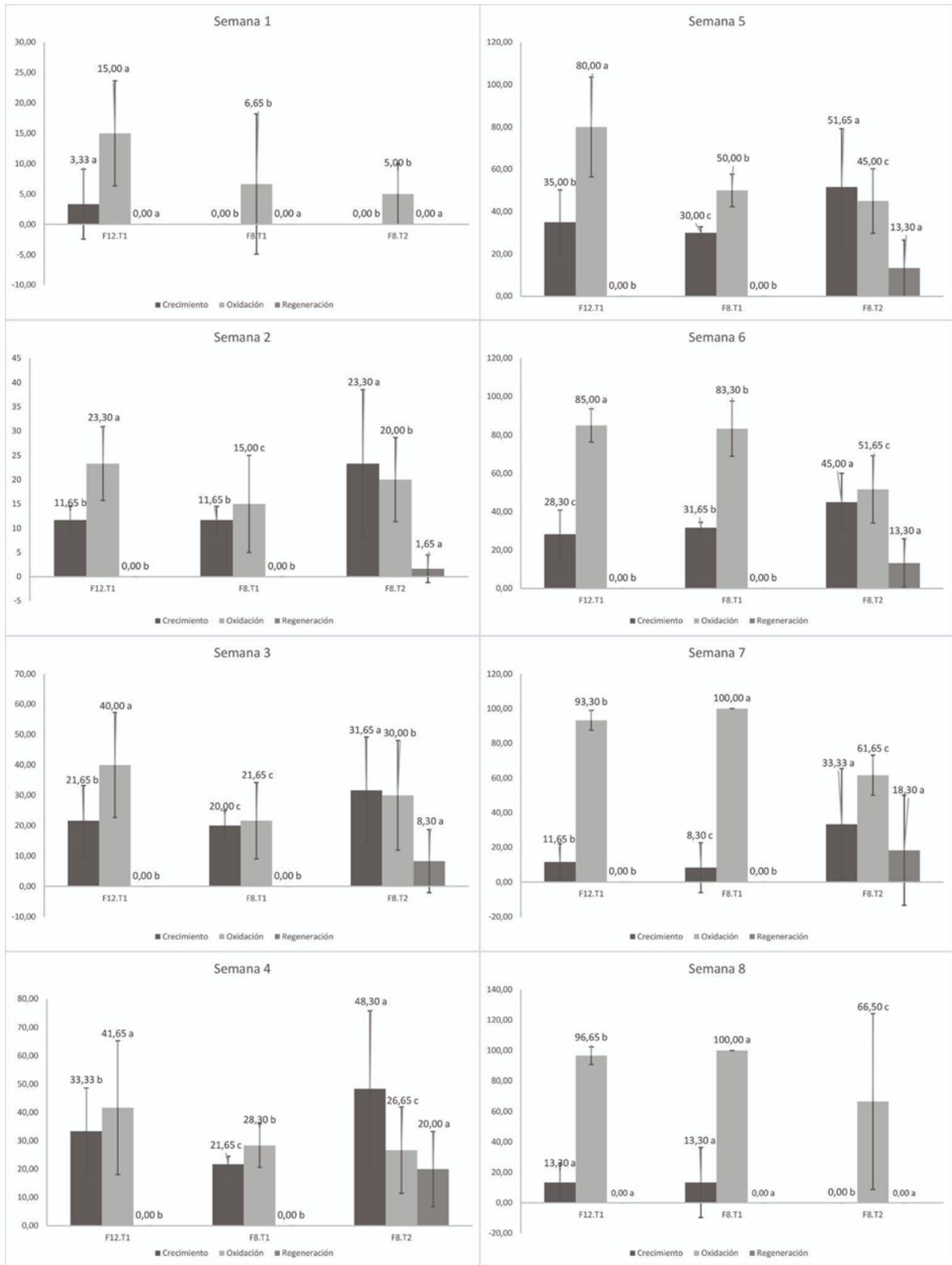


Figura 6. Respuesta de callos embriónicos de *Hyeronima alchorneoides* en sistema de

inmersión temporal automatizada por ocho semanas bajo tres tipos de frecuencia (F) y tiempos (T).

Medios de Cultivos:

Para este tratamiento se realizaron conteos de callos en estado de crecimiento y oxidación. El rubro de regeneración no se consideró dentro del estudio de los datos ya que no se observó respuesta de los callos durante las cuatro semanas de evaluación (Figura 7). En la Figura 7 se puede observar que en la primera semana se presenta un crecimiento total de los callos en los medios M1 y M2 (Figura 7). Para esta semana se observa un crecimiento limitado del medio MC, el cual se mantiene para el resto de las tres semanas (Figura 7). En oxidación se evidencia que el tratamiento MC es el que presenta mayor oxidación de los callos en el sistema RITA, mientras que los medios M1 y M2 presentan bajos niveles de callos oxidados (Figura 7). En general, el medio M2 es el que presenta mayor crecimiento de los callos en la segunda y tercera semana, y presenta un alto nivel de crecimiento para la cuarta semana (Figura 7).

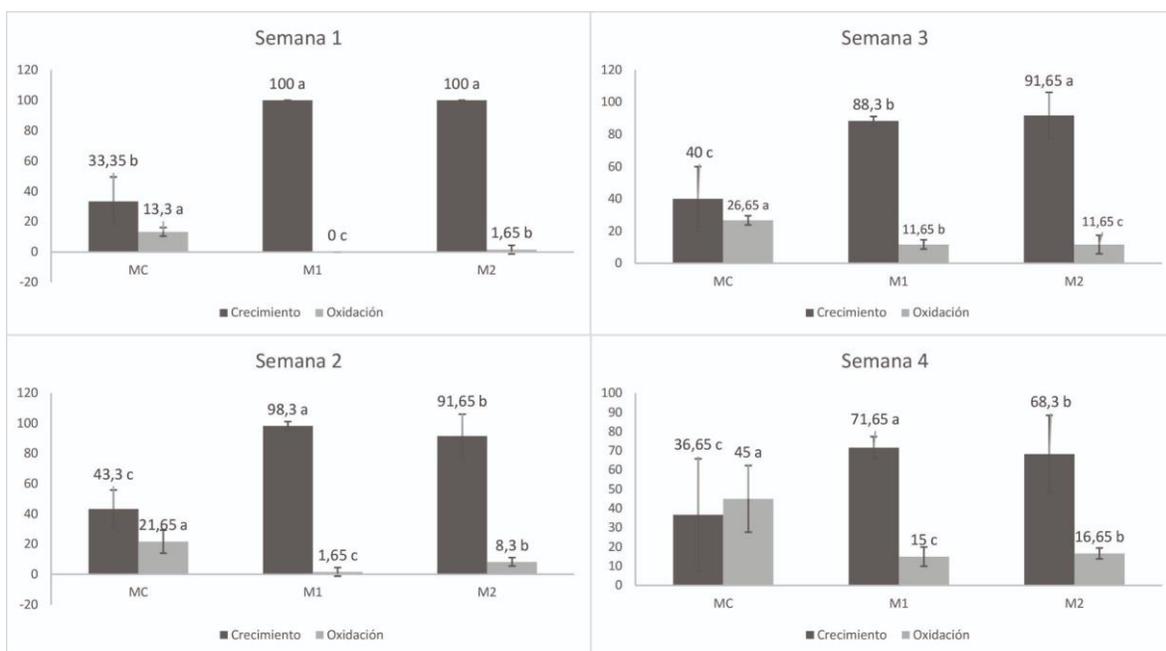


Figura 7. Respuesta de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* en sistema de inmersión temporal automatizada por cuatro semanas bajo tres tipos de medio: medio control (MC), medio 0,45 mg/l 6-BAP (M1), medio 0,9 mg/l 6-BAP (M2).

### Viabilidad celular:

Para ambos tratamientos de tiempo y frecuencia, y medios de cultivo los callos provenientes de los sistemas RITA<sup>®</sup> se dispusieron en cloruro de tetrazolio (TTC) para evaluar la viabilidad celular. Donde un cambio de coloración a rojo indicaba la respiración celular. Inicialmente se dispusieron los callos del tratamiento de tiempo y frecuencia (Figura 8), así como el tratamiento de medios de cultivo (figura 9). Tanto para el tratamiento de frecuencia y tiempo (figura 8), como para el de medios de cultivo (Figura 9), se obtuvo un 100% de inviabilidad celular de los callos embriogénicos dispuestos en las RITA<sup>®</sup>.

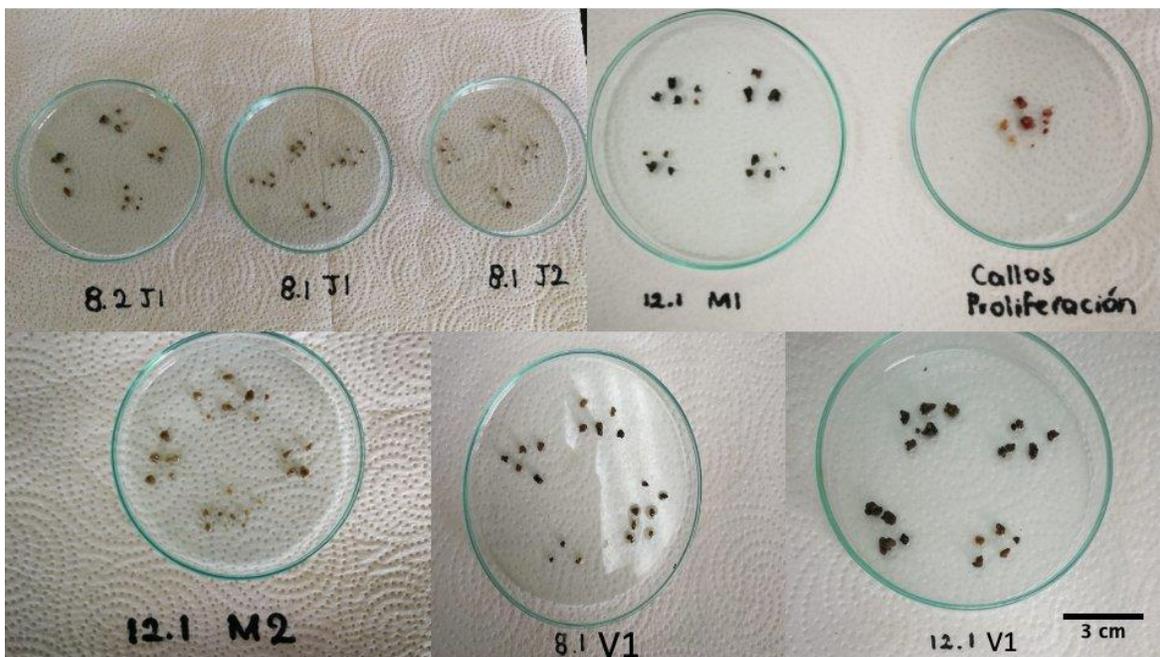


Figura 8. Respuesta de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* del tratamiento de frecuencia y tiempo en RITA en prueba de viabilidad celular con cloruro de tetrazolio (TTC) y su control positivo (callos proliferación); 8 horas 2 minutos (8.2), 8 horas 1 minuto (8.1) y 12 horas 1 minuto (12.1) (elaboración propia).

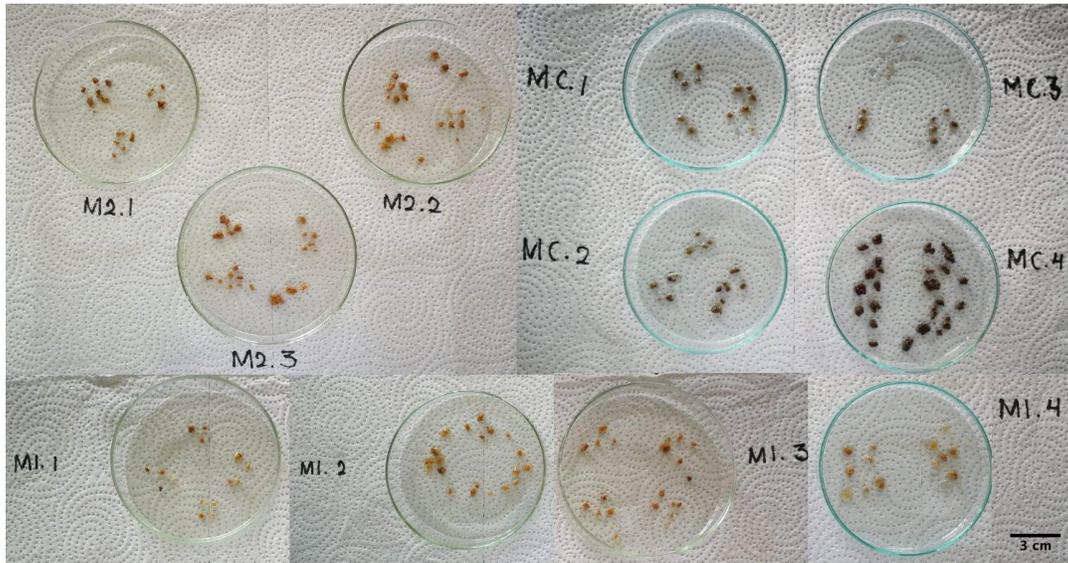


Figura 9. Respuesta de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* del tratamiento de frecuencia y tiempo en RITA en prueba de viabilidad celular con cloruro de tetrazolio (TTC) y su control positivo ; 8 horas 2 minutos (8.2), 8 horas 1 minuto (8.1) y 12 horas 1 minuto (12.1) (elaboración propia).

### Discusión y conclusiones

La propagación tradicional por semilla de *H. alchorneoides* presenta importantes desventajas para la reproducción de la especie (Abdelnour *et al.*, 2011). Como lo indica Abdelnour *et al.* (2011), la baja frecuencia de floración y la baja capacidad de germinación impiden la reproducción de la especie por métodos tradicionales usando semillas. Esfuerzos previos han permitido la propagación por mini estaquillas enraizadas, los cuales presentan una baja tasa de multiplicación si se le compara con métodos como el cultivo de tejidos (Abdelnour *et al.*, 2011). Para esto, las diferentes técnicas de cultivo de tejidos se presentan como opciones ventajosas para mejorar la propagación de la especie. Estos permiten a su vez utilizar los tejidos en aplicaciones como la crioconservación (González-Arno *et al.*, 2011), la transgénesis y edición génica (Bioethical, 2020) y la limpieza de enfermedades (Vieira *et al.*, 2015). Los sistemas de inmersión temporal, específicamente los recipientes de inmersión temporal automatizado (RITA®), han sido utilizados en diferentes especies para aumentar el crecimiento de callos (Quiñonero *et al.*, 2018; Posada-Pérez *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2013). Dado el uso de un sistema de inmersión temporal, uno de los factores más importantes a

evaluar es la frecuencia y el tiempo, el cual es determinante ya que resulta en una mejor calidad de plantas (Farshad et al., 2013). También, el tiempo y frecuencia de inmersión, tienen un efecto positivo al disminuir la hiperhidricidad de los callos en proceso de embriogénesis somática (Monja-Mio et al., 2016).

A partir de los resultados obtenidos en el tratamiento de tiempo y frecuencia, se encontraron la mejor respuesta de los callos en el tratamiento que corresponde al de una frecuencia de 8 horas y un tiempo de inmersión de 2 minutos. A pesar de que el tratamiento de 12 horas fue utilizado con éxito en otros estudios previos con las especies *Saccharum officinarum* y *Coffea arabica* (Snyman et al., 2011; Etienne et al., 1999). Para el caso de los callos embriogénicos de *H. alchorneoides* se puede establecer que un periodo tan largo entre cada inmersión no logra proveer de los nutrientes necesarios para el crecimiento y proliferación de los callos (Monja-Mio et al., 2016). A pesar de que las inmersiones cortas de un minuto han sido exitosas en otros casos de embriogénesis somática (Gatica et al., 2008), para el caso de *H. alchorneoides* una frecuencia de dos minutos demostró mejorar la respuesta de los callos a utilizar. Esto podría explicarse por el efecto de mayor tiempo de contacto entre el medio y los callos embriogénicos, lo cual mejora la absorción de nutrientes, según se ha demostrado en diversos estudios con este tipo de sistemas de inmersión temporal (Monja-Mio et al., 2016).

Por otra parte, la composición de los medios de cultivo es otro de los factores importantes en el desarrollo de embriones somáticos (Villegas et al., 2021). Para esto se tomaron dos medios de cultivo adicionados con 6-Bencilaminopurina (6-BAP) con 0,45 mg/l y 0,9 mg/l. El 6-BAP es una citoquina, este grupo de reguladores de crecimiento tienen un efecto positivo en el crecimiento de callos y su desarrollo *in vitro* (Ahmad et al., 2021). Además se ha reportado caso de éxito para la formación de estructuras globulares y nodulares a partir de callos cultivados en medio con 6-BAP (Kryvenki et al., 2008). Según los resultados obtenidos, el mayor crecimiento de los callos del presente estudio se encontró en los callos que se sometieron a inmersiones de 0,9 mg/l 6-BAP. Por lo que se evidencia que en *H. alchorneoides* una alta concentración de 6-BAP permitió tener un mejor crecimiento de los callos embriogénicos.

No obstante, al observar la totalidad de los callos provenientes de los sistemas RITA ® se evidencio una inviabilidad celular del 100%. El cloruro de tetrazolio (TTC), es un compuesto utilizado ampliamente en la determinación de la viabilidad celular (López et al., 2017). Este se basa en la reducción del TTC, que es incoloro, a un compuesto rojo insoluble llamado formazán (López et al., 2017). La inviabilidad celular se puede deber a las altas tasas de oxidación que presentaron los tratamientos, así como la necesidad de reemplazar el medio de las RITA ® por uno fresco (Paredes et al., 2013).

No obstante, la regeneración de embriones a partir de callo no es exclusiva del uso de medios líquidos (Shashi & Bhat, 2022). Para esto se utilizaron cinco diferentes medios semisólidos para inducir la proliferación y maduración de embriones a partir de callos en embriogénesis somática. Según los resultados preliminares de la primera semana de evaluación, el medio denominado doble gelificante (DG), presentó el mayor número de callos con sus estructuras embrionarias. Como explica (Chen et al., 2019), la auxinas naturales bajo condiciones de poca iluminación u oscuridad tienen una mayor proliferación del callo. Las condiciones anteriores se cumplen para los callos en DG, debido a la falta de iluminación y la ausencia de reguladores de crecimiento. Por otra parte, el aumento en la concentración del gelificante ha mostrado una mejora en la maduración de callos embriogénicos en *Pinus strobus* (Klimaszewska et al., 2000). Esto se debe a la disminución del potencial hídrico, lo que disminuye la disponibilidad del agua en el medio e induce la formación de embriones hasta el estado cotiledonar (Klimaszewska et al., 2000), similares a los observados en el presente estudio. Además, en otras especies forestales, el uso de una concentración mayor de sacarosa aumenta la osmolalidad de los medios de maduración, generando una mejor respuesta (Klimaszewska et al., 2000). El uso de un medio con doble concentración de sacarosa (DS), presentó embriones somáticos a una semana de haber introducido los callos embriogénicos (figura 7).

Sin embargo, el uso de reguladores de crecimiento, como el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido abscísico (ABA), es una alternativa para inducir estas etapas en el callo, como lo indica Gao et al. (2021). Las auxinas es el grupo de reguladores de crecimiento más utilizado para inducir callo con potencial embriogénico (Viñas & Jiménez, 2011), por lo que el NAA podría resultar en un tratamiento de relevancia a futuro. Por otra parte, el ABA también puede

ser utilizado como inductor de respuesta embriogénica. Su acción se basa en el estrés que se le ocasiona a las células del callo que eventualmente reprograman una adaptación celular que genera una inducción de embriones (Pěňčík et al., 2015). No obstante, al ser una evaluación preliminar se sugiere que los callos sean evaluados durante un mayor tiempo para observar las diferencias en la respuesta de los embriones.

Además del uso de callos, existen otras estrategias de micropropagación como el uso de rebrotes y entrenudos (Trueman et al., 2018). Este se basa en utilizar brotes o nudos para estimular la aparición de brotes axilares (Trueman et al., 2018). A partir de los tratamientos usados se logró determinar que todos los métodos de desinfección utilizados permiten la aparición de los brotes axilares (figura 8). No obstante, la contaminación y la oxidación son dos factores importantes en la evaluación de la micropropagación de brotes (Brondani et al., 2011). Debido a que *H. alchorneoides* es una especie forestal, la aparición de contaminación bacteriana y fúngica se vuelve relevante en la propagación de brotes (Hand et al., 2016). Para evitar la aparición de posibles microorganismos contaminantes en los cultivos *in vitro* se recomienda utilizar explantes de las zonas terminales o más jóvenes y que presenten un estado activo de crecimiento (Hand et al., 2016). Lo anterior se evidenció en una menor cantidad de contaminación y una mayor proporción de crecimiento en los explantes provenientes de rebrotes. Además, la desinfección es otro factor importante en el establecimiento del material *in vitro* de los brotes (García et al., 2011). Tanto el cloruro de mercurio (Hg) como el hipoclorito de sodio (Cl) son utilizados ampliamente en la desinfección del material vegetal a introducir (Benmahioul, 2017). No obstante, el cloruro de mercurio presenta la desventaja de ser una sustancia peligrosa y de difícil disposición (Benmahioul, 2017). De los diferentes tratamientos de desinfección, los tratamientos: estacas Hg y rebrotes Hg, muestran bajos niveles de contaminación. A pesar de que la oxidación sigue siendo recurrente entre todos los tratamientos de desinfección, se puede observar que el tratamiento de rebrotes y cloruro de mercurio es el que tiene una menor oxidación.

Finalmente, se determinó que el tratamiento de 2 minutos de inmersión cada 8 horas es el tiempo y frecuencia con mejor respuesta para la mayor sobrevivencia y regeneración de los callos embriogénicos de *H. alchorneoides*. También se determinó que el medio de cultivo con mayor concentración (0,9 g/l) de 6-BAP es el que permitió el crecimiento y

mantenimiento de los callos. Sin embargo, se recomienda reemplazar con medio fresco a las cuatro semanas de evaluación.

## Ensayos de Embriogénesis somática

### Metodología

#### Establecimiento *in vitro*

Como material experimental se utilizaron plantas de *Hyeronima alchorneoides* obtenidas a partir de semillas. Las plántulas fueron mantenidas en el invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología, que mantuvo temperaturas entre 18 a 26 C y humedad mayor a 95% durante el desarrollo de la investigación. Estas plantas fueron fertilizadas de forma foliar cada 4 semanas con 5 ml/L de Bayfolan ® complementado con 2 mg.L<sup>-1</sup> ácido naftalenacético (NAA) y 2X vitaminas según las recomendaciones de Murashige y Skoog (MS 1962). La frecuencia de riego fue de aproximadamente 1 a 2 veces por semana dependiendo de las condiciones de humedad. Las plantas fueron asperjadas cada 2 a 3 semanas con 5 g.L<sup>-1</sup> de Zetarán ® y 5 g.L<sup>-1</sup> Afungil ® mezclados.

#### Desinfección de hojas

Hojas jóvenes de *H. alchorneoides* mantenidas en el invernadero, fueron desinfectadas utilizando una doble incubación primero en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2 o 3 % (v/v) en tiempos de 10 o 20 min cada una, después fueron incubadas en soluciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 0,5 o 1 % (v/v) por 2 o 3 min. Pasado el periodo de incubación en los desinfectantes, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar por 2 min cada uno y las hojas desinfectadas fueron reducidas en segmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> (explante) que incluyeron secciones de vena principal o secundaria. Estos explantes fueron incubados por 2 min en la solución 40% (v/v) de supresor microbiológico SB de la casa comercial Laboratorios ARVI S.A. (Methylisothiazolone (2-methyl-4-isothiazolin-3-one, MIT) and Methylchlorisothiazolinone (5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, CIT)), reactivos Químicos Gamma, Laboratorios ARVI S.A). Los explantes desinfectados fueron cultivados en el medio compuesto por las sales y vitaminas descritas por Murashige y Skoog (MS, 1962), a un pH de 5,6 y gelificado con Gelzan ® previo a la esterilización en autoclave a 121 C por 25 min. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de oscuridad a 25 ± 3 C para su establecimiento *in vitro*.

La evaluación se realizó cada semana durante tres semanas, contabilizando los explantes contaminados, asépticos y oxidados (necrosados). Para continuar con la etapa de inducción

de la embriogénesis somática se utilizó la metodología que permitió el mayor número de explantes asépticos y menor número de explantes oxidados.

#### Diseño experimental

Los experimentos de desinfección de hojas fueron evaluados en un diseño factorial 2<sup>4</sup>. La variabilidad de estos datos fue analizada mediante modelo lineal general con distribución binomial y una función de enlace logit, con una significancia menor o igual a 0,05 para cada variable evaluada (explantes contaminados, explantes asépticos, explantes oxidados). Los factores fueron: (1) La concentración de NaOCl (2 niveles= 2 o 3 %), (2) el tiempo de incubación en esta solución (2 niveles= 10 o 20 min), (3) la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 niveles= 0,5 o 1 %), y (4) el tiempo de incubación en esta solución (2 niveles= 2 o 3 min). Cada tratamiento (combinación de factores) fue repetido tres veces, con 10 unidades experimentales (explantes) cada repetición, determinando a priori el tamaño de la muestra para obtener una potencia mayor a 90%. Las medias de contaminación, explantes asépticos y oxidación, fueron comparadas por el método de Tukey HSD (*Honest Significant Differences*).

#### Inducción de la embriogénesis somática

##### Inducción de callo

Los explantes desinfectados fueron inoculados en el medio de cultivo para la inducción de callo embriogénico, compuesto por las sales MS y vitaminas B5 (Gamborg *et al.* 1968) suplementado con 300 mg.L<sup>-1</sup> de L-prolina y 200 mg.L<sup>-1</sup> de L-cisteína, 300 mg.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada y 3% (m/v) de sacarosa, con un pH ajustado a 5,8 (medio basal, MB), medio similar a los recomendados por Syombua et al. (2019), Kahia et al. (2016) y Rahman et al. (2017), y una concentración de reguladores de crecimiento tipo auxinas 2.26 µM ácido-2,4-Diclorofenoxiacético (2.4-D), 1.34 µM ácido naftalenacético (NAA) o 4.14 µM ácido 4-amino-3,5,6- tricloropicolínico (picloram), gelificado con Gelzan ® previo a la esterilización en autoclave a 121 C por 20 min. Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad a 25 ± 3 C. La formación de callos embriogénicos fue evaluada después de ocho semanas visualizando los tejidos en el estereoscopio y microscopio electrónico de barrido. Según los resultados obtenidos, únicamente el cultivo en presencia de picloram permitió la producción de callos embriogénicos, por lo que este regulador fue seleccionado a partir de este primer ensayo para evaluar en los experimentos de proliferación junto con el regulador 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (TDZ).

##### Proliferación de callo embriogénico

Segmentos de hoja de 1 cm<sup>2</sup> fueron cultivados por 8 semanas en el medio basal complementado con 4.14, 8.28 o 12.42 µM picloram o 4.54, 9.08 o 13.62 µM TDZ. Los callos inducidos fueron seleccionados para establecer líneas de callos embriogénicos. Cada

grupo de callos producidos a partir de explantes de una misma planta madre cultivados en la misma concentración de regulador se consideró una línea. Con este criterio, fue posible obtener 96 líneas de callos diferentes, que fueron subcultivadas en el medio basal complementado con 0, 50 o 100 % de la concentración de Picloram o TDZ, de acuerdo con el regulador y concentración utilizados en la inducción inicial (Cuadro 1). Después de ocho semanas de cultivo en oscuridad a  $25 \pm 3$  C se evaluó la presencia de callos que mostraron proliferaciones celulares formadas por masas translucidas compuestas por células elongadas (células embriogénicas) en cada uno de los medios, al observarlas al estereoscopio. Los embriones producidos en cada uno de estos tratamientos fueron separados de los callos y mantenidos en el medio basal sin reguladores de crecimiento.

Cuadro 2. Concentración de los reguladores de crecimiento ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) y 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (TDZ) evaluadas en el medio basal para la proliferación de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides*.

| Tratamiento  | Regulador de crecimiento ( $\mu\text{M}$ ) |               |           |               |
|--|--|---------------|-----------|---------------|
|  | Picloram                                   |               | TDZ       |               |
|  | Inducción                                  | Proliferación | Inducción | Proliferación |
| Medio basal +<br>0% Regulador<br>de crecimiento      | 4.14                                       | 0.00          | 4.54      | 0.00          |
|  | 8.28                                       | 0.00          | 9.08      | 0.00          |
|  | 12.42                                      | 0.00          | 13.62     | 0.00          |
| Medio basal +<br>50%<br>Regulador de<br>crecimiento  | 4.14                                       | 2.07          | 4.54      | 2.27          |
|  | 8.28                                       | 4.14          | 9.08      | 4.54          |
|  | 12.42                                      | 6.21          | 13.62     | 6.81          |
| Medio basal +<br>100%<br>Regulador de<br>crecimiento | 4.14                                       | 4.14          | 4.54      | 4.54          |
|  | 8.28                                       | 8.28          | 9.08      | 9.08          |
|  | 12.42                                      | 12.42         | 13.62     | 13.62         |

#### Diseño experimental

Los experimentos fueron evaluados en un diseño en bloques completos al azar. La variabilidad de estos datos fue analizada mediante un modelo lineal general con distribución binomial y una función de enlace logit. Los factores estudiados en este ensayo fueron el tipo

de regulador utilizado en la inducción como bloque (picloram y tidiazuron), el origen o la línea de callo establecida en la inducción (factor categórico, 96 líneas) y la concentración de regulador de crecimiento utilizada para la proliferación (factor numérico, 3 niveles= 0, 50 y 100 %). Las variables analizadas fueron porcentaje de explantes que produjeron tejidos embriogénicos, porcentaje de explantes oxidados (tejidos con coloración oscura o necróticos), porcentaje de explantes hiperhidratados (tejidos con apariencia vidriosa debido a un contenido de agua intracelular excesivamente alto) y porcentaje de callos en crecimiento. La producción de masas proembriogénicas fue la de mayor interés, por lo que se modeló esta variable en respuesta a los factores evaluados. Los modelos fueron comparados mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC) y se consideraron factores significativos en la respuesta aquellos con  $p < 0.05$ . Las medias de la producción de masas proembriogénicas fueron comparadas por el método de Tukey HSD (*Honest Significant Differences*). Las medianas de oxidación, hiperhidratación y crecimiento de callos fueron comparadas gráficamente según las recomendaciones de Chambers et al. (1983), de manera que, al estimar el tamaño del efecto en un gráfico de cajas, si las hendiduras dibujadas en dos gráficos no se traslapan existe suficiente evidencia estadística para afirmar que las medianas de dichos grupos son diferentes.

#### Análisis de los callos por microscopía electrónica de barrido

Muestras de los callos inducidos en los tratamientos fueron procesadas para su caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para este análisis, los tejidos fueron incubados en la disolución de Karnovsky compuesta por 2.5 % (v/v) glutaraldehído y 2 % (v/v) paraformaldehído disueltos en buffer Sorensen 0.1 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) durante 48 h a 4 C. La solución de Karnovsky fue retirada y los tejidos fueron lavados tres veces con buffer Sorensen por 10 min cada lavado. Seguido a esto los tejidos fueron sometidos a un proceso de post fijación con 2 % (m/v) tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) disuelto en buffer Sorensen por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada por 10 min cada uno y se realizó una deshidratación por incubación en concentraciones crecientes de etanol al 30, 50, 70, 80, 90, 95 % por 15 min cada una y tres incubaciones finales en etanol al 100% por 20 min cada una. Después de la deshidratación, se realizó un procedimiento de secado en punto crítico utilizando  $\text{CO}_2$  en el equipo Leica CPD300. Después del secado, las muestras fueron recubiertas con partículas de oro en un cobertor iónico EMS 150R ES. Las muestras recubiertas fueron analizadas y se obtuvieron micrografías en un microscopio electrónico de barrido Hitachi TM-3000 a 7.5 kV.

## Resultados

### Establecimiento *in vitro*

En el presente estudio, se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación en desinfectantes para establecer los cultivos asépticos. Se observó que la cantidad de explantes asépticos y la necrosis de estos fue afectada únicamente por el factor de tiempo de incubación en NaOCl (Figura 10). En este ensayo, se determinó que el tratamiento en 1% (v/v) NaOCl por 20 min y 0.5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 min fue el que presentó la mayor cantidad de explantes asépticos y la menor cantidad de explantes necróticos, mientras que el tratamiento en 1% (v/v) NaOCl por 10 min y 0.5% (v/v) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentó la mayor cantidad de explantes contaminados (Figura 2). Por su parte, el tratamiento en 2% (v/v) NaOCl por 20 min y 1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 min presentó pocos explantes contaminados, pero hasta un 60% de explantes necróticos (Figura 10).

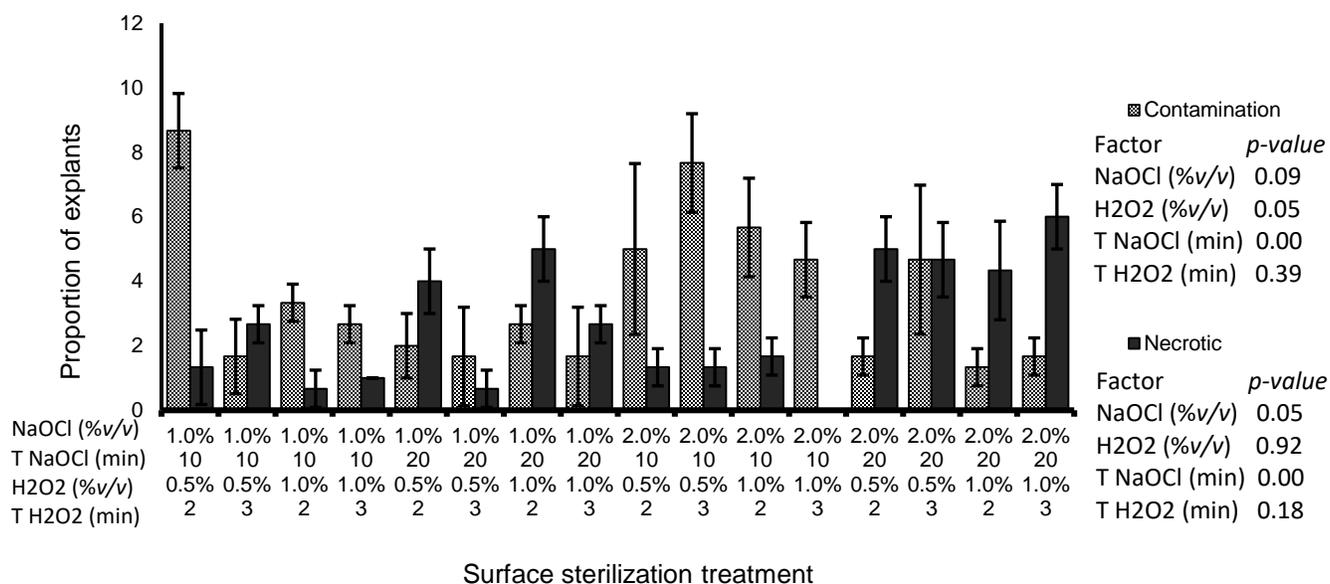


Figura 10. Proporción de explantes de *Hyeronima alchorneoides* contaminados y necrosados después de su desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y cultivo *in vitro* por dos semanas. En la figura se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar. Los valores de p en cada variable de respuesta se obtuvieron por medio de un modelo lineal general con un  $\alpha \leq 0.05$ .

### Inducción de la embriogénesis somática

#### Inducción de callo

Al evaluar el tipo de regulador de crecimiento en la inducción de callos embriogénicos, se observó que este factor tuvo efecto significativo en todas las variables de respuesta analizadas (Figura 11). Se determinó que el cultivo de los explantes en el medio basal sin reguladores no indujo la callogénesis, y estos explantes se necrosaron después de las ocho semanas de

evaluación (Figura 11). Los explantes cultivados en presencia de 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D y 1.34  $\mu\text{M}$  NAA permitió la calogénesis en un 20 y 87 % de los explantes respectivamente, sin embargo, en estos callos no se identificaron estructuras proembriónicas ni embriones somáticos (Figura 11). El cultivo en 4.14  $\mu\text{M}$  picloram permitió la producción de un 80% de callos a partir del total de los explantes evaluados, de los cuales un 20 % mostraron embriones somáticos y masas proembriónicas en algunas zonas de los callos (Figura 11 y Figura 4D).

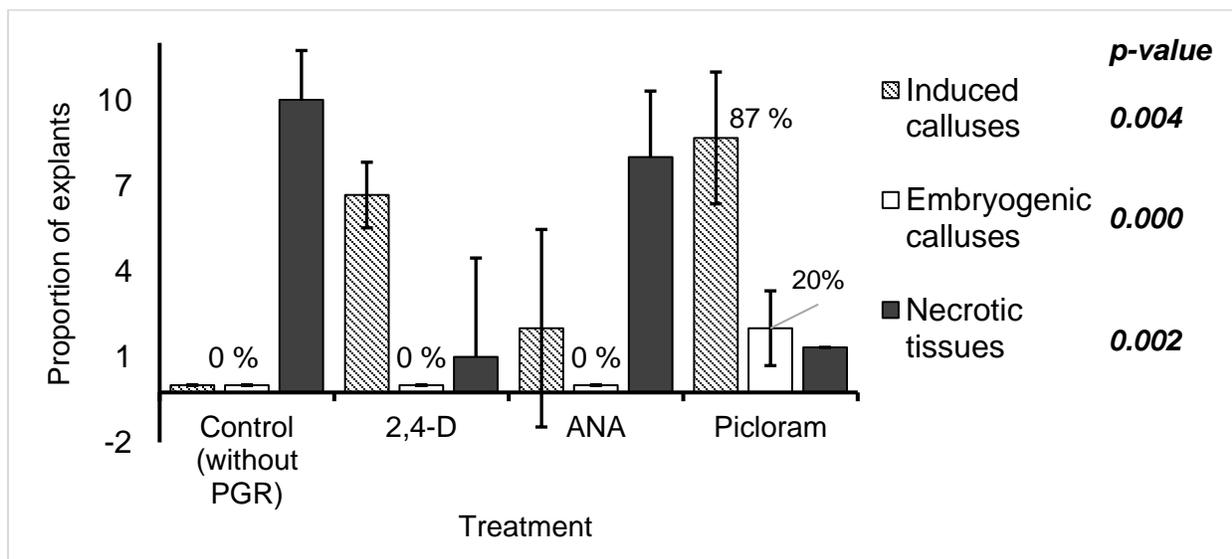


Figura 11. Respuesta de explantes de *Hyeronima alchorneoides* al cultivo *in vitro* en presencia de diferentes reguladores de crecimiento (ácido-2,4-diclorofenoxiacético, ácido naftalenacético y ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), después de ocho semanas. En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar. Los valores de p de cada variable de respuesta se obtuvieron al analizar los datos por medio de un modelo lineal general con un  $\alpha \leq 0.05$ .

Todos los explantes cultivados en ausencia de reguladores de crecimiento presentaron necrosis y no se observó desarrollo de ninguna estructura a partir de estos (Figura 12A). Los explantes cultivados en presencia de 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D produjeron callos desarrollados a partir de los espacios intervenales del haz de las hojas y se observó brotación de raíces a partir de estos callos (Figura 12B). Los explantes cultivados en 1.34  $\mu\text{M}$  NAA permitieron el desarrollo de callos a partir de la vena central o secundaria del envés de la hoja, en estos callos no se observó el desarrollo de masas proembriónicas ni embriones somáticos (Figura 12C). Por otro lado, a partir de los explantes cultivados en 4.14  $\mu\text{M}$  picloram (Figura 12D) se produjeron callos a partir del espacio intervenal del haz de la hoja, y en algunos de estos se observó el desarrollo de embriones somáticos en regiones con células de apariencia alargada y translúcidas (Figura 12D).

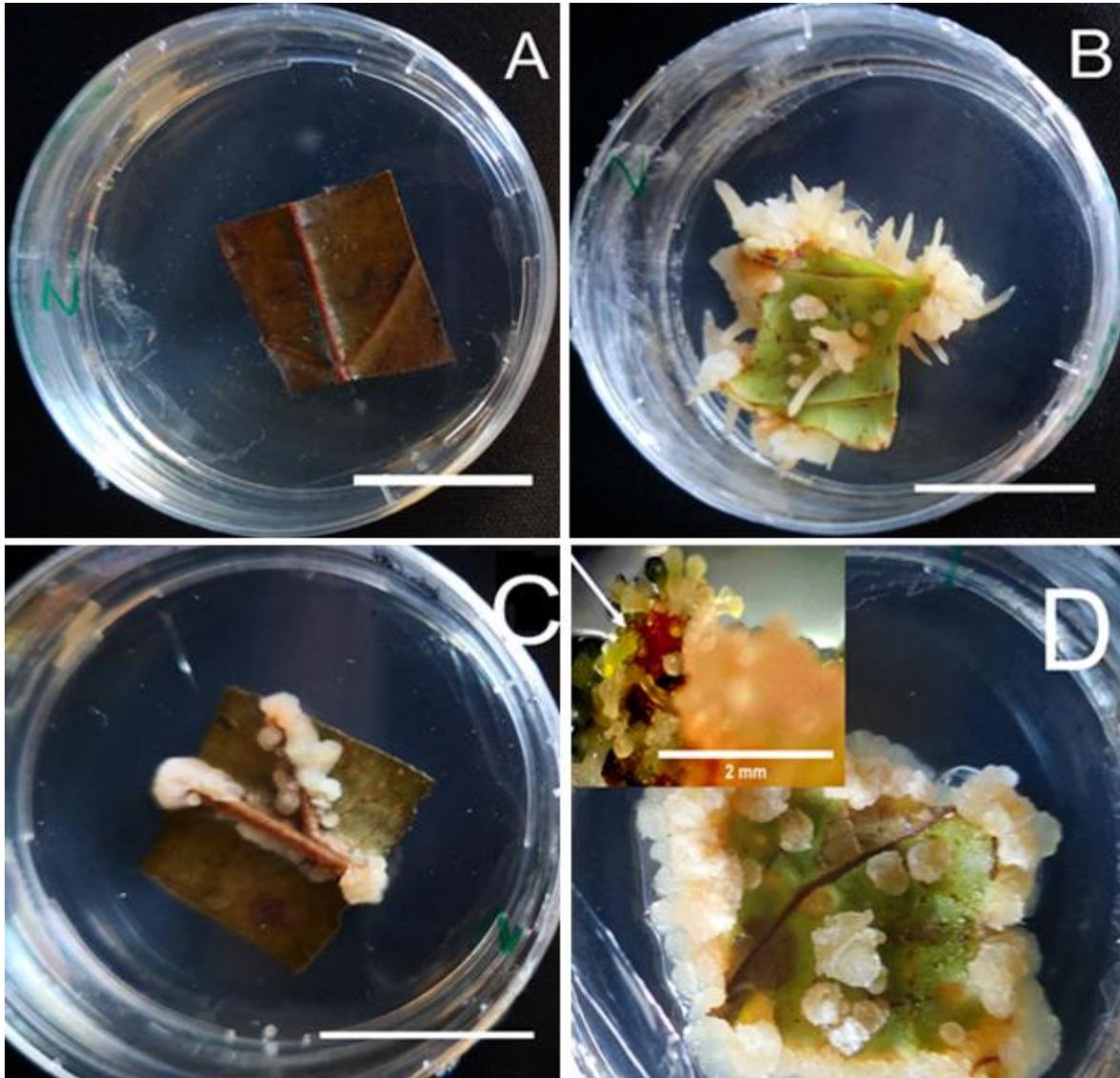


Figura 12. Inducción de callo en explantes de *Hyeronima alchorneoides* cultivados por ocho semanas en oscuridad en el medio de inducción de callo basal complementado con (A) Control sin reguladores, (B) 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D, (C) 1.34  $\mu\text{M}$  NAA y (D) 4.14  $\mu\text{M}$  picloram. En el recuadro en (D) se muestran los embriones somáticos observados en el estereoscopio. Barra de escala: A-C = 2 cm; D = 2 mm.

#### Proliferación del callo embriogénico

#### Análisis de la respuesta de producción de masas proembriónicas por Modelo Lineal General

En la etapa de proliferación del callo proembriogénico, el efecto de los factores evaluados en la producción de masas proembriónicas fue determinado mediante ajustes de modelo lineal general (Cuadro 3). En todos los modelos analizados se observó que el factor “línea” no

aportó un efecto significativo en la variabilidad de la respuesta, ni de forma individual ni como factor cruzado (Cuadro 3). Los factores “tipo de PGR” y “Concentración de PGR” aportaron efectos significativos en todos los modelos, sin embargo, se determinó que no existe significancia de estos cuando se analizaron como factores cruzados (Cuadro 3), lo cual se considera suficiente evidencia estadística para afirmar que la interacción de estos factores no produce cambios relevantes en la variabilidad de la respuesta embriogénica. El valor de criterio de información de Akaike (AIC) sugiere que no existe suficiente evidencia estadística para aumentar la cantidad de factores en el modelo, se observó un mayor ajuste de los modelos que incluyeron cada factor por separado para explicar la variabilidad en la producción de masas proembriogénicas, que los que tomaron en cuenta factores cruzados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del tipo de regulador de crecimiento (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea y ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), la línea y la concentración del regulador (medio sin reguladores, medio con 50% o 100% de regulador con respecto a la usada en la inducción) en el medio de proliferación, analizados como predictores en la respuesta de producción de masas proembriogénicas (PEM) en callos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados durante 8 semanas en oscuridad a  $25 \pm 3$  C. Este análisis se realizó mediante diferentes ajustes de modelo lineal general con una función de enlace logit.

| Predictores en el GLM                    | Tipo de predictor | Niveles  | AIC    | p-value                    |
|--|-------------------|--|--------|----------------------------|
| Tipo de PGR                              | Categórico        | - TDZ<br>- Picloram                                    | 349.51 | 0.0014                     |
| Línea (origen)                           | Categórico        | - 96 niveles   | 435.19 | 0.2831                     |
| Concentración de PGR en la proliferación | Numérico          | - 0%<br>- 50%<br>- 100%                                | 319.61 | $5.472 \times 10^{-9}$     |
| Tipo de PGR*Línea                        | categórico        | - TDZ<br>- Picloram<br>- 96 líneas<br>- Factor cruzado | 435.19 | 0.0014<br>0.5330<br>1.0000 |

|   |                                    |                            |        |                        |
|---|------------------------------------|----------------------------|--------|------------------------|
| Tipo de PGR +<br>Línea  | Categoricos                        | - TDZ                      | 435.19 | 0.0014                 |
|   |                                    | - Picloram<br>- 96. Líneas |        | 0.5340                 |
| Tipo de<br>PGR*Concentrac<br>ión de PGR en la<br>proliferación          | Categorico*Numéri<br>co            | - TDZ                      | 315.04 | 0.0014                 |
|   |                                    | - Picloram                 |        | 2.13x10 <sup>-9</sup>  |
|   |                                    | - 0%                       |        |                        |
|   |                                    | - 50%                      |        |                        |
|   |                                    | - 100%                     |        |                        |
|   |                                    | - Factor cruzado           |        | 0.8239                 |
| Tipo de<br>PGR*Línea*Con<br>centración de<br>PGR en la<br>proliferación | Categorico*Categor<br>ico*Numérico | - TDZ                      | 7336.2 | 0.0014                 |
|   |                                    | - Picloram                 |        | 2.13x10 <sup>-9</sup>  |
|   |                                    | - 0%                       |        |                        |
|   |                                    | - 50%                      |        |                        |
|   |                                    | - 100%                     |        |                        |
|   |                                    | - 96 líneas                |        | 0.1494                 |
|   |                                    | - 4 factores cruzados      |        | 0.1495 < p<br>≤ 1.0000 |

#### Producción de masas proembriogénicas

La inducción y proliferación de callos en presencia de TDZ produjo masas proembriogénicas en más del 54.9% de los explantes cultivados en 50 o 100% de TDZ (Figura 13A). Sin embargo, los explantes cultivados en picloram produjeron hasta un 38.6% de masas proembriogénicas (Figura 13A). El subcultivo de los callos en un medio sin reguladores de crecimiento produjo el menor porcentaje de masas proembriogénicas en ambos tratamientos (TDZ y picloram), pero en TDZ esta cantidad fue casi 3 veces mayor que en picloram con un 16,1% comparado con 5,7% respectivamente (Figura 13A).

Los tejidos necróticos fueron significativamente mayores en ambos reguladores cuando la concentración de reguladores utilizada en la proliferación fue de 0 (Figura 13B). Sin

embargo, cuando la cantidad de callos subcultivados en proliferación fue en 50% o 100% de la concentración de regulador de crecimiento, el número de callos necróticos fue aproximadamente la mitad en TDZ comparado con picloram (Figura 13B)

El porcentaje de tejidos hiperhidratados fue bajo para ambos reguladores con un máximo de 31,7% de los callos hiperhidratados que fueron cultivados en picloram (Figura 13C). En picloram todos los tratamientos presentaron diferencias significativas y en TDZ solo los tratamientos de 0 y 100% de regulador presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 13C). Los datos de los callos que mostraron crecimiento presentaron una relación directamente proporcional con la concentración de regulador de crecimiento en ambos casos con TDZ y picloram (Figura 13D).

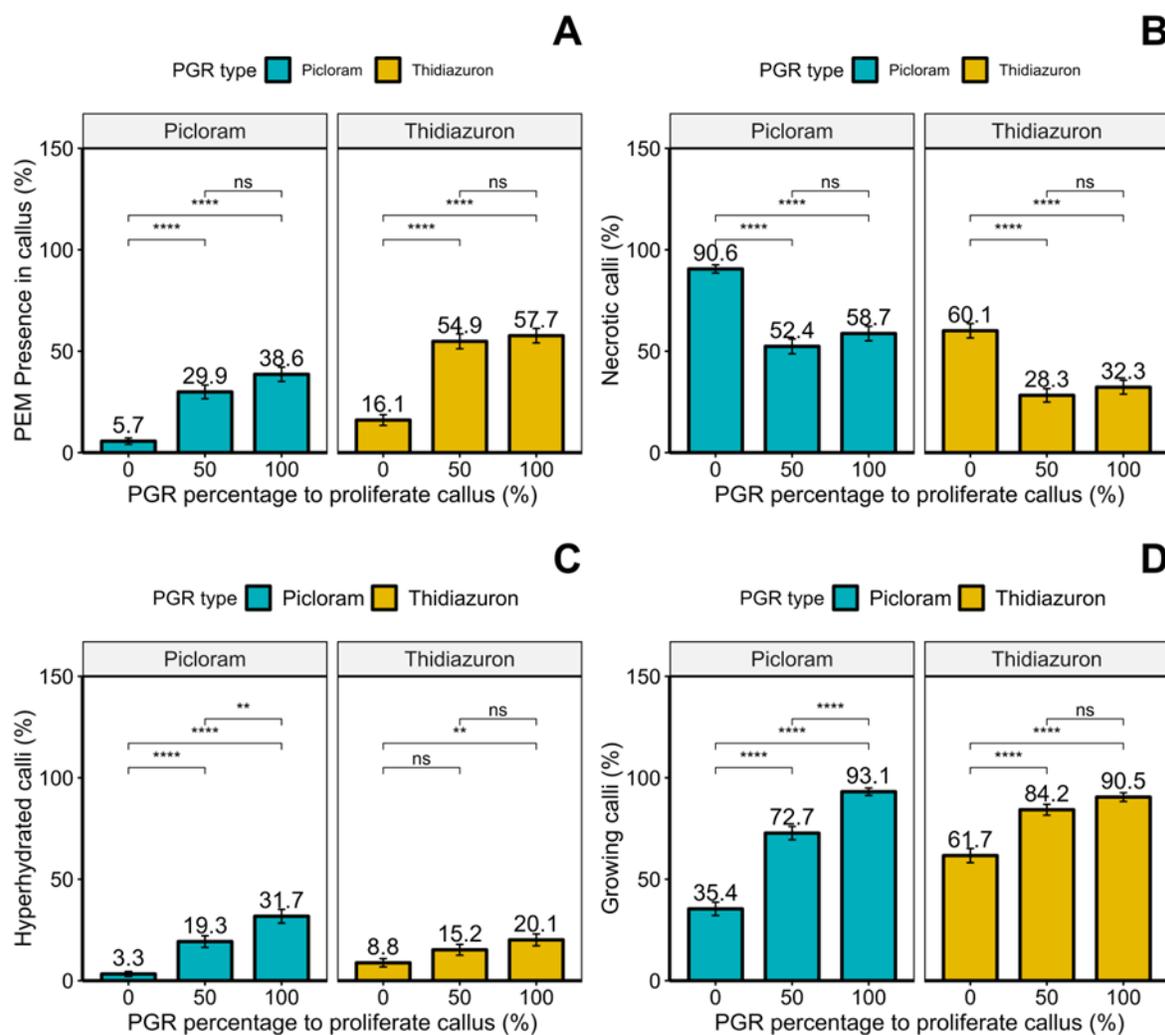


Figura 13. Respuesta de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* a los tratamientos de proliferación. Gráficos: (A) Relación entre la concentración del regulador de crecimiento

utilizada en la proliferación y el porcentaje de callos con masas proembriogénicas, (B) Porcentaje de callos necróticos en respuesta a la concentración de regulador de crecimiento, (C) Callos hiperhidratados, (D) Callos en crecimiento. Todos los tratamientos fueron evaluados después de 8 semanas de cultivo en oscuridad a  $25 \pm 3$  C.

En la etapa de proliferación, los callos cultivados en los tratamientos con picloram presentaron una apariencia más uniforme con segmentos de callo embriogénico de mayor tamaño comparado con los callos cultivados en tidiazuron durante la misma etapa (Figura 14A y 14B). Los callos en los tratamientos con tidiazuron presentaron segmentos embriogénicos y no embriogénicos mezclados en superficies menores, por lo que fueron tejidos con apariencia más heterogénea (Figura 14B). Los tratamientos de proliferación permitieron la producción de embriones somáticos en los dos reguladores evaluados, observándose diferentes estadios de desarrollo, particularmente se identificaron los estadios globular y torpedo en los varios de los tratamientos con picloram (Figura 14A) y globulares en algunos de los tratamientos con tidiazuron (Figura 14B). Los embriones que proliferaron en picloram mostraron un desarrollo mayor para el periodo de evaluación que los que proliferaron en tidiazuron (Figura 14C y Figura 14D). Varios de los embriones de los tratamientos de picloram se encuentran germinando, y presentaron bipolaridad con un eje radical y un eje caulinar (Figura 14C). Por su parte, los embriones de los tratamientos con tidiazuron mostraron un menor desarrollo, se observaron únicamente en el estadio globular durante el periodo de evaluación (Figura 14D).

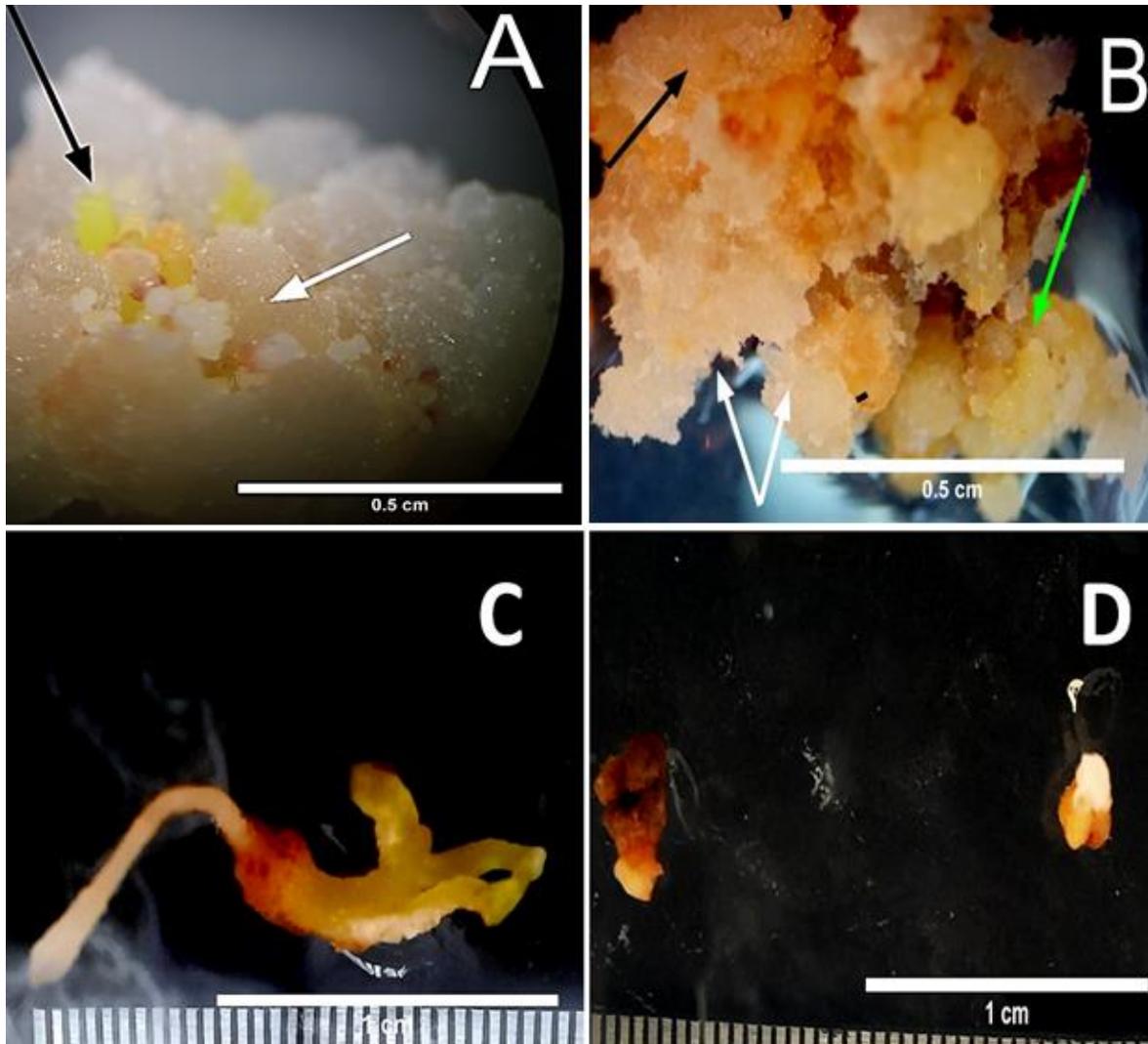


Figura 14. Respuesta de los callos embriónicos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados en los tratamientos de proliferación. (A) Callos inducidos en  $12.42 \mu\text{M}$  picloram y subcultivados en 50% de este regulador para inducir su proliferación. (B) Callos inducidos en  $6.81 \mu\text{M}$  tiazuron y subcultivados en 100% de este regulador para inducir su proliferación. (C) Embrión somático en germinación producido a partir de callo inducido en  $4.14 \mu\text{M}$  picloram y subcultivado en  $2.07 \mu\text{M}$  picloram durante la proliferación. (D) Embriones somáticos en estadio globular producidos a partir de callo inducido en  $9.08 \mu\text{M}$  tiazuron y subcultivado en la misma concentración durante la proliferación. Flecha negra en A señala embriones en estadio torpedo, flecha blanca en A señala embriones en estadio globular. Flecha negra en B señala apariencia del callo no embriónico, flechas blancas en B señalan la apariencia del callo embriónico, flecha verde en B señala embriones en estadio globular. Barra de escala: A, B = 0.5 cm, C, D = 1 cm.

Correlación de las variables de los tratamientos de proliferación

En este análisis se determinó que el porcentaje de callos en crecimiento correlacionado con el de callos necróticos presentó un valor de  $r = -0.52$ , este par de variables presentaron la correlación más fuerte de todo el ensayo de proliferación (Figura 15). El porcentaje de callos hiperhidratados correlacionado con la cantidad de regulador de crecimiento en la proliferación presentó un coeficiente  $r = 0.24$ , indicando una correlación significativa y directamente proporcional entre estas variables, asimismo, se observó que no existe una relación significativa entre el porcentaje de callos hiperhidratados y el porcentaje de callos que mostraron presencia de masas proembriónicas, con un  $r = -0.11$  (Figura 15). También se determinó que la concentración de regulador de crecimiento en el medio de cultivo de proliferación se relacionó de forma significativa y directamente proporcional con el porcentaje de callos que presentaron masas proembriónicas y con el porcentaje de callos en crecimiento (Figura 15). Por último, se determinó que existe una correlación significativa y directamente proporcional entre el porcentaje de callos en crecimiento y el porcentaje de presencia de masas proembriónicas (Figura 15).

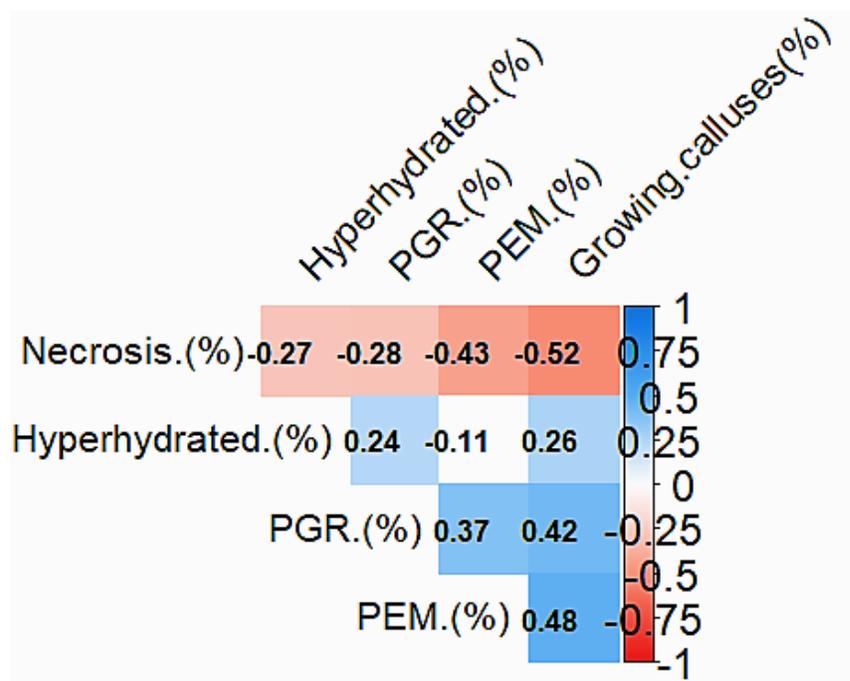


Figura 15. Correlograma de las relaciones entre las variables del experimento de proliferación de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides*. Análisis realizado con un nivel de significancia menor o igual a 0.05. La escala de color indica el valor del coeficiente de correlación de Pearson para cada par de variables. Correlaciones no significativas se indican con coloración blanca en el correlograma.

Análisis de los callos por microscopía electrónica de barrido (SEM)

## Inducción de callo

Los callos no embriogénicos inducidos a partir del cultivo de los segmentos de hoja en presencia de  $1.34 \mu\text{M}$  NAA y  $2.26 \mu\text{M}$  2,4-D mostraron la proliferación de gran cantidad de células, poco compactas entre sí y con bajo nivel de organización, anatomía característica de células en callos no embriogénicos (Figura 16A y Figura 16B). Por su parte, los callos inducidos en  $4.14 \mu\text{M}$  picloram que produjeron embriones somáticos se caracterizaron por ser estructuras granulares compactas, y se observaron divisiones celulares anticlinales asimétricas (Figura 16C), estos callos embriogénicos iniciaron su proliferación a partir de células epidérmicas que formaron centros meristemáticos (MC), caracterizados por ser clúster con alta tasa de división celular (Figura 16D).

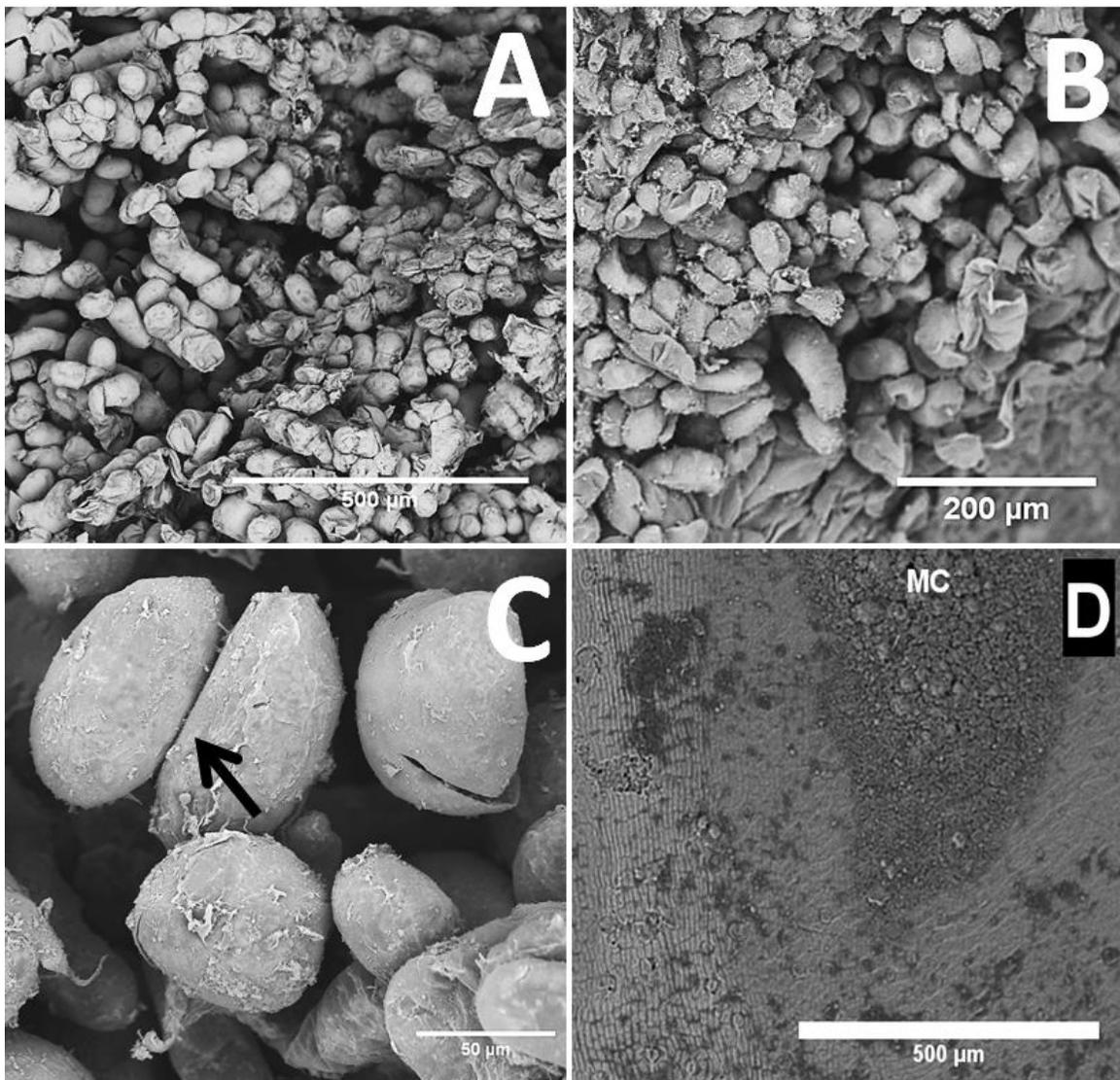


Figura 16. Micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de los callos de *Hyeronima alchorneoides* cultivados en el medio de inducción por 8 semanas. (A) Callo

inducido en 1.34  $\mu\text{M}$  NAA (ácido naftalenacético). (B) Callo inducido en 2.26  $\mu\text{M}$  2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético). (C) Células en división celular asimétrica del callo inducido en 4.14  $\mu\text{M}$  picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico). (D) Tejido epidérmico iniciando la formación de callo, se observa una región con un centro meristemático (MC). La flecha negra en C señala una diada producida por una división celular anticlinal. Barra de escala: A = 500  $\mu\text{m}$ ; B = 200  $\mu\text{m}$ ; C = 50  $\mu\text{m}$ ; D = 500  $\mu\text{m}$ .

### Proliferación de callo embriogénico

El análisis de microscopía electrónica de barrido permitió determinar la morfología de los callos y el estadio de los embriones somáticos en la etapa de proliferación (Figura 17). Los callos embriogénicos inducidos en 8.28  $\mu\text{M}$  picloram y subcultivados en un medio sin reguladores de crecimiento durante la proliferación (Figura 17A) y los callos embriogénicos inducidos en 4.54  $\mu\text{M}$  tidiazuron y subcultivados en la misma concentración de regulador en la etapa de proliferación (Figura 17B) mostraron una superficie compacta, con células alargadas a partir de las cuales fue posible observar el desarrollo de embriones somáticos. Los embriones en estadio torpedo presentaron un ápice caulinar característico y un tamaño aproximado de 2 mm y se desarrollaron a partir de segmentos de callo embriogénico (EC) compactos y con células alargadas (Figura 17C). Los embriones somáticos en estadio globular se desarrollaron a partir de los márgenes del callo embriogénico y se observó una cobertura con una capa fibrilar compacta de material extracelular (ECM) (Figura 17 D). Esta cobertura con material extracelular fue discontinua en algunas regiones, conectando la mayoría embriones globulares y células proembriogénicas (Figura 17D). Esta capa desapareció en estadios más avanzados como torpedo, en favor de la diferenciación de la protodermis (Figura 17C).

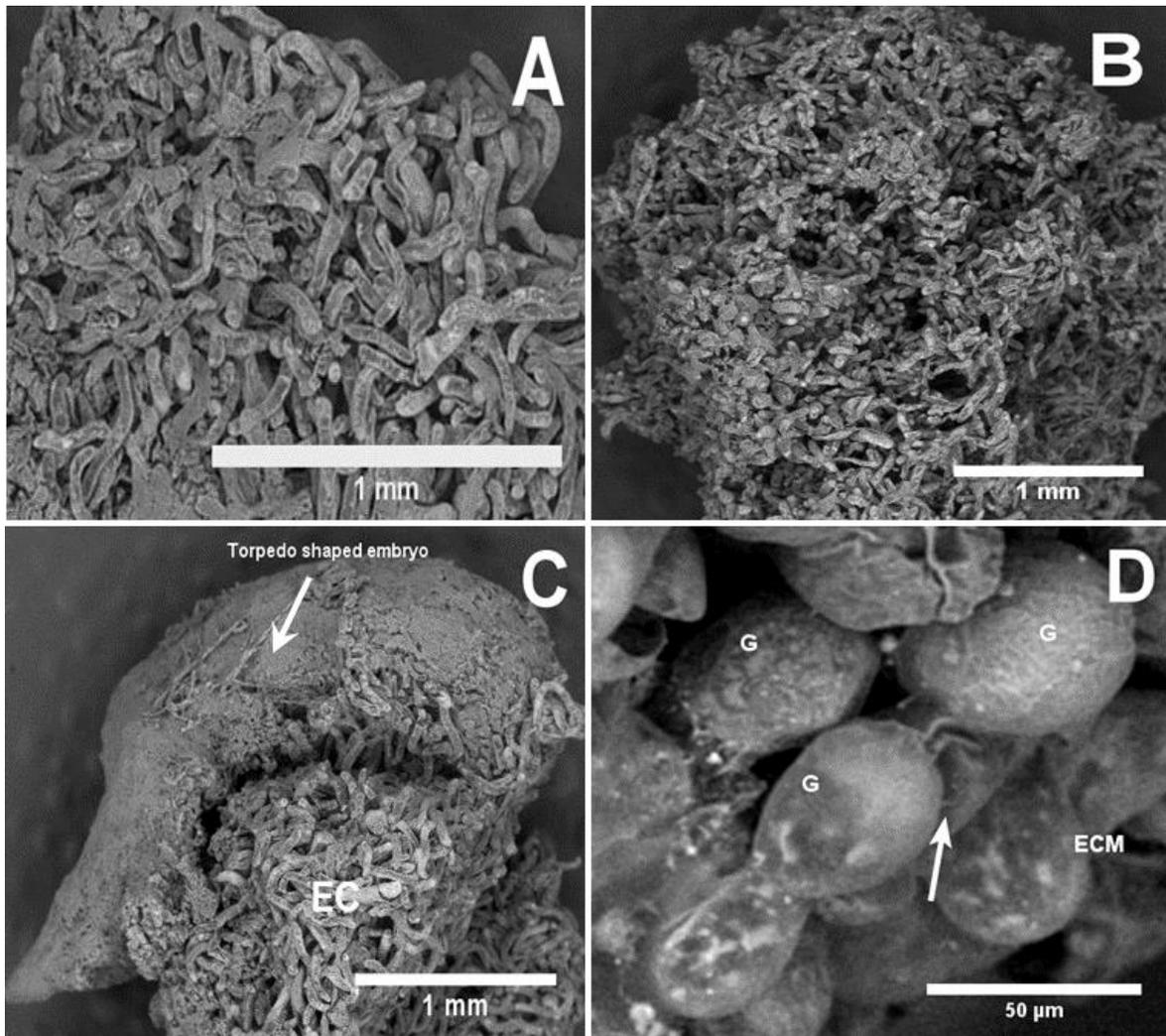


Figura 17. Embriogénesis somática de *Hyeronima alchorneoides* observada en el microscopio electrónico de escaneo después del cultivo en el medio de proliferación por 8 semanas. (A) Apariencia del callo embriogénico inducido en 8.28  $\mu\text{M}$  picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y subcultivado en ausencia de reguladores durante la proliferación. (B) Apariencia de la superficie del callo embriogénico inducido en 4.54  $\mu\text{M}$  tiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiazol-5-il)urea) y subcultivado en la misma concentración de regulador (100%) en la etapa de proliferación. (C) Vista detallada de embrión somático en estadio de torpedo producido a partir de callo embriogénico inducido en 8.28  $\mu\text{M}$  picloram y subcultivado en 0  $\mu\text{M}$  picloram por 8 semanas. (D) Vista detallada de embriones somáticos globulares formados a partir del callo embriogénico inducido y subcultivado en 4.54  $\mu\text{M}$  tiazuron en la etapa de proliferación. Nótese la presencia de material extracelular (ECM) membranoso cubriendo algunos de los embriones somáticos (flecha blanca). Barra de escala: A-C= 1 mm; D =50  $\mu\text{m}$ .

## Discusión y conclusiones

La embriogénesis somática es un proceso de expresión de la totipotencia vegetal, que se utiliza como la plataforma de preferencia para la regeneración de plantas, tanto en la micropropagación como para la conservación de germoplasma y para el mejoramiento de rasgos específicos (Kaur et al., 2018; Pais 2019). Diversos estudios recomiendan esta estrategia para la propagación clonal de especies forestales de interés comercial como *Pinus* sp. (Castander-Olarrieta et al., 2020; Gao et al., 2020), *C. arabica* (Awada et al., 2020), *Betulla platyphalla* (Yang et al., 2020), *Quercus suber* (Benali & Lamarti, 2019), *Santallum album* (Singh et al., 2016), así como para la conservación (Gladfelter et al., 2020), lo cual evidencia la utilidad de la técnica en estas aplicaciones.

Para inducir la embriogénesis somática *in vitro* se requiere establecer cultivos asépticos de los explantes utilizados como material de partida. En el presente estudio se desarrolló un protocolo para el establecimiento de explantes de hoja mediante la incubación en NaOCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una combinación de Methylisothiazolone y Methylchloroisothiazolinone. Se determinó que el factor que tuvo efectos significativos en la asepsia y sobrevivencia de los explantes fue el tiempo de incubación en NaOCl (p-value = 0.00) y este resultado coincide con los obtenidos en otras investigaciones similares que señalan que es posible lograr mayor cantidad de cultivos asépticos al aumentar el tiempo de exposición de los explantes en este desinfectante (Abdelnour-Esquivel et al. 2020). Adicionalmente, el NaOCl es un desinfectante económico y fácil de conseguir por lo que es ampliamente utilizado en el establecimiento *in vitro* de diversos tipos de tejidos como semillas (Almeida et al. 2020; Hesami et al. 2019), yemas (Cardoso-Furlan et al. 2018; Thakur et al. 2018), ápices y espigas (Kaur y Sandhu 2015), entre otros. La utilización de otras sustancias biocidas en adición al hipoclorito de sodio es recomendada cuando la contaminación es persistente. En el presente estudio, los explantes desinfectados fueron sumergidos en 40% (v/v) supresor SB ARVI ® antes de ser inoculados en el medio de cultivo. La combinación de Methylisothiazolone y Methylchloroisothiazolinone es un potente biocida de amplio espectro, que inhibe el desarrollo de la contaminación por bacterias, hongos y microalgas en el medio de cultivo (Silvetti et al. 2018). Particularmente, esta combinación de moléculas afecta enzimas clave en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, previniendo la germinación de esporas y destruyendo células microbianas (Laboratorios Químicos ARVI S.A. 2015). En el establecimiento *in vitro* este desinfectante es de gran utilidad y se ha demostrado su efectividad tanto en la esterilización superficial de los explantes (Abdelnour-Esquivel et al. 2020), como adicionado al medio de cultivo para suprimir la aparición de microorganismos contaminantes (Putri et al. 2020).

Después de determinar las condiciones para el establecimiento *in vitro*, se evaluaron diferentes tratamientos para la inducción de callo. La elección del explante inicial y del regulador de crecimiento son dos factores de mayor importancia en la embriogénesis somática (Pal et al. 2012; Guan et al. 2016). Contrario al protocolo para la producción de

embriones somáticos previamente reportado en *H. alchorneoides* (Valverde-Cerdas et al. 2013), en el presente estudio los explantes iniciales fueron segmentos de hoja, que al ser tejidos vegetativos se espera que mantengan las características de las plantas madre (Akram & Aftab, 2016). Asimismo, es ampliamente conocido que los embriones cigóticos de esta especie presentan varias dificultades para su uso, como lo son su respuesta recalcitrante en el almacenamiento, baja tasa de viabilidad y daños por insectos, por lo que los embriones somáticos son la opción principal por considerar para la conservación de germoplasma de *H. alchorneoides* (Abdelnour, Aguilar y Valverde 2011).

La selección del regulador de crecimiento es de una importancia equivalente a la selección del explante para el proceso de embriogénesis somática (Pal et al. 2012). El uso de auxinas sintéticas para la inducción de callo se ha reportado en especies agroforestales tropicales como dicamba en *C. odorata* (Peña-Ramírez et al., 2011), 2,4-D en *Santalum album* (Singh et al., 2016), NAA en *Tectona grandis* (Akram & Aftab, 2016) y *Leucaena* sp (Pal et al., 2012). La aplicación exógena de auxinas induce una respuesta embriogénica, que es asociada con un incremento de la actividad de genes de biosíntesis de IAA como los genes TAA1 y YUCs (Méndez-Hernández et al. 2019). Al mismo tiempo, son activados los genes de transporte PIN que causan una acumulación diferencial del IAA en los proembriones desarrollados, lo cual tiene un efecto en el desarrollo de los estadios del embrión somático hasta la formación de la nueva plántula (Méndez-Hernández et al. 2019).

En la presente investigación se determinó que al comparar el cultivo de los explantes en picloram, 2,4-D y NAA, el primer regulador fue el único que indujo respuesta embriogénica en segmentos de hoja de *Hyeronima alchorneoides*, por lo cual este regulador fue seleccionado para el ensayo de proliferación. La efectividad de concentraciones moderadas de picloram en la inducción de la embriogénesis somática ha sido comprobada en recientes investigaciones con resultados similares a los obtenidos en la presente investigación Chib et al. (2020) indujeron embriogénesis somática al cultivar cormos de *Crocus sativus*, Silveira et al. (2020) en segmentos de hoja de *Plinia peruviana*, Almeida et al. (2020) en explantes de hoja de *E. guianensis*, entre otras especies.

Generalmente, la obtención de los embriones somáticos ocurre en varias etapas de inducción, que varían dependiendo de las especies y de condiciones fisiológicas todavía desconocidas (Corredoira et al., 2019). Después de obtener el callo embriogénico se requiere la proliferación de las estructuras y lograr el desarrollo de los embriones (Guerra et al., 2016). En el presente estudio se analizó el efecto de la auxina sintética ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) y el derivado de la fenilurea el 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea (tidiazuron o TDZ) en la proliferación de masas proembriogénicas en los callos inducidos con estos reguladores de crecimiento. El picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) ha sido utilizado comúnmente como herbicida, sin embargo, se han reportado sus efectos positivos en la inducción de callos para la producción de metabolitos (Genady 2017), la

organogénesis en combinación con citocininas (Gladfelter et al. 2020) y en la inducción de embriogénesis somática indirecta *in vitro* (Dai et al., 2015).

Los resultados del presente estudio fueron contrarios a los obtenidos en la embriogénesis somática de *Stewartia* sp. (Gladfelter et al., 2020). Estos autores encontraron una alta significancia relacionada con el origen genético de los tejidos en la embriogénesis somática, así como un mayor porcentaje de explantes con respuesta embriogénica al subcultivar los callos en un medio sin picloram, mientras que en la presente investigación, la línea de origen del tejido no tuvo un efecto significativo en la respuesta de los callos, y el subcultivo en el medio de proliferación sin picloram produjo menor porcentaje de callos con masas proembriogénicas.

Por otra parte, el tidiazuron es un regulador tradicionalmente usado en la agroindustria como un defoliante (Dinani et al., 2018). Comparado con otros reguladores del crecimiento, tidiazuron es de los más potentes y exhibe efectos en las plantas tanto de auxina como de citocinina, lo que explica su amplia versatilidad en aplicaciones *in vitro* e *in vivo* incluyendo la prevención de la degradación de la clorofila, aumento en la actividad fotosintética, finaliza la latencia de yemas, maduración de frutos, así como la proliferación de brotes adventicios, inducción de callo e inducción y proliferación de la embriogénesis somática (Dinani et al. 2018). Al comparar el tidiazuron con otras citocininas, se reporta que este regulador causa una alteración en el desarrollo de células meristemáticas de forma más dirigida, además al ser resistente a la citocinina oxidasa lo convierte en un compuesto estable en el cultivo de tejidos (Pal et al., 2012).

En el presente estudio, el tidiazuron mostró el potencial esperado en la inducción de embriogénesis somática, ya que se determinó que el cultivo de los explantes en este regulador permitió una respuesta embriogénica significativamente mayor al cultivo en picloram. Resultados similares utilizando este regulador se obtuvieron en la inducción de la embriogénesis somática en *Pelargonium sidoides* (Kumar et al., 2015), *Tectona grandis* (Akram & Aftab, 2016) y *Capsicum annum* (Khan et al., 2006), así como resultados contrarios a los reportados por Liang et al. (2020) en *Scaevola taccada* quienes encontraron que los tratamientos con tidiazuron mostraron poca efectividad.

En el estudio realizado por Valverde-Cerdas et al. (2013) fue posible la obtención de embriones somáticos en *Hyeronima alchorneoides* a partir de embriones cigóticos como explante. El presente es el primer reporte de inducción de embriones somáticos con picloram y TDZ no solo en *Hyeronima alchorneoides*, sino en la familia phyllantaceae utilizando segmentos de hoja como explantes de partida, lo cual representa un gran avance para la propagación y conservación de genotipos específicos de interés para el sector forestal. Esto fue confirmado por la visualización de los callos embriogénicos en el estereoscopio y el microscopio electrónico de barrido.

En el presente estudio fue posible visualizar divisiones celulares anticlinales, lo cual evidencia el crecimiento de células competentes a la embriogénesis somática para la formación de las masas proembriónicas como lo indicado en otras especies como *A. sativa* (Borji et al., 2018). Asimismo, el análisis en SEM permitió identificar algunos cambios durante la adquisición de la capacidad embriónica y el desarrollo de los embriones en *Hyeronima alchorneoides*. Fue posible observar células con capacidad y predisposición para la formación de embriones somáticos de forma indirecta. Los centros meristemáticos se desarrollaron a partir de células competentes en los explantes de hojas, y se han reportado presencia de células con competencia embriónica en diferentes tejidos de las plantas como raíces, hojas y entrenudos (Liang et al., 2020). Los centros meristemáticos poseen características particulares como son alta tasa de división celular, anatomía isodiamétrica, núcleos densos, abundantes gránulos de almidón entre otras, características observadas durante la embriogénesis somática en otras especies como *P. sidoides* (Kumar et al., 2015) y *E. guianensis* (Almeida et al., 2020), entre otros.

Otra evidencia ultraestructural de la embriogénesis somática es la presencia de cúmulos celulares (estructuras proembriónicas) en los callos cubiertos con materiales fibrilares extracelulares, que en estadios posteriores al globular puede originar la protodermis del embrión (Borji et al. 2018). En el presente estudio se identificó la cobertura de los embriones globulares con este tipo de material y estos resultados coinciden con los reportados por diversos estudios, donde se indica la presencia de la protodermis como una evidencia de un correcto desarrollo de los embriones somáticos (Kaur et al., 2018; Peña-Ramírez et al., 2011).

Asimismo, una vez separados del callo y cultivados en un medio sin reguladores se pudo observar el desarrollo de las plántulas con una estructura bipolar característica con un eje radical y un eje caulinar. Este comportamiento en el desarrollo de las plántulas es comúnmente alcanzado después de la maduración de los embriones somáticos, y es de vital importancia en la sobrevivencia de las plantas producidas mediante esta metodología. Se reporta desarrollo de los embriones somáticos en plántulas con estructura bipolar en diversas especies como *Ormosia henryi* (Wu et al., 2020), *Neolamarkia Cadamba* (Huang et al., 2020), *Tectona grandis* (Akram & Aftab, 2016), entre otras.

En el presente estudio se desarrolló un protocolo eficiente para la producción de callos embriónicos de *Hyeronima alchorneoides in vitro*, una especie forestal de conocido interés para el sector en Costa Rica y Centroamérica. Este es el primer reporte en el que se obtiene la embriogénesis somática en una especie de la familia Phyllanthaceae utilizando picloram y tidiazuron en el cultivo de explantes de hoja, lo cual representa un avance importante para la reproducción de la especie en el laboratorio, que puede utilizarse para la propagación masiva de genotipos de interés, la renovación de los jardines clonales, el mejoramiento no convencional por técnicas como ingeniería genética o inducción de mutaciones, así como

para la conservación a largo plazo de la especie en nitrógeno líquido, dada su recalcitrancia en el almacenamiento por métodos convencionales.

Se determinó que en el establecimiento la esterilización superficial de segmentos foliares en 1% (v/v) NaOCl por 20 min y 0.5% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 min fue el que presentó la mayor cantidad de explantes asépticos y la menor cantidad de explantes necróticos, por lo que es el tratamiento recomendado para iniciar los cultivos a partir de plantas mantenidas en invernadero. En la inducción de callo a partir del cultivo de segmentos de hoja se destaca que las auxinas 2,4-D y NAA permitieron la inducción de callos friables, con capacidad para la regeneración de tejidos radicales, principalmente el 2,4-D. Por su parte, la auxina picloram permitió la producción de callos, y algunos de estos fueron caracterizados como embriogénicos.

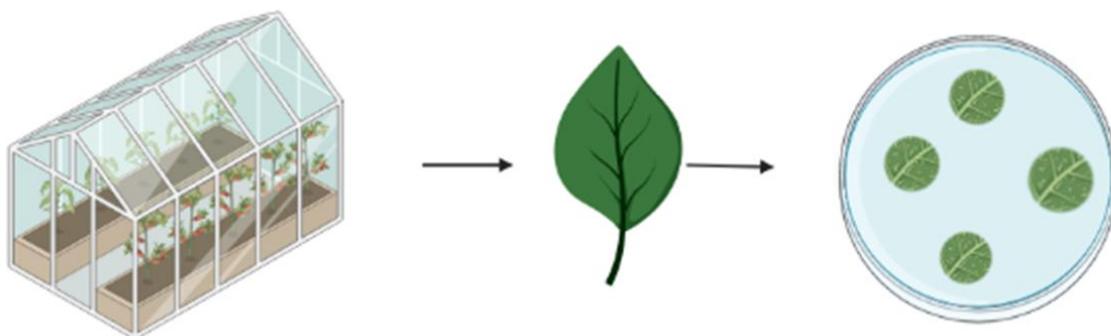
En la etapa de proliferación, se determinó que los factores que causaron mayor impacto en la respuesta embriogénica fueron el tipo de regulador de crecimiento utilizado en las fases de inducción y proliferación, así como el porcentaje de regulador utilizado en la proliferación, Por lo tanto, se recomienda el uso del regulador tidiazuron, en una concentración de 1, 2 o 3 mg.L<sup>-1</sup> para la inducción de callo y el subcultivo en la misma concentración o reducido a la mitad, puesto que no se encontraron diferencias significativas en esta etapa del proceso en la producción de masas proembriogénicas. Adicionalmente, el análisis estadístico de la respuesta embriogénica en la proliferación permitió determinar que la línea de origen de los tejidos no tuvo un impacto significativo en esta respuesta, por lo que la metodología reportada se perfila como promisoría para una mayor diversidad de genotipos.

## Ensayos de Crioconservación

### Metodología

#### Obtención del material vegetal

Los callos empleados en este estudio fueron obtenidos previamente en el Laboratorio de Crioconservación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Segmentos de hojas de plantas de dos a tres años mantenidas en condiciones de invernadero en el CIB, fueron desinfectadas mediante incubación por 30 minutos en la solución 1% (v/v) de NaOCl, seguido de tres lavados con agua destilada estéril y posterior incubación por 5 minutos en 1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, continuando nuevamente con tres lavados con agua destilada estéril. Dichos segmentos fueron colocados con la sección adaxial en contacto con el medio de cultivo de inducción, compuesto por sales descritas por Murashige y Skoog (MS, 1962), complementado con 1 mg/L BAP, 2 mg/L Picloram, 30 g/L sacarosa, 300 mg/L Caseína, 200 mg/L Cisteína y 6 mg/L Prolina, el pH fue ajustado a 5.7 y 5.4 g/L Gelzán® fueron añadidos para gelificar el medio, previo a su esterilización en autoclave a 121°C por 30 min. Después de 15 días de ser cultivados en condiciones de oscuridad a 27 +/- 2°C, los callos obtenidos de la inducción fueron transferidos al medio de proliferación, compuesto por sales MS, complementado con 1 mg/L BAP, 2 mg/L Picloram, 30 g/L sacarosa, 300 mg/L Caseína, 200 mg/L Cisteína y 600 mg/L Prolina gelificado con 5.4 g/L Gelzán® después de ajustar el pH a 5.7. La esterilización se realizó por 30 min a 121°C en la autoclave. Para la selección de los callos embriogénicos, se utilizó un estereoscopio con el que los segmentos de callos que mostraron células elongadas con apariencia refulgente a la luz (propias de callos embriogénicos de pilón) fueron seleccionados y transferidos a un medio de proliferación fresco.



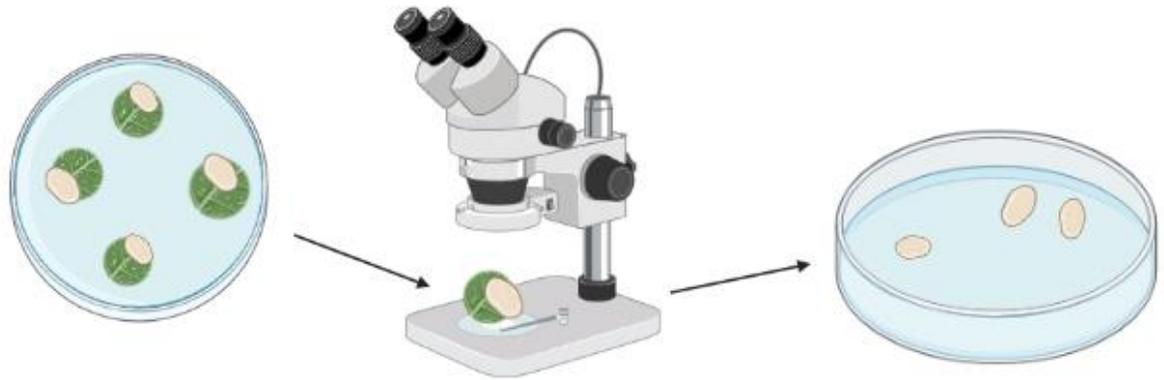


Figura 18. Esquemática del proceso de obtención del material vegetal, desde su etapa de invernadero, cultivo in vitro, inducción de calogénesis y obtención de callos embriogénicos de *H. alchorneoides*. Creado con BioRender.com.

### 3.2 Encapsulado de los callos

Los callos previamente identificados como embriogénicos fueron seccionados en trozos de aproximadamente dos milímetros. Estos fueron sumergidos en el medio de cultivo de proliferación líquido, descrito anteriormente, preparado con solución madre de macroelementos sin calcio, complementado con 3% (m/v) de alginato de sodio. Utilizando un gotero estéril, se succionó una gota del medio líquido que contenía un segmento de callo embriogénico y esa gota fue transferida al medio de cultivo de proliferación complementado con 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . La polimerización se llevó a cabo por 20 minutos en el medio de calcio para una formación adecuada de la cápsula. Transcurrido este tiempo, las cápsulas fueron trasladadas a una placa *Petri* con papel toalla estéril para eliminar el exceso de humedad.

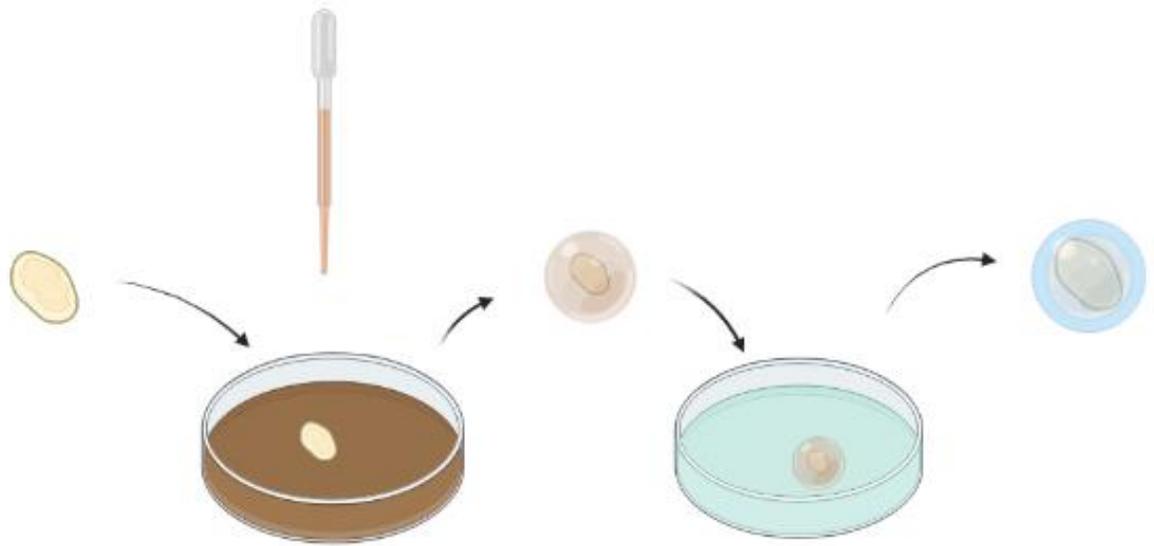


Figura 19. Esquematación del proceso de encapsulamiento de los callos embriogénicos de *H. alchorneoides*.

#### Precultivo de los callos encapsulados

Cinco cápsulas de alginato previamente formadas se colocaron en crioviales de 2 mL. En cada uno de los crioviales fueron añadidos 2 mL de soluciones de precultivo, que consistieron en medio de cultivo de proliferación descrito anteriormente, complementado con diferentes tratamientos correspondientes a 0,09 M de Sacarosa; 0,2 M de Sacarosa y 0,4 M Sacarosa; 0,2 M de Sorbitol y 0,4 M Sorbitol y un tratamiento con 0,2M sorbitol + 0,2M sacarosa. En esas condiciones, las cápsulas fueron incubadas en oscuridad por 24 horas en cada tratamiento. Para este experimento, se utilizaron 30 unidades experimentales por tratamiento, cada unidad experimental fue constituida por una cápsula, y esas unidades experimentales se dividieron en seis repeticiones con cinco cápsulas cada una. La sobrevivencia de los callos embriogénicos a los tratamientos descritos fue evaluada con una solución 1% (m/v) de cloruro de tetrazolio (TTC), mediante la conversión de ese reactivo a trifeníl formazán que es de color rojizo, ante la presencia de actividad metabólica.

#### Vitrificación de las cápsulas

Una vez transcurridas las 24 horas de precultivo, las soluciones fueron retiradas de los crioviales con ayuda de un gotero estéril. Posteriormente, la solución de carga compuesta por sales MS, complementado con 2.0 M de glicerol y 0.6 M sacarosa fue agregada a los crioviales y las muestras fueron incubadas en esta solución por 20 minutos. Después de ese periodo, se descartó la solución de carga utilizando un gotero estéril y se procedió a añadir

la solución vitrificadora PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) que consistió en el medio de cultivo MS complementado con 30% (m/v) glicerol, 15% (m/v) Dimetilsulfoxido, 15% (m/v) Etilenglicol, 0,09M sacarosa y un pH de 5.8 a los crioviales. En esta solución, los explantes fueron incubados por 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos; lo que corresponde a los cuatro tiempos de tratamiento de vitrificación evaluados.

Una vez completado el tiempo de incubación en la PVS2, los crioviales fueron colocados en cánulas de aluminio y fueron congelados por inmersión en nitrógeno líquido, por un periodo de al menos 60 minutos. Las cánulas fueron recuperadas del nitrógeno líquido y los crioviales fueron colocados en un beaker con agua a 80 °C por 20 segundos, con el fin de descongelar las muestras. La PVS2 fue retirada y se realizaron tres lavados de dos minutos cada uno con la solución de lavado compuesta por sales MS complementadas con 2.0 M de Sacarosa. La sobrevivencia ante este tratamiento fue evaluada empleando una solución de 1% (m/v) de TTC, donde fueron sumergidos los callos embriogénicos encapsulados y los tejidos vivos evidenciaron una coloración rojiza.

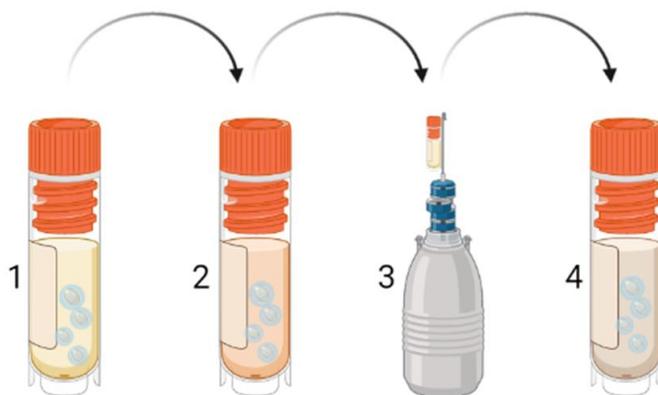


Figura 20. Esquematización del proceso de precultivo, vitrificación y criopreservación de los callos embriogénicos de *H. alchorneoides*.

#### Evaluación de los tratamientos

##### Sobrevivencia

Las cápsulas fueron inoculadas, en grupos de cinco, en placas Petri con medio de proliferación semisólida. La supervivencia del tejido fue evaluada utilizando la solución 1% (m/v) TTC, mediante la reacción de ese reactivo a trifeníl formazán que es de color rojizo y observando la aparición de oxidación en los callos embriogénicos encapsulados después de cada tratamiento. En todas las etapas del proceso de criopreservación, tanto la viabilidad como la oxidación fueron evaluadas en un diseño factorial 3x4x2 (Factor 1=Precultivo 24 horas, niveles: 0.2 M Sacarosa, 0.2 M Sorbitol y 0.09 M Sacarosa; Factor 2= Vitrificación,

niveles: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos Y Factor 3= Crioconservación= Expuesto a Nitrógeno líquido y no expuesto a Nitrógeno líquido). El análisis de esas variables de respuesta se realizó mediante regresión binomial, utilizando una función de enlace logit, con una significancia menor a 0.05. Las medias de cada tratamiento fueron comparadas mediante una prueba de Tukey.

#### Evaluación de la integridad de la membrana

Esta metodología se basó en el análisis de integridad de la membrana celular en las muestras crioconservadas empleado por Pérez *et al* (2017). Para esto se llenaron tubos cónicos de 15 ml con agua destilada y en esas muestras se determinó la conductividad del agua, posteriormente, se agregaron las cápsulas crioconservadas con cada uno de los tratamientos y se realizó la medición de la conductividad inicial ( $C_{inicial}$ ). Las muestras fueron incubadas por 24 horas en tubos cónicos a temperatura ambiente y se realizó nuevamente la medición para obtener la conductividad final ( $C_{final}$ ) de las muestras. Finalmente, las cápsulas fueron colocadas en la autoclave a  $121 \pm 2^\circ\text{C}$  por 30 minutos para liberar el contenido total de electrolitos en la muestra y realizar la medición de conductividad total ( $C_{total}$ ). La pérdida de electrolitos fue calculada empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de electrolitos (\%)} = (C_{final} - C_{inicial}) / (C_{total} - C_{inicial}) * 100$$

#### Análisis de metilación de ADN en los tejidos crioconservados

El análisis de la metilación de ADN fue basado en el método MSAP (*Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism*), y consistió en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción producidos por isoesquizómeros con sensibilidad diferencial a la metilación en la citosina del tetranucleótido 5'-CCGG-3'. Callos embriogénicos, callos precultivados en 0,2M sacarosa por 24h, callos precultivados por 24 h y vitrificados con la PVS2 por 15 min, y los tratamientos crioconservados de los dos últimos, fueron utilizados para la evaluación de la metilación global. Los callos en recuperación fueron macerados y liofilizados y almacenados a  $-20^\circ\text{C}$  antes de la extracción de ADN.

#### Extracción de ADN

50 mg de tejido liofilizado de cada estadio de recuperación fueron colocados en un microtubo Eppendorf® con 750  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción (20 mM Na-EDTA y 100 mM Tris-HCl, pH ajustado a 8 con HCl, 1,4 M NaCl, 2 % (m/v) CTAB, 2% (m/v) PVP y 0,2 % (v/v) beta-mercaptoetanol). Las muestras fueron agitadas en vórtex e incubadas a  $65^\circ\text{C}$  por 20 min. Después, 750  $\mu\text{l}$  de cloroformo:octanol (24:1) fueron agregados y los microtubos se agitaron suavemente invirtiéndolos 20 veces. La mezcla fue centrifugada a 13000 rpm por 5 min y 300  $\mu\text{l}$  de la fase acuosa fueron transferidos a un microtubo nuevo. 300  $\mu\text{l}$  de isopropanol enfriado a  $-20^\circ\text{C}$  fueron agregados y los microtubos fueron incubados a temperatura ambiente por 5 min. Después, los tubos fueron centrifugados nuevamente a 13000 rpm por 5 min y el

sobrenadante se descartó. 500 µl de etanol al 70% (v/v) enfriado a -20 C fueron agregados y las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 13000 rpm por 2 min y el sobrenadante se descartó. Los pellets de ADN fueron secados a 42 C por 15 min y resuspendidos en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH ajustado a 8, 1 mM EDTA con RNAasa a una concentración final de 0,1 mg/ml) e incubados a 37 C por 30 min.

La concentración final de ADN de cada muestra fue medida con un espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop (Thermo Scientific ®) utilizando 1 µl de cada muestra, calibrando el blanco con 1 µl de buffer TE. La concentración final de ADN fue ajustada a 100 ng/µl utilizando agua libre de nucleasas. Para la determinación de la concentración de ADN se utilizó la ecuación de Beer-Lambert modificada (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del equipo UV/VIS NanoDrop) con un coeficiente de extinción dependiente de la longitud de onda de la absorbancia en cada muestra:

$$c = (A * \epsilon) / b$$

Con: c = la concentración de ADN en ng/µl

A = la absorbancia registrada por el espectrofotómetro

$\epsilon$  = 50 ng\*cm/µl que corresponde al coeficiente de extinción dependiente de la longitud de onda de la absorbancia de la muestra

b = la longitud recorrida por la luz en la muestra en cm

Analisis de la metilación global de ADN utilizando MSAP

Para este ensayo fueron utilizadas la enzima EcoRI y los isoesquizómeros específicos para “CCGG”, MspI y HpaII. Cuando el CpG interno en el tetranucleótido 5'-CCGG-3' está metilado, la digestión con HpaII fue bloqueada, pero con MspI no fue afectada. El ADN extraído de los tejidos en cada estadio de recuperación fue digerido con las combinaciones de enzimas EcoRI+MspI y EcoRI+HpaII en un volumen final de 20 µl. La concentración final de los componentes de la digestión fue de 2X buffer de digestión Tango (Fermentas ®), 1X buffer ADN ligasa T4, 50 mM NaCl, 0,05 mg/ml BSA, 5 U de ADN ligasa T4 (Fermentas ®), 5 U EcoRI y 0,250 µM adaptador EcoRI, y 5 U MspI y 2,5 µM adaptador MspI o 5 U HpaII y 0,25 µM adaptador HpaII. El ADN fue agregado a una concentración final de aproximadamente 500 ng. La digestión fue llevada a cabo por 2,5 h a 37 C en el termociclador Veriti (Applied Biosystem™). Después, las enzimas fueron desactivadas a 80 C por 20 min. Los productos de la digestión fueron diluidos con 60 µl de buffer TE.

La amplificación preselectiva fue preparada en un volumen final de 50 µl con una concentración final de 1X buffer para PCR DreamTaq (Fermentas ®), 0,2 mM dNTPs, 0,2 mg/ml BSA, 0,2 µM primer preselectivo EcoRI, 0,2 µM primer preselectivo MspI o HpaII, 1 U Taq polimerasa (Fermentas ®) y 5 µl del producto de la ligación-restricción diluido.

El termociclador fue programado de la siguiente manera: un paso a 72 C por 2 min, 20 ciclos a 94 C por 30 s, 56 C por 1 min, 72 C por 1 min y un paso final a 60 C por 15 min. La amplificación fue confirmada por la electroforesis de 10 µl de cada muestra en un gel de agarosa 1,5 % (m/v) a 50V constante por 90 min y un barrido de bandas en el rango de 100 a 1500 pb fue observado.

Una vez confirmada la amplificación, 10 µl del producto de PCR serán diluidos en 90 µl de agua libre de nucleasas (dilución 1/10). La amplificación selectiva fue preparada en un volumen final de 25 µl con una concentración final de 1X de buffer para PCR DreamTaq (Fermentas ®), 0,2 mM dNTPs, 0,2 mg/ml BSA, 0,05 µM primer selectivo EcoRI, 0,250 µM primer selectivo MspI o HpaII, 1 U Taq Polimerasa (Fermentas ®) y 5 µl del producto de la amplificación preselectiva diluido. La secuencia de los imprimadores selectivos que se utilizaron se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Secuencias de los imprimadores utilizados para la detección de fragmentos de AND metilados en callos embriogénicos y embriones somáticos de *Hyeronima alchorneoides* crioconservados en nitrógeno líquido.

| Imprimadores | Secuencia de nucleótidos     |
|--------------|------------------------------|
| Eco_AGA      | 6-FAM<br>GACTGCGTACCAATTCAGA |
| Eco_ACC      | VIC-GACTGCGTACCAATTCACC      |
| Eco_AAC      | NED-GACTGCGTACCAATTCAAC      |
| Eco_AAG      | PET-GACTGCGTACCAATTCAAG      |
| HM_ATG       | ATCATGAGTCCTGCTCGGATG        |
| HM_ATT       | ATCATGAGTCCTGCTCGGATT        |
| HM_AAC       | ATCATGAGTCCTGCTCGGAAC        |
| HM_AAG       | ATCATGAGTCCTGCTCGGAAG        |

El perfil térmico para la amplificación será el siguiente: un paso a 94 C por 60 s, un ciclo de 94 C por 30 s, 65 C por 30 s, 72 C por 60 s, en cada uno de los 12 ciclos subsecuentes la temperatura de alineamiento será reducida 0,7 °C (touchdown PCR), 20 ciclos a 94 °C por 30 s, 56 °C por 20 s, 72 °C por 1 min, y un paso final de 60 °C por 20 min.

Los imprimadores complementarios al sitio de restricción de EcoRI fueron etiquetados con fluorocromo para su detección utilizando electroforesis capilar. Los productos de la amplificación fueron visualizados en un analizador genético ABI PRISM ® 3130xl (Applied Biosystems ®), utilizando LIZ500 como estándar interno de tamaño. La presencia o ausencia de fragmentos amplificados será observada utilizando el programa GeneMapper 4.0.

#### Análisis de la proporción global de ADN metilado

Los datos fueron organizados en una matriz binaria (1/0) indicando la presencia o ausencia de fragmentos cortados con EcoRI-HpaII y EcoRI-MspI. La matriz de datos fue analizada con el paquete *msap* de R, de acuerdo con las indicaciones de Pérez-Figueroa (2013), para determinar los cambios en el estatus de metilación completa del ADN, cuando ni MspI ni HpaII puede digerir el sitio CCGG. La proporción de ADN metilado fue utilizada como un indicador de actividad metabólica.

### Resultados

En este estudio se analizó la supervivencia de los callos embriogénicos encapsulados en alginato ante los distintos tratamientos de precultivo, el tiempo sometido al mismo y la exposición a Nitrógeno líquido (de manera independiente por cada factor y la interacción entre los tres). En cuanto a la exposición a Nitrógeno Líquido (Figura 21) se obtuvo una sobrevivencia de un 52% en el grupo +NL y un 50% en el grupo de -NL, y no se notaron diferencias significativas entre ambos tratamientos.

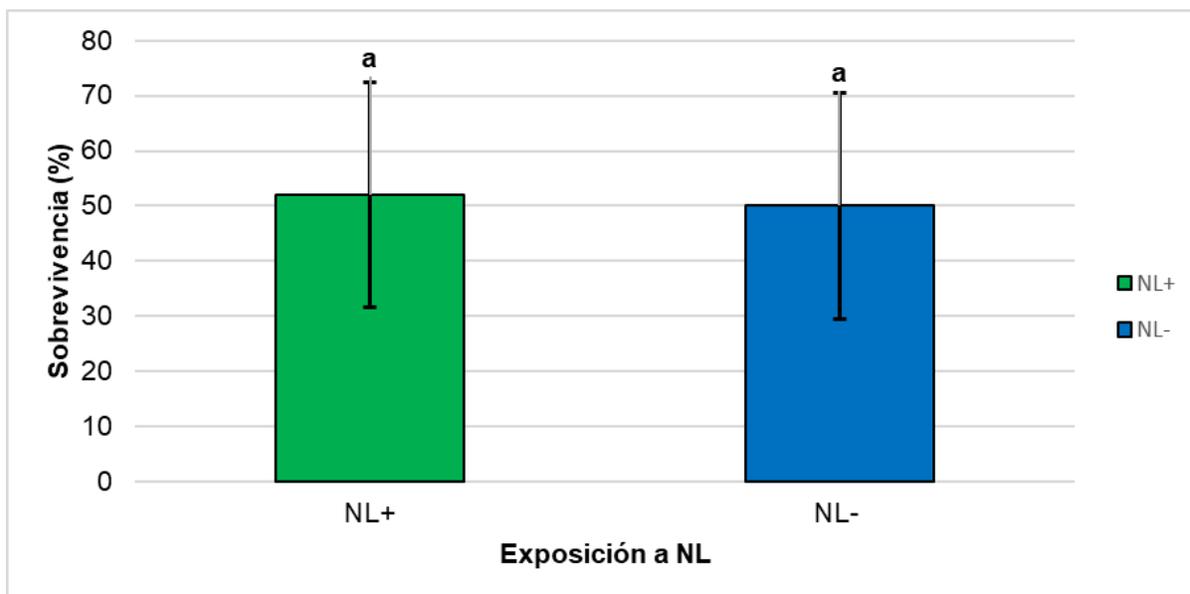


Figura 21. Porcentajes de sobrevivencia de los callos de *Hyeronima alchorneoides* encapsulados ante la exposición al nitrógeno líquido. La altura de las barras indica la media

de la sobrevivencia y las barras de error indican el margen de incertidumbre presente. Las mismas letras presentes en cada barra indican la no existencia de diferencias significativas después de realizar el análisis de Tukey con una significancia  $<0.05$

Para los tratamientos de precultivo los porcentajes de sobrevivencia obtenidos fueron de 55.2% para el tratamiento de 0.2 M sacarosa; 53,9% para el grupo de 0,2 M sorbitol y de 43.6% para el precultivo con 0.09 M de sacarosa (Figura 22). Se observó una relación inversamente proporcional entre la concentración de sacarosa y la sobrevivencia.

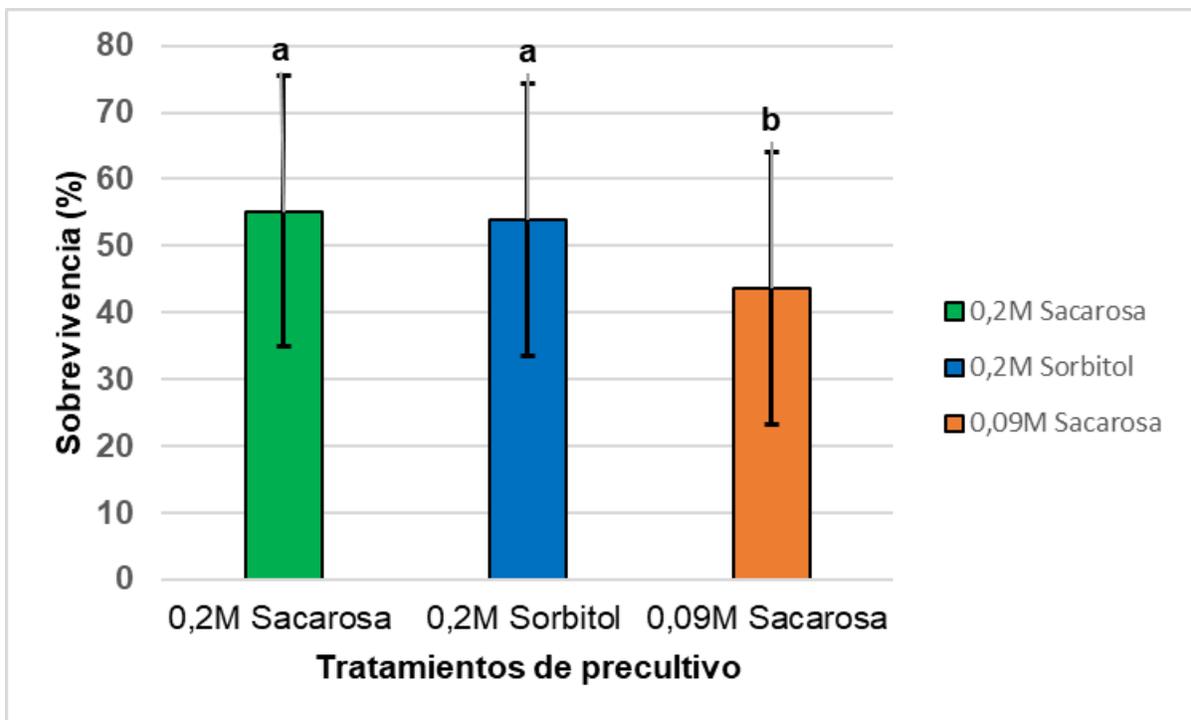


Figura 22. Porcentajes de sobrevivencia de los callos de *Hyeronima alchorneoides* encapsulados ante las diferentes soluciones de precultivo. La altura de las barras indica la media de la sobrevivencia y las barras de error indican el margen de incertidumbre presente. Las mismas letras presentes en cada barra indican la no existencia de diferencias significativas después de realizar el análisis de Tukey con una significancia  $<0.05$

En cuanto al tiempo de incubación en PVS2, la sobrevivencia que obtuvieron los grupos fue de 64,2% para los 0 minutos; 54,3% para los 30 minutos; de 49% para los 15 minutos y de 37,5% para los 60 minutos (Figura 23). Posteriormente, se analizaron y compararon las interacciones entre los factores mencionados (inmersión en nitrógeno líquido, concentración de agente osmótico y el tiempo de incubación en PVS2) obteniendo la interacción entre los tres factores, valores que evidencian su influencia significativa sobre la sobrevivencia de las unidades experimentales. Con respecto al tiempo en la PVS2, se observó una relación inversamente proporcional entre el tiempo de incubación y la sobrevivencia (Figura 23). Las

diferencias significativas se encontraron entre los tratamientos 0 min y 60 min de incubación, de acuerdo con la comparación de medias de Tukey (Figura 23).

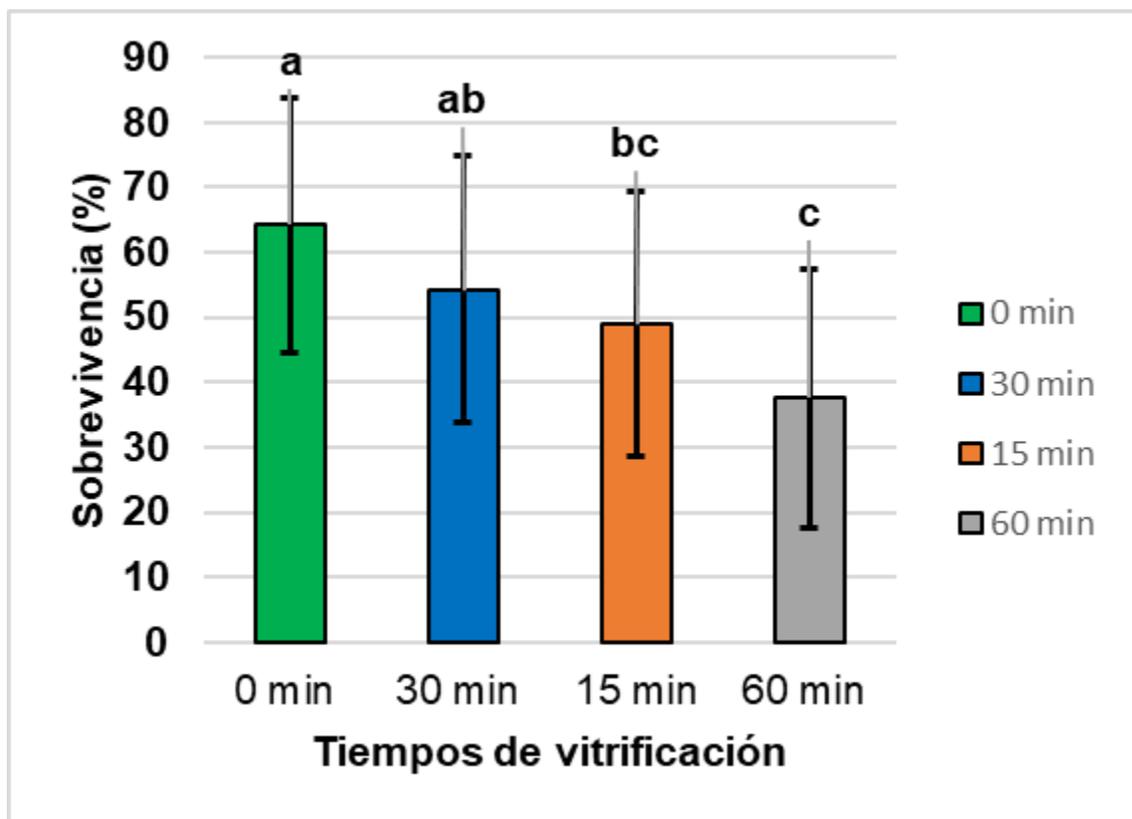


Figura 23. Porcentajes de sobrevivencia de los callos de *Hyeronima alchorneoides* encapsulados ante distintos tiempos de incubación en PVS2. La altura de las barras indica la media de la sobrevivencia y las barras de error indican el margen de incertidumbre presente. Las mismas letras presentes en cada barra indican la no existencia de diferencias significativas después de realizar el análisis de Tukey con una significancia  $<0.05$

La prueba de daño a la membrana celular dio como resultado porcentajes de pérdida de electrolitos que se describen en la Figura 24. Los tratamientos de 0,2M Sacarosa presentaron un porcentaje de pérdida de electrolitos de 11,3% al ser incubadas por 0 minutos en PVS2; con 15 minutos de incubación en PVS2 dio como resultado 12,1% de pérdida de electrolitos; con 30 minutos de incubación el porcentaje fue de 35,8% y con 60 minutos de incubación en PVS2 el porcentaje de pérdida de electrolitos fue de 76,1% (Figura 24). Para los tratamientos de 0,2M de Sorbitol los porcentajes de pérdida de electrolitos fueron de 15,4% para las cápsulas incubadas 0 minutos en PVS2; de 17,2% para las que fueron incubadas por 15 minutos; de 32% para las que fueron incubadas por 30 minutos y de 47,1% para las que fueron incubadas por 60 minutos (Figura 24). En cuanto al tratamiento de 0,09M de Sacarosa la pérdida fue de 7,5% las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; de 31,7% para las que fueron incubadas por 15 minutos, de 44,8% para las que fueron incubadas por 30 minutos y

de 48,4% para las que fueron incubadas por 60 minutos (Figura 4). Para todos los tratamientos de precultivo, se observó una relación directamente proporcional entre la pérdida de electrolitos y el periodo de incubación en la PVS2 cuando los tejidos fueron crioconservados (Figura 24).

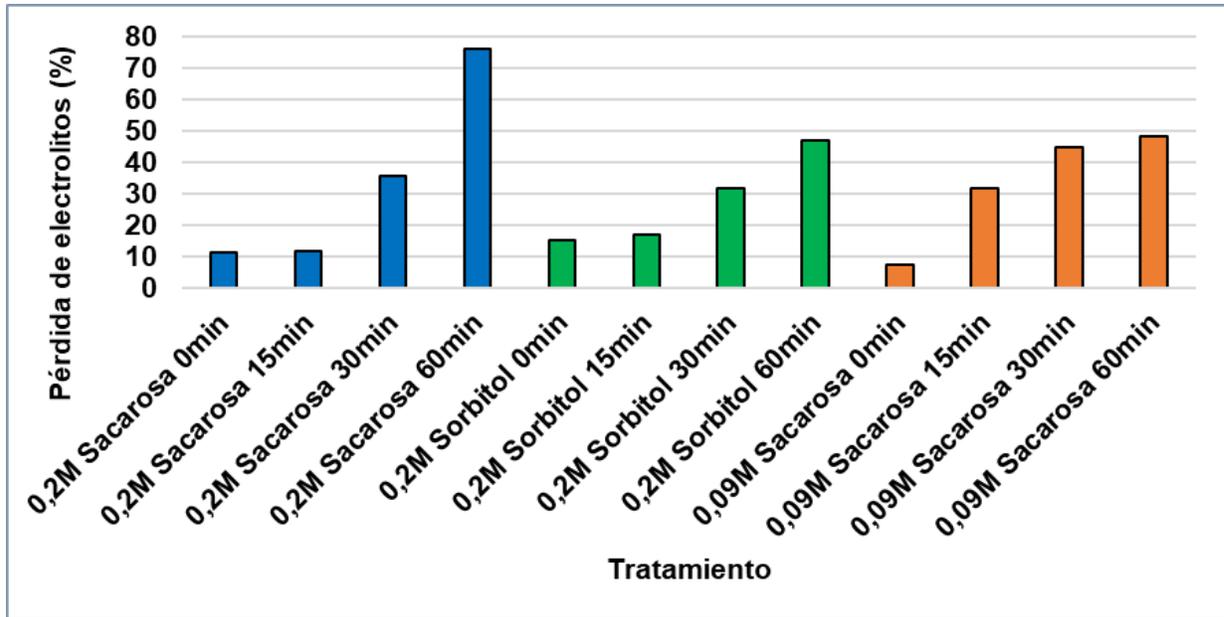


Figura 24. Porcentaje de pérdida de electrolitos de los diversos tratamientos al ser expuestos a Nitrógeno líquido. La altura de las barras representa el porcentaje de pérdida de electrolitos que sufren los callos encapsulados de *Hyeronima alchorneoides*. Las barras de color azul corresponden a las cápsulas tratadas con 0,2M de sacarosa; las barras de color verde corresponden a las cápsulas tratadas con 0,2M sorbitol y las barras de color naranja corresponden a las cápsulas tratadas con 0,09M de sacarosa.

En cuanto a los tratamientos que no fueron expuestos a la conservación en Nitrógeno Líquido (Figura 25A) las cápsulas con el precultivo de 0,2M de sacarosa obtuvieron una sobrevivencia de 55,6% para las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; 47,2% para las incubadas por 15 minutos en PVS2; 72,2% para las incubadas por 30 minutos y de 66,7% para las que fueron incubadas por 60 minutos en PVS2 (Figura 25A). Las cápsulas con el precultivo de 0,2M de Sorbitol obtuvieron una sobrevivencia de 77,8% para las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; 25% para las incubadas por 15 minutos en PVS2; 52,8% para las incubadas por 30 minutos y de 33,3% para las que fueron incubadas por 60 minutos en PVS2 (Figura 25A). En cuanto al precultivo de 0,09M de Sacarosa se obtuvieron sobrevivencias de 43,3% para las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; 26,7% para las incubadas por 15 minutos en PVS2; 30% para las incubadas por 30 minutos y de 61,1% para las que fueron incubadas por 60 minutos en PVS2.

Los tratamientos que fueron expuestos a la conservación en nitrógeno líquido las cápsulas con el precultivo de 0,2M de sacarosa obtuvieron una sobrevivencia de 83,3% para las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; 52,8% para las incubadas por 15 minutos en PVS2; 52,8% para las incubadas por 30 minutos y de 11,1% para las que fueron incubadas por 60 minutos en PVS2 (Figura 25B). Las cápsulas con el precultivo de 0,2M de Sorbitol obtuvieron una sobrevivencia de 73,3% para las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; 80,6% para las incubadas por 15 minutos en PVS2; 50% para las incubadas por 30 minutos y de 41,2% para las que fueron incubadas por 60 minutos en PVS2 (Figura 25B). En cuanto al precultivo de 0,09M de Sacarosa se obtuvieron sobrevivencias de 50% para las cápsulas incubadas por 0 minutos en PVS2; 60% para las incubadas por 15 minutos en PVS2; 63,9% para las incubadas por 30 minutos y de 11,1% para las que fueron incubadas por 60 minutos en PVS2.

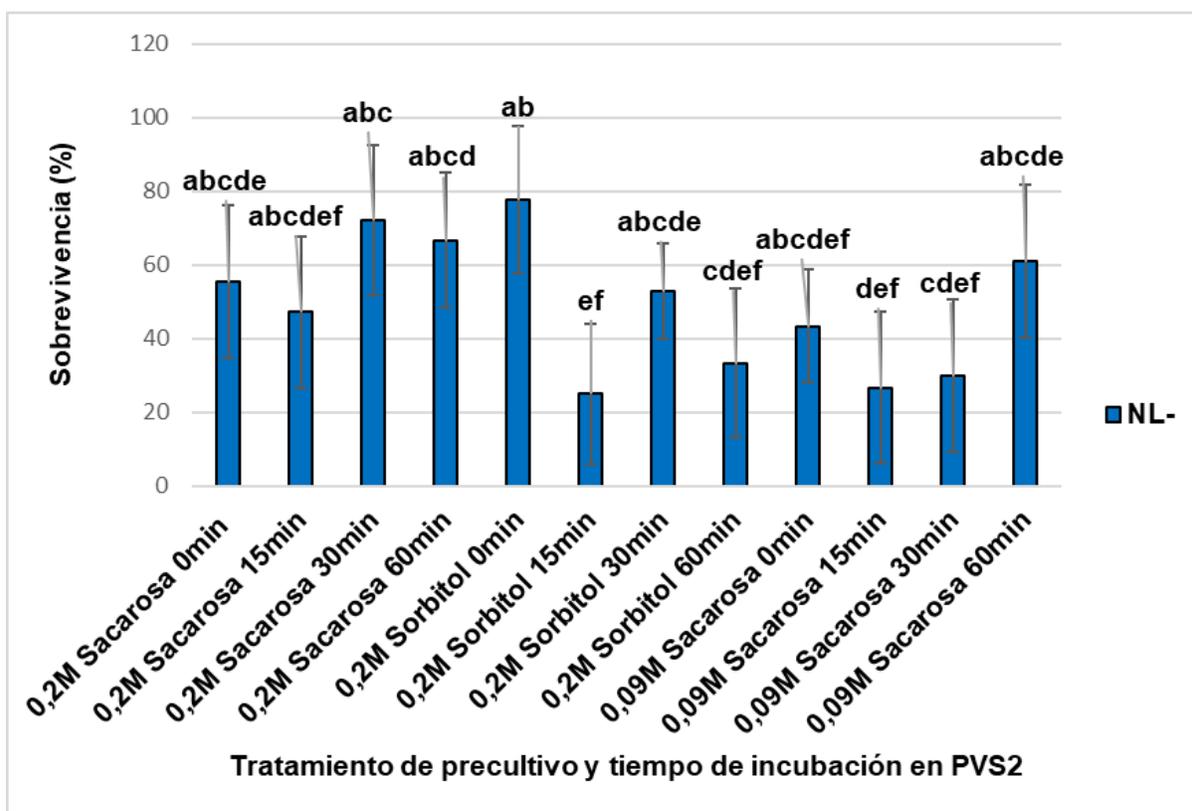


Figura 25A. Porcentajes de sobrevivencia de los callos encapsulados de *Hyeronima alchorneoides* producto de la interacción entre los tratamientos de precultivo y tiempo de incubación en PVS2 sin exposición a nitrógeno líquido. La altura de las barras indica la media de la sobrevivencia y las barras de error indican el margen de incertidumbre presente. Las mismas letras presentes en cada barra indican la no existencia de diferencias significativas después de realizar el análisis de Tukey con una significancia <0.05.

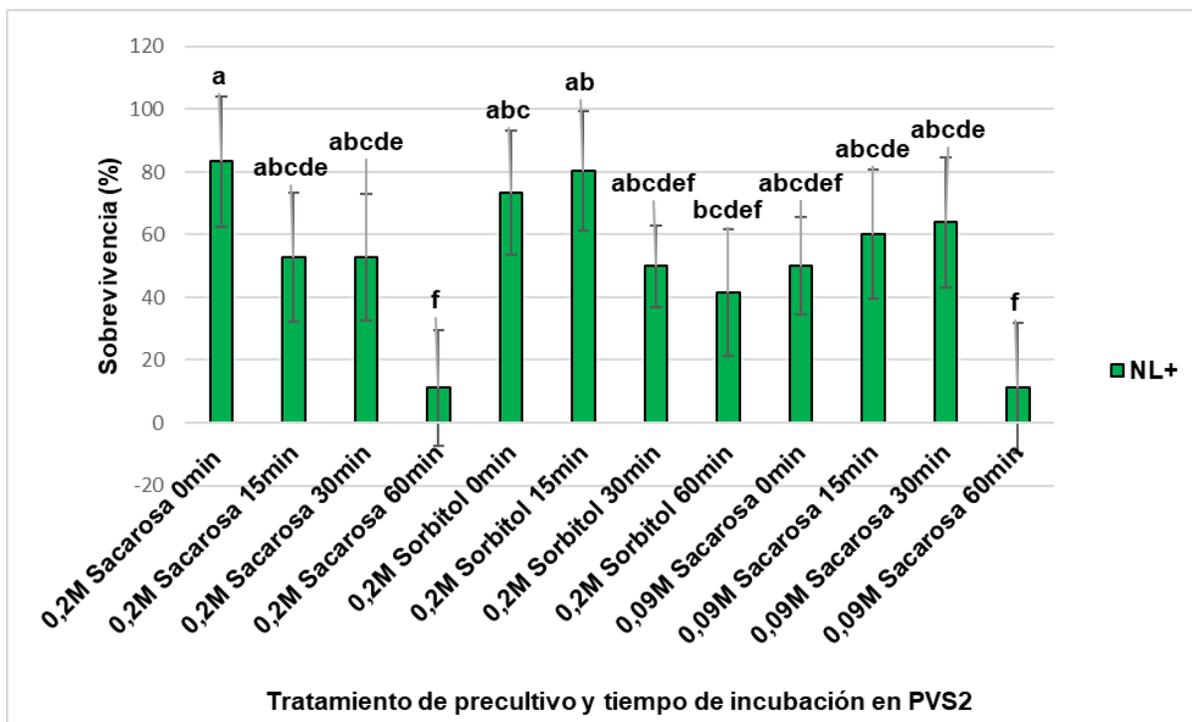


Figura 25B. Porcentajes de sobrevivencia de los callos encapsulados de *Hyeronima alchorneoides* producto de la interacción entre los tratamientos de precultivo y tiempo de incubación en PVS2 con exposición a nitrógeno líquido. La altura de las barras indica la media de la sobrevivencia y las barras de error indican el margen de incertidumbre presente. Las mismas letras presentes en cada barra indican la no existencia de diferencias significativas después de realizar el análisis de Tukey con una significancia  $<0.05$ .

Cuando se evaluó el efecto de la criopreservación en la metilación del ADN se encontró que los tratamientos de criopreservación evaluados cambiaron los patrones de metilación completa de ADN (Cuadro 5). Se observó los menores porcentajes de metilación fueron obtenidos en los tratamientos de precultivo, y precultivo seguido de vitrificación por 15 min (Cuadro 5). Se determinó que el congelamiento en nitrógeno líquido por 1 h produjo mayores porcentajes de metilación, indistinto del tratamiento aplicado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Respuesta de los tejidos de *H. alchorneoides* crioconservados a la metilación de ADN. La evaluación fue realizada una vez concluido el congelamiento en nitrógeno líquido por 1 h.

| <b>Tratamiento de criopreservación</b>  | <b>Metilación completa (%)</b> |
|---|--------------------------------|
| Callo embriogénico  | 88                             |
| Callo embriogénico precultivado en 0,2M sacarosa por 24 h   | 76                             |
| Callo embriogénico precultivado en 0,2M sacarosa por 24 h y vitrificado por 15 min                          | 81                             |
| Callo embriogénico precultivado en 0,2M sacarosa por 24 h y congelado en NL por 1 h                         | 93                             |
| Callo embriogénico precultivado en 0,2M sacarosa por 24 h, vitrificado por 15 min y congelado en NL por 1 h | 94                             |

### **Discusión y conclusiones**

El principal interés en el desarrollo de protocolos para la criopreservación de distintos tejidos es la sobrevivencia del material conservado (Oseni, Pande & Nailwal, 2018). Muchos estudios de criopreservación se basan en aumentar la sobrevivencia, que se relaciona de forma directa con la formación de hielo intra o extracelular (Chang & Tsao, 2021). Para esto, los tejidos congelados deben almacenarse con bajos porcentajes de humedad como mecanismo de protección del frío, así como mediante la incubación en sustancias crioprotectoras como la sacarosa, DMSO, glicerol, etilenglicol, sorbitol, manitol, fructosa, algunos aminoácidos como la prolina, entre otros (Pi, Yu, Petersen & Hubel, 2018).

A la hora de analizar cada uno de los factores de manera independiente, se pueden ver ciertas diferencias en la influencia que tienen sobre la sobrevivencia del material encapsulado. En el caso del tratamiento de precultivo empleado, se puede apreciar que el porcentaje de sobrevivencia es mayor cuando se realiza con las soluciones de 0,2M Sacarosa y 0,2M Sorbitol. En cuanto al tratamiento con la solución de 0,09M de Sacarosa, tiene como producto un porcentaje más bajo de sobrevivencia. Resultados similares a los observados, se han presentado en otras investigaciones en especies forestales como *Betula platyphylla* (Endoh, Hanaoka, Matsushita, Ubukata & Yamada, 2022), *Pinus koraiensis* (Peng, Gao, Wang, Shen & Yang, 2021) y *Cupressus sempervirens* (Lambardi, Ozudogru, Barberini & Danti, 2018); donde se encontraron relaciones entre la sobrevivencia y el periodo de incubación, comparables a los obtenidos en el presente estudio. De acuerdo con Cañizares-Rodríguez

(2019), el tipo de tratamiento de precultivo afecta la respuesta que las cápsulas tienen ante la vitrificación, al ser la actividad osmótica de las soluciones de precultivo clave para preparar a los callos encapsulados, para tolerar de mejor manera el choque osmótico que representa la exposición a la PVS2. En este sentido, es de esperar que las soluciones con una mayor actividad osmótica desarrollen mejores porcentajes de sobrevivencia, como evidencian los resultados.

En cuanto al tiempo de incubación en la PVS2, este constituye uno de los componentes clave y más importantes en los protocolos de vitrificación y criopreservación, debido a los agentes crioprotectores que lo componen (Romadanova, Kushnarenko y Karasholakova, 2017). Estos agentes protectores son, al mismo tiempo, los componentes que comprometen la sobrevivencia de los tejidos a la exposición a la PVS2 debido a su citotoxicidad, como lo hacen notar Sulong, Shahabudin y Noor (2018); los autores explican la influencia del tiempo de incubación en la solución vitrificadora, periodos de incubación muy reducidos no son suficientes para alcanzar la tolerancia de las células a la criopreservación, sin embargo, tiempos muy prolongados permitirían que los compuestos citotóxicos propios de la PVS2 ejerzan efectos excesivamente intensos y aumentan su mortalidad. En el caso de las cápsulas de callos embriogénicos de *H. alchorneoides* se observa, que la mayor sobrevivencia se obtuvo con una incubación de 0 min y de 15 min, en concordancia con lo anteriormente descrito. Siguiendo el mismo principio, la mortalidad aumentó para los tiempos de incubación de 30 min y 60 min.

Tirado-Pérez y Sandoval-Cancino (2022) describen a la sobrevivencia ante la exposición a Nitrógeno Líquido, como uno de los factores clave en el éxito de los protocolos de criopreservación y a su vez como uno de los más retadores. El principal propósito de los protocolos de criopreservación, es justamente el aumentar la sobrevivencia de los tejidos ante la exposición al nitrógeno líquido, mediante el uso de agentes osmóticos como el sorbitol y la sacarosa y crioprotectores como el glicerol, el etilenglicol y el dimetilsulfóxido (Pereira *et al*, 2021). Estos métodos buscan reducir los daños causados por la exposición a bajas temperaturas, como los daños causados a la membrana y pared celular por la cristalización del agua (Madrigal Valverde *et al*, 2020). En el caso de este estudio, la sobrevivencia ante el nitrógeno líquido fue similar a la que se obtuvo en las cápsulas que no fueron expuestas al nitrógeno líquido (52,1% y 50,5% respectivamente) lo cual indica la efectividad de los tratamientos para evitar la mortalidad causada por las temperaturas criogénicas.

Diversos estudios como el de Villalobos *et al* (2019) establecen que la prueba de pérdida de electrolitos es utilizada para analizar la integridad de la pared celular luego de los tratamientos de criopreservación. La exposición a nitrógeno líquido produce la cristalización del agua contenida dentro de las células de los tejidos vegetales, lo cual produce a su vez daños irremediables en la pared celular, conduciendo a necrosis, oxidación y muerte de los tejidos preservados (Acosta *et al*, 2020). El objetivo de los protocolos de vitrificación es reducir el daño celular que pueda generar la cristalización del agua provocada por el

nitrógeno líquido y preparar los tejidos para que conserven su viabilidad; es por esto que el análisis del daño producido a la pared celular, es un indicativo de la eficiencia de los distintos tratamientos para conservar la viabilidad de los tejidos y cumplir a cabalidad el objetivo de la criopreservación (Huang *et al*, 2018). En el caso del presente estudio, se observó que los tejidos tienden a tener una mayor pérdida de electrolitos y consecuentemente un daño celular proporcionalmente mayor al aumentar el tiempo en que son incubados en PVS2, independientemente de la concentración del precultivo y agente osmótico empleado. No obstante, es posible notar una mayor pérdida al ser usado el precultivo de 0,2M sorbitol comparado con las dos concentraciones de sacarosa, indicando una mejor conservación de la viabilidad con el precultivo de sacarosa.

Al ser necesario para los protocolos de vitrificación tomar en consideración varios factores, la elección de tratamientos ideales varía de acuerdo a la especie que se desee conservar (Bi, Hao, Cui, Volk y Wang, 2018). En este caso, para las cápsulas de callos embriogénicos de *H. alchorneoides*, se debe tomar en consideración la interacción producida entre los factores evaluados (tratamiento de precultivo y tiempo de incubación en PVS2) que resultó en la mayor sobrevivencia al ser expuestos a nitrógeno líquido, pues este es el principal objetivo (Pathirana, Mathew y McLachlan, 2021). Al tomar esto en consideración se determinó que los tratamientos de 0,2M Sacarosa 0 minutos de incubación; 0,2M Sacarosa 15 minutos en PVS2; 0,2M Sacarosa 30 minutos en PVS2; 0,2M Sorbitol 0 minutos en PVS2; 0,2M Sorbitol 15 minutos en PVS2; 0,2M Sorbitol 30 minutos en PVS2; 0,09M Sacarosa 0 minutos en PVS2 y 0,09M Sacarosa 15 minutos en PVS2; 0,09M Sacarosa 30 minutos en PVS2 constituyen el grupo que obtiene las mejores tasas de sobrevivencia. El tratamiento con 0,2M Sacarosa de precultivo y 0 minutos de incubación en PVS2 es el que produce un mayor porcentaje de sobrevivencia al ser expuestas a Nitrógeno líquido.

El presente estudio logró establecer un protocolo para la criopreservación de callos embriogénicos de *Hyeronima alchorneoides* por medio de encapsulamiento y vitrificación. Se pudo observar la influencia que ejercen los compuestos crioprotectores y el proceso de vitrificación en la sobrevivencia de los callos ante la inmersión en nitrógeno líquido. Adicionalmente, el TTC resultó ser un compuesto útil y eficaz para la determinación en la sobrevivencia de los callos encapsulados.

En cuanto al procedimiento para la criopreservación de callos embriogénicos de *H. alchorneoides* por medio de encapsulamiento y vitrificación, los parámetros que tienen como resultado la mayor tasa de sobrevivencia corresponde al uso del precultivo de 0,2M Sacarosa o 0,2M Sorbitol con un tiempo de incubación en PVS2 de entre 0 y 15 minutos; es por esto que un protocolo ideal debe contemplar estas condiciones con el fin de alcanzar el mayor porcentaje de sobrevivencia.

## **Ensayos de comparación de crecimiento de material *in vitro* y miniestacas enraizadas**

### **Metodología**

Vitroplantas en etapa de multiplicación fueron transferidas al medio de cultivo estándar MS semisólido complementado con 2 mg/l de AIB por aproximadamente 4 semanas. Una vez que las plantas contaban con un sistema radical vigoroso, fueron transportadas al invernadero del CIB y fueron aclimatadas en condiciones de alta humedad y luminosidad. Después, las plantas fueron sembradas individualmente en potes con tierra donde se mantuvieron por un periodo de seis meses y se comparó su crecimiento con plantas igualmente sembradas en potes pero provenientes de ensayos de enraizamiento de miniestacas. Se realizaron evaluaciones mensuales de crecimiento y sobrevivencia.

### **Resultados**

En el presente estudio se observaron diferencias en la sobrevivencia y el crecimiento de plantas desarrolladas a partir de material *in vitro* y miniestacas enraizadas de forma convencional (Figura 26). En cuanto al crecimiento, se observaron diferencias significativas en el tamaño de las plantas únicamente en los meses 3 y 4 de evaluación, mostrando mayor tamaño el material proveniente de estacas enraizadas (Figura 26A). En los dos meses iniciales las plantas mostraron un crecimiento muy similar, y a partir del mes 5, las plantas provenientes de miniestacas enraizadas mostraron un tamaño mayor con una diferencia de más de 10 cm (Figura 26A). Por su parte, la sobrevivencia fue la variable que presentó más diferencias, obteniéndose porcentajes de sobrevivencia menores en el material proveniente de vitroplantas desde el inicio del experimento (Figura 26B). La sobrevivencia de las vitroplantas mostró un descenso a aproximadamente la mitad en el mes 1, los meses 2, 3 y 4 presentaron un 40% de sobrevivencia y en los meses 5 y 6 la sobrevivencia cayó a un 33,3% (Figura 26B). Por otra parte, la sobrevivencia de las miniestacas enraizadas se mantuvo constante en 80% durante los primeros 3 meses, 66,7% en el mes 4 y bajó a 53,3% en los meses 5 y 6 (Figura 26B).

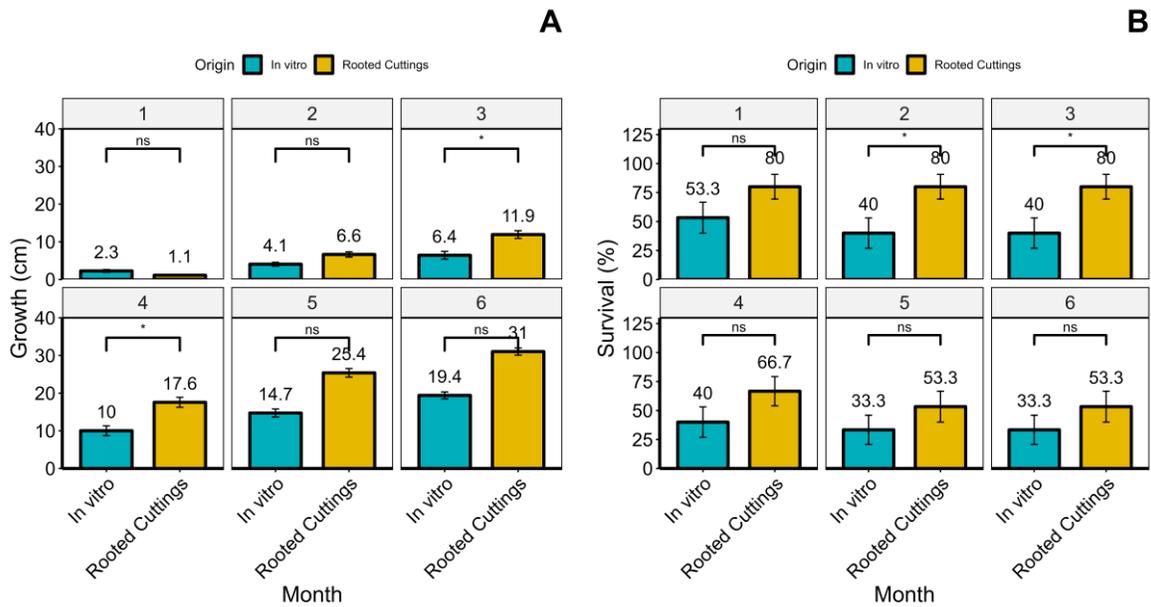


Figura 26. Comparación del crecimiento de plantas de *H. alchorneoides* en invernadero, provenientes de cultivo *in vitro* y miniestacas enraizadas convencionalmente. Gráficos: (A) Tamaño de las plantas, (B) Supervivencia de las plantas. Las evaluaciones fueron realizadas de forma mensual por 6 meses de crecimiento.

### Discusión y conclusiones

El éxito de la regeneración *ex vitro* de plantas está determinada por su capacidad para producir nuevos brotes que puedan adaptarse a nuevas condiciones de cultivo. Alta humedad relativa, control del crecimiento microbiano en el sustrato, temperatura de aclimatación e iluminación en condiciones *ex vitro* son factores determinantes en la supervivencia de las plantas en las nuevas condiciones (Akimova et al., 2022). De esta manera, las vitroplantas suelen ser susceptibles a estas condiciones estresantes ante el cambio de crecimiento en un ambiente 100% controlado a uno con amplias variaciones ambientales como lo es un invernadero.

Adicionalmente, las vitroplantas son individuos que enfocan sus recursos en su gran mayoría a su crecimiento vegetativo, ya que las condiciones de estrés son mínimas, normalmente no desarrollan mecanismos de defensa robustos como cutícula cerosa, o acumulación de lignina, al contar con fuente de carbono las tasas de fotosíntesis *in vitro* son mínimas y esto conduce a la producción de estomas atrofiados o no funcionales y muchas veces sus raíces son débiles y con significativamente menor capacidad de absorción que las raíces de plantas propagadas en condiciones de campo o invernadero (Trasar-Cepeda et al., 2023).

En el presente estudio, lo mencionado podría haber condicionado la supervivencia y el crecimiento de las plantas aclimatadas, que presentaron valores para ambas variables de respuesta mucho menores que los de las plantas desarrolladas a partir de miniestacas

enraizadas. Contrario a lo indicado para las vitroplantas, las miniestacas enraizadas se encuentran fuertemente estimuladas para resistir condiciones de campo normales y fluctuantes, ya que es un material que siempre ha estado sometido a estrés, fotosíntesis y absorción de agua y nutrientes de forma habitual (Shiwani et al., 2022).

Estudios similares al presente muestran tasas de sobrevivencia mayores al 90% en la aclimatación de *Musa acuminata* (Talla et al., 2022), *Zingiber officinale* (Zhou et al., 2022) y *Vaccinium corymbosum* (Akimova et al., 2022), contrario a lo obtenido en el presente estudio, que las tasas de sobrevivencia máxima alcanzaron el 53,3% durante la primera semana de crecimiento.

Se concluye que la aclimatación de vitroplantas continúa siendo una etapa limitante en la propagación masiva de especies forestales, y que se requiere investigación y desarrollo de sistemas que permitan mejorar las tasas de sobrevivencia y crecimiento de las mismas para poder lograr una transferencia efectiva de las biotecnologías al sector agroforestal costarricense. Estudios fisiológicos más amplios, así como considerar ambientes controlados más estrictamente son determinantes para poder desarrollar etapas posteriores en la hoja de ruta del presente proyecto.

## Referencias

1. Abdelnour, A. & A, Muñoz, (2005). Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f). *Kurú: Revista Forestal*. 2(5). Recuperado de: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/7222>
2. Abdelnour, A., Aguilar, M. & Valverde, L. (2011). Micropropagación de Pílon (*Hieronyma Alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*, 35(2), 09-19. Recuperado de: [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242011000200001&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242011000200001&script=sci_arttext)
3. Abdelnour, A., Aguilar, M., & Valverde, L. (2011). Micropropagación de pílon (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*, 35(2), 09-19.
4. Abdelnour-Esquivel, A., Perez, J., Rojas, M., Vargas, W., & Gatica-Arias, A. (2020). Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(1), 88-97. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>
5. Abdelnour-Esquivel, A., Rojas, G., & Alfaro, U. (2007). Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*, 20(1), 98-103.
6. Acosta, Y., Pérez, L., Linares, C., Hernández, L., Escalante, D., Pérez, A., ... & Lorenzo, J. C. (2020). Effects of *Teramnus labialis* (Lf) Spreng seed cryopreservation on subsequent seed and seedling growth and biochemistry. *Acta physiologiae plantarum*, 42(1), 1-7.
7. Adibi, D. & Kaviani, B. (2021). Micropropagation of Medlar (*Mespilus germanica* L.), A Mediterranean Fruit Tree. *International Journal of Fruit Science*, 21 (1), pp. 242-254. Doi: 10.1080/15538362.2020.1871156
8. Ahmad, S., Ahmad, I., Tyub, S. & Nahaid, A. (2021). Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. *Biotechnology Reports*, 32. Doi: 10.1016/j.btre.2021.e00688
9. Aka Kaçar, Y., Biçen, B., Şimşek, Ö., Dönmez, D. & Erol, M. (2020). Evaluation and comparison of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for myrtle (*Myrtus communis* l.).

*Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1),1611-1620. Doi: 10.15666/aeer/1801\_16111620

10. Akimova, S., Radzhabov, A., Esaulko, A., Samoshenkov, E., Nechiporenko, I., Kazakov, P., Voskoboinikov, Y., Matsneva, A., Zubkov, A., & Aisanov, T. (2022). Improvement of Ex Vitro Growing Completion of Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Containers. *Forests*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/f13101550>
11. Akram, M., & Aftab, F. (2016). Establishment of Embryogenic Cultures and Efficient Plant Regeneration System from Explants of Forced Softwood Shoots of Teak ( *Tectona grandis* L.). *Horticultural Plant Journal*, 2(5), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.01.008>
12. Almeida, R. F., Meira, F. S., Gomes, H. T., Balzon, T. A., Bartos, P. M. C., Meira, R. de O., da Cunha, R. N. V., Lopes, R., Mehta, A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2020). Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. *South African Journal of Botany*, 131, 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.026>
13. Álvarez, S. P., Tapia, M. A. M., Vega, M. E. G., Ardisana, E. F. H., Medina, J. A. C., Zamora, G. L. F., & Bustamante, D. V. (2019). Nanotechnology and Plant Tissue Culture. En R. Prasad (Ed.), *Plant Nanobionics: Volume 1, Advances in the Understanding of Nanomaterials Research and Applications* (pp. 333-370). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-12496-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-12496-0_12)
14. Arab, M. M., Yadollahi, A., Hosseini-Mazinani, M., & Bagheri, S. (2014). Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G×N15 (hybrid of almond×peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(2), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.10.002>
15. Arigundam, U., Mulayath, A., Siow, Y., Marshall, D. & Debnath, S. (2020). Liquid culture for efficient in vitro propagation of adventitious shoots in wild *Vaccinium vitis-idaea* ssp. *minus* (lingonberry) using temporary immersion and stationary bioreactors. *Scientia Horticulturae*. 264. Doi: 10.1016/j.scienta.2020.109199
16. Awada, R., Verdier, D., Froger, S., Brulard, E., de Faria Maraschin, S., Etienne, H., & Breton, D. (2020). An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Scientific Reports*, 10(1), 810. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57800-6>
17. Bayraktar, M. (2019). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni Using RITA® Bioreactor. *HortScience*, 54(4), 725-731. Doi: 10.21273/HORTSCI13846-18
18. Bekheet, S. A., Sota, V., El-Shabrawi, H. M., & El-Minisy, A. M. (2020). Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-8.
19. Benali, N., & Lamarti, A. (2019). Secondary Somatic Embryogenesis for Cork Oak (*Quercus Suber* L.): Influence of Sugars. 2019, 6(1), 9.
20. Benmahioul, B. (2017). Factors affecting *in vitro* micropropagation of Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Agriculture and Forestry Journal*, 1 (1), pp. 56-61.
21. Bi, W. L., Hao, X. Y., Cui, Z. H., Volk, G. M., & Wang, Q. C. (2018). Droplet-vitrification cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(6), 590-599.
22. BIOETHICAL, F. T. T. G. E. (2020). De la transgénesis a la edición génica. Aplicaciones y consideraciones bioéticas. *Cuadernos de Bioética*, 31(103), pp. 387-401.
23. Blázquez, M. A., Nelson, D. C., & Weijers, D. (2020). Evolution of Plant Hormone Response Pathways. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 327-353. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100309>

24. Borji, M., Bouamama-Gzara, B., Chibani, F., Teyssier, C., Ammar, A. B., Mliki, A., Zekri, S., & Ghorbel, A. (2018). Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var 'Meliane'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 329-342. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1333-1>
25. Brondani, G., Ferreira, L., Wendling, I., Grossi, F., Augusto, F. & Araujo, M. (2011). Micropropagation of an Eucalyptus hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33 (4), pp. 655-663. Doi: 10.4025/actasciagron.v33i4.8317
26. Camara, M. C., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., de Oliveira, J., Faulds, C., Bertrand, E., & Soccol, C. R. (2018). Current advances in gibberellic acid (GA3) production, patented technologies and potential applications. *Planta*, 248(5), 1049-1062. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2959-x>
27. Cañizares Rodríguez, V. (2019). Desarrollo de procedimientos de criopreservación basados en la vitrificación en *Mentha* sp. para minimizar el crecimiento de bacterias endófitas.
28. Canosa, S., Cimadomo, D., Conforti, A., Maggiulli, R., Giancani, A., Tallarita, A., ... & Rienzi, L. (2022). The effect of extended cryo-storage following vitrification on embryo competence: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1-10.
29. Cartabia, A., Sarropoulou, V., Grigoriadou, K., Maloupa, E., & Declerck, S. (2022). In vitro propagation of *Alkanna tinctoria* Tausch.: A medicinal plant of the Boraginaceae family with high pharmaceutical value. *Industrial Crops and Products*, 182, 114860. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114860>
30. Carvalho, L., Ozudogru, E., Lambardi, M. & Paiva, L. (2019). Temporary Immersion System for Micropropagation of Tree Species: a Bibliographic and Systematic Review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 2019, 47(2), 269-277. Doi:10.15835/nbha47111305
31. Castander-Olarrieta, A., Moncaleán, P., & Montalbán, I. A. (2020). *Pinus canariensis* plant regeneration through somatic embryogenesis. *Forest Systems*, 29(1), eSC05. <https://doi.org/10.5424/fs/2020291-16136>
32. Castillo, A., Moreno, A. & García, R. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173-182. Recuperado de: <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/284/315>
33. Chang, T., & Zhao, G. (2021). Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced Science*, 8(6), 2002425.
34. Chawla, H. (2002). Introduction To Plant Biotechnology. *Science press*. Doi: 10.1201/9781315275369
35. Chen, Y., Huang, J., Hou, T. & Pan, I. (2019). Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent *Haworthia*. *Botanical Studies*, 60 (10). Doi: 10.1186/s40529-019-0257-y
36. Chib, S., Thangaraj, A., Kaul, S., Dhar, M. K., & Kaul, T. (2020). Development of a system for efficient callus production, somatic embryogenesis and gene editing using CRISPR/Cas9 in Saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Methods*, 16(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00589-2>
37. Ciringer, T., Martín, C., Šajna, N., Kaligarič, M., & Ambrožič-Dolinšek, J. (2018). Cryopreservation of an endangered *Hladnikia pastinacifolia* Rchb. by shoot tip encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(6), 565-575.
38. Corredoira, E., Merkle, S. A., Martínez, M. T., Toribio, M., Canhoto, J. M., Correia, S. I., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (2019). Non-Zygotic Embryogenesis in Hardwood Species. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(1), 29-97. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
39. COSEFORMA 1998. Pilón en la Zona Norte de Costa Rica. MINAE/GTZ/ITCR/CCF. San José, Costa Rica.

40. Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., Cheng, S., Zhang, J., & Wang, Y. (2015). Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(2), 397-412. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0711-9>
41. Devi, P. S., Satyanarayana, B., Arundhati, A., & Rao, T. R. (2014). Plant regeneration from encapsulated nodal segments of *Sterculia urens* roxb., an endangered gum-yielding tree. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(1), 21-25. <https://doi.org/10.1007/s12892-013-0097-3>
42. Dinani, E. T., Shukla, M. R., Turi, C. E., Sullivan, J. A., & Saxena, P. K. (2018). Thidiazuron: Modulator of Morphogenesis In Vitro. En N. Ahmad & M. Faisal (Eds.), *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator* (pp. 1-36). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1)
43. Endoh, K., Hanaoka, S., Matsushita, M., Ubukata, M., & Yamada, H. (2022). Ex situ conservation of birch trees by cryopreservation of dormant buds adapted to subzero temperatures by extracellular freezing. *New Forests*, 1-9.
44. Etienne, D., Bertrand, B., Vasquez, N. & Etienne, H. (1999). Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell. Plant Cell Reports*, 19, pp. 111-117. Doi: 10.1007%2Fs002990050720
45. Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215–231. Doi:10.1023/a:1015668610465
46. Faisal, M., Abdel-Salam, E., Alatar, A. & Qahtan, A. (2021). Induction of somatic embryogenesis in *Brassica juncea* L. and analysis of regenerants using ISSR-PCR and flow cytometer. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28 (1), pp. 1147-1153. Doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.050
47. Farshad, M., Abd, M., Stanslas, J. & Abdul, M. (2013). Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of *Chlorophytum borivilianum* in RITA system on production of saponins. *Process biochemistry*, 48(1), pp.73-77. Doi: 10.1016/j.procbio.2012.12.001
48. Fki, L., Kriaa, W., Nasri, A., Baklouiti, E., Chkir, O., Masmouidi, R. Rival, A. & Drira, N. (2017). Indirect Somatic Embryogenesis of Date Palm Using Juvenile Leaf Explants and Low 2,4-D Concentration. *Date Palm Biotechnology Protocols. 1*, pp. 99-106. Doi: 10.1007/978-1-4939-7156-5\_9
49. Folgado, R., & Panis, B. (2018, March). Cryopreservation of Ashe magnolia shoot-tips by droplet-vitrification. In *III International Symposium on Plant Cryopreservation 1234* (pp. 233-240).
50. Gaidamashvili, M., Khurtsidze, E., Kutchava, T., Lambardi, M., & Benelli, C. (2021). Efficient protocol for improving the development of cryopreserved embryonic axes of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) by encapsulation–vitrification. *Plants*, 10(2), 231.
51. Gao, F., Peng, C., Wang, H., Shen, H., & Yang, L. (2020). Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01147-1>
52. García, R., Delgado, M., González, Y., González, A., Garriga, M., Caligari, P., Carrasco, B. & Quiroz, K. (2011). In vitro propagation of cedar (*Cedrela odorata* l.) from juvenile shoots. *Chilean Journal Of Agricultural Research*, 71 (3), pp. 376-382. Doi: 10.4067/S0718-58392011000300005
53. Gatica, A., Arrieta, G. & Espinoza, A. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11 (1). Doi: 10.2225/vol11-issue1-fulltext-9
54. Gladfelter, H. J., Johnston, J., Wilde, H. D., & Merkle, S. A. (2020). Somatic embryogenesis and cryopreservation of *Stewartia* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01834-1>

55. González-Arno, M. T., Gámez-Pastrana, R., Martínez-Ocampo, Y., Valdés-Rodríguez, S., Mascorro, J. O., Osorio-Saenz, A., Pastelín-Solana, M., Guevara-Valencia, M. & Cruz-Cruz, C. A. (2013). Estado actual de la crioconservación vegetal en México. Crioconservación de Plantas en América Latina y El Caribe. *González-Arno María Teresa y Engelmann Florent (Eds). IICA*
56. Grea, D. Z., Wuhibe, Y. A., & Zewdu, G. A. (2021). REGENERATION OF APPLE (*Malus x domestica* Borkh). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22, 108-123.
57. Guerra, M. P., Steiner, N., Farias-Soares, F. L., Vieira, L. do N., Fraga, H. P. F., Rogge-Renner, G. D., & Maldonado, S. B. (2016). Somatic Embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae). En M. A. Germana & M. Lambardi (Eds.), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* (pp. 439-450). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_24)
58. Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M., Sayeed, R., Mamgain, J. & Ejaz, B. (2020). Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 18 (1). Doi: 10.1186/s43141-020-00047-5
59. Hand, C., Wada, N., Stockwell, V. & Reed, B. (2016). Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant volume 52*, pp. 580–589. Doi: 10.1007/s11627-016-9791-4
60. Huang, B., Zhang, J. M., Chen, X. L., Xin, X., Yin, G. K., He, J. J., ... & Zhou, Y. C. (2018). Oxidative damage and antioxidative indicators in 48 h germinated rice embryos during the vitrification–cryopreservation procedure. *Plant cell reports*, 37(9), 1325-1342.
61. Huang, H., Wei, Y., Zhai, Y., Ouyang, K., Chen, X., & Bai, L. (2020). High frequency regeneration of plants via callus-mediated organogenesis from cotyledon and hypocotyl cultures in a multipurpose tropical tree (*Neolamarkia Cadamba*). *Scientific Reports*, 10(1), 4558. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61612-z>
62. Kaur, A., Reddy, M. S., & Kumar, A. (2018). Direct somatic embryogenesis of potato [*Solanum tuberosum* (L.)] cultivar ‘Kufri Chipsona 2’. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(3), 457-466. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1435-4>
63. Kaya, E., & Souza, F. V. D. (2017). Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(4), 410-417.
64. Khan, H., Siddique, I., & Anis, M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*, 50(4), 789-792. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0133-y>
65. Khatik, N. & Joshi, R. (2018). *In vitro* propagation of *Murraya koenigii* by axillary bud proliferation using mature explants. *Indian Journal of Biotechnology*, 17 (2), pp. 379-382. Recuperado de: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/45085>
66. Kim, N., Hwang, H., Kim, J., Kwon, B., Kim, D. & Park, S. (2020). Efficient production of virus-free apple plantlets using the temporary immersion bioreactor system. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 61, pp. 779–785. Doi: 10.1007/s13580-020-00257-3
67. Klimaszewska, K., Bernier-Cardou, M., Cyr, D. & Sutton, B. (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* l. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(4), pp. 279-286. Recuperado desde: [https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect\\_uri=https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11627-000-0051-1.pdf&casa\\_token=1TjY2SpGlrUAAAAA:j6keNHnEDdA7NygfyUGZ8ix\\_TI6QJSeOki7T17J9AGobQTh9cuUzOT09FYz6AJO\\_WAC8m6PRNXdCZO\\_](https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11627-000-0051-1.pdf&casa_token=1TjY2SpGlrUAAAAA:j6keNHnEDdA7NygfyUGZ8ix_TI6QJSeOki7T17J9AGobQTh9cuUzOT09FYz6AJO_WAC8m6PRNXdCZO_)

68. Kryvenki, M., Kosky, R., Guerrero, D., Domínguez, M. & Reyes, M. (2008). Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biología Vegetal*, 8 (2), pp. 91-98. Recuperado desde: <https://biblat.unam.mx/es/revista/biologia-vegetal/articulo/obtencion-de-callos-con-estructuras-embriogenicas-de-stevia-rebaudiana-bert-en-medios-de-cultivo-semisolidos>
69. Kumar, V., Moyo, M., & Van Staden, J. (2015). Somatic embryogenesis of *Pelargonium sidoides* DC. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 121(3), 571-577. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0726-2>
70. Lambardi, M., Ozudogru, E. A., Barberini, S., & Danti, R. (2018). Strategies for fast multiplication and conservation of forest trees by somatic embryogenesis and cryopreservation: a case study with cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 32-38.
71. Liang, H., Xiong, Y., Guo, B., Yan, H., Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., Zheng, F., Teixeira da Silva, J. A., Xiong, Y., & Ma, G. (2020). Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*. *Scientific Reports*, 10(1), 11343. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68084-1>
72. López, L., Navarro, D., Martínez, V., Toorop, P. & Iannetta, P. (2017). A Spectrophotometric Assay for Robust Viability Testing of Seed Batches Using 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride: Using *Hordeum vulgare* L. as a Model. *Frontiers in Plant Science*, 8. Doi: 10.3389/fpls.2017.00747
73. Madrigal-Valverde, M., Bittencourt, R. F., de Lisboa Ribeiro Filho, A., Araujo, G. R., Lents, M. P., Santos, E. S., ... & Mattos, P. (2020). Can amides be alternative cryoprotectors for the preservation of feline semen?. *Cryobiology*, 97, 138-143.
74. Martín, D. (2017). Embriogénesis somática: una herramienta biotecnológica para la propagación *in vitro* de guayaba. *Biología Vegetal*, 17 (4), pp. 209-220. Recuperado de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/563/pdf>
75. Martínez, M., Correidora, E., Vieitez, A., Cernadas, M., Montenegro, R., Ballester, A., Vieitez, F. & San José, M. (2017). Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131, pp. 499-512. Doi: 10.1007/s11240-017-1300-x
76. Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
77. Monja-Mio, K., Herrera-Alamillo, M. & Robert, M. (2016). Somatic Embryogenesis in Temporary Immersion Bioreactors. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer, Cham. Doi: 10.1007/978-3-319-33705-0\_24
78. Montero, M., De Los Santos, H., & Kanninen, M. (2007). *Hyeronima alchorneoides*: Ecología y Silvicultura en Costa Rica. 50.
79. Muñoz Flores, C. (2020). Análisis de la metilación del ADN en las especies forestales *Sideroxylon capiri* e *Hyeronima alchorneoides* y su posible relación con los factores climatológicos de la región del pacífico en Costa Rica.
80. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473-497. Doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
81. Nausch, H., & Buyel, J. F. (2021). Cryopreservation of plant cell cultures—Diverse practices and protocols. *New Biotechnology*, 62, 86-95.
82. Ngezahayo, F & Liu, B. (2014). Axillary Bud Proliferation Approach for Plant Biodiversity Conservation and Restoration. *International Journal of Biodiversity*. 2014 (1). Doi: 10.1155/2014/727025

83. Oliveira, K. E. S. D., Souza, R. A. V. D., Carvalho, L. S. O., & Paiva, L. V. (2022). Influence of ethylene glycol on *Eucalyptus grandis* cryopreservation using the V cryo-plate technique. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 22.
84. Oseni, O. M., Pande, V., & Nailwal, T. K. (2018). A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 7(7), 3778-3786.
85. Pais, M. S. (2019). Somatic Embryogenesis Induction in Woody Species: The Future After OMICs Data Assessment. *Frontiers in Plant Science*, 10, 240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00240>
86. Pal, A., Negi, V. S., & Borthakur, D. (2012). Efficient in vitro regeneration of *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos as explants. *Agroforestry Systems*, 84(2), 131-140. <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9438-8>
87. Paredes, G., Peña, C., Jadán, M. (2013). Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 34 (1-2), pp. 63-83. Recuperado desde: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6537245>
88. Pathirana, R., Mathew, L., & McLachlan, A. (2021). A simplified method for high recovery of kiwifruit (*Actinidia* spp.) shoot tips after droplet vitrification cryopreservation suitable for long-term conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 97-102.
89. Peña-Ramírez, Y. J., García-Sheseña, I., Hernández-Espinoza, Á., Domínguez-Hernández, A., Barredo-Pool, F. A., González-Rodríguez, J. A., & Robert, M. L. (2011). Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(2), 203-209. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9853-y>
90. Pěňčík, A., Turečková, V., Paulišić, S., Rolčík, J., Strnad, M. & Mihaljević, S. (2015). Ammonium regulates embryogenic potential in *Cucurbita pepo* through pH-mediated changes in endogenous auxin and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122, pp. 89-100. Doi: 10.1007/s11240-015-0752-0
91. Peng, C., Gao, F., Wang, H., Shen, H., & Yang, L. (2021). Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in *Pinus koraiensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(1), 185-194.
92. Pereira, S. T. S., Vendrame, W. A., Pivetta, K. F. L., Sorgato, J. C., & Faria, R. T. D. (2021). Efficiency of cryoprotectors for cryopreservation of two orchid species from Americas. *Rodriguésia*, 72.
93. Pérez, J. (2020). *Desarrollo de un protocolo para la multiplicación masiva de Hyeronima alchorneoides por medio de embriogénesis somática*. [Tesis de maestría, Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio TEC.
94. Perez, J., Araya-Valverde, E., Garro, G., & Abdelnour-Esquivel, A. (2017). Analysis of stress indicators during cryopreservation of seeds of landrace maize (*Zea mays*). *CryoLetters*, 38(6), 445-454.
95. Pérez, M., Bueno, M., Escalona, M., Toorop, P., Rodríguez, R. & Cañal, M. (2013). Temporary immersion systems (RITA®) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. *Trees*, 27, pp. 1277–1284. Doi: 10.1007/s00468-013-0876-y

96. Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: An overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(3), 242-257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
97. Pi, C. H., Yu, G., Petersen, A., & Hubel, A. (2018). Characterizing the “sweet spot” for the preservation of a T-cell line using osmolytes. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
98. Posada-Pérez, L., Montesinos, Y., Guerra, D., Daniels, D. & Gómez-Kosky, R. (2017). Complete germination of papaya (*Carica papaya* L. cv. `Maradol Roja`) somatic embryos using temporary immersion system type RITA® and phloroglucinol in semi-solid culture medium. *Plant Tissue Culture*, 53, pp. 505-513. Doi: 10.1007/s11627-017-9842-5
99. Priyanka, V., Kumar, R., Dhaliwal, I., & Kaushik, P. (2021). Germplasm conservation: instrumental in agricultural biodiversity—A review. *Sustainability*, 13(12), 6743.
100. Quijala, E., Barbón, R., Chávez, M., La O, M., Silva, M., Pérez, M. & León, M. (2014). Propagación Clonal de la Teca (*Tectona grandis* L.) mediante cultivo in vitro. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 4(2), 1-34. Recuperado de: <http://www.revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/118>
101. Quiñonero, C., Corral, P., Lorrain-Lorrette, B., Martínez-Swatson, K., Michoux, F. & Toft, H. (2018). Use of a temporary immersion bioreactor system for the sustainable production of thapsigargin in shoot cultures of *Thapsia garganica*. *Plant Methods*, 79 (14). Doi: 10.1186/s13007-018-0346-z
102. Rojas-Parajeles, F., & Abdelnour-Esquivel, A. (2012). Brotación in vitro de yemas de teca (*Tectona grandis* L. f.). *Revista Tecnología En Marcha*, 25(5), pág. 67–72. Doi: 10.18845/tm.v25i5.475
103. Romadanova, N., Kushnarenko, S., & Karasholakova, L. (2017). Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit and vegetable crops. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(4), 382-393.
104. Sánchez, D. (2014). *Evaluación de la respuesta de tres genotipos seleccionados de café robusta (Coffea canephora Pierre) mediante embriogénesis somática indirecta y uso de Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados, RITA®*. Tesis de pregrado. Universidad de las Fuerzas Armadas, Ecuador. Recuperado de: [https://www.academia.edu/download/57879450/Tesis\\_Coffea\\_canephora\\_Diana\\_Sanchez.pdf](https://www.academia.edu/download/57879450/Tesis_Coffea_canephora_Diana_Sanchez.pdf)
105. Shashi & Bhat, V. (2022). Plant regeneration via somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis of a C4 bioenergy crop *Pennisetum pedicellatum* Trin. *South African Journal of Botany*, 146, pp. 286-292. Doi: 10.1016/j.sajb.2021.10.020
106. Shirin, F., Rana, P. & Mandal, A. (2005). *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. *Journal of Forest Research*, 10, pp. 465-469. Doi: 10.1007/s10310-005-0173-8
107. Shiwani, K., Sharma, D., & Kumar, A. (2022). Improvement of Plant Survival and Expediting Acclimatization Process. En S. Gupta & P. Chaturvedi (Eds.), *Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops* (pp. 277-291). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-19-0055-6_12)
108. Silveira, S. S., Sant’Anna-Santos, B. F., Degenhardt-Goldbach, J., & Quoirin, M. (2020). Somatic embryogenesis from mature split seeds of jaboticaba (*Plinia peruviana* (Poir) Govaerts). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 42, e43798-e43798. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.43798>
109. Singh, C. K., Raj, S. R., Jaiswal, P. S., Patil, V. R., Punwar, B. S., Chavda, J. C., & Subhash, N. (2016). Effect of plant growth regulators on in vitro plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis. *Agroforestry Systems*, 90(2), 281-288. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9853-3>
110. Snyman, J., Nkwanyana P., Watt M. (2011). Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. *South African Journal of Botany*, 77 (3), pp. 685-692. Doi: 10.1016/j.sajb.2011.03.004

111. Solís, M., & Moya, R. (2004). *Hyeronima alchorneoides* en Costa Rica. San José, Costa Rica.: Fondo Nacional de Financiamiento Forestal.
112. Suárez, I. (2020). Cultivo de Tejidos Vegetales. Montería: Fondo Editorial Universidad de Córdoba. Recuperado desde: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro%20Cultivo%20de%20Tejidos%20Vegetales%20Edici%3%b3n%2003-03-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
113. Sulong, N., Shahabudin, N. F., & Noor, N. M. (2018). Etapas críticas de vitrificación para la supervivencia de ápices caulinares de *Garcinia hombroniana* (Clusiaceae) después de criopreservación. *Revista de Biología Tropical*, 66(3), 1314-1324.
114. Talla, S. K., Bagari, P., Manga, S., Aileni, M., & Mamidala, P. (2022). Comparative study of micropropagated plants of Grand Naine banana during in vitro regeneration and ex vitro acclimatization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102325. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102325>
115. Tambunan, I. R., Damayanti, F., & Witjaksono, W. (2022). SUCCESSFUL PRESERVATION OF BANANA EMBRYOGENIC CALLUS BY MINIMAL GROWTH AND CRYOPRESERVATION TECHNIQUE. *Jurnal Teknologi*, 84(5).
116. Tariq, A., Ilyas, S., & Naz, S. (2020). Nanotechnology and Plant Tissue Culture. En S. Javad (Ed.), *Nanoagronomy* (pp. 23-35). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41275-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41275-3_2)
117. Tirado Pérez, B. & Sandoval Cancino, G. (2022). Cryopreservation of plant genetic resources: A legacy for humanity. *African Journal of Biotechnology*, 21(2), 55-63.
118. Trasar-Cepeda, C., Sánchez, C., Casalderrey, M., Bello, D., Vielba, J. M., Rico, S., Aldrey, A., & Vidal, N. (2023). Effect of Soil Type and In Vitro Proliferation Conditions on Acclimation and Growth of Willow Shoots Micropropagated in Continuous Immersion Bioreactors. *Plants*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/plants12010132>
119. Trueman, S., Dinh, C. & Wendling, I. (2018). Tissue Culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forest*, 9 (2). Doi: 10.3390/f9020084
120. Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., ... & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, 6, 268.
121. Uma, S., Kumaravel, M., Backiyarani, S., Somasundaram, M., Durai, P., & Karthic, R. (2021). Somatic embryogenesis as a tool for reproduction of genetically stable plants in banana and confirmatory field trials. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 147, pp. 181-188. Doi: 10.1007/s11240-021-02108-0
122. Vaidya, B., Asakunov, B., Shahin, L., Jernigan, H., Joshee, N. & Dhekney, S. (2019). Improving micropropagation of *Mentha × piperita* L. using a liquid culture system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55, pp. 71–80. Doi: 10.1007/s11627-018-09952-4
123. Vallejos-Salazar, J. A. (2019). Cultivo de madera de pilón (*Hyeronima alchorneoides* Allemão) en Costa Rica.
124. Valverde, L., Rojas, A., Hine, A. & Azofeifa, J. (2013). Formación de embriones somáticos en *Hyeronima alchorneoides* Allemao a partir de embriones cigóticos. *Bioteología Vegetal*, 13 (4). Recuperado de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/119/0>
125. Vidal, N., Blanco, B., & Cuenca, B. (2015). A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(2), 229–243. Doi:10.1007/s11240-015-0827-y

126. Vieira, R. L., da Silva, A. L., Zaffari, G. R., Steinmacher, D. A., de Freitas Fraga, H. P., & Guerra, M. P. (2015). Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta physiologiae plantarum*, 37(1), 1733.
127. Villalobos, A., Arguedas, M., Escalante, D., Martínez, J., Zevallos, B. E., Cejas, I., ... & Feijoo, J. C. L. (2019). Cryopreservation of sorghum seeds modifies germination and seedling growth but not field performance of adult plants. *J. App. Bot. Food Qual*, 92, 94-99.
128. Villegas, E., Macías, M., Osegueda, S., Herrera, L., Nuñez, H. & Gozáles, J. (2018). *In Vitro* Culture of *Rosmarinus officinalis* L. in a Temporary Immersion System: Influence of Two Phytohormones on Plant Growth and Carnosol Production. *Pharmaceuticals*, 14, 747. Doi: 10.3390/ph14080747
129. Viñas, M. & Jiménez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (*Arecaceae*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8 (2), pp. 229-242. Recuperado desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a23.pdf>
130. Wang, M. R., Zhang, Z., Zámečník, J., Bilavčík, A., Blystad, D. R., Haugslie, S., & Wang, Q. C. (2020). Droplet-vitrification for shoot tip cryopreservation of shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*): Effects of PVS3 and PVS2 on shoot regrowth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(1), 185-195.
131. Wu, G.-Y., Wei, X.-L., Wang, X., & Wei, Y. (2020). Induction of somatic embryogenesis in different explants from *Ormosia henryi* Prain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(2), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01822-5>
132. Yang, J., Yang, D., Lü, W., Zhang, X., Ma, M., Liu, G., Jiang, J., & Li, C. (2020). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Betula platyphalla*. *Journal of Forestry Research*. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01131-9>
133. Zhou, J., Guo, F., Qi, C., Fu, J., Xiao, Y., & Wu, J. (2022). Efficient ex-vitro rooting and acclimatization for tissue culture plantlets of ginger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(2), 451-458. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02296-3>

## Apéndices

Análisis estadísticos

### Análisis Estacas

Jason Pérez

2023-02-13

1. Establecer el directorio de trabajo

Donde se guarda el trabajo, los gráficos y documentos producidos

2. Acomodar los datos para su análisis

a- Cargar datos desde excel

```
library(readxl)
```

```
## Warning: package 'readxl' was built under R version 4.3.1
```

```
Estacas <- read_excel("Intro_estacas.xlsx",  
                      sheet= "Hoja1", col_types = c("text", "text",  
                                                    "text", "numeric", "numeric", "numeric", "numeric"))
```

```
Estacas_sinAq <- read_excel("Intro_estacas.xlsx",  
                            sheet= "Hoja1", col_types = c("skip", "text",  
                                                          "text", "numeric", "numeric", "numeric", "numeric"))
```

```
Estacas_sinAq
```

```
## # A tibble: 90 × 7
```

```
##   Disinfectant           Ag_Nano  Fungi Bacteria Sprouting
```

```
Aseptic Necrotic
```

```
##   <chr>                 <chr>   <dbl>   <dbl>   <dbl>
```

```
<dbl>   <dbl>
```

```
## 1 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano    0     0     0
```

```
100     100
```

```
## 2 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano    0     0     0
```

```
100     100
```

```
## 3 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano    0     0     0
```

```

100      100
## 4 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## 5 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## 6 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## 7 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## 8 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## 9 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## 10 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min 0_AgNano      0      0      0
100      100
## # i 80 more rows

```

```

Estacas_conAq <- read_excel("Intro_estacas.xlsx",
                             sheet= "Hoja2", col_types = c("skip", "text",
"text", "numeric", "numeric",
                             "numeric","numeric","numeric"))

```

```
Estacas_conAq
```

```

## # A tibble: 80 × 7
##   Disinfectant      Ag_Nano  Fungi  Bacteria  Sprouting
Aseptic Necrotic
##   <chr>             <chr>    <dbl>   <dbl>    <dbl>
<dbl>   <dbl>
## 1 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      100
0      0
## 2 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      100
0      0
## 3 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      100
0      0
## 4 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      100
0      0
## 5 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      0
0      0
## 6 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      0
0      0
## 7 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano  100     0      0

```

```

0      0
## 8 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano 100      0      0
0      0
## 9 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano 100      0      100
0      0
## 10 3%_(m/v)_NaOCl_8min 0_AgNano 100      0      0
0      0
## # i 70 more rows

```

b- Revisar la estructura de los datos:

**str**(Estacas)

```

## tibble [90 × 8] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Afungil_Agrygent: chr [1:90] "Agrochem_0" "Agrochem_0"
"Agrochem_0" "Agrochem_0" ...
## $ Disinfectant    : chr [1:90] "0.095%_(m/v)_HgCl2_10min"
"0.095%_(m/v)_HgCl2_10min" "0.095%_(m/v)_HgCl2_10min"
"0.095%_(m/v)_HgCl2_10min" ...
## $ Ag_Nano        : chr [1:90] "0_AgNano" "0_AgNano"
"0_AgNano" "0_AgNano" ...
## $ Fungi          : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Bacteria       : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Sprouting      : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Aseptic        : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 100 ...
## $ Necrotic       : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 100 ...

```

**str**(Estacas\_conAq)

```

## tibble [80 × 7] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Disinfectant: chr [1:80] "3%_(m/v)_NaOCl_8min"
"3%_(m/v)_NaOCl_8min" "3%_(m/v)_NaOCl_8min"
...
## $ Ag_Nano      : chr [1:80] "0_AgNano" "0_AgNano" "0_AgNano"
"0_AgNano" ...
## $ Fungi       : num [1:80] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 ...
## $ Bacteria    : num [1:80] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Sprouting   : num [1:80] 100 100 100 100 0 0 0 0 100 0 ...

```

```
## $ Aseptic      : num [1:80] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Necrotic     : num [1:80] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
```

```
str(Estacas_sinAq)
```

```
## tibble [90 × 7] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Disinfectant: chr [1:90] "0.095%_(m/v)_HgCl2_10min"
"0.095%_(m/v)_HgCl2_10min" "0.095%_(m/v)_HgCl2_10min"
"0.095%_(m/v)_HgCl2_10min" ...
## $ Ag_Nano      : chr [1:90] "0_AgNano" "0_AgNano" "0_AgNano"
"0_AgNano" ...
## $ Fungi        : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Bacteria     : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Sprouting    : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Aseptic      : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 ...
## $ Necrotic     : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 ...
```

c- Convertimos a factor lo correspondiente:

y corroboramos revisando de nuevo la estructura de los datos

```
Estacas$Afungil_Agrygent<-as.factor(Estacas$Afungil_Agrygent)
Estacas$Disinfectant<-as.factor(Estacas$Disinfectant)
Estacas$Ag_Nano<-as.factor(Estacas$Ag_Nano)
```

```
Estacas_conAq$Disinfectant<-as.factor(Estacas_conAq$Disinfectant)
Estacas_conAq$Ag_Nano<-as.factor(Estacas_conAq$Ag_Nano)
```

```
Estacas_sinAq$Disinfectant<-as.factor(Estacas_sinAq$Disinfectant)
Estacas_sinAq$Ag_Nano<-as.factor(Estacas_sinAq$Ag_Nano)
```

```
str(Estacas)
```

```
## tibble [90 × 8] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Afungil_Agrygent: Factor w/ 1 level "Agrochem_0": 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 ...
## $ Disinfectant    : Factor w/ 1 level
"0.095%_(m/v)_HgCl2_10min": 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Ag_Nano         : Factor w/ 2 levels "0_AgNano","5_AgNano":
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
```

```
## $ Fungi : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Bacteria : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Sprouting : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Aseptic : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 100 ...
## $ Necrotic : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 100 ...
```

`str(Estacas_conAq)`

```
## tibble [80 × 7] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Disinfectant: Factor w/ 1 level "3%_(m/v)_NaOCl_8min": 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Ag_Nano : Factor w/ 4 levels "0_AgNano","10_AgNano",...:
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Fungi : num [1:80] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 ...
## $ Bacteria : num [1:80] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Sprouting : num [1:80] 100 100 100 100 0 0 0 0 100 0 ...
## $ Aseptic : num [1:80] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Necrotic : num [1:80] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
```

`str(Estacas_sinAq)`

```
## tibble [90 × 7] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Disinfectant: Factor w/ 1 level "0.095%_(m/v)_HgCl2_10min":
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Ag_Nano : Factor w/ 2 levels "0_AgNano","5_AgNano": 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Fungi : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Bacteria : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Sprouting : num [1:90] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Aseptic : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 ...
## $ Necrotic : num [1:90] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100
100 ...
```

Ahora sí, los factores del experimento y las variables de respuesta están correctamente asignadas.

d- Exploración de los datos:

##tablas de frecuencia datos con agroquímicos##

```
table(Estacas_conAq$Fungi, Estacas_conAq$Disinfectant)#fungi vs Disinf
```

```
##  
##      3%_(m/v)_NaOCl_8min  
##  0                22  
## 100               58
```

```
table(Estacas_conAq$Fungi, Estacas_conAq$Ag_Nano)#fungi vs Ag_Nano
```

```
##  
##      0_AgNano 10_AgNano 20_AgNano 5_AgNano  
##  0           7         7         5         3  
## 100          25        9         19        5
```

```
table(Estacas_conAq$Bacteria, Estacas_conAq$Disinfectant)#bact vs Disinf
```

```
##  
##      3%_(m/v)_NaOCl_8min  
##  0                71  
## 100               9
```

```
table(Estacas_conAq$Bacteria, Estacas_conAq$Ag_Nano)#bact vs Ag_Nano
```

```
##  
##      0_AgNano 10_AgNano 20_AgNano 5_AgNano  
##  0           31        14        19        7  
## 100          1         2         5         1
```

```
table(Estacas_conAq$Sprouting, Estacas_conAq$Disinfectant)#brotes vs Disinf
```

```
##  
##      3%_(m/v)_NaOCl_8min  
##  0                54  
## 100               26
```

```
table(Estacas_conAq$Sprouting, Estacas_conAq$Ag_Nano)#brotes vs Ag_Nano
```

```
##  
##      0_AgNano 10_AgNano 20_AgNano 5_AgNano
```

```
##      0      17      8      24      5
##    100     15      8       0      3
```

```
table(Estacas_conAq$Aseptic, Estacas_conAq$Disinfectant)#Aseptic vs
Disinf
```

```
##
##      3%_(m/v)_NaOCl_8min
##      0      67
##    100     13
```

```
table(Estacas_conAq$Aseptic, Estacas_conAq$Ag_Nano)#Aseptic vs
Ag_Nano
```

```
##
##      0_AgNano 10_AgNano 20_AgNano 5_AgNano
##      0      25      12      24      6
##    100      7      4      0      2
```

```
table(Estacas_conAq$Necrotic, Estacas_conAq$Disinfectant)#Necrotic
vs Disinf
```

```
##
##      3%_(m/v)_NaOCl_8min
##      0      68
##    100     12
```

```
table(Estacas_conAq$Necrotic, Estacas_conAq$Ag_Nano)#Necrotic vs
Ag_Nano
```

```
##
##      0_AgNano 10_AgNano 20_AgNano 5_AgNano
##      0      32      16      12      8
##    100      0      0      12      0
```

tablas de frecuencia datos sin agroquímicos

```
table(Estacas_sinAq$Fungi, Estacas_sinAq$Disinfectant)#fungi vs
Disinf
```

```
##
##      0.095%_(m/v)_HgCl2_10min
##      0      86
##    100      4
```

```
table(Estacas_sinAq$Fungi, Estacas_sinAq$Ag_Nano)#fungi vs Ag_Nano
```

```
##  
##      0_AgNano 5_AgNano  
##  0           56       30  
## 100          4        0
```

```
table(Estacas_sinAq$Bacteria, Estacas_sinAq$Disinfectant)#bact vs  
Disinf
```

```
##  
##      0.095%_(m/v)_HgCl2_10min  
##  0                               87  
## 100                              3
```

```
table(Estacas_sinAq$Bacteria, Estacas_sinAq$Ag_Nano)#bact vs Ag_Nano
```

```
##  
##      0_AgNano 5_AgNano  
##  0           58       29  
## 100          2        1
```

```
table(Estacas_sinAq$Sprouting, Estacas_sinAq$Disinfectant)#brotes  
vs Disinf
```

```
##  
##      0.095%_(m/v)_HgCl2_10min  
##  0                               82  
## 100                              8
```

```
table(Estacas_sinAq$Sprouting, Estacas_sinAq$Ag_Nano)#brotes vs  
Ag_Nano
```

```
##  
##      0_AgNano 5_AgNano  
##  0           54       28  
## 100          6        2
```

```
table(Estacas_sinAq$Aseptic, Estacas_sinAq$Disinfectant)#Aseptic vs  
Disinf
```

```
##  
##      0.095%_(m/v)_HgCl2_10min
```

```
## 0 24
## 100 66
```

```
table(Estacas_sinAq$Aseptic, Estacas_sinAq$Ag_Nano)#Aseptic vs
Ag_Nano
```

```
##
## 0_AgNano 5_AgNano
## 0 8 16
## 100 52 14
```

```
table(Estacas_sinAq$Necrotic, Estacas_sinAq$Disinfectant)#Necrotic
vs Disinf
```

```
##
## 0.095%_(m/v)_HgCl2_10min
## 0 6
## 100 84
```

```
table(Estacas_sinAq$Necrotic, Estacas_sinAq$Ag_Nano)#Necrotic vs
Ag_Nano
```

```
##
## 0_AgNano 5_AgNano
## 0 6 0
## 100 54 30
```

### 3- Gráficos de barras con la comparación de medias

a- cargar paquetes requeridos para los gráficos

```
library(ggplot2)
```

```
## Warning: package 'ggplot2' was built under R version 4.3.1
```

```
library(ggpubr)
```

```
## Warning: package 'ggpubr' was built under R version 4.3.1
```

```
library(ggsignif)
```

```
## Warning: package 'ggsignif' was built under R version 4.3.1
```

```
library(dplyr)
```

```
## Warning: package 'dplyr' was built under R version 4.3.1
```

```
##
## Attaching package: 'dplyr'

## The following objects are masked from 'package:stats':
##
##   filter, lag

## The following objects are masked from 'package:base':
##
##   intersect, setdiff, setequal, union
```

b- realizamos los gráficos y los guardamos b1- datos con agroquímicos

b1.1- gráfico de hongos

```
Hongos_conAq<-ggbarplot(Estacas_conAq, x = "Ag_Nano", y="Fungi",
fill= "Ag_Nano",
                        palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
                        add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
                        xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
                        ylab = "Fungal contamination (%)")+
  ggtitle("A")+
  stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano", "5_AgNano"),
c("0_AgNano", "10_AgNano"), c("0_AgNano", "20_AgNano"),
c("10_AgNano", "5_AgNano"),c("10_AgNano", "20_AgNano"),
c("5_AgNano", "20_AgNano")), label = "p.signif")+
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1),
        axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
        axis.text= element_text(size = 13),
        axis.title = element_text(size = 14),
  legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y..., 1)),
              position = position_dodge(width = 0.9),
              vjust = -3.4,
              color = "black", size = 5)
```

```
## Warning: The `size` argument of `element_line()` is deprecated
as of ggplot2 3.4.0.
## i Please use the `linewidth` argument instead.
## This warning is displayed once every 8 hours.
## Call `lifecycle::last_lifecycle_warnings()` to see where this
warning was
## generated.
```

```
ggsave("Hongos_conAq.png", Hongos_conAq, dpi = 1000, height = 5,
width = 7, units = "in")
```

```
## Warning: The dot-dot notation (`..y..`) was deprecated in
ggplot2 3.4.0.
## i Please use `after_stat(y)` instead.
## i The deprecated feature was likely used in the ggpubr package.
## Please report the issue at
<https://github.com/kassambara/ggpubr/issues>.
## This warning is displayed once every 8 hours.
## Call `lifecycle::last_lifecycle_warnings()` to see where this
warning was
## generated.
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 0, 0,
0), c(0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

Hongos_conAq

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 0, 0,
0), c(0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).
```

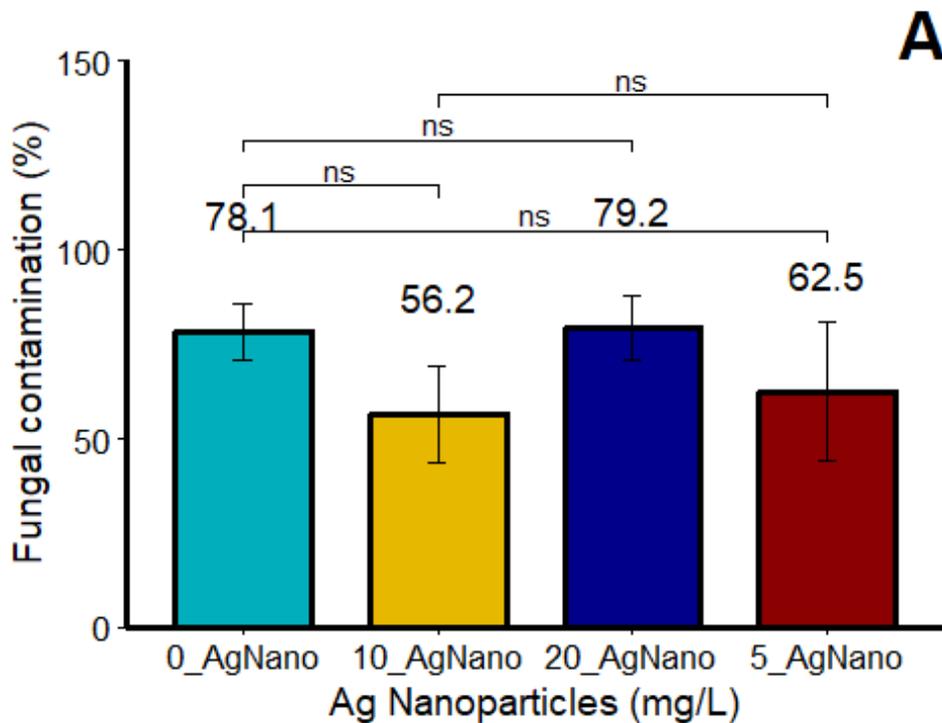


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: fungal contamination %"

b1.2- gráfico de bacteria

```
Bacteria_conAq<-ggbarplot(Estacas_conAq, x = "Ag_Nano",
y="Bacteria", fill= "Ag_Nano",
palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
ylab = "Bacteria contamination (%)")+
ggtitle("B")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano", "5_AgNano"),
c("0_AgNano", "10_AgNano"), c("0_AgNano", "20_AgNano"),
c("10_AgNano", "5_AgNano"),c("10_AgNano", "20_AgNano"),
c("5_AgNano", "20_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
```

```

  legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
              position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -3.3,
              color = "black", size = 5)
ggsave("Bacteria_conAq.png", Bacteria_conAq, dpi = 1000, height =
5, width = 7, units = "in")

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 100,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 100,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 100),
c(100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

Bacteria_conAq

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 100,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 100,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 100),
c(100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).
```

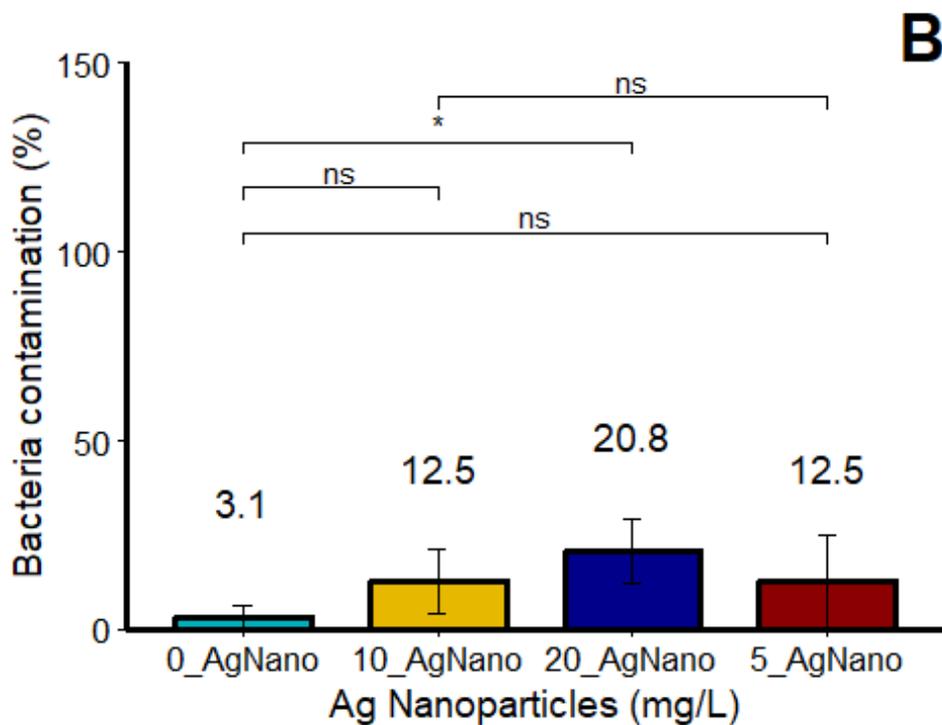


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Bacteria contamination %" b1.3- gráfico de brotación

```

Brotas_conAq<-ggbarplot(Estacas_conAq, x = "Ag_Nano",
y="Sprouting", fill= "Ag_Nano",
                        palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
                        add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
                        xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
                        ylab = "Sprouting (%)")+
ggtitle("C")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano", "5_AgNano"),
c("0_AgNano", "10_AgNano"), c("0_AgNano", "20_AgNano"),
c("10_AgNano", "5_AgNano"),c("10_AgNano", "20_AgNano"),
c("5_AgNano", "20_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
legend.position = "none")+

```

```

    scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
    stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
                position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -3.3,
                color = "black", size = 5)
ggsave("Brotos_conAq.png", Brotos_conAq, dpi = 1000, height = 5,
width = 7, units = "in")

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100),
c(0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

Brotos_conAq

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100),
c(0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).
```

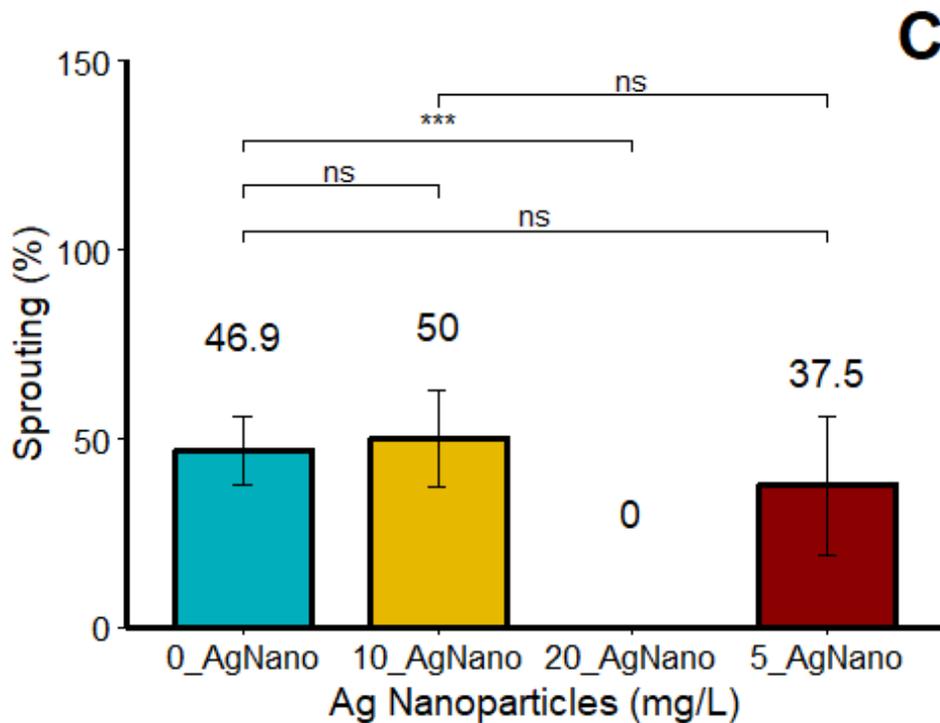


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Sprouting %"

b1.4- gráfico de asépticos

```
Aseptic_conAq<-ggbarplot(Estacas_conAq, x = "Ag_Nano",
y="Aseptic", fill= "Ag_Nano",
palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
ylab = "Aseptic explants (%)")+
ggtitle("D")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano", "5_AgNano"),
c("0_AgNano", "10_AgNano"), c("0_AgNano", "20_AgNano"),
c("10_AgNano", "5_AgNano"),c("10_AgNano", "20_AgNano"),
c("5_AgNano", "20_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
```

```

  legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
              position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -3.3,
              color = "black", size = 5)
ggsave("Aseptic_conAq.png", Aseptic_conAq, dpi = 1000, height = 5,
width = 7, units = "in")

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
100, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
100, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 0),
c(0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

Aseptic_conAq

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 0, 0, 0, 0, 0,
100, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 0, 0, 0, 0, 0,
100, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 0),
c(0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).
```

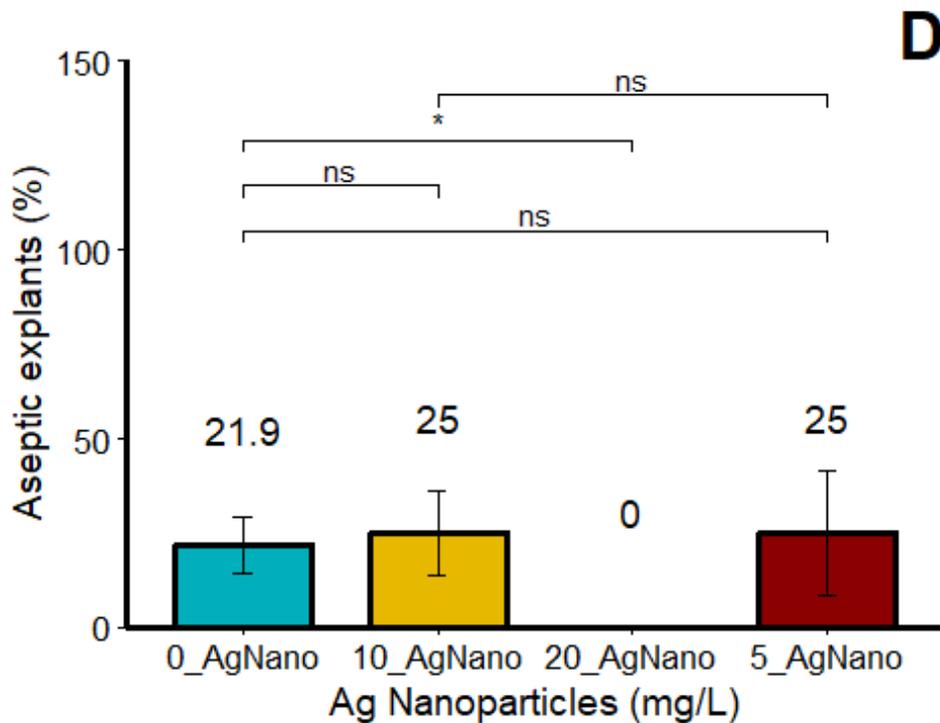


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Aseptic explants %" b1.5- gráfico de necróticos

```

Necrotic_conAq<-ggbarplot(Estacas_conAq, x = "Ag_Nano",
y="Necrotic", fill= "Ag_Nano",
palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
ylab = "Necrotic explants (%)")+
ggtitle("E")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano", "5_AgNano"),
c("0_AgNano", "10_AgNano"), c("0_AgNano", "20_AgNano"),
c("10_AgNano", "5_AgNano"),c("10_AgNano", "20_AgNano"),
c("5_AgNano", "20_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
legend.position = "none")+

```



```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0),
c(100, 100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).
```

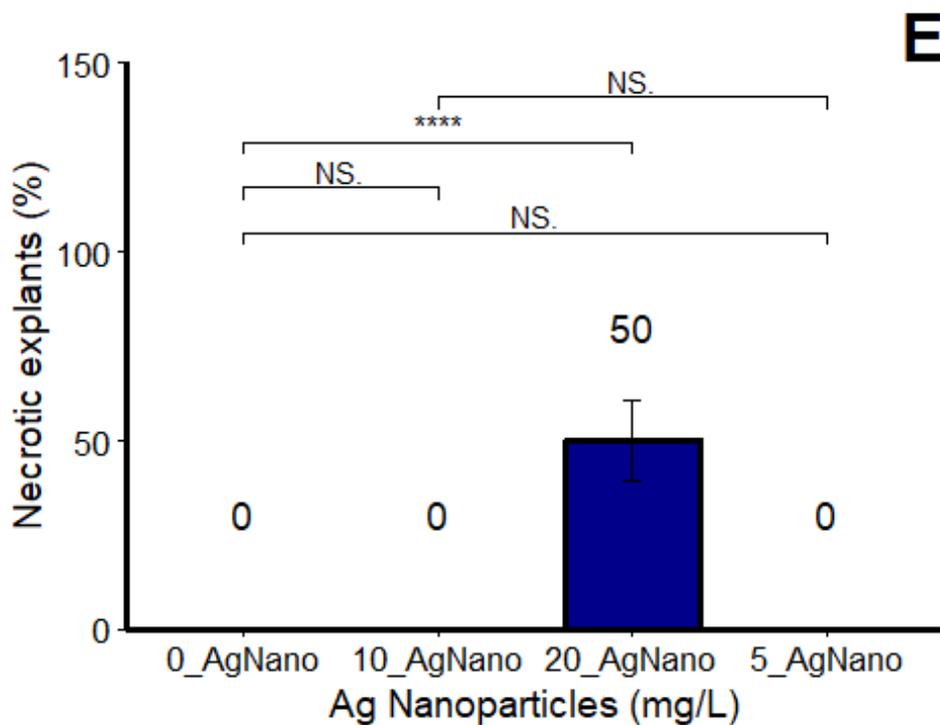


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Necrotic explants %"

b2- datos sin agroquímicos

b2.1- gráfico de hongos

```
Hongos_sinAq<-ggbarplot(Estacas_sinAq, x = "Ag_Nano", y="Fungi",
fill= "Ag_Nano",
palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
ylab = "Fungal contamination (%)")+
ggtitle("A")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano",
"5_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1),
axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
```



```

      ylab = "Bacteria contamination (%)")+
  ggtitle("B")+
  stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano",
"5_AgNano")), label = "p.signif")+
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1),          axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
      axis.text= element_text(size = 13),
      axis.title = element_text(size = 14),
  legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
      position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -3.3,
      color = "black", size = 5)
ggsave("Bacteria_sinAq.png", Bacteria_sinAq, dpi = 1000, height =
5, width = 7, units = "in")
Bacteria_sinAq

```

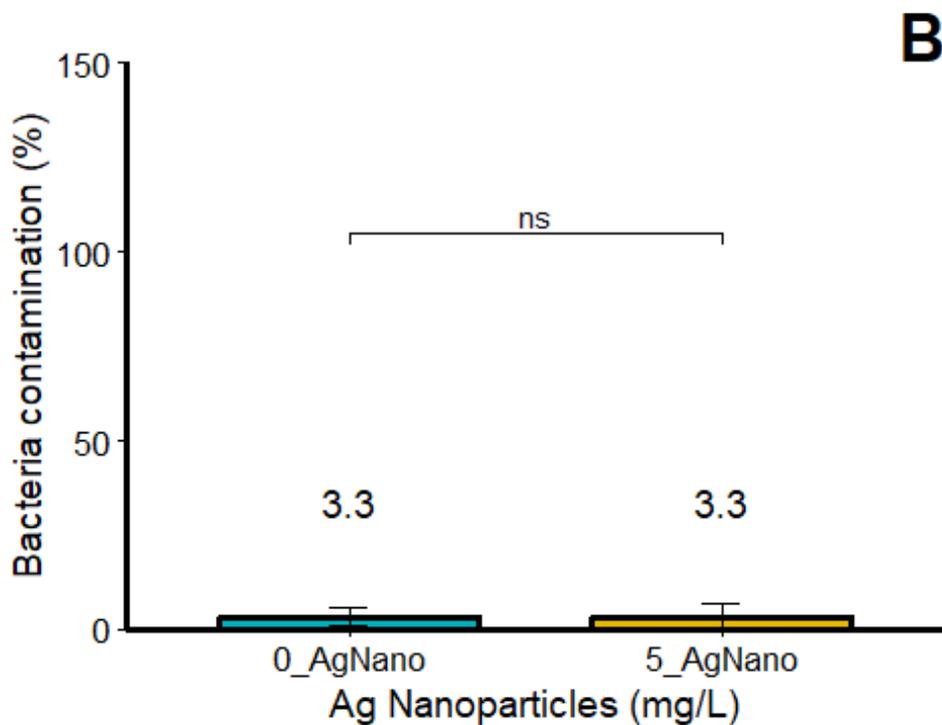


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Bacteria contamination %" b1.3- gráfico de brotación

```

Brotos_sinAq<-ggbarplot(Estacas_sinAq, x = "Ag_Nano",
y="Sprouting", fill= "Ag_Nano",
                        palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
                        add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
                        xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
                        ylab = "Sprouting (%)")+
ggtitle("C")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano",
"5_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
legend.position = "none")+
scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +

```

```

stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
              position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -3.3,
              color = "black", size = 5)
ggsave("Brotos_sinAq.png", Brotos_sinAq, dpi = 1000, height = 5,
width = 7, units = "in")
Brotos_sinAq

```

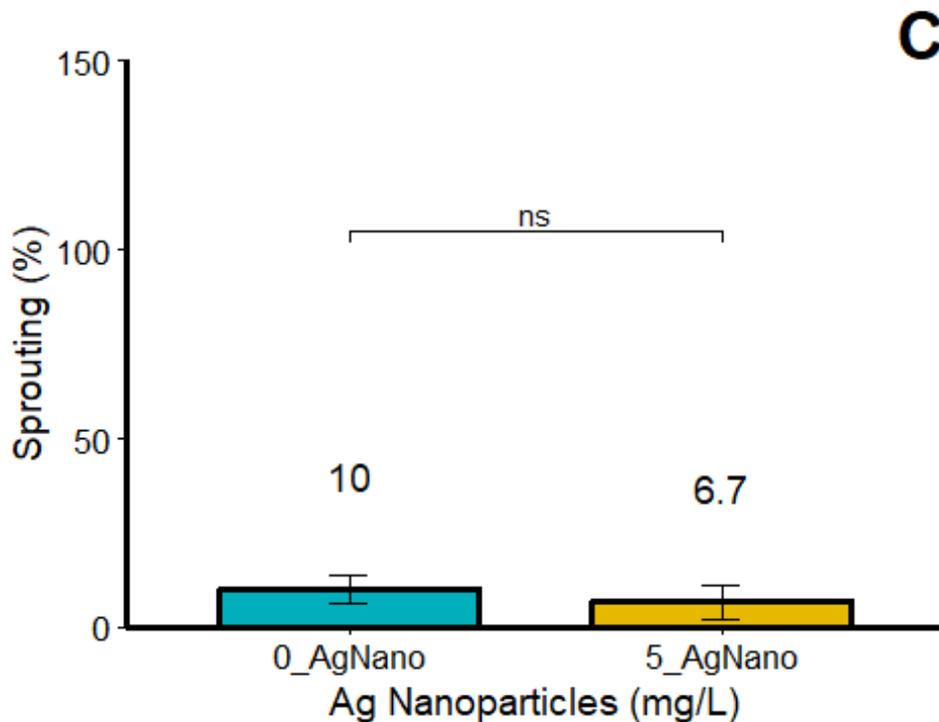


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Sprouting %"

b1.4- gráfico de asépticos

```

Aseptic_sinAq<-ggbarplot(Estacas_sinAq, x = "Ag_Nano",
y="Aseptic", fill= "Ag_Nano",
                        palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
                        add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
                        xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
                        ylab = "Aseptic explants (%)")+
ggtitle("D")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano",

```

```

"5_AgNano")), label = "p.signif")+
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1),
        axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
        axis.text= element_text(size = 13),
        axis.title = element_text(size = 14),
  legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
              position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -1.8,
              color = "black", size = 5)
ggsave("Aseptic_sinAq.png", Aseptic_sinAq, dpi = 1000, height = 5,
width = 7, units = "in")
Aseptic_sinAq

```

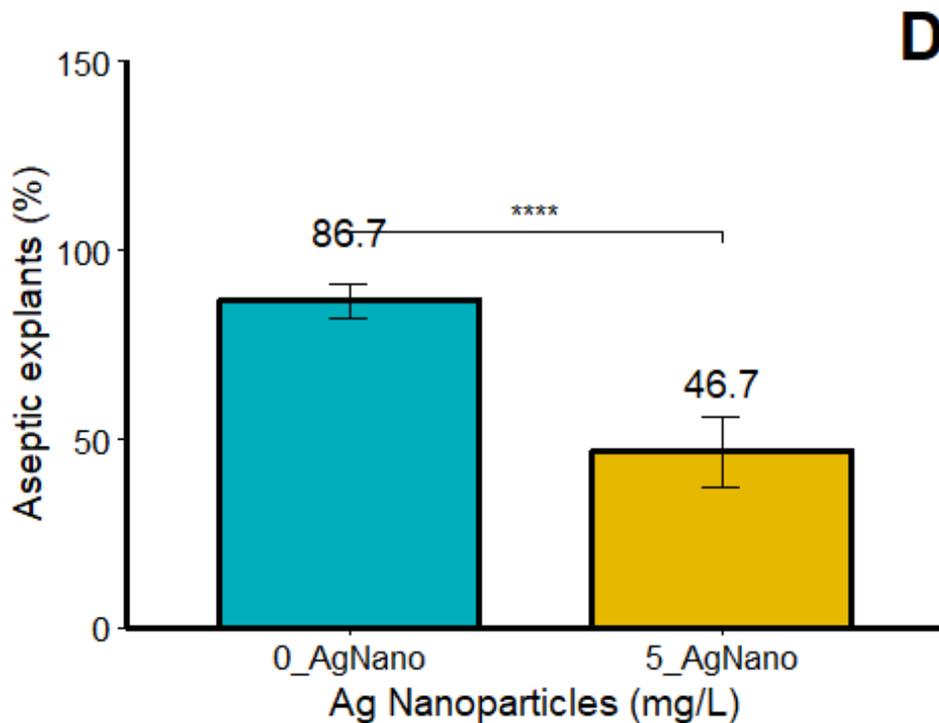


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Aseptic explants %" b1.5- gráfico de necróticos

```

Necrotic_sinAq<-ggbarplot(Estacas_sinAq, x = "Ag_Nano",
y="Necrotic", fill= "Ag_Nano",
palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue",
"darkred"),
add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
xlab = "Ag Nanoparticles (mg/L)",
ylab = "Necrotic explants (%)")+
ggtitle("E")+
stat_compare_means(comparisons = list(c("0_AgNano",
"5_AgNano")), label = "p.signif")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
= 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size =
1.2),
strip.text= element_text(size = 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title = element_text(size = 14),
legend.position = "none")+
scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0,
150)) +
stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label =
round(..y.., 1)),
position = position_dodge(width = 0.9),
vjust = -3.3,
color = "black", size = 5)
ggsave("Necrotic_sinAq.png", Necrotic_sinAq, dpi = 1000, height =
5, width = 7, units = "in")
Necrotic_sinAq

```

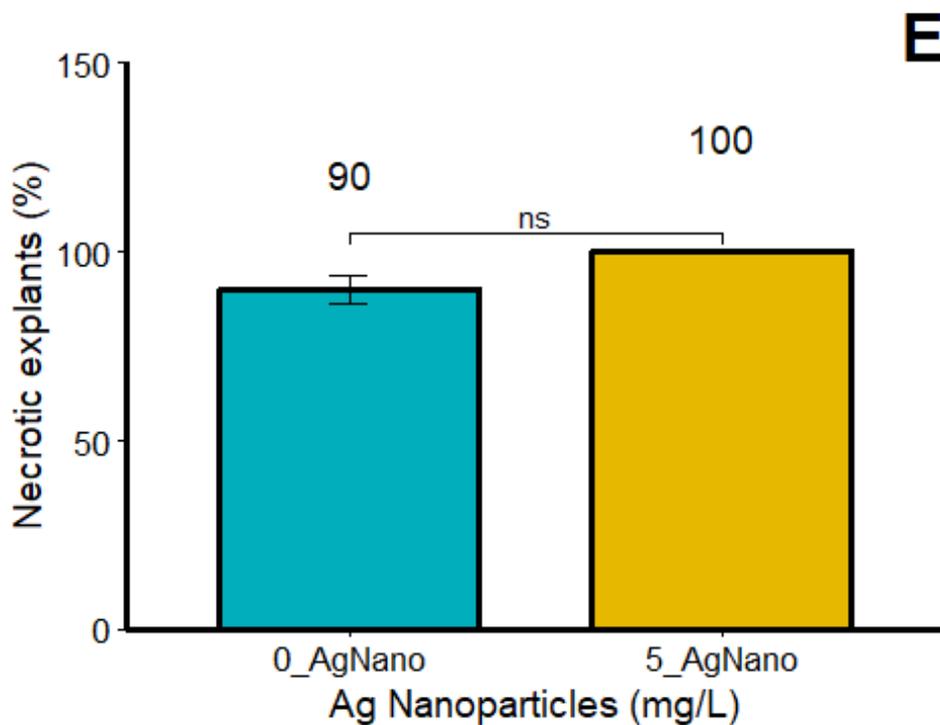


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to disinfection treatments. Response variable: Necrotic explants %"

Combinar todos los gráficos en dos figuras

Con Agroquímicos

`library(gridExtra)`

```
## Warning: package 'gridExtra' was built under R version 4.3.1
```

```
##
```

```
## Attaching package: 'gridExtra'
```

```
## The following object is masked from 'package:dplyr':
```

```
##
```

```
## combine
```

```
FigComb_conAq<- grid.arrange(Hongos_conAq,Bacteria_conAq,
Brotos_conAq, Aseptic_conAq, Necrotic_conAq, ncol=2)
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 0, 0,
0), c(0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 100,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 100, 0, 100,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 100),
c(100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 0, 0, 0,
0, 100, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100,
0, 0, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 100),
c(0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 0, 0, 0, 0, 0,
100, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 0, 0, 0, 0, 0,
100, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 100, 100, 0),
c(0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

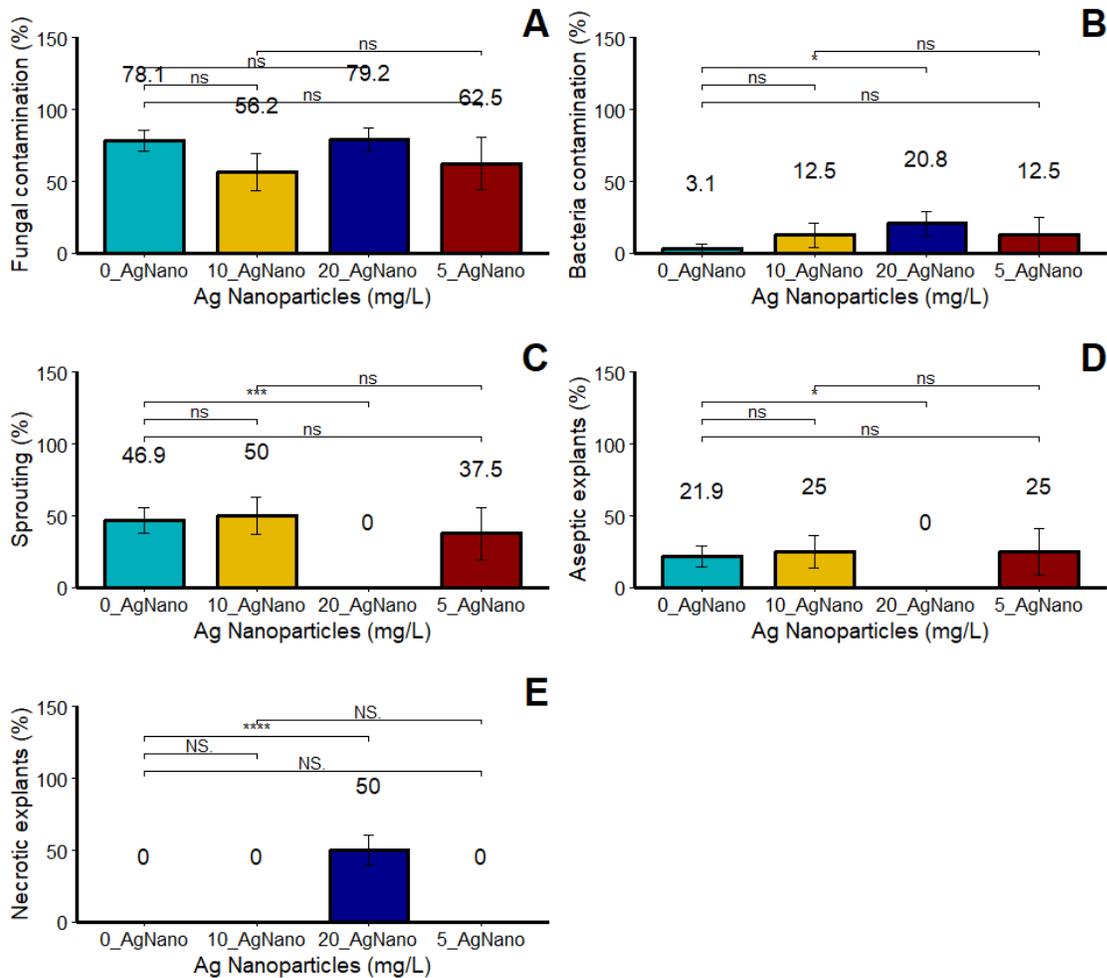
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
0, 0, 0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0),
c(100, 100, 100, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning: Removed 6 rows containing missing values
(`geom_signif()`).
```



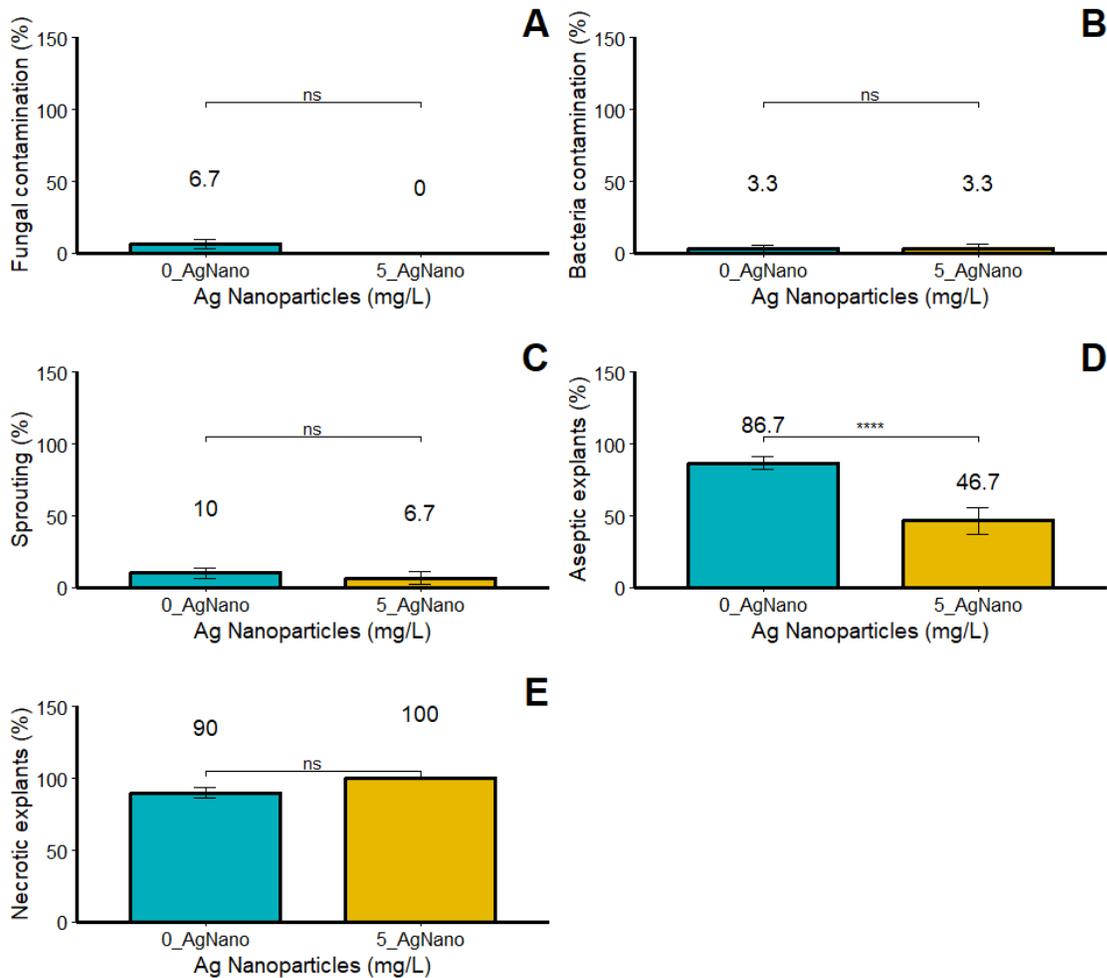
```
ggsave("FigComb_conAq.png", FigComb_conAq, dpi=1000, width = 10,
height = 12, units = "in")
```

```
FigComb_conAq
```

```
## TableGrob (3 x 2) "arrange": 5 grobs
##   z     cells  name      grob
## 1 1 (1-1,1-1) arrange gtable[layout]
## 2 2 (1-1,2-2) arrange gtable[layout]
## 3 3 (2-2,1-1) arrange gtable[layout]
## 4 4 (2-2,2-2) arrange gtable[layout]
## 5 5 (3-3,1-1) arrange gtable[layout]
```

Sin Agroquímicos

```
FigComb_sinAq<- grid.arrange(Hongos_sinAq, Bacteria_sinAq,
Brotos_sinAq, Aseptic_sinAq, Necrotic_sinAq, nrow=3)
```



```
ggsave("FigComb_sinAq.png", FigComb_sinAq, dpi=1000, width = 8,
height = 10, units = "in")
```

```
FigComb_sinAq
```

```
## TableGrob (3 x 2) "arrange": 5 grobs
##   z     cells  name      grob
## 1 1 (1-1,1-1) arrange gtable[layout]
## 2 2 (1-1,2-2) arrange gtable[layout]
## 3 3 (2-2,1-1) arrange gtable[layout]
## 4 4 (2-2,2-2) arrange gtable[layout]
## 5 5 (3-3,1-1) arrange gtable[layout]
```

R Markdown

This is an R Markdown presentation. Markdown is a simple formatting syntax for authoring HTML, PDF, and MS Word documents. For more details on using R Markdown see <http://rmarkdown.rstudio.com>.

When you click the **Knit** button a document will be generated that includes both content as well as the output of any embedded R code chunks within the document.

Slide with Bullets

Bullet 1

Bullet 2

Bullet 3

## Brotación

Jason Pérez

2022-06-13

1. Establecer el directorio de trabajo

Donde se guarda el trabajo, los gráficos y documentos producidos

2. Acomodar los datos para su análisis

a- Cargar datos desde excel

```
library(readxl)

## Warning: package 'readxl' was built under R version 4.3.1

multi <- read_excel("multi.xlsx",
                    sheet= "Hoja1", col_types = c("text", "numeric", "numeric"))

multi

## # A tibble: 146 × 3
##   Medium Sprouting Necrotic
##   <chr>          <dbl>    <dbl>
## 1 1_KIN           0      100
## 2 1_KIN           0      100
## 3 1_KIN           0      100
## 4 1_KIN           0      100
```

```
## 5 1_KIN      0      100
## 6 1_KIN      0      100
## 7 1_KIN      0      100
## 8 1_KIN      0      100
## 9 1_KIN      0      100
## 10 1_KIN     0      100
## # i 136 more rows
```

b- Revisar la estructura de los datos:

```
str(multi)

## tibble [146 × 3] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Medium : chr [1:146] "1_KIN" "1_KIN" "1_KIN" "1_KIN" ...
## $ Sprouting: num [1:146] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Necrotic : num [1:146] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 ...
```

c- Convertimos a factor lo correspondiente:

y corroboramos revisando de nuevo la estructura de los datos

```
multi$Medium<-as.factor(multi$Medium)

str(multi)

## tibble [146 × 3] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Medium : Factor w/ 5 levels "0.5_AG3", "1.5_AG3", ...: 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 ...
## $ Sprouting: num [1:146] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Necrotic : num [1:146] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 ...
```

Ahora sí, los factores del experimento y las variables de respuesta están correctamente asignadas.

d- Exploración de los datos:

##tablas de frecuencia datos con agroquímicos##

```
table(multi$Sprouting, multi$Medium)

##
##      0.5_AG3 1.5_AG3 1.5_KIN 1_AG3 1_KIN
## 0          54      8       11    11    28
## 100         6       8        5    13     2

table(multi$Necrotic, multi$Medium)

##
##      0.5_AG3 1.5_AG3 1.5_KIN 1_AG3 1_KIN
## 0           2      16       16    24     4
## 100         58       0        0     0    26
```

### 3- Gráficos de barras con la comparación de medias

a- cargar paquetes requeridos para los gráficos

```
library(ggplot2)
## Warning: package 'ggplot2' was built under R version 4.3.1
library(ggpubr)
## Warning: package 'ggpubr' was built under R version 4.3.1
library(ggsignif)
## Warning: package 'ggsignif' was built under R version 4.3.1
library(dplyr)
## Warning: package 'dplyr' was built under R version 4.3.1
##
## Attaching package: 'dplyr'
## The following objects are masked from 'package:stats':
##
##   filter, lag
## The following objects are masked from 'package:base':
##
##   intersect, setdiff, setequal, union
```

b- realizamos los gráficos y los guardamos

b1- gráfico de brotación

```
Brotos<-ggbarplot(multi, x = "Medium", y="Sprouting", fill = "Medium",
                  palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue", "darkred", "cyan"),
                  add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
                  xlab = "Medium + PGR (mg/L)",
                  ylab = "Sprouting (%)")+
  ggtitle("A")+
  stat_compare_means(comparisons = list(c("0.5_AG3", "1_AG3"), c("0.5_AG3", "1.5_AG3"), c("0.5_AG3", "1_KIN"), c("0.5_AG3", "1.5_KIN"), c("1_AG3", "1.5_AG3"), c("1_AG3", "1_KIN"), c("1_AG3", "1.5_KIN"), c("1.5_AG3", "1_KIN"), c("1.5_AG3", "1.5_KIN"), c("1_KIN", "1.5_KIN")), p.signif.threshold=.05,label.y = c(65, 72, 79, 86, 93, 100, 107, 114, 121, 128), label = "p.signif", hide.ns = F)+
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust = 1, vjust = -1), axis.line = element_line(size = 1.2),
        strip.text= element_text(size = 13),
        axis.text= element_text(size = 13),
```

```

        axis.title = element_text(size = 14),
    legend.position = "none")+
    scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 135)) +
    stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y.
., 1)),
                position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
3.4,
                color = "black", size = 5)

## Warning: The `size` argument of `element_line()` is deprecated as of g
gplot2 3.4.0.
## i Please use the `linewidth` argument instead.
## This warning is displayed once every 8 hours.
## Call `lifecycle::last_lifecycle_warnings()` to see where this warning
was
## generated.

ggsave("Brotos.png", Brotos, dpi = 1000, height = 5, width = 7, units = "
in")

## Warning: The dot-dot notation (`..y..`) was deprecated in ggplot2 3.4.
0.
## i Please use `after_stat(y)` instead.
## i The deprecated feature was likely used in the ggpubr package.
## Please report the issue at <https://github.com/kassambara/ggpubr/iss
ues>.
## This warning is displayed once every 8 hours.
## Call `lifecycle::last_lifecycle_warnings()` to see where this warning
was
## generated.

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100, 0, 0, 1
00, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100, 0, 0, 1
00, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100, 0, 0, 1
00, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100, 0, 0, 1
00, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100, 0, 0, 1
00, :
## cannot compute exact p-value with ties

```



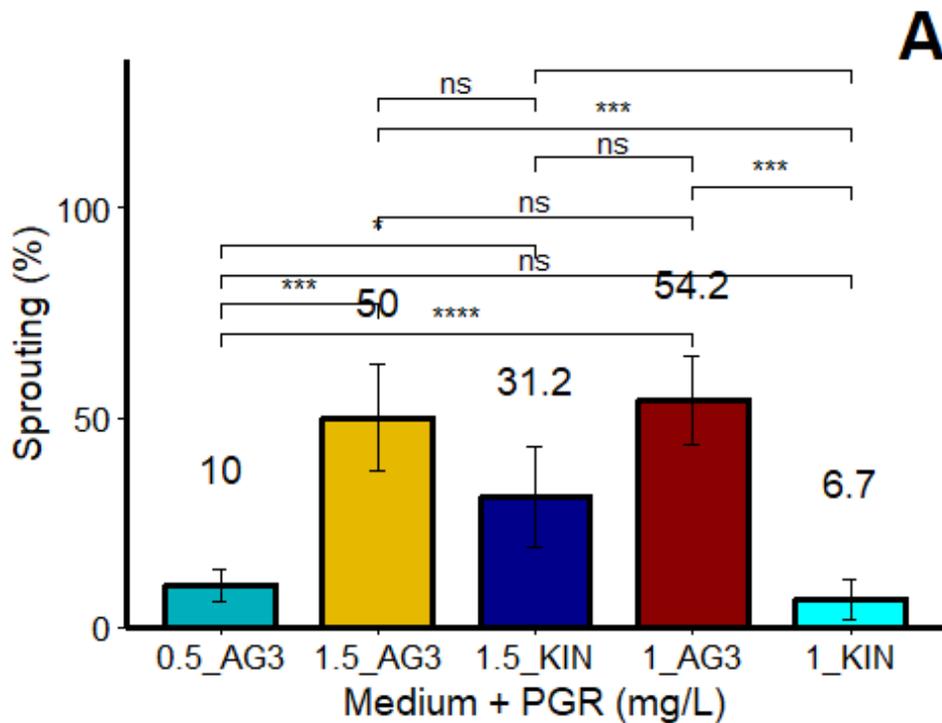


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to multiplication treatments. Response variable: sprouting %"

b1.2- gráfico de necrosis

```
Necrosis<-ggbarplot(multi, x = "Medium", y="Necrotic", fill = "Medium",
  palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue", "darkred", "cyan"),
  add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
  xlab = "Medium + PGR (mg/L)",
  ylab = "Necrosis (%)")+
  ggtitle("B")+
  stat_compare_means(comparisons = list(c("0.5_AG3", "1_AG3"), c("0.5_AG3", "1.5_AG3"), c("0.5_AG3", "1_KIN"), c("0.5_AG3", "1.5_KIN"),c("1_AG3", "1.5_AG3"), c("1_AG3", "1_KIN"), c("1_AG3", "1.5_KIN"), c("1.5_AG3", "1_KIN"), c("1.5_AG3", "1.5_KIN"), c("1_KIN", "1.5_KIN")), p.signif.threshold=.05, label = "p.signif", hide.ns = T)+
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust = 1, vj
ust = -1), axis.line = element_line(size = 1.2),
  strip.text= element_text(size = 13),
    axis.text= element_text(size = 13),
    axis.title = element_text(size = 14),
  legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 135)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y
., 1)),
    position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
3.4,
```

```
color = "black", size = 5)
```

```
ggsave("Necrosis.png", Necrosis, dpi = 1000, height = 5, width = 7, units  
= "in")
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 10  
0, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning: Removed 21 rows containing missing values (`geom_signif()`).
```

```
Necrosis
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0  
, :
```

```
## cannot compute exact p-value with ties
```



```
Prolif <- read_excel("Proliferacion.xlsx",
                    sheet = "Hoja2", col_types = c("text", "text", "numeric",
                                                  "numeric", "numeric",
                                                  "numeric", "numeric",
                                                  "numeric"))
```

Prolif

```
## # A tibble: 1,154 × 8
##   PGR_type      Line PGR_Conc PEM_Presence Necrosis Hyperhydrated Growing_calli
##   <chr>         <chr>   <dbl>     <dbl>     <dbl>     <dbl>
## 1 Thidiazuron 1T1         0         0         100         100
## 2 Thidiazuron 1T1         0         0         100         100
## 3 Thidiazuron 1T1         0         0         100         100
## 4 Thidiazuron 1T1         0         0         100         100
## 5 Thidiazuron 1T2         0         0           0         100
## 6 Thidiazuron 1T2         0         0           0         100
## 7 Thidiazuron 1T3         0         0         100           0
## 8 Thidiazuron 1T3         0        100           0           0
## 9 Thidiazuron 1T3         0         0         100           0
## 10 Thidiazuron 1T3         0        100           0           0
## # ... with 1,144 more rows, and 1 more variable: total <dbl>
```

b- Revisar la estructura de los datos:

```
str(Prolif)
```

```
## tibble [1,154 × 8] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ PGR_type      : chr [1:1154] "Thidiazuron" "Thidiazuron" "Thidiazuro
n" "Thidiazuron" ...
## $ Line         : chr [1:1154] "1T1" "1T1" "1T1" "1T1" ...
## $ PGR_Conc     : num [1:1154] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ PEM_Presence : num [1:1154] 0 0 0 0 0 0 0 100 0 100 ...
## $ Necrosis     : num [1:1154] 100 100 100 100 0 0 100 0 100 0 ...
## $ Hyperhydrated: num [1:1154] 100 100 100 100 100 100 0 0 0 0 ...
## $ Growing_calli: num [1:1154] 100 100 100 100 100 100 0 100 0 100 ...
## $ total       : num [1:1154] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
```

c- Convertimos a factor lo correspondiente:

y corroboramos revisando de nuevo la estructura de los datos

```
Prolif$`PGR_type` <- as.factor(Prolif$`PGR_type`)
Prolif$`Line` <- as.factor(Prolif$`Line`)
Prolif$`PGR_Conc` <- as.factor(Prolif$`PGR_Conc`)
str(Prolif)

## tibble [1,154 × 8] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ PGR_type      : Factor w/ 2 levels "Picloram","Thidiazuron": 2 2 2 2
## $ Line          : Factor w/ 96 levels "1P1","1P10","1P11",...: 21 21 21
## $ PGR_Conc     : Factor w/ 3 levels "0","50","100": 1 1 1 1 1 1 1 1 1
## $ PEM_Presence : num [1:1154] 0 0 0 0 0 0 0 100 0 100 ...
## $ Necrosis     : num [1:1154] 100 100 100 100 0 0 100 0 100 0 ...
## $ Hyperhydrated: num [1:1154] 100 100 100 100 100 100 0 0 0 0 ...
## $ Growing_calli: num [1:1154] 100 100 100 100 100 100 0 100 0 100 ...
## $ total        : num [1:1154] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
```

Ahora sí, los factores del experimento y las variables de respuesta están correctamente asignadas.

d- Exploración de los datos:

##tablas de frecuencia##

```
table(Prolif$PEM_Presence, Prolif$PGR_Conc)
```

```
##
##      0  50 100
## 0    362 214 196
## 100  43 157 182
```

```
table(Prolif$PEM_Presence, Prolif$PGR_type)
```

```
##
##      Picloram Thidiazuron
## 0           447          325
## 100          141          241
```

```
table(Prolif$PEM_Presence, Prolif$Line)
```

```
##
##      1P1 1P10 1P11 1P12 1P13 1P14 1P15 1P16 1P17 1P18 1P19 1P2 1P20 1
## 0      17   15    8   10    8    6   19    7   10    6   11    6   15
## 100    0    0    5    2    6    4    0    1    2    2    0    2    1
## 0      6
```

```

##
##      1P5 1P6 1P7 1P8 1P9 1T1 1T10 1T11 1T12 1T13 1T14 1T15 1T16 1T17
1T18 1T19
##    0    7 14 14 14 20  4  13   7   6   6   1   7   5   6
11    6
##   100  1  0  0  0  1  8   3   2   3   4   5   2   5   3
1    3
##
##      1T2 1T20 1T21 1T22 1T23 1T3 1T4 1T5 1T6 1T7 1T8 1T9 2P1 2P10 2P1
1 2P12
##    0    2  2  4  8  10  3  3 21  7  6  5  5 14  13  1
0   15
##   100  4  3  4  8  6  3  6  0  2  9  8  1  3  5
5    1
##
##      2P13 2P14 2P15 2P16 2P17 2P18 2P19 2P2 2P20 2P3 2P4 2P5 2P6 2P7
2P8 2P9
##    0    7  10  10  7  12  14  16 10  9  6 11  6 14  11
7    9
##   100  9  8  7  12  0  2  0  4  8  7  4  9  2  5
5    6
##
##      2T1 2T10 2T11 2T2 2T3 2T4 2T5 2T6 2T7 2T8 2T9 3P1 3P2 3P3 3T1 3T
10 3T11
##    0    6  0  0  0  5  3  3  2  7  2  2  1  1  2  5
17   5
##   100  6  8  10  6  3  6  0  5  5  2  6  2  2  2  4
0   11
##
##      3T12 3T13 3T15 3T16 3T17 3T18 3T19 3T2 3T20 3T3 3T4 3T5 3T6 3T7
3T8 3T9
##    0    6  11  2  12  10  8  6  7  10  6  9  5 10  2
14  2
##   100  7  6  10  4  6  1  0  7  5  3  0  7  6 11
1   2

```

```
table(Prolif$Necrosis, Prolif$PGR_Conc)
```

```

##
##      0  50 100
##    0  97 221 206
##   100 308 150 172

```

```
table(Prolif$Necrosis, Prolif$PGR_type)
```

```

##
##      Picloram Thidiazuron
##    0      187      337
##   100     401     229

```

```
table(Prolif$Necrosis, Prolif$Line)
```

```

##
##      1P1 1P10 1P11 1P12 1P13 1P14 1P15 1P16 1P17 1P18 1P19 1P2 1P20 1
P3 1P4
##    0    11    7    8    2    11    6    6    5    2    2    3    4    0
4    8
##   100    6    8    5   10    3    4   13    3   10    6    8    4   16
9   10
##
##      1P5 1P6 1P7 1P8 1P9 1T1 1T10 1T11 1T12 1T13 1T14 1T15 1T16 1T17
1T18 1T19
##    0    2    9    6    8    5    4   16    4    6    7    4    9    7    3
0    1
##   100    6    5    8    6   16    8    0    5    3    3    2    0    3    6
12    8
##
##      1T2 1T20 1T21 1T22 1T23 1T3 1T4 1T5 1T6 1T7 1T8 1T9 2P1 2P10 2P1
1 2P12
##    0    6    5    5   11   10    4    5    0    7   11   11    6    2    7
0    0
##   100    0    0    3    5    6    2    4   21    2    4    2    0   15   11   1
5   16
##
##      2P13 2P14 2P15 2P16 2P17 2P18 2P19 2P2 2P20 2P3 2P4 2P5 2P6 2P7
2P8 2P9
##    0    5    2    6    9   12    9    0    1    5    3    2    7    1    0
1    4
##   100   11   16   11   10    0    7   16   13   12   10   13    8   15   16
11   11
##
##      2T1 2T10 2T11 2T2 2T3 2T4 2T5 2T6 2T7 2T8 2T9 3P1 3P2 3P3 3T1 3T
10 3T11
##    0   12    8    9    6    8    9    3    6   12    4    8    1    1    0    4
0    4
##   100    0    0    1    0    0    0    0    1    0    0    0    2    2    4    5
17   12
##
##      3T12 3T13 3T15 3T16 3T17 3T18 3T19 3T2 3T20 3T3 3T4 3T5 3T6 3T7
3T8 3T9
##    0    7   11    8   10   16    1    0    5   10    2    0    7    7   12
4    2
##   100    6    6    4    6    0    8    6    9    5    7    9    5    9    1
11    2

```

```
table(Prolif$Hyperhydrated, Prolif$PGR_Conc)
```

```

##
##      0  50 100
##    0 381 307 280
##   100 24 64 98

```

```
table(Prolif$Hyperhydrated, Prolif$PGR_type)
```

```

##
##      Picloram Thidiazuron
##    0      485      483
##   100     103      83

table(Prolif$Hyperhydrated, Prolif$Line)

##
##      1P1 1P10 1P11 1P12 1P13 1P14 1P15 1P16 1P17 1P18 1P19 1P2 1P20 1
P3 1P4
##    0     7     7     7    10    11    10    13     5     4     8     7     7     5
11 16
##   100  10    8     6     2     3     0     6     3     8     0     4     1    11
2   2
##
##      1P5 1P6 1P7 1P8 1P9 1T1 1T10 1T11 1T12 1T13 1T14 1T15 1T16 1T17
1T18 1T19
##    0     7  10  10  10  15   8  16   4   6   8   6   6   8   9
11   8
##   100   1   4   4   4   6   4   0   5   3   2   0   3   2   0
1   1
##
##      1T2 1T20 1T21 1T22 1T23 1T3 1T4 1T5 1T6 1T7 1T8 1T9 2P1 2P10 2P1
1 2P12
##    0     4     3     8    13    16     6     9    19     9    14    13     3    16    18    1
3    16
##   100   2     2     0     3     0     0     0     2     0     1     0     3     1     0
2     0
##
##      2P13 2P14 2P15 2P16 2P17 2P18 2P19 2P2 2P20 2P3 2P4 2P5 2P6 2P7
2P8 2P9
##    0     14    15    16    19    12    11    16    11    17    12    15    15    16    16
12    15
##   100     2     3     1     0     0     5     0     3     0     1     0     0     0     0
0     0
##
##      2T1 2T10 2T11 2T2 2T3 2T4 2T5 2T6 2T7 2T8 2T9 3P1 3P2 3P3 3T1 3T
10 3T11
##    0     8     8    10     6     8     9     2     7     9     3     4     3     3     4     3
17    16
##   100     4     0     0     0     0     0     1     0     3     1     4     0     0     0     6
0     0
##
##      3T12 3T13 3T15 3T16 3T17 3T18 3T19 3T2 3T20 3T3 3T4 3T5 3T6 3T7
3T8 3T9
##    0     13     9    11     8    11     9     6    14    15     6     9    12    15    11
15     2
##   100     0     8     1     8     5     0     0     0     0     3     0     0     1     2
0     2

table(Prolif$Growing_calli, Prolif$PGR_Conc)

```

```

##
##      0  50 100
##  0  211 80 31
## 100 194 291 347

table(Prolif$Growing_calli, Prolif$PGR_type)

##
##      Picloram Thidiazuron
##  0          201          121
## 100         387          445

table(Prolif$Growing_calli, Prolif$Line)

##
##      1P1 1P10 1P11 1P12 1P13 1P14 1P15 1P16 1P17 1P18 1P19 1P2 1P20 1
P3 1P4
##  0      4    7    5    2    0    2    2    0    1    6    4    1    7
6    0
## 100    13    8    8    10   14    8    17    8    11    2    7    7    9
7   18
##
##      1P5 1P6 1P7 1P8 1P9 1T1 1T10 1T11 1T12 1T13 1T14 1T15 1T16 1T17
1T18 1T19
##  0      2    5    7    5   11    0    3    1    0    2    2    1    0    2
5    7
## 100    6    9    7    9   10   12   13    8    9    8    4    8   10    7
7    2
##
##      1T2 1T20 1T21 1T22 1T23 1T3 1T4 1T5 1T6 1T7 1T8 1T9 2P1 2P10 2P1
1 2P12
##  0      0    0    2    2    7    2    0    8    2    1    5    0    4    3
6   12
## 100    6    5    6   14    9    4    9   13    7   14    8    6   13   15
9    4
##
##      2P13 2P14 2P15 2P16 2P17 2P18 2P19 2P2 2P20 2P3 2P4 2P5 2P6 2P7
2P8 2P9
##  0      0    7    3    4    6    6   16    6    6    3    5    5   13    5
5    5
## 100   16   11   14   15    6   10    0    8   11   10   10   10    3   11
7   10
##
##      2T1 2T10 2T11 2T2 2T3 2T4 2T5 2T6 2T7 2T8 2T9 3P1 3P2 3P3 3T1 3T
10 3T11
##  0      0    0    0    0    0    0    0    0    0    1    0    1    1    2    0
17   3
## 100   12    8   10    6    8    9    3    7   12    3    8    2    2    2    9
0   13
##
##      3T12 3T13 3T15 3T16 3T17 3T18 3T19 3T2 3T20 3T3 3T4 3T5 3T6 3T7

```

```

3T8 3T9
## 0 5 3 3 2 0 8 6 3 0 1 4 2 4 0
7 0
## 100 8 14 9 14 16 1 0 11 15 8 5 10 12 13
8 4

```

```
table(Prolif$total, Prolif$PGR_Conc)
```

```
##
## 0 50 100
## 1 405 371 378
```

```
table(Prolif$total, Prolif$PGR_type)
```

```
##
## Picloram Thidiazuron
## 1 588 566
```

```
table(Prolif$total, Prolif$Line)
```

```
##
## 1P1 1P10 1P11 1P12 1P13 1P14 1P15 1P16 1P17 1P18 1P19 1P2 1P20 1P3
1P4 1P5
## 1 17 15 13 12 14 10 19 8 12 8 11 8 16 13
18 8
##
## 1P6 1P7 1P8 1P9 1T1 1T10 1T11 1T12 1T13 1T14 1T15 1T16 1T17 1T18 1
1T19 1T2
## 1 14 14 14 21 12 16 9 9 10 6 9 10 9 12
9 6
##
## 1T20 1T21 1T22 1T23 1T3 1T4 1T5 1T6 1T7 1T8 1T9 2P1 2P10 2P11 2P12
2P13
## 1 5 8 16 16 6 9 21 9 15 13 6 17 18 15 16
16
##
## 2P14 2P15 2P16 2P17 2P18 2P19 2P2 2P20 2P3 2P4 2P5 2P6 2P7 2P8 2P9
2T1 2T10
## 1 18 17 19 12 16 16 14 17 13 15 15 16 16 12 15
12 8
##
## 2T11 2T2 2T3 2T4 2T5 2T6 2T7 2T8 2T9 3P1 3P2 3P3 3T1 3T10 3T11 3T1
2 3T13
## 1 10 6 8 9 3 7 12 4 8 3 3 4 9 17 16 1
3 17
##
## 3T15 3T16 3T17 3T18 3T19 3T2 3T20 3T3 3T4 3T5 3T6 3T7 3T8 3T9
## 1 12 16 16 9 6 14 15 9 9 12 16 13 15 4
```

```
table(Prolif$PEM_Presence, Prolif$PGR_type, Prolif$PGR_Conc)
```

```
## , , = 0
##
##
##      Picloram Thidiazuron
##  0      200      162
## 100      12      31
##
## , , = 50
##
##
##      Picloram Thidiazuron
##  0      131      83
## 100      56      101
##
## , , = 100
##
##
##      Picloram Thidiazuron
##  0      116      80
## 100      73      109
```

En general, proliferan más en la misma concentración de inducción hay más PEM en TDZ

e- Construimos interacciones para poder realizar las comparaciones:

```
PGR_ty_Cn<-interaction(Prolif$PGR_type,Prolif$PGR_Conc, sep = " ")
PGR_ty_Li<-interaction(Prolif$PGR_type, Prolif$Line, sep = " ")
PGR_Cn_Li<-interaction(Prolif$PGR_Conc, Prolif$Line, sep = " ")
PGR_ty_Cn_Li<-interaction(Prolif$PGR_type, Prolif$PGR_Conc, Prolif$Line,
sep= " ")
```

Gráficos de barras con la comparación de medias

cargar paquetes requeridos para los gráficos

```
library(ggpubr)

## Loading required package: ggplot2

library(ggsignif)

PEMgraf <- ggbarplot(Prolif, x = "PGR_Conc", y = "PEM_Presence", fill= "PGR_type",
                    facet.by = "PGR_type", palette = c("#00AFBB", "#E7B800"),
                    add = "mean_se", width = 0.7, size = 1,
                    xlab = "PGR percentage to proliferate callus (%)",
                    ylab = "PEM Presence in callus (%)") +
stat_compare_means(comparisons = list(c("0", "50"), c("0", "100"),
                    c("50", "100")), label = "p.signif") +
```

```

    labs(fill = "PGR type") +
    ggtitle("A") +
    theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust = 1, vjust = -1),
          axis.line = element_line(size = 1),
          strip.text= element_text(size = 13),
          axis.text= element_text(size = 13),
          axis.title = element_text(size = 14))+
    scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 150)) +
    stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y.
    ., 1)),
                position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
    .5,
                color = "black", size = 5)
ggsave("PEMgraf.png", PEMgraf, dpi = 2000, height = 4, width = 4.5, units
= "in")
PEMgraf

```

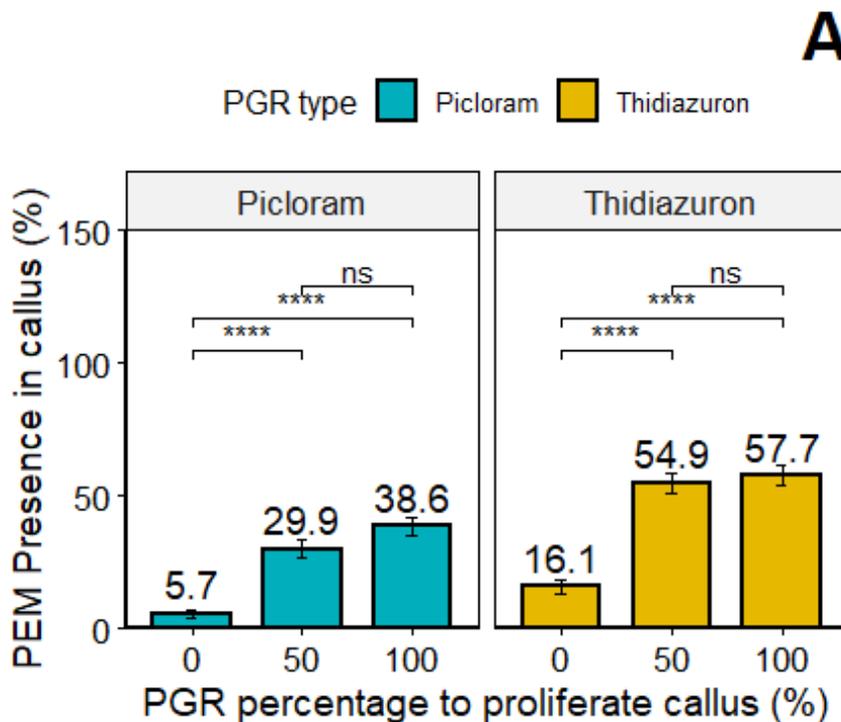


fig.cap="Response of

*H. alchorneoides* calli to proliferation treatments. Response variable: Proembriogenic mases presence %"

```

Necgraf <- ggbarplot(Prolif, x = "PGR_Conc", y = "Necrosis", fill = "PGR_
type",
                    facet.by = "PGR_type", palette = c("#00AFBB", "#E7B8
00"),
                    add = "mean_se", width = 0.7, size = 1,
                    xlab = "PGR percentage to proliferate callus (%)",

```

```

      ylab = "Necrotic calli (%)") +
      stat_compare_means(comparisons = list(c("0", "50"), c("0", "100"),
      c("50", "100")), label = "p.signif") +
      labs(fill = "PGR type")+
      ggtitle("B") +
      theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust = 1,
      vjust = -1),
      axis.line = element_line(size = 1),
      strip.text = element_text(size = 13),
      axis.text= element_text(size = 13),
      axis.title= element_text(size = 14))+
      scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 150)) +
      stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y.., 1))
      ,
      position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -.5,
      color = "black", size = 5)
ggsave("Necgraf.png", Necgraf, height = 4, width = 4.5, dpi= 2000, units = "in")
Necgraf

```

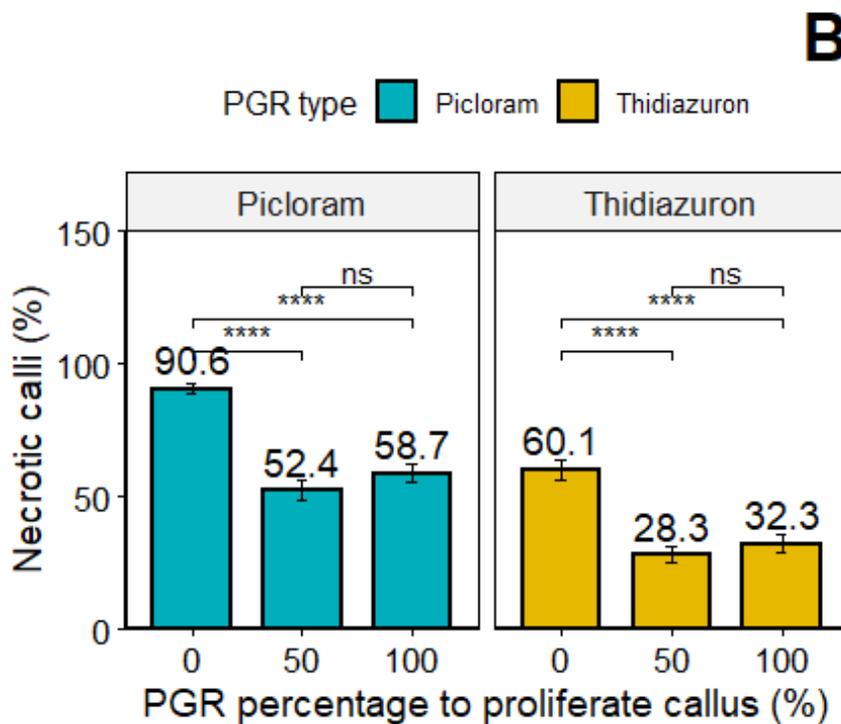


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* calli to proliferation treatments. Response variable: Necrosis %"

```

Hypgraf <- ggbarplot(Prolif, x = "PGR_Conc", y = "Hyperhydrated", fill = "PGR_type",

```

```

facet.by = "PGR_type", palette = c("#00AFBB", "#E7B8
00"),
add = "mean_se", width = 0.7, size = 1,
xlab = "PGR percentage to proliferate callus (%)",
ylab = "Hyperhydrated calli (%)") +
stat_compare_means(comparisons = list(c("0", "50"), c("0", "10
0"), c("50", "100")), label = "p.signif") +
labs(fill="PGR type") +
ggtitle("C") +
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
t = 1, vjust = -1), legend.text = element_text(size=13),
axis.line = element_line(size = 1),
strip.text= element_text(size= 13),
axis.text= element_text(size = 13),
axis.title= element_text(size = 14))+
scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 150)) +
stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y.., 1)
,
position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
.5,
color = "black", size = 5)
ggsave("Hypgraf.png", Hypgraf, dpi= 2000, height = 4, width = 4.5, units
= "in")
Hypgraf

```

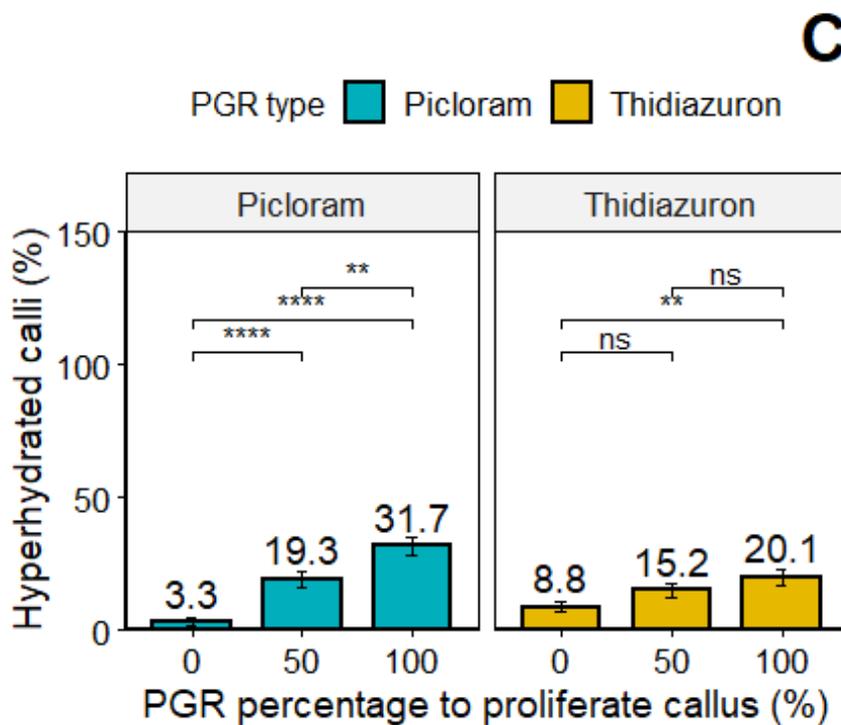


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* calli to proliferation treatments. Response variable: Hyperhydrated calli %"

```

GCgraf <- ggbarplot(Prolif, x = "PGR_Conc", y = "Growing_calli", fill = "
PGR_type", facet.by = "PGR_type", palette = c("#00AFBB", "#E7B800"),
  add = "mean_se", width = 0.7, size = 1,
  xlab = "PGR percentage to proliferate callus (%)",
  ylab = "Growing calli (%)") +
  stat_compare_means(comparisons = list(c("0", "50"), c("0", "
100"), c("50", "100")), label = "p.signif") +
  labs(fill = "PGR type") +
  ggtitle("D") +
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust
t = 1, vjust = -1), legend.text= element_text(size=13),
  axis.line = element_line(size = 1),
  strip.text = element_text(size = 13),
  axis.text = element_text(size=13),
  axis.title= element_text(size=14)) +
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 150)) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y
., 1)),
  position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
.5,
  color = "black", size = 5)
ggsave("CGgraf.png", GCgraf, dpi= 2000, height = 4,width = 4.5, units =
"in")
GCgraf

```

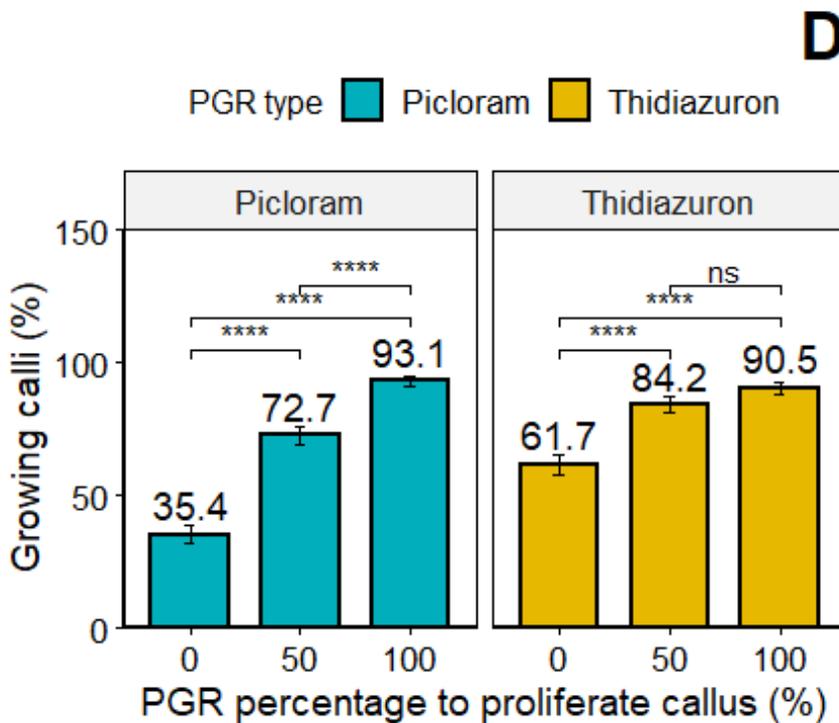
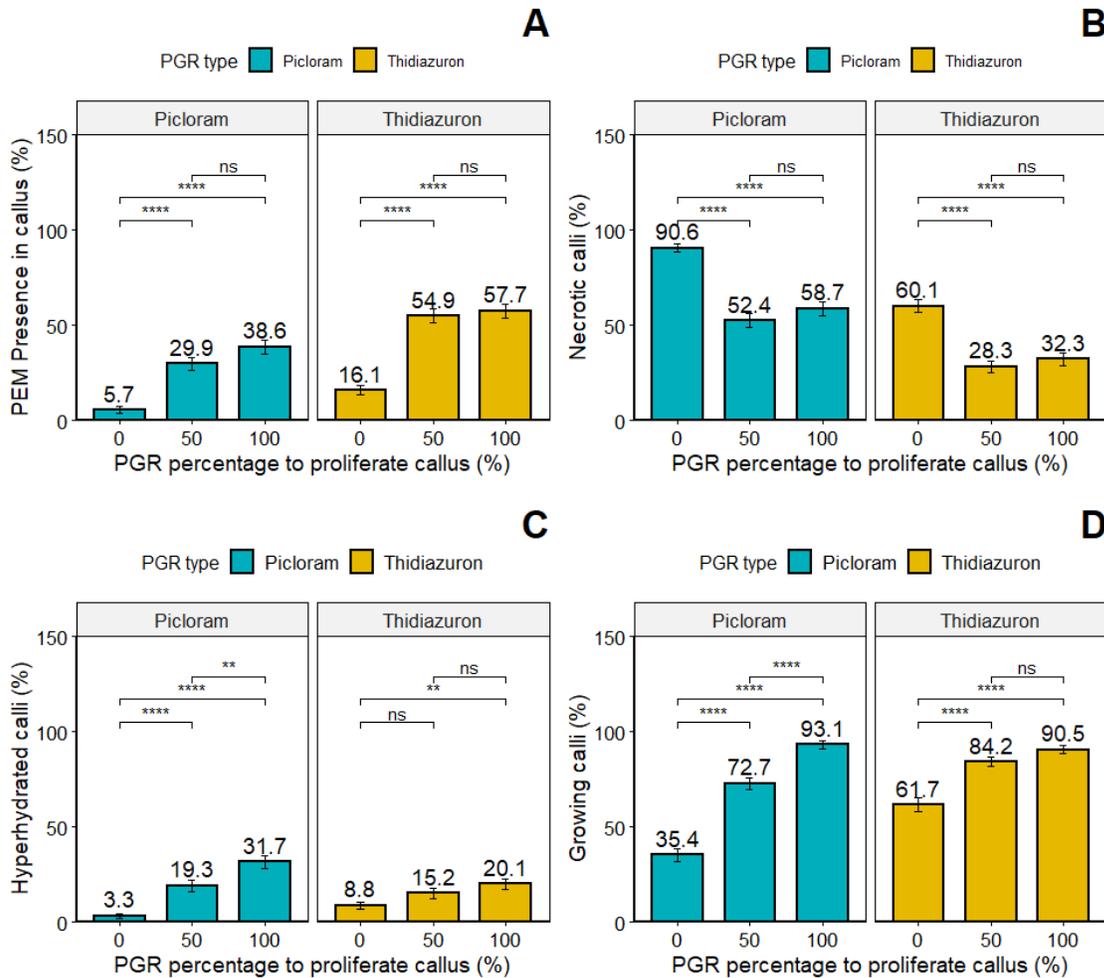


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* calli to proliferation treatments. Response variable: Growing calli"

Combinar los gráficos en una sola figura:

```
library(gridExtra)
```

```
FigComb<- grid.arrange(PEMgraf, Necgraf, Hypgraf, GCgraf, nrow=2)
```



```
ggsave("FigComb.png", FigComb, dpi=1000, width = 10, height = 9, units = "in")
```

Análisis de correlación

Chunk Options

Chunk output can be customized with knitr options, arguments set in the {} of a chunk header. Above, we use five arguments:

- include = FALSE prevents code and results from appearing in the finished file. R Markdown still runs the code in the chunk, and the results can be used by other chunks.
- echo = FALSE prevents code, but not the results from appearing in the finished file. This is a useful way to embed figures.

- `message = FALSE` prevents messages that are generated by code from appearing in the finished file.
- `warning = FALSE` prevents warnings that are generated by code from appearing in the finished.
- `fig.cap = "..."` adds a caption to graphical results.

### Global Options

- To set global options that apply to every chunk in your file, call `knitr::opts_chunk$set` in a code chunk. *Knitr will treat each option that you pass to `knitr::opts_chunk$set` as a global default that can be overwritten in individual chunk header*

## Validación del crecimiento en invernadero

Jason Pérez

2023-05-19

### 1. Establecer el directorio de trabajo

Donde se guarda el trabajo, los gráficos y documentos producidos

### 2. Acomodar los datos para su análisis

#### a- Cargar datos desde excel

```
library(readxl)

## Warning: package 'readxl' was built under R version 4.2.3

invern <- read_excel("invern.xlsx",
                    sheet= "Hoja1", col_types = c("text", "numeric", "num
eric","numeric", "numeric"))

invern

## # A tibble: 180 × 5
##   Origin      Month Growth Survi Survival
##   <chr>      <dbl> <dbl> <dbl>    <dbl>
## 1 Rooted Cuttings 1 1.6 1 100
## 2 Rooted Cuttings 1 0.5 1 100
## 3 Rooted Cuttings 1 0.5 1 100
## 4 Rooted Cuttings 1 2 1 100
## 5 Rooted Cuttings 1 1 1 100
## 6 Rooted Cuttings 1 1.8 1 100
## 7 Rooted Cuttings 1 0.8 1 100
```

```
## 8 Rooted Cuttings      1    0.6    1    100
## 9 Rooted Cuttings      1    1.5    1    100
## 10 Rooted Cuttings     1    1.2    1    100
## # ... with 170 more rows
```

b- Revisar la estructura de los datos:

```
str(invern)

## tibble [180 × 5] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Origin : chr [1:180] "Rooted Cuttings" "Rooted Cuttings" "Rooted C
uttings" "Rooted Cuttings" ...
## $ Month : num [1:180] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Growth : num [1:180] 1.6 0.5 0.5 2 1 1.8 0.8 0.6 1.5 1.2 ...
## $ Survi : num [1:180] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Survival: num [1:180] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 ...
```

c- Convertimos a factor lo correspondiente:

y corroboramos revisando de nuevo la estructura de los datos

```
invern$Origin<-as.factor(invern$Origin)
invern$Month<-as.factor(invern$Month)
str(invern)

## tibble [180 × 5] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Origin : Factor w/ 2 levels "In vitro","Rooted Cuttings": 2 2 2 2
2 2 2 2 2 2 ...
## $ Month : Factor w/ 6 levels "1","2","3","4",...: 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 ...
## $ Growth : num [1:180] 1.6 0.5 0.5 2 1 1.8 0.8 0.6 1.5 1.2 ...
## $ Survi : num [1:180] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
## $ Survival: num [1:180] 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 ...
```

Ahora sí, los factores del experimento y las variables de respuesta están correctamente asignadas.

d- Exploración de los datos:

##tablas de frecuencia datos con agroquímicos##

```
table(invern$Origin, invern$Growth)

##
##           0.5 0.6 0.8 1 1.2 1.3 1.5 1.6 1.8 2 2.3 2.5 2.9 3.5
3.8 4 4.1
## In vitro           0  0  0 1  0  0  1  1  0 2  1  1  1  1
3 1  1
## Rooted Cuttings   2  2  1 1  1  1  1  1  1 1  0  0  0  0
0 0  0
##
##           5.1 5.5 6 6.3 7 8.2 8.6 9 10 10.3 11 11.1 11.3 11.7
```

```

12 12.3
## In vitro      1  3 2  0 1  0  1 1  0  1  0  1  0  1
0  1
## Rooted Cuttings 0  0 0  1 2  1  0 0  1  0  2  0  1  0
2  0
##
##          12.6 13 13.3 13.9 14 14.1 15 15.3 15.6 16.1 16.3 16.
8 16.9 17
## In vitro      0  1  0  0  1  0  1  0  0  0  1
0  0  1
## Rooted Cuttings 1  2  1  1  0  1  2  1  1  1  0
1  1  0
##
##          17.3 17.8 18 18.3 18.6 19.3 19.7 19.9 20 20.3 20.6 2
1 21.3
## In vitro      0  1  1  0  0  0  1  0  0  1  0
0  0
## Rooted Cuttings 1  0  3  1  1  2  1  1  1  0  1
1  1
##
##          22.1 22.2 22.3 23 23.5 23.6 24.3 24.6 25.6 26 26.7 2
6.9 27.9
## In vitro      0  1  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
0  0
## Rooted Cuttings 1  1  1  1  1  1  1  1  1  1  1
1  1

```

```
table(invern$Month, invern$Growth)
```

```

##
##      0.5 0.6 0.8 1 1.2 1.3 1.5 1.6 1.8 2 2.3 2.5 2.9 3.5 3.8 4 4.1 5.1
5.5 6 6.3
## 1  2  2  1 2  1  1  2  2  1 3  0  1  0  1  0  1  0  0
0 0  0
## 2  0  0  0 0  0  0  0  0  0 0  1  0  1  0  2  0  1  0
1 1  1
## 3  0  0  0 0  0  0  0  0  0 0  0  0  0  0  1  0  0  1
1 1  0
## 4  0  0  0 0  0  0  0  0  0 0  0  0  0  0  0  0  0  0
1 0  0
## 5  0  0  0 0  0  0  0  0  0 0  0  0  0  0  0  0  0  0
0 0  0
## 6  0  0  0 0  0  0  0  0  0 0  0  0  0  0  0  0  0  0
0 0  0
##
##      7 8.2 8.6 9 10 10.3 11 11.1 11.3 11.7 12 12.3 12.6 13 13.3 13.9 14
14.1 15
## 1 0  0  0 0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0  0
0 0
## 2 1  1  0 0  1  0  0  0  0  0  1  0  0  1  1  0  0

```

```

1 1
## 3 2 0 0 0 0 0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0
0 1
## 4 0 0 1 1 0 1 1 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0
0 1
## 5 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1
0 0
## 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
##
## 15.3 15.6 16.1 16.3 16.8 16.9 17 17.3 17.8 18 18.3 18.6 19.3 19.7
19.9 20
## 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0
## 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2 0 0 0 0
0 0
## 3 0 1 1 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1 0
0 0
## 4 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1 0 1 0
1 1
## 5 1 0 0 1 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1
0 0
## 6 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 1
0 0
##
## 20.3 20.6 21 21.3 22.1 22.2 22.3 23 23.5 23.6 24.3 24.6 25.6 26 26
.7 26.9
## 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0
## 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0
## 3 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0
## 4 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
0 0
## 5 0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0
0 0
## 6 1 0 0 0 0 1 0 0 1 1 1 0 1 1
1 1
##
## 27.9
## 1 0
## 2 0
## 3 0
## 4 0
## 5 0
## 6 1

```

```
table(invern$Origin, invern$Survival)
```

```
##
##           0 100
## In vitro   54  36
## Rooted Cuttings 31  59

table(invern$Month, invern$Survival)

##
##           0 100
## 1 10  20
## 2 13  17
## 3 13  17
## 4 14  16
## 5 19  11
## 6 16  14
```

### 3- Gráficos de barras con la comparación de medias

a- cargar paquetes requeridos para los gráficos

```
library(ggplot2)
library(ggpubr)
library(ggsignif)
library(dplyr)

##
## Attaching package: 'dplyr'

## The following objects are masked from 'package:stats':
##
##   filter, lag

## The following objects are masked from 'package:base':
##
##   intersect, setdiff, setequal, union

library(gridExtra)

##
## Attaching package: 'gridExtra'

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##   combine
```

b- realizamos los gráficos y los guardamos

b1- gráfico de crecimiento

```
Growth<-ggbarplot(invern, x = "Origin", y="Growth", fill = "Origin",
                  palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue", "darkred", "cyan"),
                  add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
```

```

        xlab = "Month",
        ylab = "Growth (cm)",
        facet.by = "Month")+
  ggtitle("A")+
  stat_compare_means(comparisons = list(c("In vitro", "Rooted Cuttings")))
, p.signif.threshold=.05,label = "p.signif", hide.ns = F, paired = T, lab
el.y = 33, vjust = -.2, bracket.size = .9, tip.length = .1, show.legend =
T, method = "t.test")+
theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust = 1, vjus
t = 1),
      axis.line = element_line(size = 1.2),
      strip.text= element_text(size = 15),
      axis.text= element_text(size = 15),
      axis.title = element_text(size = 17.5),
      legend.position = "top",
      axis.text.x= element_text(angle = 45, hjust = 1),
      plot.margin=unit(c(5,5,5,5), "mm"))+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 40))+
stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y.., 1)),
            position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
1,
            color = "black", size = 5)

ggsave("Growth.png", Growth, dpi = 1000, height = 7, width = 6, units = "
in")

## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_summary).
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_signif).
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_summary).
Growth
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_summary).
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_signif).
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_summary).

```

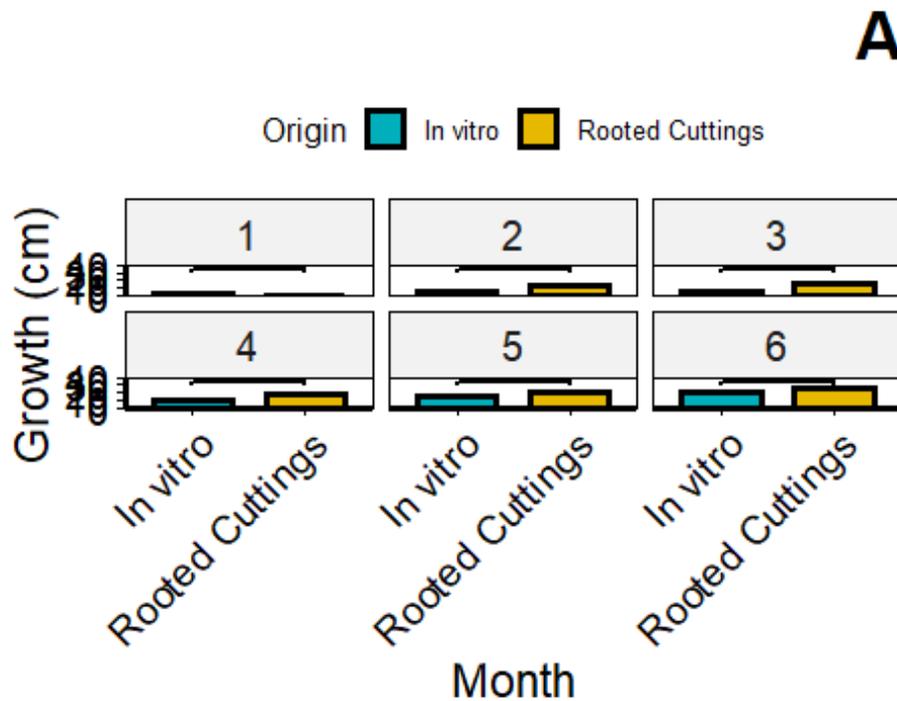


fig.cap="Response of *H. alchorneoides* to growth in greenhouse in response to origin of the material. Response variable: growth

b1.2- gráfico de sobrevivencia

```
Survival<-ggbarplot(invern, x = "Origin", y="Survival", fill = "Origin",
  palette = c("#00AFBB", "#E7B800", "darkblue", "darkred", "cyan"),
  add = "mean_se", width = .7, size = 1.2,
  xlab = "Month",
  ylab = "Survival (%)",
  facet.by = "Month")+
  ggtitle("B")+
  stat_compare_means(comparisons = list(c("In vitro", "Rooted Cuttings")))
, p.signif.threshold=.05,label = "p.signif", hide.ns = F, paired = T, label.y = 110, vjust = -.2, bracket.size = .9, tip.length = .08, show.legend = T)+
  theme(plot.title = element_text(size = 25, face = "bold", hjust = 1, vjust = 1),
  axis.line = element_line(size = 1.2),
  strip.text= element_text(size = 15),
  axis.text= element_text(size = 15),
  axis.title = element_text(size = 17.5),
  legend.position = "top",
  axis.text.x= element_text(angle = 45, hjust = 1),
  plot.margin=unit(c(5,5,5,5), "mm"))+
  scale_y_continuous(expand = c(0, 0), limits = c(0, 130))+
  stat_summary(fun = mean, geom = "text", aes(label = round(..y.., 1)),
```

```

1.8,                                     position = position_dodge(width = 0.9), vjust = -
                                     color = "black", size = 5)

ggsave("Survival.png", Survival, dpi = 1000, height = 7, width = 6, units
= "in")

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with ties

```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with zeroes

Survival

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

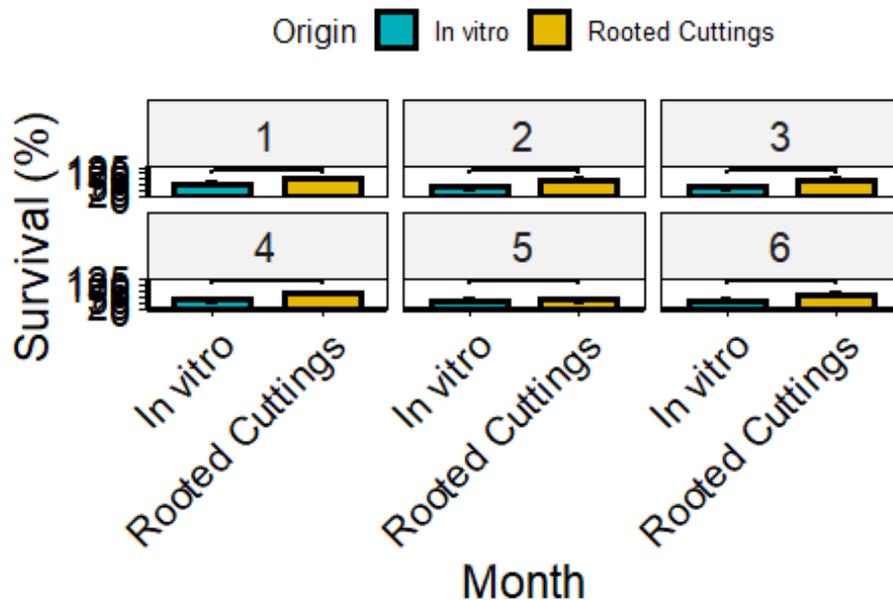
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with zeroes
```

**B**

```
invernadero <- grid.arrange(Growth, Survival, ncol=2)
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_summary).
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_signif).
## Warning: Removed 81 rows containing non-finite values (stat_summary).
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 100, 0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties
```

```
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with ties

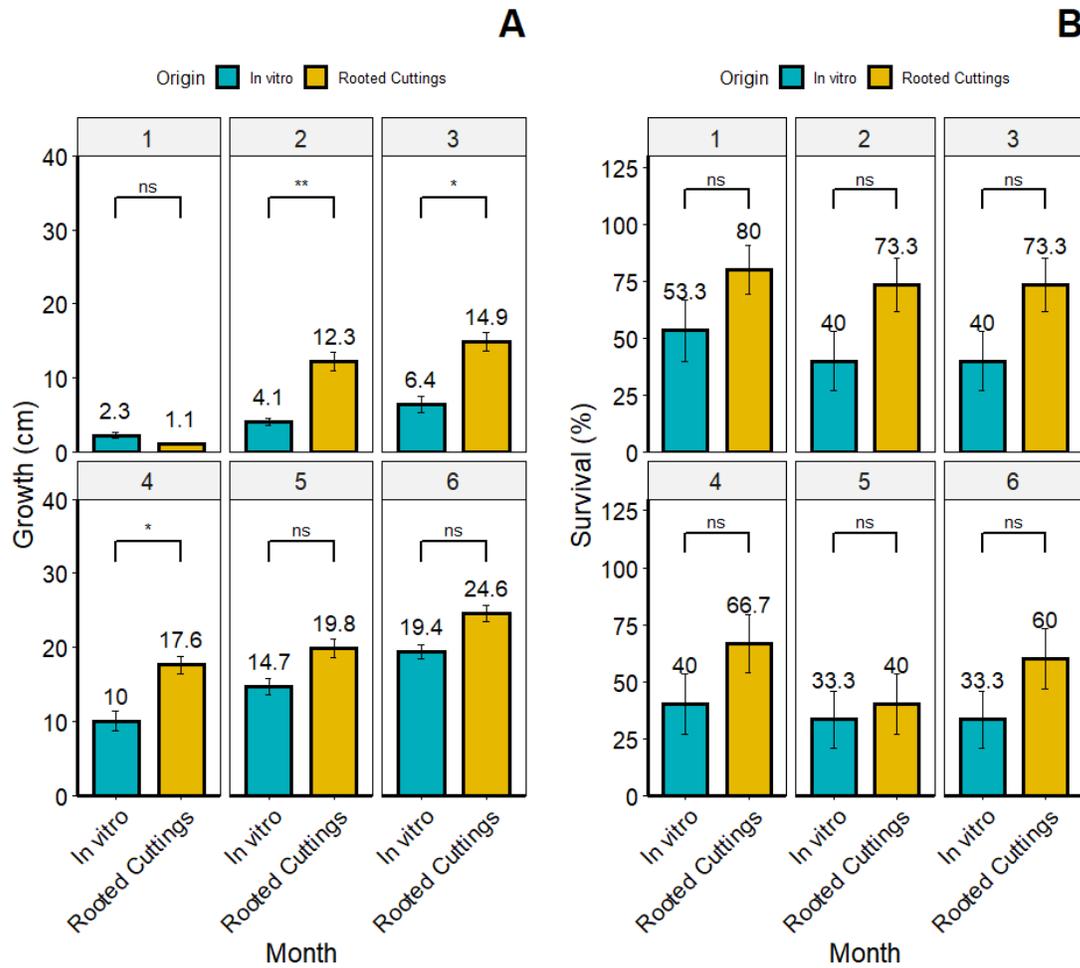
## Warning in wilcox.test.default(c(100, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0,
0, :
## cannot compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with zeroes

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with ties

## Warning in wilcox.test.default(c(0, 0, 0, 100, 0, 100, 0, 100, 0, 0, 0
, : cannot
## compute exact p-value with zeroes
```



```
ggsave("invernadero.png", invernadero, dpi=1000, width = 13, height = 7,
units = "in")
invernadero
```

```
## TableGrob (1 x 2) "arrange": 2 grobs
##   z      cells  name      grob
## 1 1 (1-1,1-1) arrange gtable[layout]
## 2 2 (1-1,2-2) arrange gtable[layout]
```