

**Crecimiento, evaluación morfológica y de la
susceptibilidad a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. &
Broome) en una población de plantas M1 de café (*Coffea
arabica* L.) tratadas con el agente mutagénico Azida de
Sodio en Turrialba, Costa Rica.**

Emmanuel López Gamboa

**Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de
Licenciado en Agronomía.**

**Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Universidad de Costa Rica**

2018

**Crecimiento, evaluación morfológica y de la susceptibilidad a la roya
(*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome) en una población de plantas M1 de café
(*Coffea arabica* L.) tratadas con el agente mutagénico Azida de Sodio en
Turrialba, Costa Rica.**

Emmanuel López Gamboa

**Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo con el grado de
Licenciado en Agronomía.**



DIRECTOR DE TESIS

Andrés Gatica Arias, Ph.D.



MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ana Cecilia Tapia Fernández, M.Sc



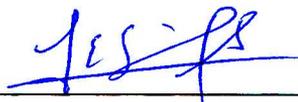
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Miguel Barquero Miranda, M. Sc.



MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Paul Solórzano Cascante, M.Sc



DIRECTOR DE ESCUELA

Luis Gómez Alpizar, Ph.D.



SUSTENTANTE

Emmanuel López Gamboa

DEDICATORIA

A Dios por darme fortaleza e iluminar mi camino en cada momento de dificultad, por estar presente y cuidar a mi familia mientras no estuve.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en todo momento y enseñarme a no darme por vencido. A mi padre por enseñarme tenazmente el sentido de la humildad y el trabajo duro. A mi madre por apoyarme, darme ánimos en cada momento de dificultad e incentivar me a seguir adelante y por tenerme siempre en sus oraciones.

AGRADECIMIENTOS

A Andrés Gatica Arias, quien como mi director de tesis confió en mí y me dio el apoyo moral y académico para llevar a cabo dicho proyecto.

A Ana Tapia Fernández por hacerme formar parte del laboratorio de patología de la sede del atlántico en Turrialba, y a cada uno de los compañeros que fueron parte del desarrollo de mi estancia en dicha ciudad. A cada uno de los revisores de tesis, por sus valiosos aportes.

A cada uno de los trabajadores y trabajadoras de la Finca Experimental Interdisciplinaria de Modelos Agroecológicos (FEIMA) que me ayudaron en cada etapa del proyecto

A Miguel Barquero y al CICAPE por ayudarme a llevar a cabo parte de mis ensayos en sus instalaciones.

A la profesora Gerardina Umaña Rojas por ser una mentora en la formación profesional, por incentivar me a trabajar siempre con excelencia y por aconsejarme en muchas decisiones de peso tanto en la vida personal como profesional.

Una inmensa gratitud a María Felicia “Nani” y a toda su familia, quienes me acogieron como un hijo más y me trataron como tal en la etapa de desarrollo del proyecto.

Contenido

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Resumen	vii
Introducción	1
Antecedentes	5
Genética y origen de la variedad Catuaí	5
Historia de la roya (<i>H. vastatrix</i>) en Costa Rica	5
Mejoramiento genético en café para generar resistencia a enfermedades	7
Inducción de mutaciones como alternativa en programas de mejoramiento genético	8
Uso del azida de sodio como agente mutagénico	9
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Metodología	11
Ubicación experimental	11
Material experimental	12
Preparación del terreno y el sustrato	12
Comportamiento morfológico y fisiológico	12
Inoculación artificial de la roya	14
Recolección de la roya	14
Prueba de germinación del inóculo recolectado	15
Inoculación con roya en plantas de café	15
Inoculación con roya del cafeto sobre hojas desprendidas	16
Evaluación de la severidad de la enfermedad	17
Análisis estadístico	19
Resultados y discusión	20
Efecto en el crecimiento y en la morfología	20
Efecto en las variantes fenotípicas	23
Efecto en las variables fisiológicas	28
Efecto en la incidencia y la severidad de la roya del café	37
Incidencia de la roya en segmentos de hoja	37
Incidencia de la roya en campo	40

Incidencia y severidad de la roya por medio de la inoculación artificial en campo	44
Correlaciones de las variables de crecimiento y susceptibilidad a la roya.....	46
Análisis de Componentes Principales (PCA)	51
Conclusiones	55
Recomendaciones	56
Referencias.....	57
Anexos.....	65

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujos del ciclo de la roya de <i>Hemileia vastatrix</i> (línea continua) y factores que lo afectan (línea discontinua); tomado de: Avelino y Rivas, 2014.	6
Figura 2. Condiciones climáticas de temperatura y precipitación con respecto a los grados día acumulados, en la parcela experimental (FEIMA), durante el período de experimentación, en flechas representado las fechas de evaluación.....	11
Figura 3. Escala estándar del área de la severidad de la roya (<i>H. vastatrix</i>) del café (<i>Coffea spp.</i>). Capucho et al. 2011.....	18
Figura 4. Valores promedio para A: altura de la planta (cm), B: número de hojas, C: número de ejes plagiotrópicos (bandolas), D: número de nudos ortotrópicos (pisos) y E: diámetro del tallo (grosor), para el total de la población de plantas mutantes M1 y los testigos no mutados de la variedad Catuaí. * <i>Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)</i>	22
Figura 5. Frecuencia de anomalías observadas en la población M1 de plantas tratadas con el agente mutagénico azida de sodio, para cada una de las evaluaciones. ...	25
Figura 6. Malformaciones y características diferenciadoras en plantas evaluadas en campo según su crecimiento. A: doble tallo, B: hoja pequeña, C: hoja alargada, D: hoja pigmentada, E: hoja corrugada o deforme, F: bandola con diferenciales en tamaño en una misma planta o con más de dos hojas por nudo, G: malformaciones en nudo ortotrópico u horqueta (tres hojas y ejes plagiotrópicos (bandolas) por nudo), H: planta diferenciada en crecimiento.	26
Figura 7. Unidades SPAD de la población de plantas tratadas con el agente mutagénico azida de sodio (U.SPAD) y de los testigos no tratados con el mutagénico (U.SPAD-T) como comparadores. Para cada una de las evaluaciones (EV1, EV2, EV3). * <i>Letras</i>	

distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).....29

Figura 8. Comportamiento de la frecuencia relativa del promedio de las unidades SPAD de la población de plantas M1 tratadas con el mutagénico azida de sodio.31

Figura 9. Conductancia estomática (g_s) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para la muestra de 155 plantas del total de la población M1 tratadas con el agente mutagénico azida de sodio. Señalado en flechas las plantas testigo no tratadas con el mutagénico.32

Figura 10. Conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) según las horas de análisis para una muestra 155 plantas del total de la población M1 tratadas con el agente mutagénico azida de sodio.34

Figura 11. Valores del contenido relativa de agua (CRA) para una muestra de 155 plantas tratadas con el agente mutagenico azida de sodio. Señalado en flechas las plantas testigo no tratadas con el mutagénico.35

Figura 12. Área foliar de una muestra de 155 plantas de la población, tratados con el mutagénico azida de sodio. Señalado en flechas las plantas testigo no tratadas con el mutagénico.37

Figura 13. Promedio de la incidencia de la enfermedad en segmentos de hoja, según los días después de la inoculación (DDI) y su período de incubación, en una muestra de 155 plantas tratadas con el mutagénico más controles, llevado a cabo en el CICAFFE, Heredia.
**Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)*38

Figura 14. Promedio de las 5 evaluaciones de la incidencia de roya en segmentos de hoja, para una muestra de 155 plantas de la población tratados con el mutagénico azida de sodio, marcado con flechas los testigos no tratados con el mutagénico y en rojo testigos de variedades resistentes a la roya.39

Figura 15. Incidencia de la roya en cada una de las evaluaciones de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio, para la primera (EV1), segunda (EV2) y tercera (EV3) evaluación.....41

Figura 16. Incidencia de la roya en los testigos ubicados en el campo, para las evaluaciones de la primera (EV1), segunda (EV2) y tercera (EV3) evaluación.42

Figura 17. Valore de incidencia y severidad de roya en campo a los 30 días (A) y a los 45 días (B) de realizado la inoculación. Plantas sin respuesta a la roya (0.00), presencia de roya esporulada (1.00) y presencia de síntomas en plantas (2.00).45

Figura 18. Correlaciones entre las variables de altura (ALT_1), número de hojas (N-HOJ_1), número de ejes plagiotrópicos (bandolas) (N-BAN_1), diámetro del tallo (grosor) (GROS_1) y unidades SPAD (SPAD_1), para la población de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio, para la primera evaluación A, para la segunda evaluación B y para la tercera evaluación C.	48
Figura 19. Correlaciones de las variables de conductancia estomática (COND_EST), promedio de los valores SPAD (PROMSpad), contenido relativo de agua (CRA), área foliar (AFOL), número de hojas (N_HOJ_3) y diámetro del tallo (grosor) (GROS_3), de una muestra de 155 plantas del total de la población.....	49
Figura 20. Correlación de las variables de crecimiento con respecto a la severidad de la roya (SEV_RY) con mayor valor de correlación, para una muestra de 155.	50
Figura 21. Correlación de las variables de crecimiento con respecto a la incidencia de la roya, con mayor valor de correlación, para una muestra de 155 plantas de la población.	51
Figura 22. Análisis de componentes principales (PCA) para las variables de crecimiento de la población de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.....	52
Figura 23. Análisis de componentes principales (PCA) para variables de crecimiento y morfología, para una muestra de 155 plantas de la población tratada con el agente mutagénico azida de sodio.	53
Figura 24. Círculo de correlaciones del análisis de componentes principales de las variables evaluadas en la población de plantas.....	54

Índice de tablas

Tabla 1. Representación de los grados día acumulados como indicador de la tasa de desarrollo para cada una de las evaluaciones, así como los días después de la siembra y el mes de evaluación.	13
Tabla 2. Descripción de la escala de Eskes para el desarrollo de la roya en café (Rozo y Cristancho 2010).	18

Resumen

El café es el segundo producto más comercializado a nivel mundial después del petróleo. Millones de familias dependen de la actividad económica del café, los cuales se ven afectados por la volatilidad de los precios y en los últimos años por plagas y enfermedades. La principal enfermedad del café es la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome) la cual ha generado pérdidas de producción de hasta 20 y 30% e incrementos de costos entre 10 y 20%. En los programas de mejoramiento genético se ha optado por el uso de mutaciones para generar de forma puntual cambios con la posibilidad de mejorar características sin irrumpir el resto del genotipo. El uso de agentes mutagénicos como el azida de sodio, crea cambios puntuales al alterar genes al romper cromosomas con variantes específicas para poder mejorar el cultivo.

Con el objetivo de evaluar una población de plantas de café M1 (*Coffea arabica* L.) tratada con el agente mutagénico azida, se seleccionaron 710 individuos más 10 testigos sin la aplicación del mutagénico y se sembraron en la Finca Experimental Interdisciplinaria de Modelos Agroecológicos (FEIMA) de la Universidad de Costa Rica, en Turrialba.

Para la altura de la planta se observó un crecimiento de 5 cm por mes. El número de las hojas tuvo un aumento promedio por planta de 15 hojas por mes. El diámetro del tallo presentó un crecimiento de 0,55 cm entre la primera y la segunda evaluación y de un 0,1 cm entre la segunda y la tercera evaluación. Se realizó un análisis de frecuencia de malformación observadas en la población de plantas, donde se observó: color del brote nuevo (bronce), malformaciones en bandola, nudo ortotrópico u horqueta, malformación en planta completa, hoja alargada, hoja pequeña, hoja corrugada, hoja pigmentada, tallo doble o múltiple. La característica que se expresa en un porcentaje menor es el color del brote con un valor de 0.3%, la de mayor valor porcentual es la de tallo doble que alcanza un 4%. La característica del crecimiento de tres ejes plagiotrópicos (bandolas) por nudo representa una característica importante en la productividad de la planta.

Las unidades SPAD tuvieron valores mínimos por debajo de las 40 Unidades y el mayor rango de valores se observó en los 62.33 unidades SPAD. La conductancia estomática tuvo valores mínimos de $42,6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y valores máximos de $663,9 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para el contenido relativo de agua se encontró un valor promedio de 95,18%. El área foliar presenta valores mínimos de $26,57 \text{ cm}^2$ y valores máximos de $88,19 \text{ cm}^2$.

Para las evaluaciones de incidencia de la roya en laboratorio (segmentos de hojas) y de los datos de incidencia en campo se obtuvieron plantas que presentaron incidencia cero: 179, 240, 631. Se realizó una inoculación en campo y se determinó la severidad a los 30 y 45 días, en el primer caso con valores entre el 3 y el 12%, en el segundo caso los valores se observaron en un rango desde el 5% al 50%.

Se realizaron análisis de correlación para diferentes variables de crecimiento, donde las que presentaron un mayor grado fueron entre la altura de la planta con el número de hojas, el número de ejes plagiotrópicos (bandolas) y el diámetro del tallo (grosor), con valores entre 0.80 y 0.90. Los valores de severidad de la roya se correlacionaron más con las unidades SPAD y la incidencia de la roya se correlacionó más con el diámetro del tallo (grosor). Por medio de un análisis de componentes principales se determinó las plantas que son diferentes del resto de la población (743 plantas): 30, 89, 201, 258, 580, 605 y 642. Y se realizó el mismo PCA para la muestra de las 155 plantas de la población, donde se encontraron plantas diferentes: 22, 56, 109, 123 y 135.

Introducción

El café es una de los productos más comercializados en el mundo. Millones de personas dependen directa o indirectamente de la producción y venta del café para subsistir y generar grandes ingresos para los países productores. El café en el mercado mundial presenta precios volátiles y cambios en la cantidad producida; en algunos países representa hasta el 50% de los ingresos por exportación (Bustillo y Villacorta 1994; ICAFE 2017; Alzate 2015).

Según reportes de la OIC, la producción mundial del café es abastecida por dos especies: para las cosechas 2015-16 y 2016-17, el 61.4% correspondió a la especie Arábica y el 38.6% a la especie Robusta. Para la cosecha 2016-2017 la producción mundial de café Arábica alcanzó un total de 101.55 sacos de 60 kg, lo cual representa un 14.7% superior de la cosecha anterior, mientras que la especie Robusta alcanzó un total de 55.88 millones de sacos de 60 kg, un 12.2% menos (ICAFE 2017).

Además, el consumo de café ha aumentado establemente durante los últimos 7 años, crecimiento se denota más fuerte en Asia y Oceanía, con una tasa media anual del 3.1%, junto con el crecimiento importante de un 1.0 % en Norteamérica (ICAFE 2017). Costa Rica se ubica como país productor dentro del grupo de “otros suaves”, grupo conformado por 22 países de todos los bloques continentales. Conjuntamente aportan el 22.07 % de las exportaciones mundiales para el 2017, con un incremento en la producción de 15.64 % con respecto al periodo anterior (ICAFE 2017).

Según el censo nacional en Costa Rica en el 2014, el cultivo de café representó una extensión de 84,133.1, comparado con el año 2012 la actividad experimentó una disminución de 9,641.1 hectáreas. La producción de café para el 2016-2017 disminuyó en un 17.6 por ciento con respecto a la cosecha anterior, la cual se convirtió en la más baja experimentada en por el sector desde la cosecha de 1976-1977, y con respecto a la cosecha más baja recientemente registrada del año 2014-2015, sin embargo bajo las predicciones del CICAPE, para el año 2018

se esperaba un aumento del 14.31 por ciento con respecto al año anterior (ICAPE, 2017).

El café es uno de los cultivos principales en Costa Rica, en su totalidad de tipo arábico (*Coffea arabica* L.), que forma parte del grupo de “otros suaves”, considerado entre los mejores del mundo (Jiménez 2013; Mora 2008, citado por Vargas 2016). Esta variedad tiene origen en las tierras altas del sureste de Etiopía, la cual es considerada alotetraploide segmentaria, es autógamo y presenta una variación fenotípica relativamente pequeña. La calidad de la bebida de esta variedad es superior a otras especies de café cultivadas (Moncada y McCouch 2004).

C. arabica es altamente susceptible a la roya del cafeto o roya anaranjada causada por el basidiomiceto *Hemileia vastatrix*, es la principal enfermedad del café. Se encuentra distribuida en todas las áreas de producción en el mundo, causando pérdidas de producción de hasta 20 y 30% y costos entre 10 y 20% (Romero et al. 2010; Cristancho et al. 2007; Sera et al. 2007; Gonzales 2009, citado por Alzate 2015, Virginio y Astorga 2015).

Esta enfermedad ha mostrado diferente comportamiento según el clima, influenciado por los factores climáticos de temperatura y precipitación. En Costa Rica el cambio más drástico se dio debido al cambio en el patrón normal de lluvias, que disminuyó a partir de junio del 2012, cuando se presentó el mayor daño económico para el país. El ataque de la roya generó fuertes defoliaciones y pérdidas de cosecha provocadas por la baja en la calidad y la caída del fruto en el periodo 2013-2014 (Barquero 2013).

Para el desarrollo de la enfermedad se deben de presentar una serie de parámetros a nivel ambiental como cambios en el régimen de lluvias y el rocío, la temperatura y la altitud, la carga fructífera, el periodo de cosecha y la sombra. Los cuales según su comportamiento pueden favorecer el desarrollo de la roya (Avelino y Rivas, 2014).

Por medio del descubrimiento del “Híbrido de Timor”, intraespecífico entre *Coffea canephora* y *Coffea arabica*, este ha sido un factor clave en los programas de mejoramiento genético. Muchos países a partir de sus centros de investigación junto con CIFC (Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeeiro, en Portugal), han desarrollado cultivares locales de café resistentes a la roya como: Oeiras, Tupi, Obata, Iapar59 (Brasil), Catrenic (Nicaragua), Costa Rica 95 (Costa Rica), Ihcafe 96 y Lempira (Honduras), Catisic (El Salvador), Mida 96 (Panamá), variedad Colombia y Castillo (Colombia) (Avelino et al. 2015).

Sin embargo, algunos cultivares han perdido la resistencia a la roya, lo que confirma que esta enfermedad puede evolucionar (Avelino et al. 2015), lo cual sugiere la posibilidad de una reproducción sexual oculta o criptosexualidad, que se da dentro de las esporas de *H. vastatrix* (Carvalho et al. 2011).

A finales de la epidemia de la roya del 2012-2013, solo las razas XXIV (v2, v4, v5) y XXXVI (v2, v4, v5, v8), fueron identificadas en Costa Rica (por el ICAFE y el CIFC), en genotipos susceptibles a la raza II (circular n° 2139 del 1° de agosto del 2013). Una hipótesis es que esto no fue causa de la epidemia, sino una consecuencia, donde una severa epidemia significa una alta población del patógeno, muchos eventos de multiplicación y por ende un amplio número de eventos de mutación y como consecuencia una alta probabilidad de tener nuevas razas (McDonald y Linde 2002).

Probablemente un nuevo enfoque es necesario, donde una posibilidad novedosa puede implicar plantas de café con resistencia total y parcial para controlar la enfermedad (McDonald y Linde 2002). Como parte de los esfuerzos en búsqueda de técnicas no convencionales de mejoramiento genético para prevenir la susceptibilidad a enfermedades, se cuenta con herramientas de mejoramiento, con las cuales se puede realizar hibridación, recombinación y mutación (Gutiérrez et al. 2003).

Las mutaciones son una alternativa porque forman un papel muy importante al incrementar la seguridad alimentaria mundial, debido al aumento en la

productividad de cultivos (Srivastava *et al.* 2011). La importancia del uso de mutaciones es la posibilidad de mejorar una o dos características sin cambiar el resto del genotipo. El uso de esta técnica se ha usado ampliamente en programas de mejoramiento de cultivos como trigo, arroz, cebada, algodón, maní, vigna, tomate (Al-Qurainy y Khan 2009, Laskar *et al.* 2016). El uso de agentes mutagénicos como el azida de sodio y el etil metanosulfonato (EMS) generan mutaciones puntuales, cuya importancia radica en la obtención de variantes específicas que provocan mejoras en las características de un cultivo.

Vargas (2016) realizó trabajos con los agentes mutagénicos azida de sodio y etil metanosulfonato para diseñar un protocolo y verificar la posibilidad de conseguir variantes en el cultivo de café para la variedad Catuaí. La posibilidad de generar variantes con respecto a la resistencia a enfermedades como la roya en el cultivo de café podría generar la seguridad en el sector, al aumentar productividad y reducir costos. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende evaluar una población M1 de plantas de café (*Coffea arabica* L.) luego de ser inducidas a mutación con el agente azida de sodio, donde es posible encontrar cambios a nivel morfológico, fisiológico o la susceptibilidad a enfermedades como la roya (*Hemileia vastatrix*). Con el fin de generar variantes en la variedad e introducir la posibilidad de características diferenciadoras en programas de mejoramiento genético.

Antecedentes

Genética y origen de la variedad Catuaí

La especie de café *C. arábica* L. es la única tetraploide, la cual posee cuatro conjuntos del número básico cromosómico del género ($n=11$), en total 44 cromosomas, por lo tanto el modo de reproducción de este género es autógamo, el cual indica que la reproducción se da principalmente por autofecundación (en un 90-95%), al unir polen y óvulo de su propia planta. Debido a esto, las variedades de café arábico presentan una gran uniformidad genética y muestran gran susceptibilidad a diferentes enfermedades y plagas (Franca 2004, Barquero 2013).

La variedad Catuaí es el resultado del cruce artificial de los materiales seleccionados de “Caturra Amarelo” de porte bajo y “Mundo Novo”, el resultado es una planta bastante rústica y productiva de porte bajo con entrenudos cortos y facilidad de manejo, las ramificaciones secundarias y terciarias son abundantes. Esta planta es susceptible a la roya del café y tiene un agotamiento mayor después de producción (Franca 2004; Barquero 2013; Herrera et al 2002, citado por Vargas 2016).

Historia de la roya (*H. vastatrix*) en Costa Rica

En Costa Rica, la roya ingresó en 1983, en ese momento ya se tenían materiales vegetales y estudios para el buen control de la roya bajo condiciones de manejo de la enfermedad en el país. Tras subsistir alrededor de 30 años, la enfermedad ha mostrado diferente comportamiento según la época, lo cual está influenciado por los factores climáticos de temperatura y precipitación. El ataque de la roya provoca fuertes defoliaciones y pérdidas de cosecha provocadas por la baja en la calidad y la caída del fruto. El agotamiento prematuro disminuye el potencial de cosecha para los años siguientes (Barquero 2013).

El ciclo biológico de la roya (*H. vastatrix*) inicia con el proceso de liberación y deposición de la espora en la hoja de café, luego se da la esporulación y la infección. Los síntomas se presentan con la aparición de manchas de color amarillo pálido en la parte superior de las hojas, aumentan de tamaño

gradualmente hasta producir esporulaciones en el envés de las hojas, llamadas uredosporas, las cuales corresponden a las estructuras reproductivas del hongo (Rivillas *et al.* 2011, citado por Alzate 2015 y Virginio y Astorga 2015).

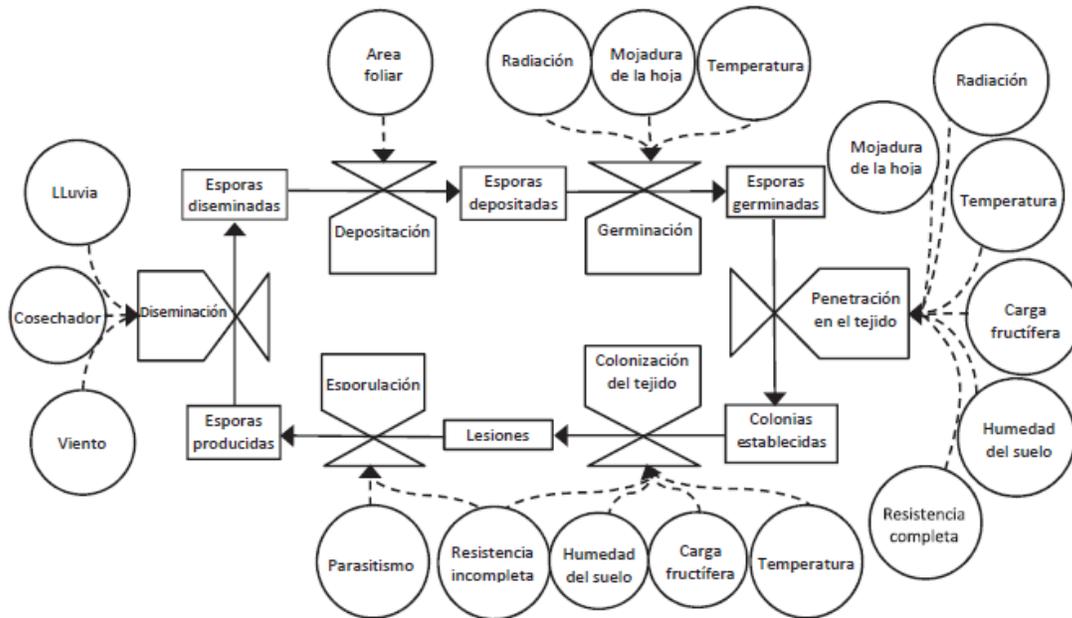


Figura 1. Diagrama de flujos del ciclo de la roya de *Hemileia vastatrix* (línea continua) y factores que lo afectan (línea discontinua); tomado de: Avelino y Rivas, 2014.

Algunos cambios en el microclima y en la fisiología de la planta influyen en los diferentes componentes del ciclo de infección de la roya del café, de esta forma los factores que afectan la roya se encuentran representados en la Figura 1. donde la representación es iniciada con la diseminación, el cual se divide en liberación y dispersión y se da la deposición sobre la hoja. La germinación constituye la siguiente etapa y marca el inicio de la etapa infecciosa (Avelino y Rivas, 2014).

La penetración es el siguiente paso, a través de los estomas, donde se dan relaciones tróficas entre el hongo y el hospedero y se inicia la infección. Los primeros síntomas visuales se dan cuando se da la colonización de la hoja por medio de las hifas. A este proceso, desde la germinación hasta y la aparición de

los primeros síntomas se conoce como el periodo de incubación. A partir de este momento, cuando se da la producción de nuevas uredosporas, se conoce como la etapa de esporulación. El tiempo que transcurre entre el inicio de la germinación y la esporulación es el periodo de latencia, este representa una de las variables de mayor importancia, ya que entre más corto sea este más rápido podrá repetirse el ciclo y más grave será la epidemia (Avelino y Rivas, 2014).

La mayor infección se da por el envés de la hoja debido a una mayor densidad estomática, donde el tiempo de germinación de la espóra oscila entre 20 a 40 días, la esporulación es favorecida por la presencia de agua libre al menos por seis horas, temperaturas entre los 21-25 °C y condiciones de oscuridad (Barquero 2013; Sagarpa 2013, citado por Virginio y Astorga 2015).

El potencial evolutivo de una especie está determinado por cinco factores: tasa de mutación (a mayor tasa, mayor mutación), tamaño de la población (a mayor tamaño mayor número de eventos de mutación), flujo de genotipos (a mayor capacidad de dispersión, mayor probabilidad de que los nuevos genotipos encuentren las condiciones favorables), sistema de reproducción (la presencia de reproducción sexual y asexual favorece la diversificación por recombinación y la multiplicación de estos recombinantes en grandes números) y presión de selección (deben de haber condiciones que seleccionen los nuevos genotipos). En este caso *Hemileia vastatrix* tiene un potencial gran potencial evolutivo (Avelino y Rivas, 2014).

Mejoramiento genético en café para generar resistencia a enfermedades

El mejoramiento genético en café ha sido destinado a la generación de variedades resistentes a la roya del café, la cual ha sido la mejor forma de control de la enfermedad, además de ser eficientemente económica. Nueve genes dominantes llamados S_H1 , S_H2 , S_H3 , S_H4 , S_H5 , S_H6 , S_H7 , S_H8 y S_H9 fueron identificados en tener resistencia a la enfermedad. Los genes S_H1 , S_H2 , S_H4 y S_H5 le confieren resistencia a ciertas razas de roya, los cuales fueron identificados en arabicos puros de Etiopia. El gen S_H3 aparentemente se deriva de *Coffea liberica*

y los genes S_{H6}, S_{H7}, S_{H8} y S_{H9} se derivan de *C. canephora*, uno de los progenitores del Híbrido de Timor (Sera et al. 2007; Fazuiló et al. 2005).

En este caso los programas de mejoramiento genético y colecciones de materiales vegetales, además de los materiales resistentes cultivados comercialmente, ofrecen a la roya una diversidad de genotipos que ejercen una presión de selección y se debe de seguir generando mayor variabilidad en las especies comunes de café (Avelino y Rivas, 2014).

Los estudios realizados en el cultivo han sido principalmente bajo el contexto agronómico, mientras el conocimiento a nivel bioquímico y molecular es escaso (Alzate 2015). En este caso, el uso de materiales con resistencia a la roya son una posibilidad de integrar una solución genética como estrategia de manejo integrado de la enfermedad, donde la resistencia a la roya se puede distinguir de dos tipos: resistencia completa o total y la resistencia incompleta o parcial (Barquero 2013).

Inducción de mutaciones como alternativa en programas de mejoramiento genético

La inducción con mutagénicos en tejidos vegetales altera los genes o rompen los cromosomas. La mutación de genes ocurre normalmente en la naturaleza debido a un error en la replicación, algunos de estos son reparados y algunos otros pasan a la siguiente división celular dando como resultado mutaciones espontáneas, donde generalmente no hay un reconocimiento de la mutación si no hay expresión fenotípica (Srivastava et al. 2011).

Recientemente se ha encontrado que la edición de genomas representa una alternativa rápida para generar variabilidad en café. Por medio de esta técnica se pueden introducir rasgos específicos a genotipos de café elite y desarrollar nuevos cultivares con tratamientos basados en la resistencia a plagas y enfermedades, sequía y tolerancia al frío y la mejora de la calidad, lo cual para otras técnicas de mejoramiento se hace un tanto difícil, con hasta 30 años de para desarrollar un nuevo cultivar (Breitler et al. 2018)

Uso del azida de sodio como agente mutagénico

La azida de sodio ha sido probada como químico para inducir la variabilidad genética, siendo este un agente alquilante muy efectivo como mutagénico (Srivastava et al. 2011). Este compuesto es uno de los mutagénicos más poderosos en tejidos vegetales, debido a la producción de un metabolito orgánico del compuesto de azida; el cual penetra dentro del núcleo, interactúa con el ADN y crea mutaciones puntuales en el genoma (Srivastava et al. 2011).

Con las características antes mencionadas sobre la inducción de mutaciones y los trabajos realizados en los últimos años como herramienta para el mejoramiento genético, Vargas (2016), realizó trabajos con agentes mutagénicos para establecer un protocolo y verificar la posibilidad de conseguir variantes en el cultivo de café para variedades ampliamente conocidas por su calidad como el Catuaí, el cual no presenta resistencia a enfermedades como la roya.

Vargas (2016), a partir de la inducción de mutación con agente químicos encontró variantes en la germinación, en la longitud del tallo y de la raíz. A partir de electroferogramas generados con electroforesis capilar y por medio de imprimadores selectivos para AFLP, este autor logró detectar polimorfismos de un 4% para la combinación AGC*CAT de las plantas tratadas con azida de sodio a 50 y 100 mM.

En este caso de mutaciones inducidas con agentes mutagénicos, se requiere de técnicas precisas que, a través de caracteres morfológicos, fisiológicos, y/o moleculares, permitan determinar tanto los nuevos genotipos como sus progenies y evaluar la estabilidad del carácter mejorado (Luan et al. 2007, citado por Vargas 2016). De esta forma y como lo recomienda Vargas (2016), es importante evaluar las plantas establecidas luego de la inducción a mutación para verificar su comportamiento contra enfermedades como la roya y el crecimiento.

Objetivo general

Evaluar una población de plantas de café M₁ (*Coffea arabica* L.) tratada con el agente mutagénico azida de sodio a nivel morfológico, fisiológico y susceptibilidad a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broome), en Turrialba, Costa Rica.

Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento morfológico y fisiológico de una población de plantas M₁ de café, tratadas con el mutagénico azida de sodio.
- Determinar la susceptibilidad de una población M₁ de café, tratadas con el mutagénico azida de sodio, ante la enfermedad de la roya (*Hemileia vastatrix*) del café.

Metodología

Ubicación experimental

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas y en el Invernadero de la Escuela de Biología, ambos de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, en el laboratorio de Fitopatología de la Sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica en Turrialba y en el Laboratorio de Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Café (CICAFE) en Barba de Heredia.

Los ensayos de campo se llevaron a cabo en la Finca Experimental Interdisciplinaria de Modelos Agroecológicos (FEIMA: 9°51'56.81"Latitud Norte, 83°38'15.44"Longitud Oeste), con temperaturas promedio de 23 °C (Figura 2), en la sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica, Turrialba, Costa Rica.

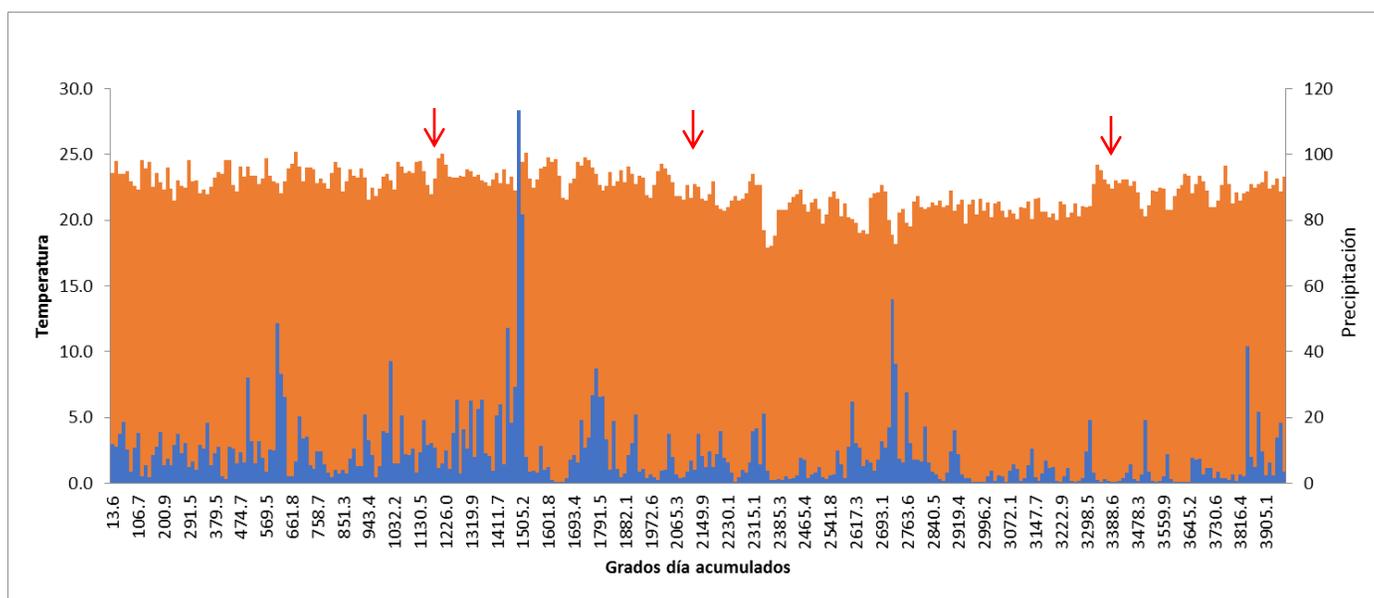


Figura 2. Condiciones climáticas de temperatura y precipitación con respecto a los grados día acumulados, en la parcela experimental (FEIMA), durante el período de experimentación, en flechas representado las fechas de evaluación.

Material experimental

Se trabajó con la variedad Catuaí (certificada), con 33 plantas control y una población de 710 plantas de café inducidas a mutación, tratadas en la etapa de semilla con el mutagénico azida de sodio con dosis de 50 mM con inmersión por 8 horas (Vargas 2016). Las plantas tenían una edad mayor a los seis meses de establecidas en almácigo (Blanco et al. 2003; Mosquera et al. 1999; Gordillo et al. 2008). Después de esta etapa se establecieron en la FEIMA en Turrialba- Sede Atlántico de la UCR.

Preparación del terreno y el sustrato

Las plantas fueron llevadas a campo en la Finca Experimental Interdisciplinaria de Modelos Agroecológicos. Para evitar la competencia por malezas entre calles y entre plantas se colocó un plástico en el suelo, con una cobertura de aproximadamente 600 m². Las plantas se sembraron en macetas, las cuales contenían un sustrato compuesto por suelo, materia orgánica y peat moss (50, 25 y 25% respectivamente).

Se hizo de esta forma para complementar las características de suelo de la finca (anexo 1), con el fin de suministrar aireación, drenaje y retención de humedad. Las plantas se colocaron en disposición de este a oeste con una densidad de siembra de 0.8m entre plantas y 1m entre filas, con una distribución al azar de las plantas testigo.

Comportamiento morfológico y fisiológico

Las evaluaciones de crecimiento de la población se realizaron con una separación de dos meses entre la primera y segunda evaluación y de 3 meses entre la segunda y tercera evaluación, debido al tipo de variables y a las condiciones climáticas. Para tener un comparador entre cada una de las etapas de crecimiento se estimaron las unidades de tiempo fisiológica (grados día), de esta forma las evaluaciones se basaron en la edad o tasa de desarrollo de la planta, con base en la fecha de siembra, al partir del parámetro de temperatura base de crecimiento (10 °C) para café y temperatura ambiental diaria, las evaluaciones se

basaron en la medida de la edad de la planta representada por grados día acumulados (Rodríguez et al. 2011), los cuales se representan a continuación para cada una de las evaluaciones, además se presentan los días después de siembra (DDS) y el mes de evaluación.

Tabla 1. Representación de los grados día acumulados como indicador de la tasa de desarrollo para cada una de las evaluaciones, así como los días después de la siembra y el mes de evaluación.

	Evaluación 1	Evaluación 2	Evaluación 3
Grados día acumulado	1211,7	2138,3	3388,6
Días después de la siembra	75	145	258
Mes de evaluación	Sep (2017)	Nov (2017)	Feb (2018)

Se evaluó en el total de la población el crecimiento en altura de la planta y diámetro del tallo en centímetros (cm), número de pisos o nudos (número de yemas ortotrópicas), número de hojas, número de ejes plagiotrópicos (bandolas) y forma de la hoja y ejes plagiotrópicos (bandolas). Asimismo se determinó el contenido relativo de clorofila por medio del equipo Minolta SPAD 502 siguiendo las instrucciones del fabricante, en una hoja para el estrato bajo, una para el estrato medio y una para el estrato alto por planta.

De la población de plantas se seleccionó una muestra aleatoria de 155 plantas, con un 95% en el nivel de confianza y 7% en el error de muestreo, dicha muestra incluyó 150 de plantas mutadas con el agente mutagénico azida de sodio (50 mM) y 5 controles no tratados con el mutagénico. A esta muestra se le determinó la conductancia estomática, el contenido relativo de agua (CRA) y el área foliar.

Se midió la conductancia estomática utilizando un porómetro SC-1 de Decagon Devices (versión 2016) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

Para ello se tomó una hoja de la parte media de la planta, estas mediciones se realizaron durante la mañana, entre las 7:00 am y la 1:00 pm (Marias et al. 2017).

Para determinar el contenido relativo de agua (CRA), se tomaron las hojas más jóvenes completamente expandidas: una de la parte baja, una de la parte media y una de la parte alta de la planta. Las hojas seleccionadas se llevaron al laboratorio y se determinó el peso fresco, (PF; gramos). Luego estas hojas se colocaron en un contenedor con agua sobre una capa porosa saturada de agua, con una temperatura promedio de 25 °C, después de dos horas de imbibición, se determinó el peso turgente (PT; gramos). Luego se determinó el área foliar (cm²) por medio del equipo Licor LI-3100C, para cada una de las hojas y se colocaron en un horno a 70 °C durante 48 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se determinó el peso seco (PS; gramos). Los valores de PF, PT y PS se utilizaron para determinar el CRA, por medio de la ecuación: $[(PF-PS)/(PT-PS)]*100$ (Rodríguez et al. 2001).

Inoculación artificial de la roya

Recolección de la roya

Se recolectaron uredosporas de hojas enfermas en los lotes orgánicos del Centro de Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE: 9°53'42.93" N; 83°40'12.87" O), mediante raspado de las esporas con cápsulas de gelatina y por medio del raspado con bisturí. Estas esporas se filtraron a través de una criba estéril (60 Mesh) y se colocaron en una cápsula de gelatina limpia. Si la roya no se usaba inmediatamente, las cápsulas con las esporas se mantenían en un tubo de ensayo de 10 cm colocado en un recipiente de cierre hermético, que contenía una solución de ácido sulfúrico (36 mL) y agua destilada (66 mL) para mantener una humedad relativa de 50%, para evitar la muerte de las esporas. Este recipiente se almacenó a 5 °C por un tiempo máximo de 15 días antes del uso (Granados 2015, Escobar y Cristancho 2007).

Prueba de germinación del inóculo recolectado

Se colocó el inóculo de la roya en un vidrio reloj estéril y con ayuda de un pincel estéril, se colocó el inóculo en placas Petri con el medio agar agua al 2% m/v, con una distribución homogénea. Las placas se colocaron en la oscuridad a una temperatura de 22 °C durante 12-13 h. Luego se contaron las uredosporas germinadas y no germinadas. Las germinadas presentaron el doble del diámetro del tubo germinativo en comparación al diámetro de la uredospora y las no germinadas no presentaron crecimiento o este es menor que el doble del diámetro de la uredospora. Se seleccionaron cinco campos ópticos en el microscopio a 10X y se realizó el conteo. Se determinó el conteo según la siguiente fórmula:

$$\%Germinación = Ug \times 100 / Ut$$

Donde Ug y Ut corresponden a la cantidad de uredosporas germinadas y totales respectivamente. Se considera como adecuada una germinación superior al 30% (Granados 2015).

Inoculación con roya en plantas de café

Se realizó la inoculación en el campo para aumentar la presión de inóculo del patógeno y evaluar la respuesta de las plantas. Para tener las condiciones adecuadas para la germinación de la roya, el área experimental se acondicionó por medio de una cobertura de sarán (50% de filtrado de la luz) y se aumentó la humedad ambiental por medio de riego por aspersión, 2 horas por día.

De la roya recolectada en el CATIE se realizó una suspensión de uredosporas, por medio del raspado de la roya, la suspensión en agua y adición de tween 20 como dispersante, por medio de conteos en una cámara Neubauer se diluyó hasta conseguir una concentración de 1×10^5 esporas/mL. Por medio de un aspersor marca Truper de un litro de capacidad, se hizo la deposición de la suspensión de uredosporas en el envés de las hojas más jóvenes completamente

expandidas (hojas con apariencia de terciopelo) para una hoja del estrato bajo, estrato medio y estrato alto de la planta.

Dado el ciclo de vida del patógeno, los síntomas, esporulación y comportamiento de la enfermedad se evaluaron a los 30 y 45 días, cuando se observaron las lesiones provocadas por el patógeno.

Inoculación con roya del cafeto sobre hojas desprendidas

Se recolectó roya de lotes comerciales sin manejo a la enfermedad en el CICAPE en San Pedro de Barba, Heredia (10°02'04.61" N; 84°08'06.93" O). Se recolectaron hojas con abundante roya esporulada, sin presencia de *Lecanicilium lecanii*. En el laboratorio de Fitopatología del CICAPE, se rasparon las esporas con un bisturí estéril. Y se realizó una suspensión de esporas en agua destilada y se realizó un conteo para determinar la concentración de uredosporas en cámara de Neubauer. Se debió contar solamente las esporas con coloración anaranjada.

A partir del conteo se determinó la concentración de uredosporas al aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración uredosporas/ml} = \text{Uredosporas contadas} \times 10\,000$$

La suspensión de esporas se llevó a una concentración de 1×10^5 esporas/mL. Para la inoculación de la roya se recolectaron tres hojas por planta, una para el estrato bajo, una para el medio y una para el alto. En el laboratorio se cortaron segmentos cuadrados (2x2 cm) de la lámina de las hojas. Se prepararon las cámaras húmedas, que consistía en una caja plástica (30 cm de largo x 20 cm de ancho x 15 cm de alto) con una espuma húmeda en el fondo.

Se colocaron los segmentos de hoja, sobre la espuma y se inocularon con 50 µL de la suspensión de uredosporas preparadas con anterioridad, se colocó la gota en el centro y se extendió con una cuchara de cerámica, con un movimiento suave alrededor del segmento de la hoja. La cámara húmeda se tapó con plástico adhesivo transparente y se aseguraron los bordes con cinta adhesiva.

Las cámaras con los segmentos inoculados se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente de aproximadamente 26 °C durante 2 días y posteriormente se trasladaron a un cuarto con fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y aproximadamente 23 °C ± 2 °C de temperatura donde se incubaron por 45 días. Posteriormente se destapó las cámaras húmedas y se colocaron en un lugar con suficiente luz bajo fluorescentes, se contaron los segmentos inoculados y enfermos (síntomas y esporulación), se midió el porcentaje de incidencia de la enfermedad por medio de la siguiente formula:

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{Segmentos enfermos}}{\text{Segmentos inoculados}} * 100$$

Evaluación de la severidad de la enfermedad

La medición de la severidad se basó en la escala de la roya desarrollada por Capucho et al. 2011 (Figura 3) y la escala de Eskes basada en grados de avance de la enfermedad (Cuadro 1).

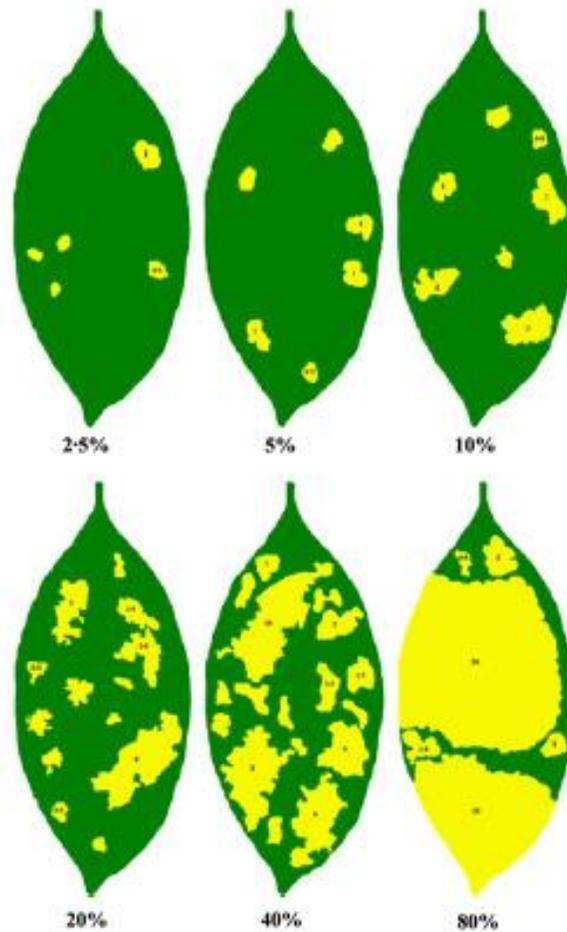


Figura 3. Escala estándar del área de la severidad de la roya (*H. vastatrix*) del café (*Coffea* spp.). Capucho et al. 2011.

Tabla 2. Descripción de la escala de Eskes para el desarrollo de la roya en café (Rozo y Cristancho 2010).

Grado de la escala	Descripción
0	Ausencia de lesión
1	Aparición de clorosis
2	Aumento en superficie de la clorosis
3	Tendencia de las lesiones a coalescer e intensificación de la decoloración
4	Aparición de las primeras esporas
5	Esporulación inferior al 25% de la lesión
6	Esporulación entre 25-50% de la lesión
7	Esporulación mayor al 50% de la lesión

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la caracterización de crecimiento y de morfología fueron analizados por medio de programa de Excel 2010 e Infostat 2008, en lo cual se realizó un análisis exploratorio a través de los parámetros descriptivos (media, desviación estándar, coeficiente de variación, valores mínimos y máximos) y de esta forma visualizar de forma general sobre la variabilidad de las características cuantitativas.

Se realizó un análisis de correlación entre las diferentes variables, tanto para cada una de las evaluaciones de morfología, fisiología y las de susceptibilidad e incidencia de la roya. La caracterización de variables se realizó por medio del análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) por medio del software RStudio 3.2.4.

Resultados y discusión

Efecto en el crecimiento y en la morfología

En la Figura 4 se observa un crecimiento gradual de las variables con respecto a cada una de las evaluaciones. Es importante observar la altura de la planta en las evaluaciones, relacionado con el crecimiento de yemas ortotrópicas (pisos), lo cual garantiza el desarrollo de la planta por los próximos años (Blanco et al. 2003). La altura de la planta (Figura 4A) en la primera evaluación tenía un valor de 34,08 cm, para la segunda un valor de 44,95 cm y para la tercera un valor de 53,79 cm (45,39, 55,82, 64,82 cm para los testigos respectivamente), con esto se tiene un ritmo de crecimiento para la altura de la planta de 5 cm por mes. Se presentan diferencias significativas entre el material mutado y los testigos, para cada una de las evaluaciones, siendo la altura de las plantas mutadas menor que la de las plantas testigo.

El número de hojas (Figura 4B) presenta un comportamiento creciente para las dos primeras evaluaciones con valores de 35,77 y 66,84 respectivamente (40,12 y 75,82 respectivamente para las plantas testigo), mientras que para la tercera evaluación hay una disminución en esta variable, con un valor de 61,56 (el testigo si aumenta con un valor de 83,55). Para las etapas de crecimiento se tiene un aumento del número de hojas de 15 en promedio por mes para el total de la planta. No se presentan diferencias significativas entre el material mutado y las plantas testigo en las dos primeras evaluaciones, salvo para la tercera evaluación.

Con respecto al número de ejes plagiotrópicos (bandolas) (Figura 4C), en la primera evaluación se obtuvo un valor de 3,37, para la segunda evaluación de 8,39 y en la tercera un valor de 12,52, con valores de 4,55, 9,42 y 14,30 respectivamente para las plantas testigo. Donde solamente en la primera evaluación se tienen diferencias estadísticamente significativas entre la población y las plantas testigo.

Para el número nudos ortotrópicos (pisos) de la planta (Figura 4D) se obtuvieron valores de 1,87 para la primera evaluación, 4,39 para la segunda

evaluación y 6,60 para la tercera (2,48, 4,39 y 7,51 respectivamente para las plantas testigo). Esto implica el crecimiento de un nuevo nudo ortotrópico (piso) cada mes.

Una variable importante y que de igual forma se relaciona con el crecimiento de la planta y con otras variables es el diámetro del tallo (diámetro del tallo (grosor)) (Figura 4E). En esta variable se observa un crecimiento, el valor en la primera evaluación es de 0,65 cm, para la segunda evaluación es de 1,19 y para la tercera presenta un valor de 1,31 (0,70, 1,36 y 1,51 respectivamente para las plantas testigo). Esto implica un crecimiento de 0,55 cm entre la primera y la segunda evaluación y de un 0,1 cm entre la segunda y la tercera evaluación.

El rápido crecimiento observado entre la primera y la segunda evaluación, posiblemente estuvo relacionado con el régimen de precipitaciones y temperatura (Figura 2) entre las épocas de evaluación, además el poco crecimiento observado después se relacionó de igual forma a la disminución en la precipitación antes de la última evaluación.

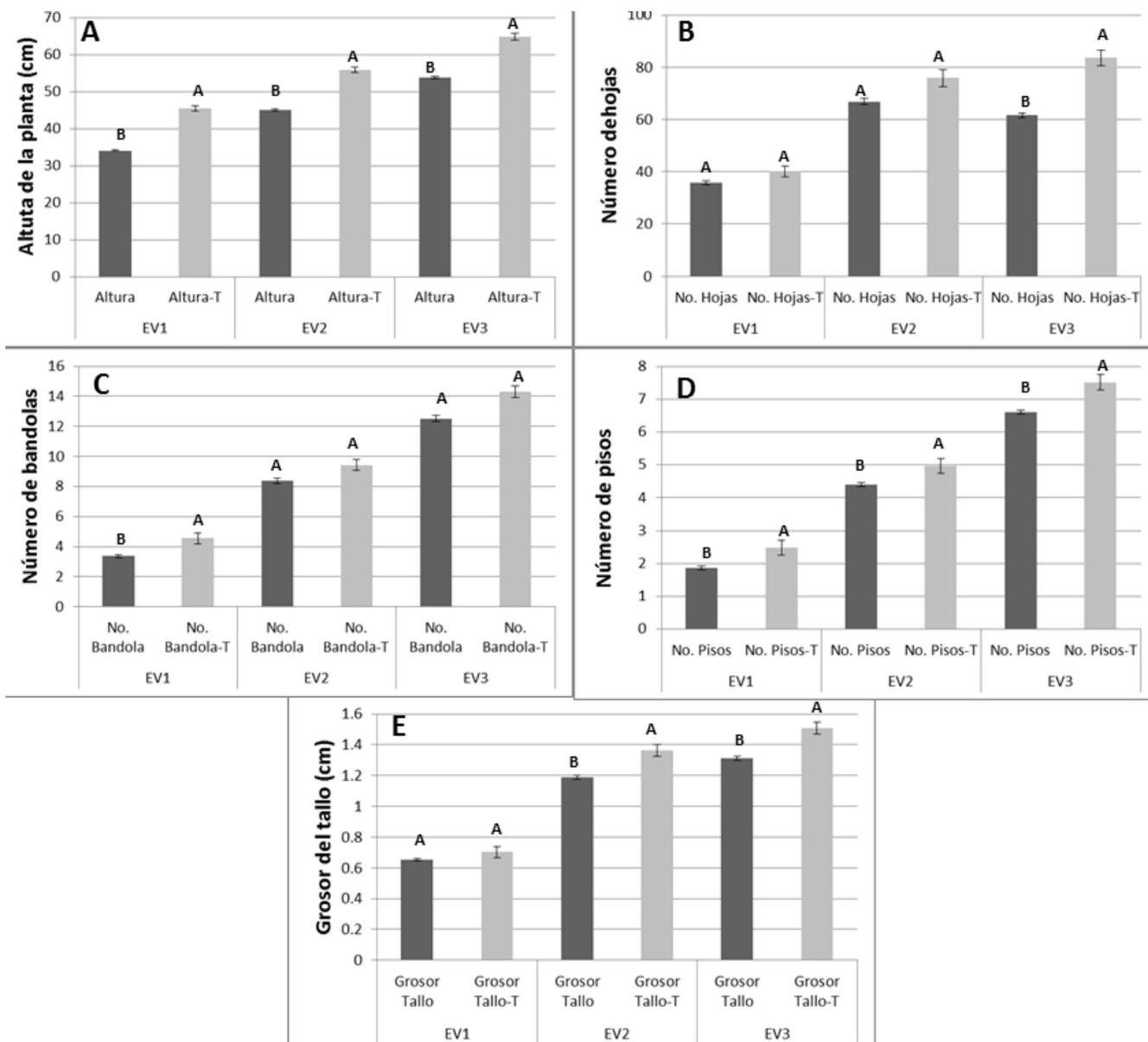


Figura 4. Valores promedio para **A:** altura de la planta (cm), **B:** número de hojas, **C:** número de ejes plagiotrópicos (bandolas), **D:** número de nudos ortotrópicos (pisos) y **E:** diámetro del tallo (grosor), para el total de la población de plantas mutantes M1 y los testigos no mutados de la variedad Catuaí. *Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Estas variables de crecimiento se relacionan entre sí, conforme crece la planta, crece el número de nudos ortotrópicos (pisos) y por ende nueva producción de ejes plagiotrópicos (bandolas) y producción de hojas, las cuales son determinantes para el rendimiento y la nutrición de los frutos de la cosecha y el

tiempo de duración de la hoja en la planta que varía entre 9 y 15 meses, lo cual depende de las condiciones ambientales y la edad de la planta (Blanco et al. 2003). De esta forma la disminución de hojas para la tercera evaluación puede estar relacionada con la cantidad de roya presente en el campo (Figura 17), ya que la cantidad de hojas para esta evaluación tiene a disminuir comparado con el ciclo normal.

Efecto en las variantes fenotípicas

Las apariencias de tipo morfológico son homogéneas, generadas específicamente por factores evolutivos, debido a que la semilla proviene de una misma variedad de plantas, la autopolinización, la especiación y las variables de morfología tienden a ser más estables dentro de una misma especie, pese a esto existen diferenciales observados entre las plantas, cuyas características las hacen plantas diferentes de lo normal (Ignacio 2017). Al realizar las comparaciones entre las diferentes variables de la población de plantas M1, tratadas con el agente mutagénico azida de sodio se puede decir que existe poca variabilidad, efecto provocado por el tipo de estadística al tomar en cuenta el promedio de la población y no de plantas individuales.

Debido a las variaciones que se dan dentro del genoma por medio de la interacción con el mutagénico y debido a la dosis utilizada, se pudieron observar diferentes características fenotípicas en la población de plantas evaluada, como lo describe Al-Qurainy y Khan (2009), el azida de sodio es un fuerte mutagénico y las partes de crecimiento de la planta se ven altamente afectadas conforme se incrementa la concentración y la duración del tratamiento, además de que estos mutagénicos químicos inducen una amplia variación de parámetros morfológicos y de rendimiento en comparación con plantas normales (Khan 2009). En tomate se ha observado una inducción efectiva con respecto al porcentaje de germinación, longitud de la raíz, altura de la planta, supervivencia de plantas, número de ramas por planta y su productividad y la posibilidad que tiene el mutagénico en generar variabilidad en estas plantas (2009; Adamu y Aliyu, 2007).

A pesar de que existen métodos para la selección de plantas mutadas basadas en marcadores bioquímicos y morfológicos, estos marcadores pueden tender a ser influenciados por condiciones ambientales (Salim et al. 2009), Laskar et al. (2016) investigó para tomate las apariencias morfológicas de la población mutada y de esta forma observó la frecuencia de mutación en la población y analizó los fenotipos mutados. Las plantas mutadas en una M2 mostraron afectación en el crecimiento de la planta (alto, ramificado, no ramificado, enano, postrado, ramas fértiles), en el hábito de la planta (altamente frondoso o vegetativo, morfología de la hoja en forma y tamaño (hojas anchas, hojas pequeñas, hojas estrechas, hojas quemadas) al igual que ciertas características de la fruta, de lo cual se determinó que había un gran número registrado comparado con el efecto de otros mutagénicos (Laskar et al 2016).

Dichas características descritas en literatura se relacionan con las características visuales encontradas en la población de plantas de café tratadas con el mutagénico, que difieren del crecimiento normal de la planta. Se realizó un análisis de frecuencia expresado en porcentajes (Figura 5), los cuales se encuentran en valores bajos, ya que se compara con el total de plantas de la población, dichas anomalías se catalogaron en color del brote (bronce), ejes plagiotrópicos (bandolas) con diferenciales, diferencial en la horqueta y entrenudos, así como cambios generalizados para la planta, hoja alargada, hoja pequeña, hoja corrugada/deforme, hoja pigmentada y tallo doble.

Algunas de las características varían en su porcentaje de aparición en las diferentes evaluaciones, esto indica que no son estables en la población. El brote bronceado no se detectó en la primera evaluación, pero en la segunda y en la tercera evaluación se encontró en las mismas plantas con un porcentaje de 0.3%. Diferenciales en ejes plagiotrópicos (bandolas) se encontró en el mismo porcentaje de 0,4% en la primera y en la segunda evaluación, mientras que disminuyó para la tercera evaluación con un valor de 0.1%. Diferenciales en la horqueta de la planta se observaron valores similares entre la primera y segunda

evaluación entre 0,5% y 0,4% respectivamente, el cual disminuyó en la tercera evaluación a un 0.1% (Figura 5).

El valor de diferencial en entrenudo disminuyó de 1,1% a 0.4% de la primera a la tercera evaluación, valor similar al diferencial encontrado en el total de la planta de 1.1% a 0.3% respectivamente. La característica de hoja alargada disminuyó de 1.1% a 0.9% y a 0.5% de la primera a la segunda y a la tercer evaluación respectivamente. Hoja pequeña disminuyó de 1,5% a 0,5% entre la primera y segunda evaluación, dicha característica no se volvió a detectar para la tercera evaluación. La característica de hoja corrugada/deforme pasó de ser uno de los valores más altos con 3,0% en la primera evaluación a 0,1% para la segunda y tercera evaluación. Hoja pigmentada disminuyó de 3.2% a 2.7% y a 1,1% de la primera evaluación a la tercer evaluación y la característica de tallo doble aumentó de 2,7% a 4% de la primera a la segunda evaluación y disminuyó a 3,2% para la tercer evaluación (Figura 5).

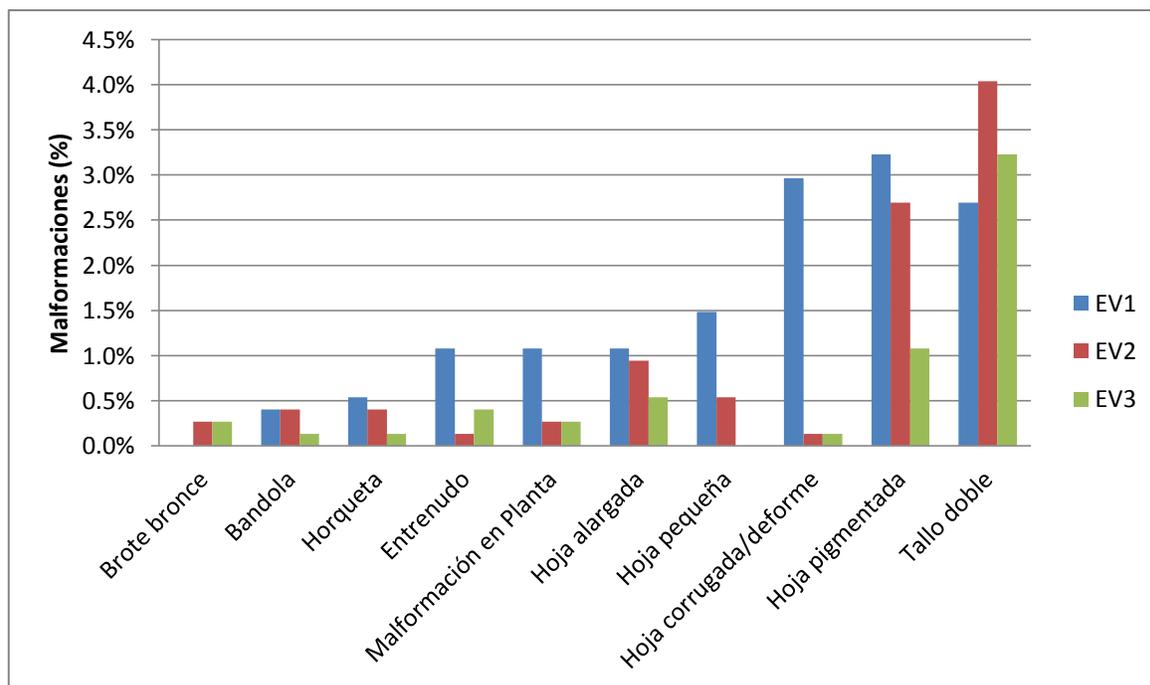


Figura 5. Frecuencia de anomalías observadas en la población M1 de plantas tratadas con el agente mutagénico azida de sodio, para cada una de las evaluaciones.

En cultivos como la cebada el mutagenico azida de sodio generó deficiencias de clorofila y mostró variaciones morfológicas, fisiológicas y citogenéticas (Ilbas et al. 2005). Las características anteriores se muestran en la Figura 6, como muestra de lo observado en las diferentes evaluaciones, donde se presentan diferencias en tallo, tamaño, forma y color de las hojas, diferenciales en forma y tamaño de las ejes plagiotrópicos (bandolas), diferencias en nudo ortotrópico u horqueta (tres ejes plagiotrópicos (bandolas) por nudo) y forma total de la planta.

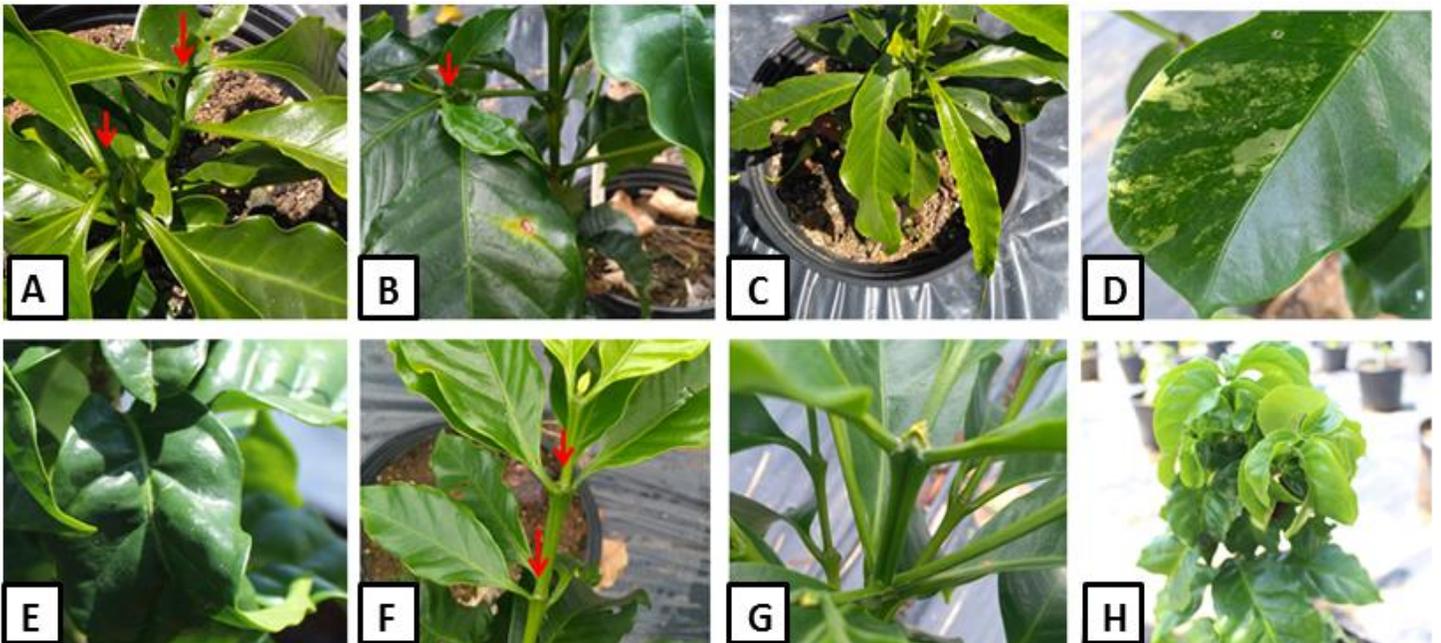


Figura 6. Malformaciones y características diferenciadoras en plantas evaluadas en campo según su crecimiento. **A:** doble tallo, **B:** hoja pequeña, **C:** hoja alargada, **D:** hoja pigmentada, **E:** hoja corrugada o deforme, **F:** bandola con diferenciales en tamaño en una misma planta o con más de dos hojas por nudo, **G:** malformaciones en nudo ortotrópico u horqueta (tres hojas y ejes plagiotrópicos (bandolas) por nudo), **H:** planta diferenciada en crecimiento.

Bobadilla et al. (2015) fenotiparon lotes de plántulas somáticas de café (*C. arabica* var. Caturra) de tres edades (4, 11, 27 meses). Basados en la arquitectura de la planta y la morfología de las hojas, se identificó un patrón de anomalías fenotípicas después de los 12 meses de desarrollo en vivero. En el cual los

autores encontraron un fenotipo aberrante predominante caracterizado por tener hojas más pequeñas, ovaladas y elípticas, el cual corresponde a un mutante de café (Bullata). De igual forma estos autores de la edad de 4 meses encontraron fenotipos normales, de la edad de 11 meses encontraron un 30% de fenotipos anormales, donde se encontraron 8 plantas enanas y 1 Bullata (de 30 observadas) y de la edad de 27 meses encontraron 94% de anomalías correspondientes a 4 plantas enanas, 1 con hoja delgada (Angustifolia) y plantas Bullata.

Etienne y Bertrand (2003), encontraron siete tipos de variantes somaclonales en cinco híbridos F1 de café (*C. arabica* L.), donde la frecuencia de variaciones como planta gigante, hoja gruesa, variegata, variantes en el color de la hoja joven (bronce) no superó el 0,3%, la variación descrita como planta enana que afecta el tamaño y la productividad, superó el 1% y la frecuencia de las variantes multi-tallo y angustifolia fue de 2 y 4% respectivamente.

Con respecto a los resultados obtenidos en la población de plantas M1 de café tratadas con el mutagénico azida de sodio se encontraron valores similares en cuanto a las características relacionadas con la hoja, como el color bronce, hoja pequeña, hoja corrugada, con valores entre los 0,3 y 1,5% (figura 6B, 6E) . Los valores de mayor valor porcentual en la población fueron los de hoja alargada (angustifolia), hoja pigmentada y tallo doble o múltiple con valores que van desde 1.1 hasta valores cercanos al 4% (Figura 6C, 6D, 6A).

La característica fenotípica identificada que es interesante resaltar desde el punto de vista productivo, es la producción de tres ejes plagiotrópicos (bandolas) por eje (Figura 6.G), lo cual a futuro puede representar una variable importante en productividad. Esta variable en la etapa de almácigo se encontraba presente en 4 plantas, sin embargo a partir del crecimiento de la planta, solo una de estas conservó la característica.

En Brasil se ha registrado plantas de Catuaí Rojo con la misma característica morfológica, de tener tres ramas plagiotrópicas por nudo, el cual difiere del crecimiento normal de dos ramas por nudo. Cada una de las ramas está

separada por ángulos aproximados de 120° , mientras que en una planta normal el ángulo promedio es de 180° . Según las observaciones, las plantas con tres ejes plagiotrópicos (bandolas) presentan un tejido triangular lobulado con un cambium establecido, mientras que una planta normal exhibe tejidos vasculares ovalados-rectangulares con un cambium establecido (Sakiyama et al. 2017).

El origen de estas plantas está ligado posiblemente a un crecimiento funcional del meristemo apical. El seguimiento de plantas de este tipo pueden ser de utilidad para programas de mejoramiento genético, ya que al conocer la producción de una bandola más, es de esperar que una rama provea un incremento de un $1/3$ en la producción, especialmente en los primeros años, sin embargo estas pueden cambiar debido a las condiciones climáticas, de manejo y fertilización (Sakiyama et al. 2017).

Efecto en las variables fisiológicas

Como se mencionó anteriormente las mutaciones pueden generar cambios en crecimiento y en la fisiología de la planta. Por tanto, al evaluar la cantidad indirecta de clorofila se puede inferir si han existido cambios en las plantas tratadas con el mutagénico. Existen diferentes cambios registrados en el comportamiento del contenido de clorofila en plantas de café, a pesar de que existen varios estudios relacionados con la inflorescencia de la clorofila bajo diferentes condiciones, existe poca información que relaciona la inflorescencia con mediciones del SPAD-502, los cuales pueden optimizar las lecturas del lector de clorofila (Netto et al. 2005).

Como parte de las variables de crecimiento se tomó en cuenta los valores SPAD-502, el cual indirectamente suministra el dato de la cantidad de clorofila dentro de las hojas de la planta. En la Figura 7, se muestra el comportamiento de la variable en cada una de las evaluaciones y su comparador con el testigo, en donde los valor de la primera evaluación es de 49,9 para la población y de 49,0

para las plantas testigo, para la segunda evaluación se obtiene un valor de 66,3 mientras que para las plantas testigo se obtuvo un valor de 76,97. Para la tercera evaluación se obtiene un valor de 59,4 para la población y 62,37 unidades SPAD para los testigos. Para lo cual se obtienen diferencias significativas solamente en la segunda evaluación entre la población de plantas y los testigos.

Un aspecto importante de resaltar es la variabilidad de las unidades SPAD, que se observa en cada una de las evaluaciones (Figura 7), por tanto se puede decir que la variable no tiene un comportamiento homogéneo en el tiempo, para la segunda evaluación se observaron los valores máximos, mientras que para la tercera evaluación esta característica disminuye tanto en plantas mutadas como en los testigos. Esta variable cambió según la época de evaluación y a sus etapas de crecimiento de hojas nuevas o nutrición, por el comportamiento de la temperatura y precipitación.

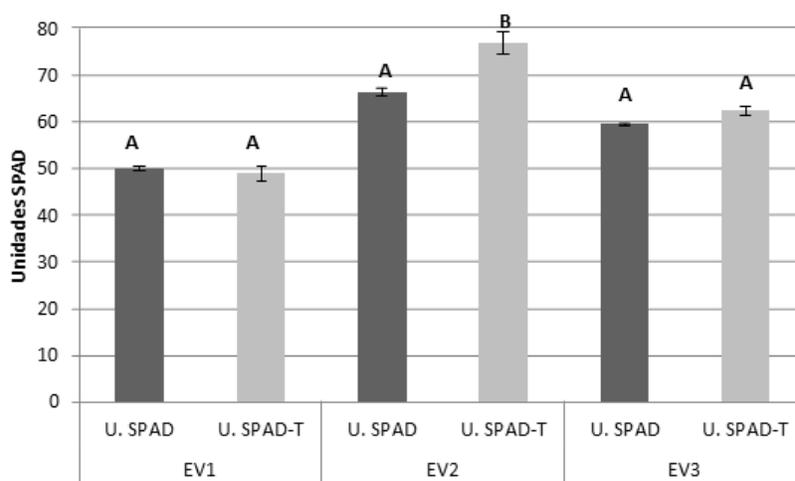


Figura 7. Unidades SPAD de la población de plantas tratadas con el agente mutagénico azida de sodio (U.SPAD) y de los testigos no tratados con el mutagénico (U.SPAD-T) como comparadores. Para cada una de las evaluaciones (EV1, EV2, EV3). **Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).*

Para las unidades SPAD, se analizó como la frecuencia relativa de estos valores, con el promedio de las tres evaluaciones se agrupan los valores según la cantidad de veces que aparece en la población, la mayor proporción (cercana al 50%) de los resultados se encuentran en los rangos de las 54,97 y 62,37

Unidades SPAD. Los valores que se encuentran por debajo de los rangos de 47,61 y superior a las 69,68 unidades SPAD, son datos que no se encuentran dentro de la normalidad (Figura 8).

Netto et al. (2005), encuentra una relación positiva entre los valores SPAD y clorofila y la concentración de carotenoides, es decir, conforme aumenta el valor del SPAD, así se incrementará el contenido de clorofila, con valores de $R^2= 0.96$ para clorofila total y un $R^2=0.92$ para la concentración de carotenoides. Este autor observa además que las mediciones del SPAD inferiores a 40 indica el inicio de un deterioro del proceso de la fotosíntesis, el cual es un buen indicador de disturbios causados en las plantas por factores ambientales.

Basado en valores del SPAD y variables de fluorescencia de la clorofila (F_0 = fluorescencia inicial, F_m = fluorescencia máxima y F_v = fluorescencia variable/ F_m), Netto et al. (2005) observó que los valores de F_0 aumentaron hasta la lectura de 40 Unidades SPAD, y después de este valor se encontraron valores estables de la curva ajustada en la experimentación. Según el modelo realizado, la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (F_v/F_m), comenzó a caer alrededor de las 40 unidades SPAD, por tanto se puede decir que las lecturas alrededor de este valor demuestran el comienzo del deterioro del fotosistema II (PSII).

De esta forma como se observa en la Figura 8, existe una proporción cercana al 4% de plantas que se encuentran por debajo del valor de las 40 unidades SPAD. Además este parámetro es altamente relacionado y como un indicador indirecto de nitrógeno presente en la planta, que se correlaciona con la lectura y el contenido de nitrógeno en diferentes estados de crecimiento (Rodriguez et al. 1998; Netto et al. 2005; Franca y Carvalho 2016, Widjaja-Putra y Soni 2018).

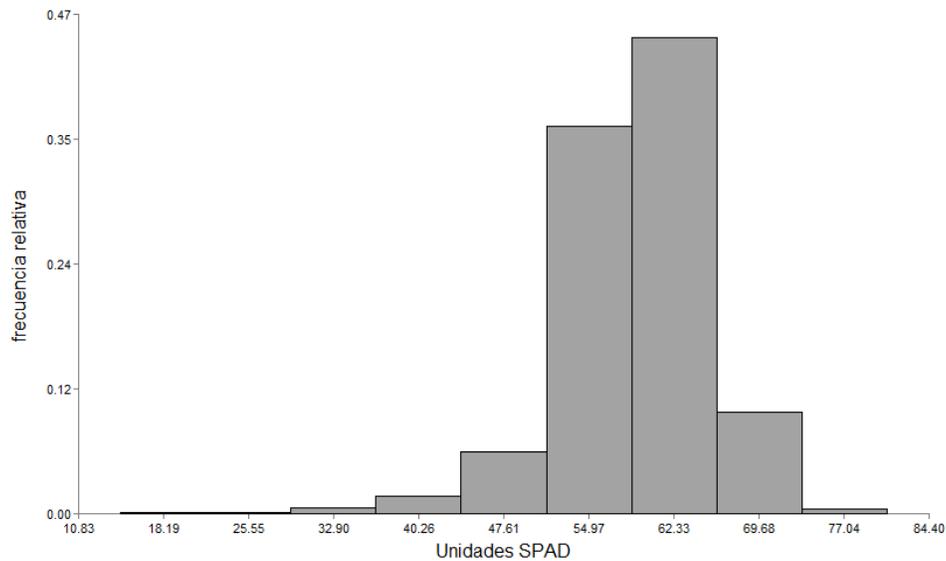


Figura 8. Comportamiento de la frecuencia relativa del promedio de las unidades SPAD de la población de plantas M1 tratadas con el mutagénico azida de sodio.

Chaves et al. (2009) indicaron que la apertura y cierre estomático tiene que ver con la cantidad de humedad en el suelo, como un agente regulador del estrés dentro de la planta. Bajo condiciones experimentales de modelación se indica que dichas funciones pueden variar con respecto al funcionamiento del estrés de humedad en el suelo. El cierre estomático en situaciones estresantes de sequía y salinidad ocurren generalmente debido a disminución de la turgencia foliar o el déficit de presión atmosférico, unido a señales químicas generadas por las raíces. De esta forma, la disminución de la tasa fotosintética en condiciones de estrés (salinidad, sequía y temperatura) son atribuidas a la detención de la conductancia estomática del mesofilo y al cierre estomático, de esta forma esta última condición altera la difusión de gases y finalmente altera el proceso fotosintético y el metabolismo del mesofilo.

Es importante definir la relación entre la conductancia estomática con la fotosíntesis de la planta, Singh y Reddy (2011) determinaron el coeficiente de determinación (R^2) entre la fotosíntesis (A) y la conductancia estomática (g_s), con rangos de correlación entre 0.95 a 0.99, entre diferentes genotipos de caupí

(*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), donde a un bajo g_s la respuesta de A fue baja, mientras que en valores más altos de g_s se observó un incremento similar, donde produjo un aumento mayor de A para muchos fenotipos.

Para obtener más información con respecto a la población en cuanto al intercambio gaseoso se tomó una muestra de 155 plantas de la población y se determinó la conductancia estomática, con el fin de observar el comportamiento del intercambio gaseoso para este grupo de plantas. En la figura 9, se muestra el comportamiento de la conductancia estomática en el total de las plantas evaluadas, en donde se obtienen un valor mínimo de $42,6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y como valor máximo de $663,9 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

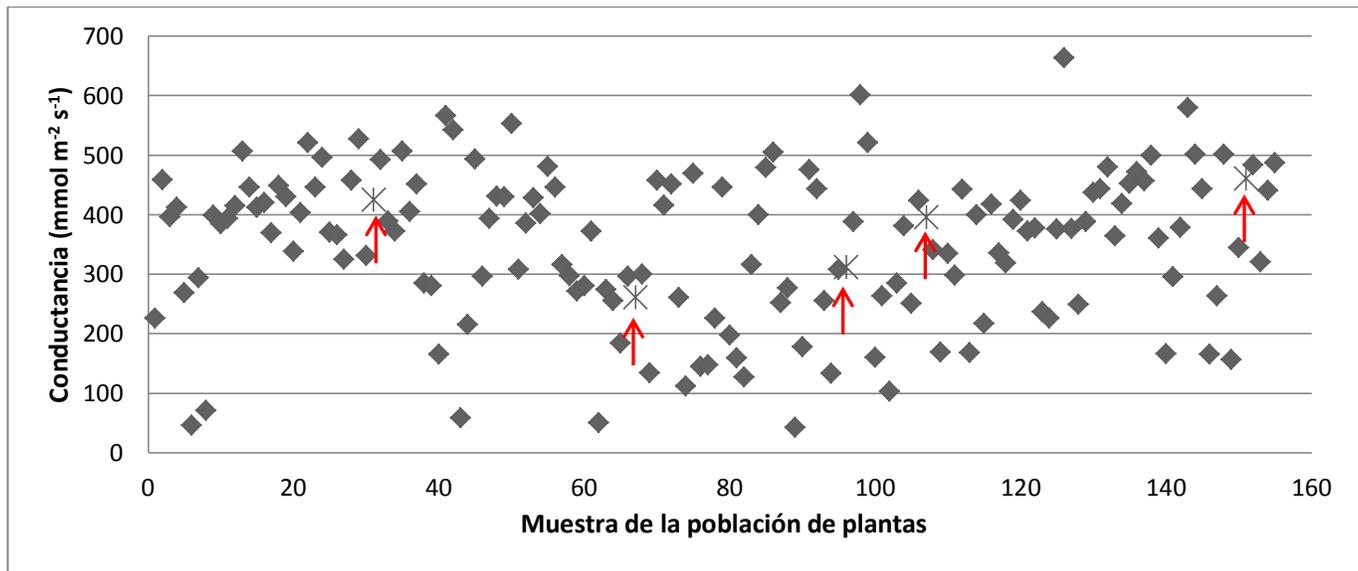


Figura 9. Conductancia estomática (g_s) ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para la muestra de 155 plantas del total de la población M1 tratadas con el agente mutagénico azida de sodio. Señalado en flechas las plantas testigo no tratadas con el mutagénico.

Silva et al. (2013) determinó valores de conductancia estomática (g_s) de entre 100 y $400 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para clones de *C. canephora* bajo amplia irrigación y valores inferiores a $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para clones bajo déficit hídrico. Craparo et al. (2017) obtiene valores de entre los 100 y los $300 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, entre diferentes horas del día, para plantas de *Coffea arabica* en diferentes niveles de sombra.

Miniussi et al. (2015) determinaron la conductancia hidráulica en las hojas de *C. arabica*, la cual disminuyó de los testigos a las plantas con estrés (25% de irrigación), con valores promedio de $150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para plantas bien irrigadas (100 %), valores cercanos a los $150 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para plantas con estrés hídrico (50 %) y un valor de aproximadamente $50 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para plantas de mayor estrés hídrico (25 %). Se ha demostrado que los cambios inducidos por la sequía en la conductancia hidráulica podrían verse influenciados por las acuaporinas, y de esta forma ayudar a las plantas a mantener la homeostasis del balance hídrico bajo la limitación de agua.

Las condiciones que afectan el comportamiento en la conductancia estomática, relacionados con el estrés hídrico, diferentes niveles de sombra, diferentes horas del día, pueden también ser influenciados por la temperatura, ya que las plantas de café son altamente susceptibles a temperaturas superiores a los $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para las plantas en crecimiento al sol, incrementos en la temperatura superiores a ese nivel resultan en una subsecuente disminución de la conductancia estomática, lo cual genera una gran limitación en la tasa de asimilación de CO_2 . Las altas temperaturas reducen la capacidad de transporte de electrones, incrementa la fotorespiración y disminuye la tasa fotosintética (Bote y Struik 2011; Marias et al. 2017).

De esta forma como se observa en la figura 9, dentro de los valores de la población se encuentran valores extremos, valores por debajo de los $100 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y valores superiores a los $600 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, los valores de las plantas testigo se encuentra entre rangos desde los $261 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ hasta los $461 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los valores extremos posiblemente son generados por condiciones ambientales que afectan el régimen hídrico de la planta, la hora de la evaluación o fluctuaciones propias del equipo de medición y de las condiciones ambientales alrededor de este.

Por lo tanto, se agruparon y se analizaron los datos con respecto a las horas de evaluación que comprendían desde las 7 am hasta las 12 pm, de esta forma se pudo observar que los promedios para cada grupo se presentó entre los

200 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los 400 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo al observar el rango en el que se presenta cada uno de los datos y las diferencias significativas, no existe diferencia entre cada una de las horas de evaluación (figura 10). Debido a que el rango de evaluación es tan estrecho entre las condiciones de horas del día y la cantidad de datos, es difícil encontrar valores diferentes.

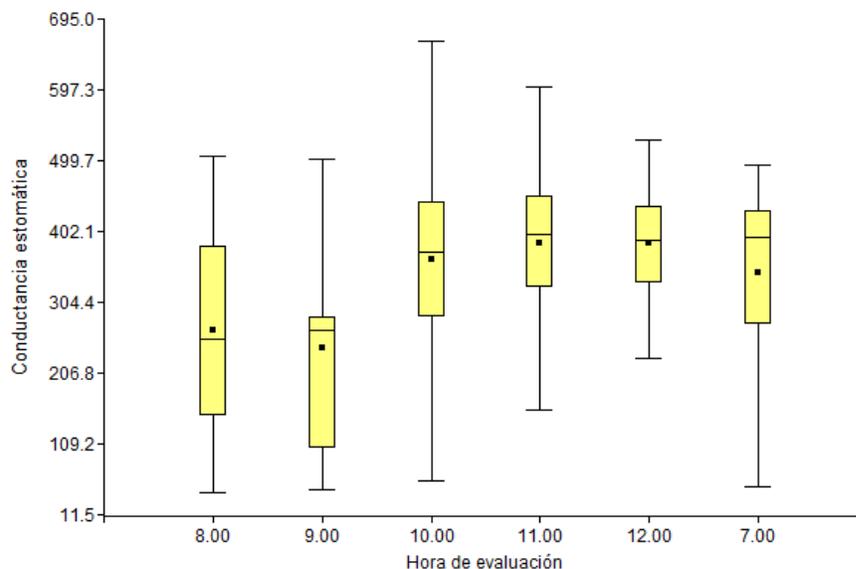


Figura 10. Conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) según las horas de análisis para una muestra 155 plantas del total de la población M1 tratadas con el agente mutagénico azida de sodio.

Yang et al. (2017) determinaron valores de CRA en rangos desde 55.8 a 94.1%, con un promedio de 80.2% para mediciones en *Eucalyptus camaldulensis* bajo diferentes tratamientos de regímenes de irrigación (100, 70, 50 y 30%). Además Ferraz et al. (2015) evaluó en ricino (*Ricinus communis*) la cantidad de pigmentos fotosintéticos y el contenido relativo de agua, bajo diferentes niveles de salinidad (0, 2, 4, 6 dS m^{-1}). El cual determinó valores de CRA que disminuyeron significativamente conforme aumento la salinidad, con valores de testigos de entre 94.5% y 97%.

Teulat et al. (1997) obtuvieron datos del contenido relativo de agua al evaluar la relación entre esta variable y parámetros de crecimiento bajo estrés

hídrico, en plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.). Estos autores obtuvieron valores de CRA entre 90 y 100% para los testigos y disminuyó conforme aumenta la cantidad de estrés hídrico. Thioune et al. (2017) determinó el CRA en plantas de café (*Coffea canephora*) en experimentación basada en choques de humedad y cambios dependientes de temperatura, para los tratamientos testigos ronda el 80% de CRA.

Como parte de la observación de las plantas, se evaluó el contenido relativo de agua (CRA), para la muestra de 155 plantas de la población, donde se observa un comportamiento muy homogéneo, la mayoría presenta datos cercanos al 100%, con un valor promedio de 95,18% (Figura 11). Además, para verificar la relación entre cada una de las plantas se realizó un análisis de varianza (Anexo 9), el cual indica que no existen diferencias significativas (*Prueba de Tukey $p > 0.05$*) entre cada una de las plantas de la población.

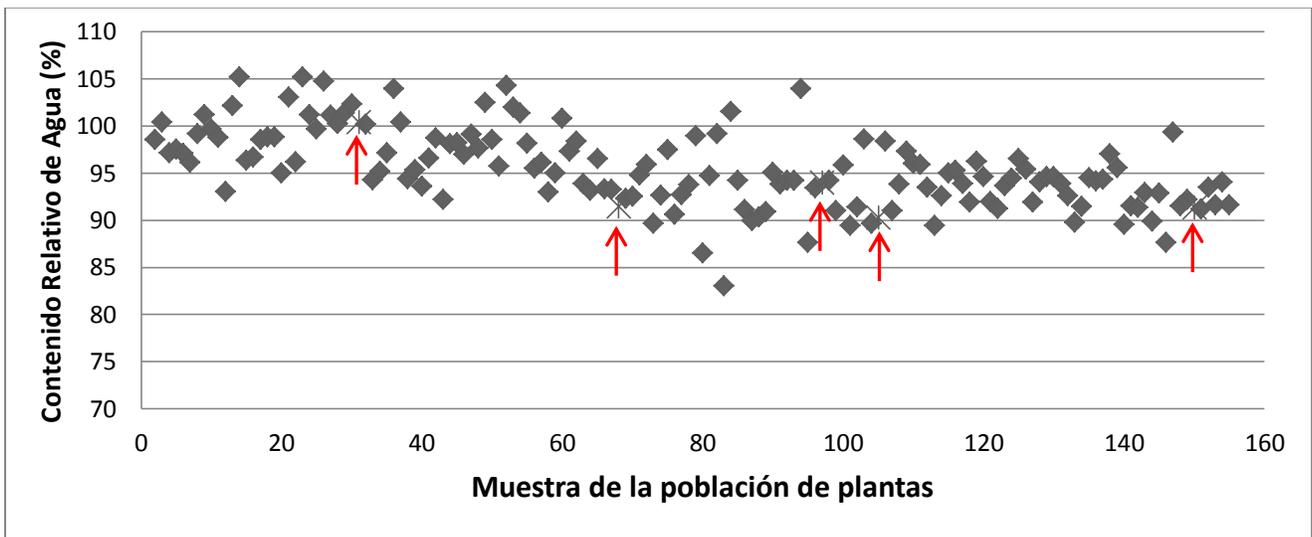


Figura 11. Valores del contenido relativa de agua (CRA) para una muestra de 155 plantas tratadas con el agente mutagenico azida de sodio. Señalado en flechas las plantas testigo no tratadas con el mutagénico.

Rodríguez et al. (2016) evaluaron plantas e café (*C. arabica* L. var. Caturra rojo), bajo diferentes niveles de sombra, al pleno sol, 70% de la radiación solar y en sombra no regulada, con valores cercanos a 20 cm² como mínimo y valores cercanos a 90 cm² como máximo, esto en diferentes meses del año, con

disminución del área foliar para los meses de mayor temperatura y menor precipitación y la mayoría de los valores promedio oscila entre los 40 y 60 cm². Morais et al. (2004), encontró en plantas de café al pleno sol, la disminución del crecimiento de las hojas en un 27%, en comparación a las que fueron cultivadas a 50% de exposición solar.

Morais et al. (2004) indicó que la disminución en el crecimiento puede estar relacionado con variaciones en la concentraciones de diferentes reguladores de crecimiento. Se ha demostrado que las auxinas son responsables de la distensión celular y que son capaces de migrar a sitios celulares menos iluminados y al estar en estos sitios provocan mayor crecimiento celular. Además, registran menor crecimiento en los meses de menor precipitación y a las altas temperaturas.

Las plantas evaluadas en campo presentan valores mínimos de 26,57 cm² y valores máximos de 88,19 cm², con un valor promedio de 48,87 cm². Las plantas que se encuentran sobre los 80 cm² son: 32, 46, 94 y 113. Y las plantas que presentan hojas pequeñas con valores inferiores a los 30 cm² son: 57, 65, 83, 99, 107, 114, 117, 147. Los valore de los testigos no tratados con el mutagénico oscila entre los 40 y los 70 cm² (Figura 12).

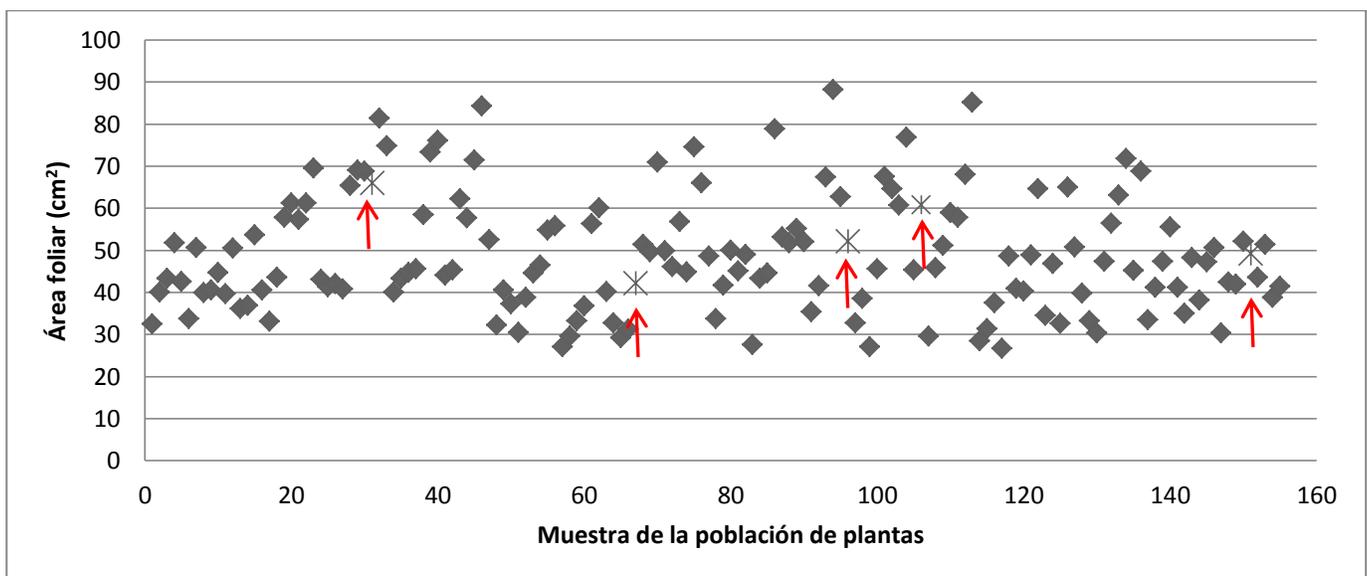


Figura 12. Área foliar de una muestra de 155 plantas de la población, tratados con el mutagénico azida de sodio. Señalado en flechas las plantas testigo no tratadas con el mutagénico.

A pesar de encontrar rangos extremos en los datos de área foliar, se realizó el análisis de varianza para la muestra de la población (Anexo 10), en el que no se encontraron diferencias significativas (*prueba de Tukey $p > 0.05$*) que evidenciaran un cambio dentro del grupo de plantas evaluadas.

Efecto en la incidencia y la severidad de la roya del café

Incidencia de la roya en segmentos de hoja

Los resultados de las 5 evaluaciones de incidencia de roya en segmentos de las hojas, llevadas a cabo en condiciones controladas en laboratorio (CICAFE-Heredia) para una muestra de 155 plantas del total de la población se observa en la Figura 13. Se da un incremento de la incidencia con respecto a los días después de la inoculación (DDI), se observaron síntomas de roya (amarillamiento) en la primera evaluación a los 13 DDI, que probablemente se realizó naturalmente con antelación en el campo o puede responder a un proceso de incubación acelerado.

Para los 20 DDI, se observa un incremento en la incidencia de la enfermedad con valores cercanos al 30%, en este caso se da el inicio de la etapa de síntomas de la enfermedad, como la aparición de lesiones amarillentas y el crecimiento de estas en el tejido de la hoja. Para la evaluación a los 27, 34 y 44 DDI corresponden a mayores valores de incidencia, cercanos al 55%, se observa una leve tendencia de incremento para la evaluación a los 34 DDI y una tendencia de disminución para la última evaluación (44 DDI), que corresponde a una mayor cantidad de tejido dañado o necrosado (Figura 13).

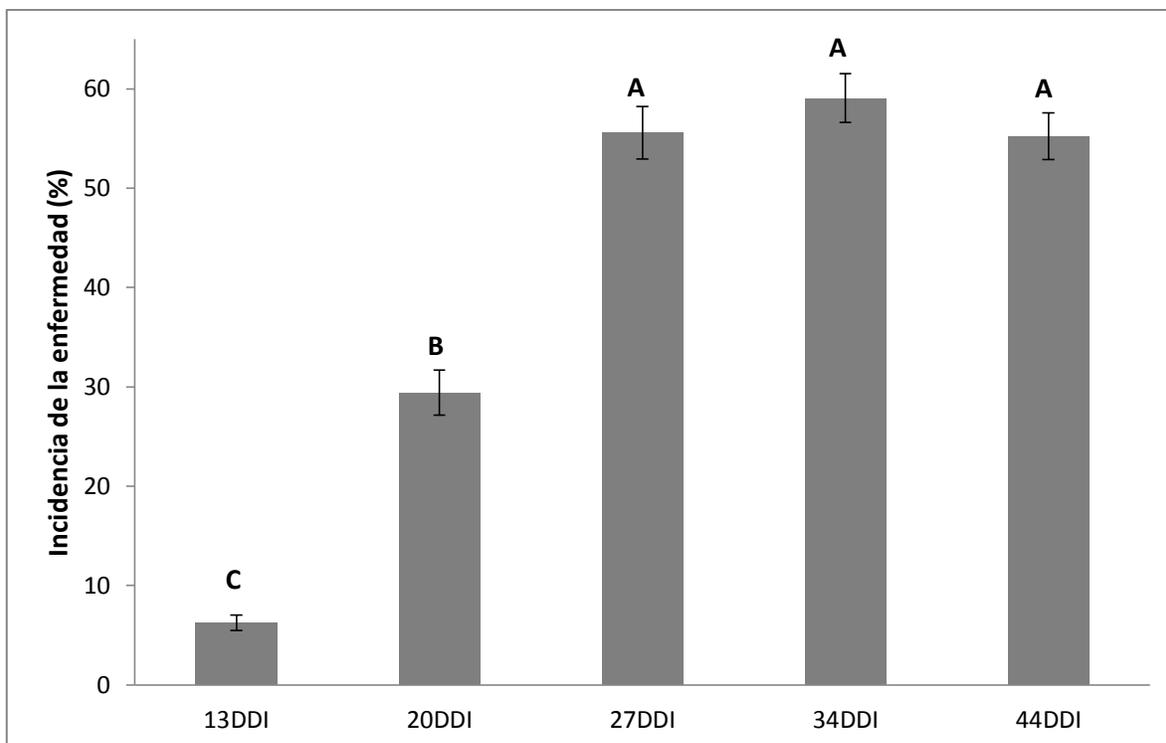


Figura 13. Promedio de la incidencia de la enfermedad en segmentos de hoja, según los días después de la inoculación (DDI) y su período de incubación, en una muestra de 155 plantas tratadas con el mutagénico más controles, llevado a cabo en el CICAFFE, Heredia. **Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey ($p \leq 0,05$)*

Con los promedios para cada evaluación, se observa la cantidad máxima de incidencia de roya en el tejido. Por lo tanto, en la Figura 14 se puede observar la incidencia de la roya por planta, a partir del total de las evaluaciones y de esta forma observar la variabilidad del resultado por cada una de las plantas. Es importante destacar las plantas que tienen valores más bajos del índice de severidad de la enfermedad.

Eskes (2005) menciona la aplicabilidad del test de resistencia por medio de inoculación artificial, el cual se realizó en hojas jóvenes de plantas en invernadero, por medio de la aplicación de esporas de roya, y se humedecen después de la aplicación. Basado en el tipo de respuesta se categoriza de la siguiente forma: resistente (R), moderadamente resistente (MR), moderadamente susceptible (MS)

y susceptible (S). Para el autor este método tuvo buen efecto para evaluar la expresión de resistencia incompleta y completa a razas específicas.

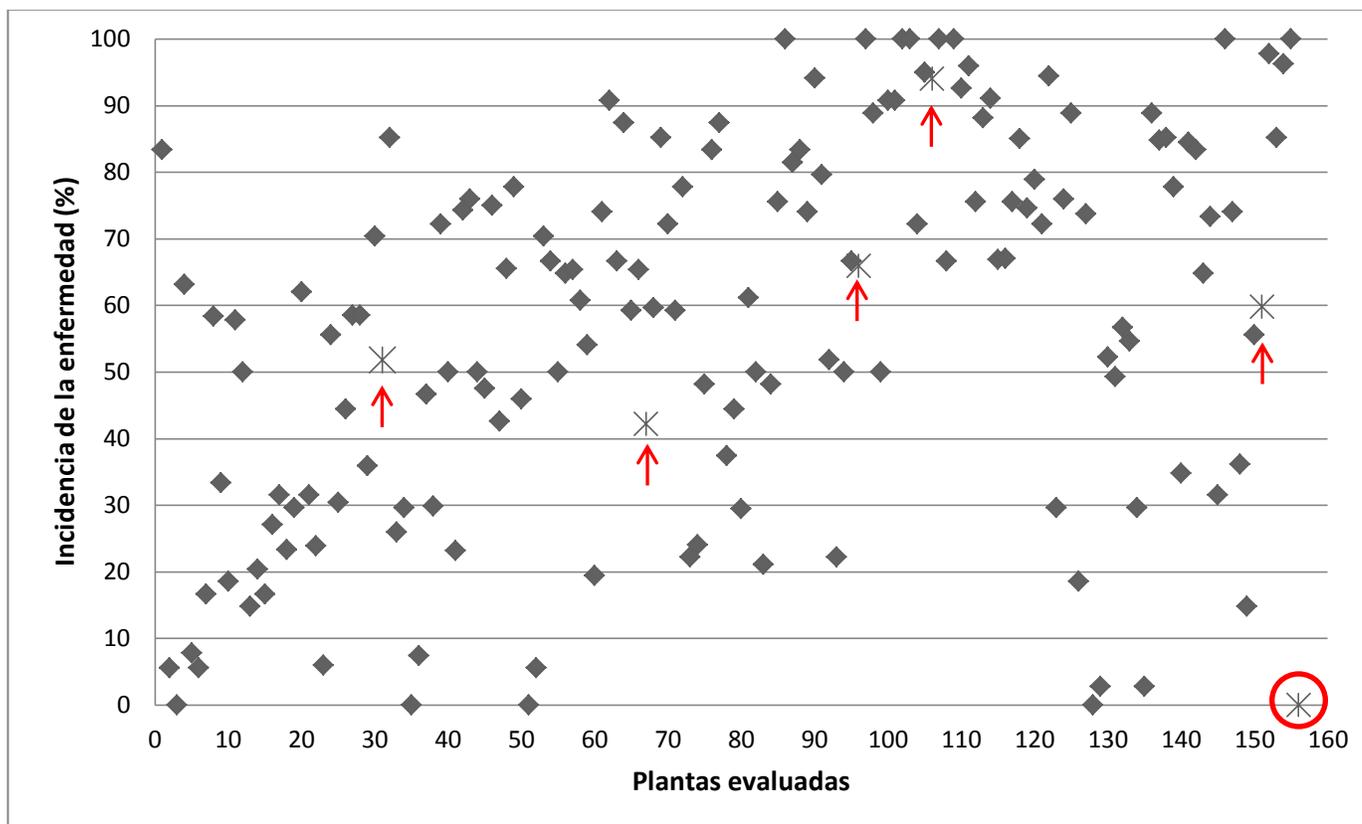


Figura 14. Promedio de las 5 evaluaciones de la incidencia de roya en segmentos de hoja, para una muestra de 155 plantas de la población tratados con el mutagénico azida de sodio, marcado con flechas los testigos no tratados con el mutagénico y en rojo testigos de variedades resistentes a la roya.

A partir del gráfico anterior se detectaron las plantas que tienen valores más bajos de la incidencia de la enfermedad. Se tomó en cuenta las plantas que presentaron un porcentaje de incidencia menor al 20%, de los cuales son las siguientes plantas: 15,16, 25, 27, 36, 43, 71, 78, 132, 179, 180, 240, 243, 274, 618, 631, 636, 652, 706, 156T. Las plantas que tienen valores de cero son: 16, 179, 240, 631 y 156T.

Los controles no tratados con el mutagénico (señalado con flechas) son las plantas 159, 306, 443, 502 y 715, con valores de incidencia de 52%, 42%, 66%, 94% y 60% respectivamente. La muestra 156T es un testigo de la variedad Costa Rica 95 resistente a la roya Costa Rica 95 (dentro del círculo rojo), tomados de los lotes experimentales del CICAPE-Heredia, por lo tanto, se toma como comparador del resultado anterior (Figura14).

Diferentes variables pueden afectar el ciclo de vida del hongo y por ende su incidencia y severidad, de esta forma se evaluó la incidencia de la roya en plantas en campo. El contexto ambiental puede afectar las lesiones causadas por las plagas y enfermedades a través de sus efecto en el entorno físico de las parcelas, la heterogeneidad del paisaje puede alterar la turbulencia y flujos de aire, esto afecta la dirección, velocidad y la distancia de las plagas y enfermedades transportadas por el viento, además de modificar las temperaturas que pueden afectar el ciclo de vida de estos (Avelino et al. 2012).

Incidencia de la roya en campo

En condiciones de campo se evaluó la incidencia de la enfermedad (Figura 15), con respecto al inóculo natural del área experimental donde se sembraron las plantas. En la primera evaluación la cantidad de plantas con roya fue de un 6,46%, debido al poco tiempo (dos meses aproximadamente) de establecimiento de las plantas. Para la segunda evaluación se observó un incremento importante en la cantidad de plantas con roya en el campo de 43,88%. En la cual se llega a valores máximos de entre 50 y 60% de incidencia de la enfermedad, aunque la mayoría con valores cercanos al 20%. Para la tercera evaluación, se obtuvo un 72,81% de plantas con roya, algunas de estas alcanzaron el 100% de hojas con roya.

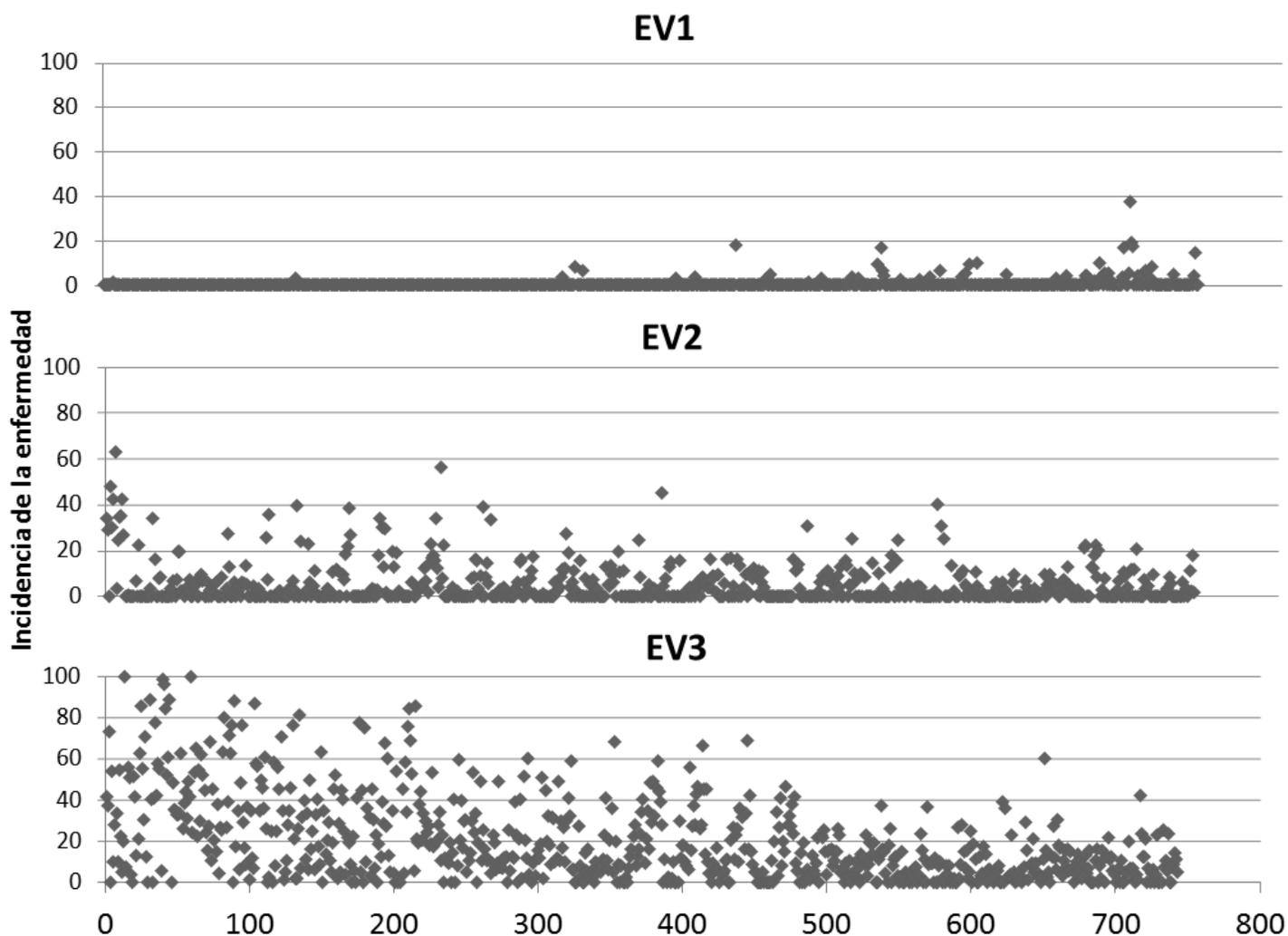


Figura 15. Incidencia de la roya en cada una de las evaluaciones de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio, para la primera (EV1), segunda (EV2) y tercera (EV3) evaluación.

La cantidad de plantas con roya en campo para cada una de las evaluaciones tiene que ver con el comportamiento de la enfermedad y factores ambientales. Avelino et al. (2012) encontraron correlaciones múltiples positivas significativas entre la incidencia máxima de la roya y de la proporción de paisaje de pastos, de igual forma la incidencia máxima de la roya se correlacionó positivamente con el número de nudos de fructificación por planta y con el porcentaje de cobertura de sombra. Como lo describe el autor, la incidencia de la

enfermedad puede estar correlacionada con diferentes variables que hacen llegar el inoculo del hongo de la roya a la plantación.

Debido al comportamiento de incidencia que presenta la población de plantas estudiada, se hace una comparación entre las diferentes evaluaciones con presencia de la enfermedad en plantas testigos (Figura 16). En la primera evaluación no se observa presencia de roya, en la segunda evaluación se observa un incremento, con un máximo de incidencia del 35% aproximadamente, mientras que en la tercera evaluación, la mayoría de los testigos (no tratados con el mutagénico) tienen presencia de roya con valores del 55%.

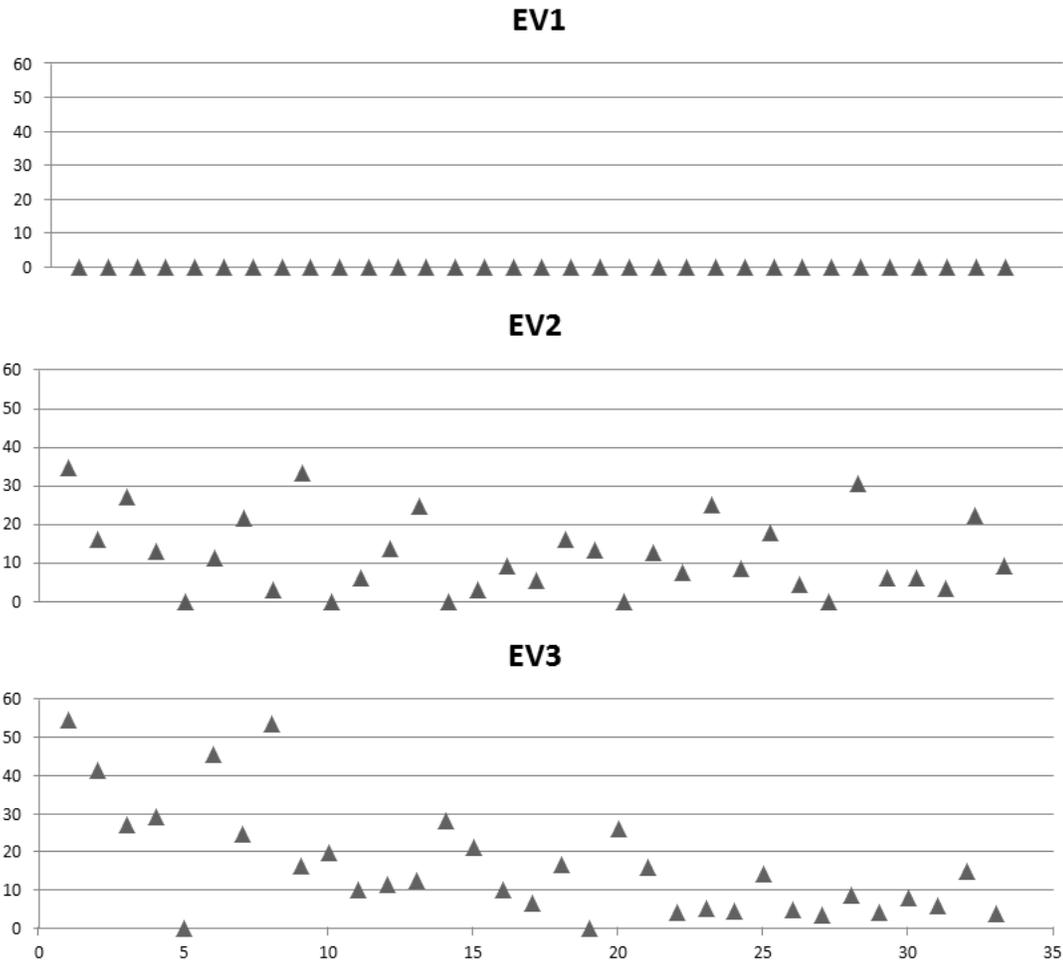


Figura 16. Incidencia de la roya en los testigos ubicados en el campo, para las evaluaciones de la primera (EV1), segunda (EV2) y tercera (EV3) evaluación.

El comportamiento de la enfermedad responde a las condiciones climáticas del lugar, como de la edad de la planta y la cantidad de inóculo en el campo. Además, de las condiciones en las que se encuentra la planta, con un porte mayor, plantas con un mayor requerimiento de nutrientes por su tamaño y crecimiento. Así como lo mencionaron Avelino et al. (2004) los cambios repentinos en el microclima y en la fisiología de la planta influyen diferentes componentes del ciclo de infección de la roya, donde los principales factores que afectan el ciclo de vida son el viento, lluvia, área foliar, humedad de la hoja, luz, temperatura, carga fructífera, humedad del suelo y densidad estomática.

Es importante destacar que las plantas en la tercera evaluación presentaban una disminución en la cantidad de hojas (Figura 4A), debido a que la incidencia de la enfermedad disminuyó la cantidad de hojas del período de inoculación anterior. Es decir, que en la tercera evaluación la cantidad de hojas no siguió en aumento, por el contrario disminuyó, ya que el tejido fue afectado por la enfermedad.

Se realizó una comparación entre las plantas con una incidencia cero de la enfermedad, para los resultados obtenidos en segmentos de hoja en laboratorio (figura 14), con respecto a las correspondientes plantas de la evaluación de incidencia de la enfermedad en campo (Figura 15). Se observó el comportamiento de incidencia cero para ambas evaluaciones en las siguientes plantas: 179, 240 y 631.

A pesar de que no se observan diferencias significativas en las variables de unidades SPAD, Conductancia estomática y área foliar, se realizó una comparación con las plantas que presentaron una incidencia y severidad de la roya con valores de cero. Para la planta 179 los valores de conductancia estomática, CRA, área foliar y unidades SPAD es de $506,4 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 97,1 por ciento, 43 cm^2 y 76,73 respectivamente.

La planta 240, para las mismas variables presenta valores de 308,5 mmol m⁻² s⁻¹, 95,7 por ciento, 30 cm² y 74,97 respectivamente. Para la planta 631 los valores obtenidos son 249,4 mmol m⁻² s⁻¹, 94,02 por ciento, 40 cm² y 43,27 respectivamente. Por lo tanto, con estas plantas que no presentan la enfermedad se puede decir que no existe una tendencia marcada entre las diferentes variables.

Incidencia y severidad de la roya por medio de la inoculación artificial en campo

Debido a las condiciones observadas tanto en laboratorio como en campo con respecto a la incidencia de la roya, por las plantas que tienen valores bajos de incidencia o infección. Se realizó una inoculación artificial en campo con el fin de observar el comportamiento de la incidencia y severidad de la roya en plantas (Figura 17). La evaluación se categoriza en: 0= plantas sin roya, 1=plantas con síntomas de la enfermedad, 2= plantas con presencia de roya

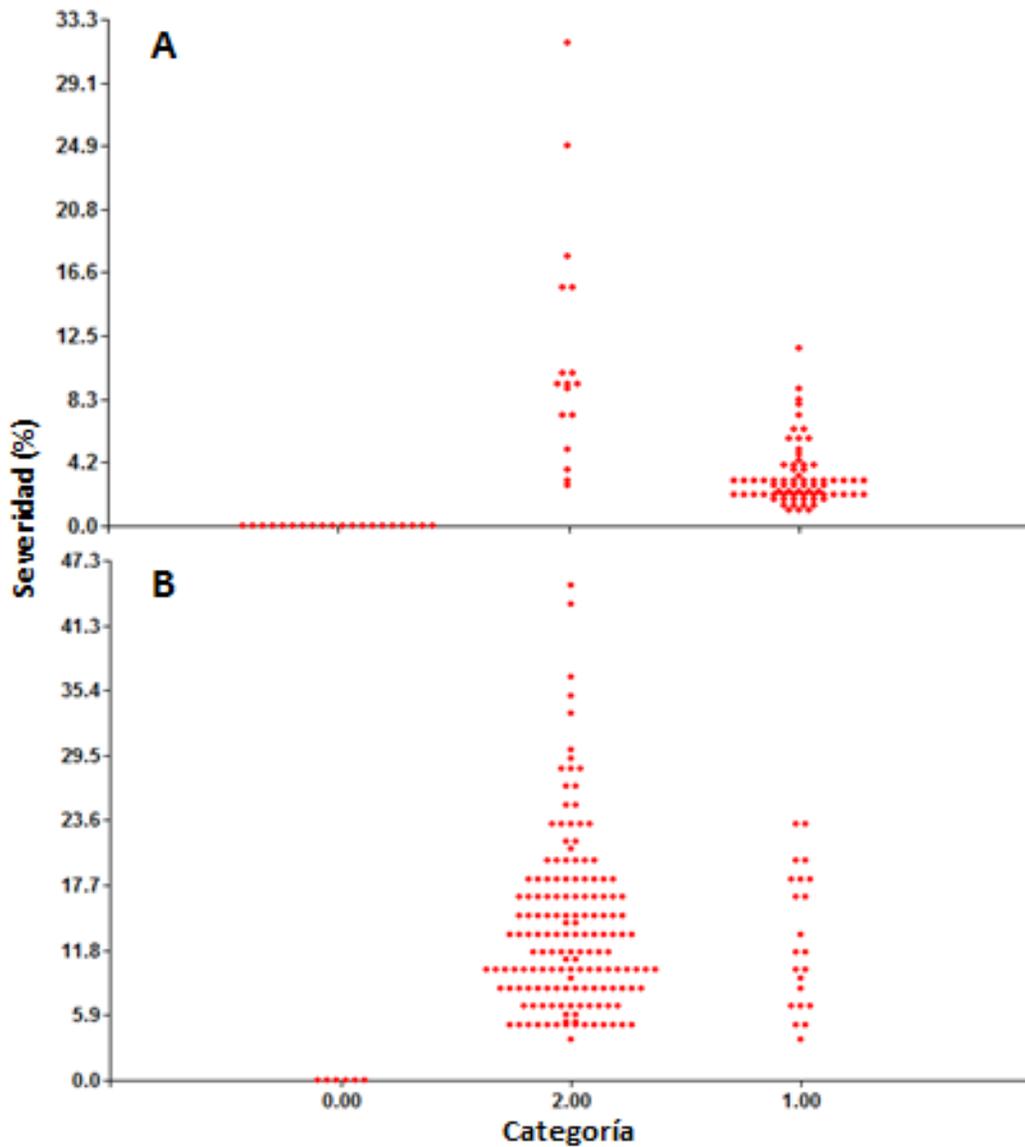


Figura 17. Valore de incidencia y severidad de roya en campo a los 30 días (A) y a los 45 días (B) de realizado la inoculación. Plantas sin respuesta a la roya (0.00), y presencia de síntomas en plantas (1.00) y presencia de roya esporulada (2.00).

Por tanto, la evaluación a los 30 días se observa una gran cantidad de plantas con síntomas (1), y el grado de severidad de las lesiones es entre el 3% con valores máximos de 12% aproximadamente. Se observó una menor cantidad de plantas con la presencia del hongo esporulado (2), con un porcentaje de

incidencia que abarca un mayor rango, desde 3% hasta el 30% aproximadamente de severidad (Figura 17A).

En la Figura 17B, se muestra la severidad de la roya en plantas para los 45 días después de realizada la inoculación, se observó un cambio en cuanto a la esporulación de las lesiones y un incremento en la cantidad de plantas con roya esporulada, donde la severidad alcanza valores cercanos al 50%. Con una mayoría que se ubica entre el 10 y el 20% de severidad. Las plantas sin presencia de roya y las plantas con síntomas disminuyen con respecto a la evaluación a los 30 días.

En el ensayo realizado en campo, parte de las hojas inoculadas presentaron una lesión, acompañada de un amarillamiento particular de un síntoma, el cual no se desarrolló, similar a los síntomas generados por una resistencia vertical o flex. Silva et al. (2000) menciona que la búsqueda de cultivares con resistencia horizontal es de suma importancia, ya que una vez la resistencia vertical haya sido quebrada, si el material tiene un alto nivel de resistencia horizontal, este puede ser aprovechado en campo al ser un material superior. Este autor al probar dos segregaciones de materiales de híbridos de Catuaí y Mundo Novo con híbridos de Timor, encuentra gran cantidad de materiales con resistencia vertical (flex), y de los materiales que segregaron, muchos presentaban la resistencia horizontal.

Correlaciones de las variables de crecimiento y susceptibilidad a la roya

Las correlaciones son importantes ya que permite visualizar la dependencia entre las diferentes variables, las siguientes figuras representan esa asociación entre los diferentes parámetros de crecimiento.

La distribución de cada variable se muestra en la diagonal. En la parte inferior de la diagonal: se muestran los diagramas de dispersión bivariados con una línea ajustada. En la parte superior de la diagonal: el valor de la correlación más el nivel de significancia como estrellas. Cada nivel de significancia está

asociado a un símbolo: p-values (0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 1) = símbolos ("****", "***", "**", ".", " ") respectivamente.

De esta forma, la Figura 18A representa el grado de correlación que existe entre las variables de la primera evaluación, donde la altura de la planta, el número de hojas, el número de ejes plagiotrópicos (bandolas) y el diámetro del tallo (grosor) tienen la mayor relación entre sí, mientras que los valores SPAD tiene poca relación con cada una de las variables. El número de ejes plagiotrópicos (bandolas) tiene el mayor valor de correlación con el número de hojas con un valor de 0,87 y para la altura de la planta con un valor de 0,68. Seguido por la relación de la altura de la planta con el número de hojas con un valor de 0,61. Y el grado de relación continúa con el diámetro del tallo (grosor) y el número de ejes plagiotrópicos (bandolas) con un valor de 0,50.

En la segunda evaluación (Figura 18B), se presenta un comportamiento similar a la primera, donde existe una relación entre las diferentes variables de crecimiento, el valor más alto de correlación sigue siendo para los valores de número de hojas y número de ejes plagiotrópicos (bandolas) con un 0,89. En este caso los valores de grosor de tallo y la altura de la planta presentan valores más altos de correlación.

Las correlaciones en la tercera evaluación (Figura 18C), muestran valores más bajos, sin embargo el comportamiento sigue siendo similar a las evaluaciones anteriores. El que presenta el mayor grado de correlación es la variable del diámetro del tallo (grosor) con respecto a la altura de la planta, con un valor de 0.80. En el caso de las variables de las unidades SPAD, se puede observar que todas presentan un comportamiento similar con respecto a las otras variables, sin embargo la que presenta un valor más alto y por ende mayor dependencia es con la altura de la planta, con un valor de 0,44.

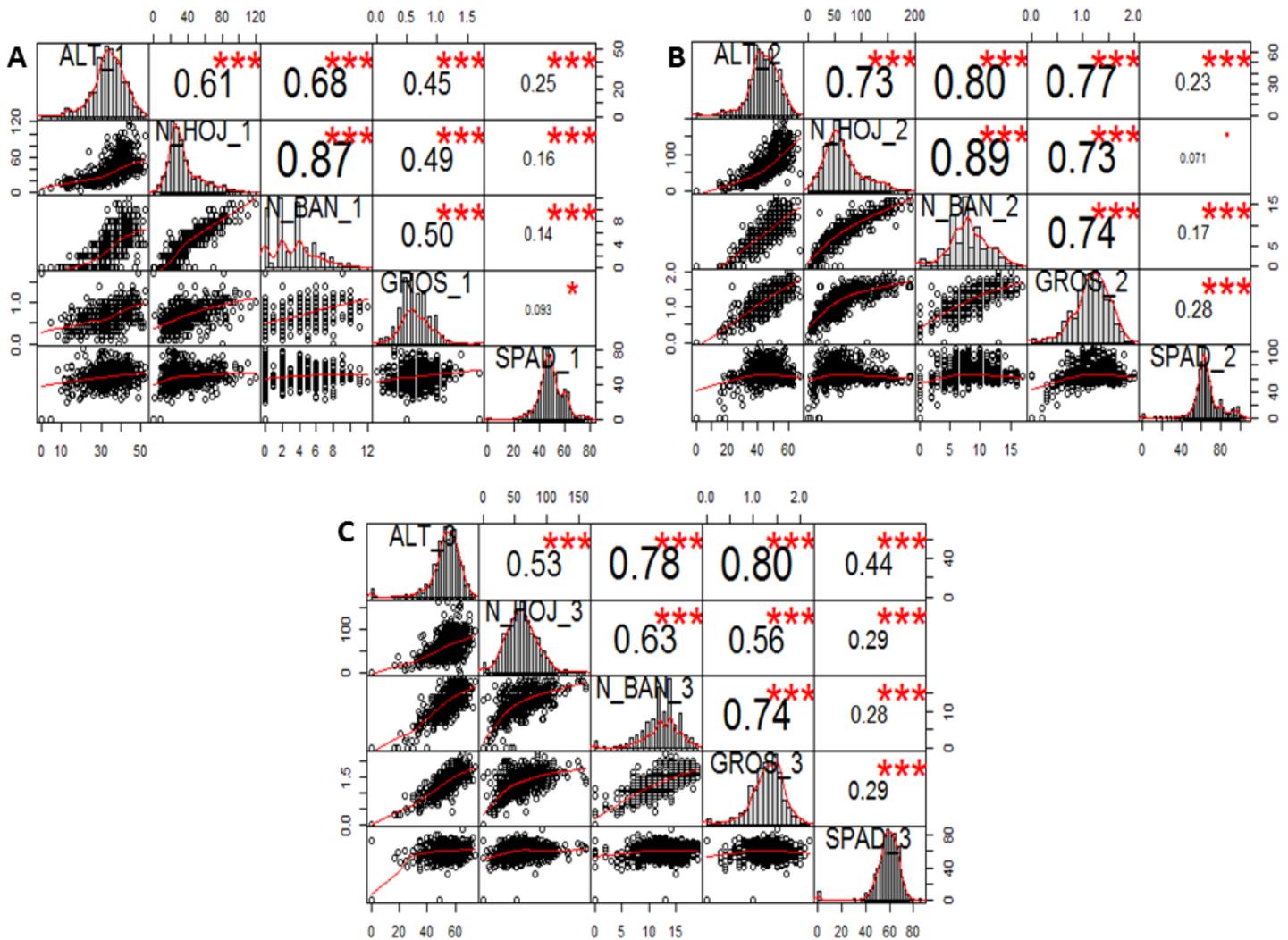


Figura 18. Correlaciones entre las variables de altura (ALT_1), número de hojas (N-HOJ_1), número de ejes plagiotrópicos (bandolas) (N-BAN_1), diámetro del tallo (grosor) (GROS_1) y unidades SPAD (SPAD_1), para la población de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio, para la primera evaluación **A**, para la segunda evaluación **B** y para la tercera evaluación **C**.

Se realiza una correlación para las variables de conductancia estomática, promedio de las unidades SPAD, del contenido relativo de agua, del área foliar, del número de hojas y del diámetro del tallo (grosor). Se logra observar en la Figura 19 que las correlaciones tiene poca significancia, es decir existe poca dependencia entre cada una de estas, en este caso los valores tomados

corresponden a una muestra de 155 plantas de la población, los valores más altos corresponden a las siguientes variables: CRA con Cond_Est con un valor de 0.23; AFol con Spad con un valor de 0,23; y el número de hojas con unidades SPAD con un valor de 0,26. En el caso del número de hojas y el diámetro del tallo (grosor), el comportamiento es similar al de las figuras anteriores.

Por el contrario la conductancia estomática (COND_EST) con respecto al área foliar (AFOL) presenta un valor muy bajo de -0,047. Como lo mencionó Rodríguez et al (2016), la existencia de una correlación negativa entre la frecuencia estomática y el área de la hoja implica que el aumento de la radiación solar, en lugar de provocar un aumento en el número de estomas favorece más bien su agrupamiento, posiblemente por el tamaño de la hoja.

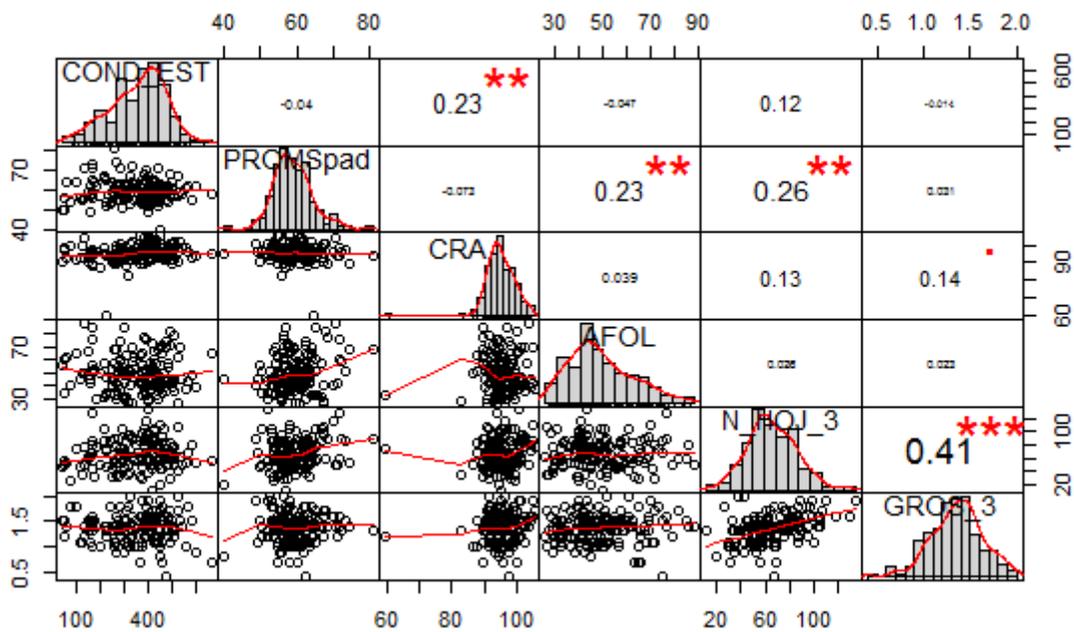


Figura 19. Correlaciones de las variables de conductancia estomática (COND_EST), promedio de los valores SPAD (PROMSpad), contenido relativo de agua (CRA), área foliar (AFOL), número de hojas (N_HOJ_3) y diámetro del tallo (grosor) (GROS_3), de una muestra de 155 plantas del total de la población.

Por medio de las correlaciones se puede determinar las variables que tienen una mayor impacto con respecto a la severidad de la roya en las plantas de café, de esta forma como se observa en la figura 20, la variable que presenta una mayor relación son las unidades SPAD, con la severidad de la roya con un valor de 0,42, lo cual implica que conforme aumenta las unidades SPAD, mayor fue la severidad de la roya.

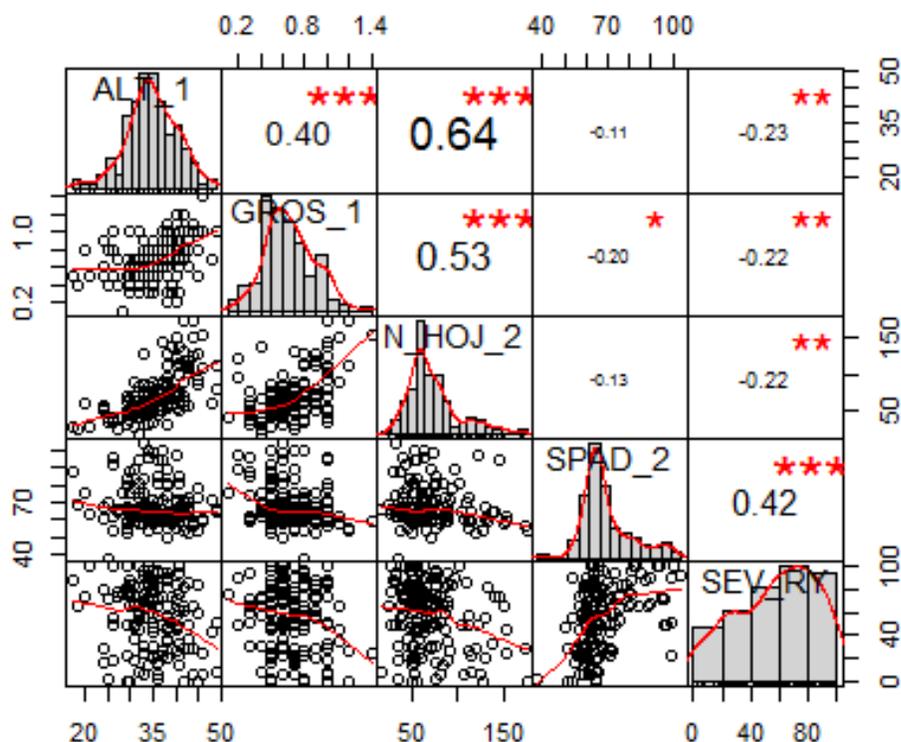


Figura 20. Correlación de las variables de crecimiento con respecto a la severidad de la roya (SEV_RY) con mayor valor de correlación, para una muestra de 155.

De igual forma, en la Figura 21 se muestra el grado de correlación que tiene la incidencia de la roya con respecto a las variables de crecimiento, siendo la altura de la planta de la evaluación número dos (0,29) y tres (0,27), el diámetro del tallo (grosor) de la evaluación número uno (0,21), dos (0,31) y tres (0,29), con los valores que presentan valores más altos de correlación. Estos valores a pesar de ser relativamente bajos indican que conforme la altura de la planta y el diámetro del tallo (grosor) aumenten, la incidencia de la roya aumentará.

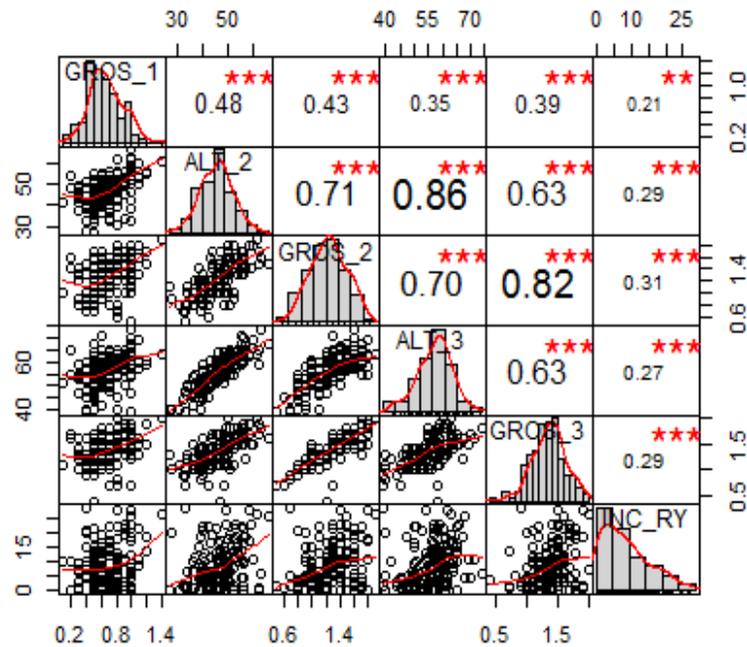


Figura 21. Correlación de las variables de crecimiento con respecto a la incidencia de la roya, con mayor valor de correlación, para una muestra de 155 plantas de la población.

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Para el análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) de la población, con el cual se puede observar de forma general el grupo de datos, al identificar las muestras similares entre sí y cuáles difieren. En este caso se realizó el análisis para la población de 743 plantas con las variables de crecimiento: altura de la planta, número de hojas, número de ejes plagiotrópicos (bandolas), diámetro del tallo (grosor), valores SPAD. Con lo cual a partir del análisis (Figura 22) se puede identificar las plantas que muestran la variabilidad más grande de entre el total de datos. Por lo tanto, se puede deducir que dentro de la población de plantas existen individuos que se diferencia del resto de la población, estas plantas son: 30, 89, 201, 258, 580, 605 y 642.

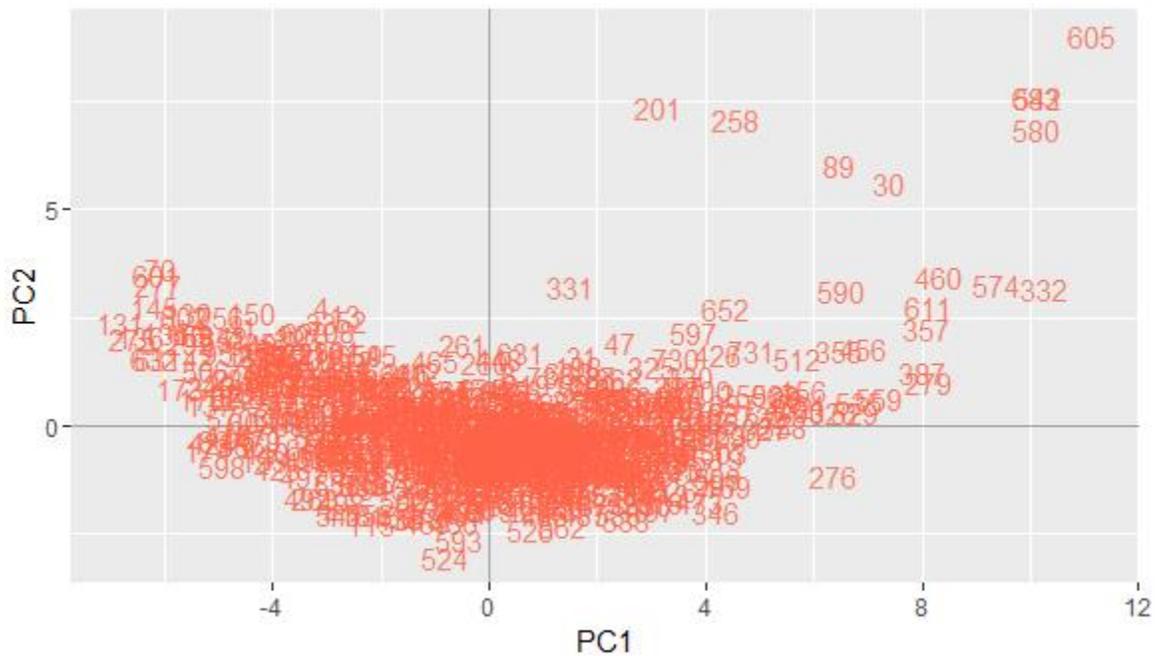


Figura 22. Análisis de componentes principales (PCA) para las variables de crecimiento de la población de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

Se tomó una muestra de 155 plantas (Figura 23) como una representación de la población, en este caso se tomaron las variables de altura de la planta, número de hojas, número de ejes plagiotrópicos (bandolas), diámetro del tallo (grosor), valores SPAD, más los datos de contenido relativo de agua, área foliar y conductancia estomática. Para lo cual, se observó un comportamiento muy homogéneo, sin embargo hay ciertos individuos que tienen una representación de tener una diferencia, entre ellos las plantas 22, 56, 109, 123 y 135.

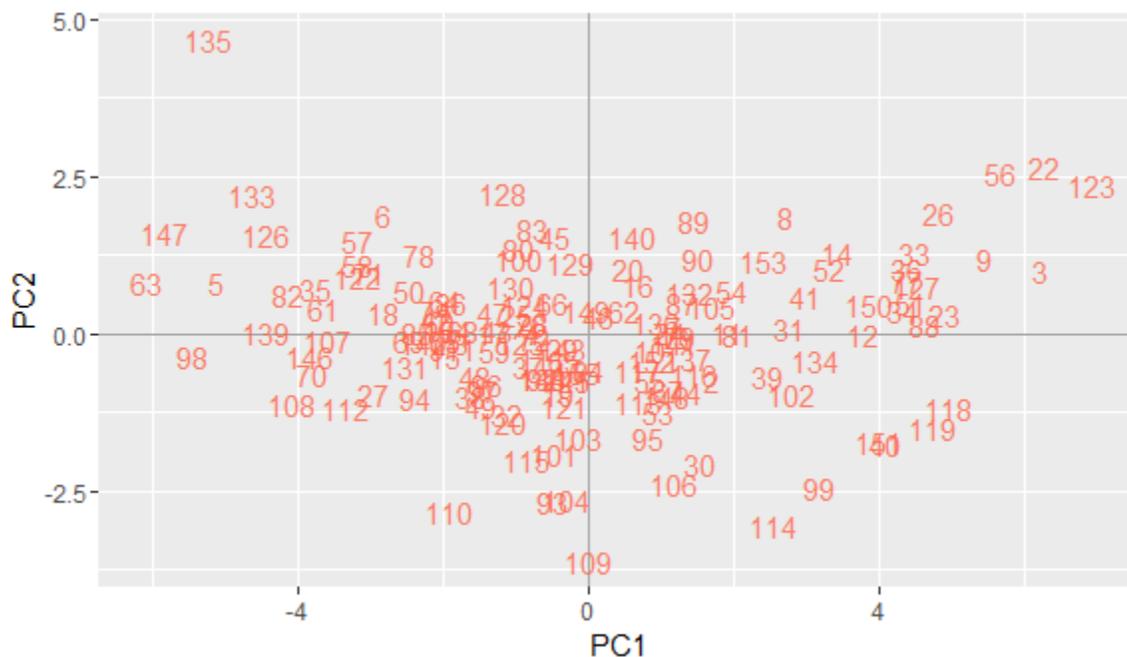


Figura 23. Análisis de componentes principales (PCA) para variables de crecimiento y morfología, para una muestra de 155 plantas de la población tratada con el agente mutagénico azida de sodio.

A partir de los gráficos de PCA antes representados, se presenta la variable que difiere de las demás, por medio de un círculo de correlaciones (Figura 24). Se muestran las variables que se parecen entre sí y las variables que quedan fuera del grupo más homogéneo de la población. De esta forma se puede observar que las variables que difieren del resto de la población son las unidades SPAD y el diámetro del tallo (grosor) para la primera evaluación y el número de hojas de la tercera evaluación.

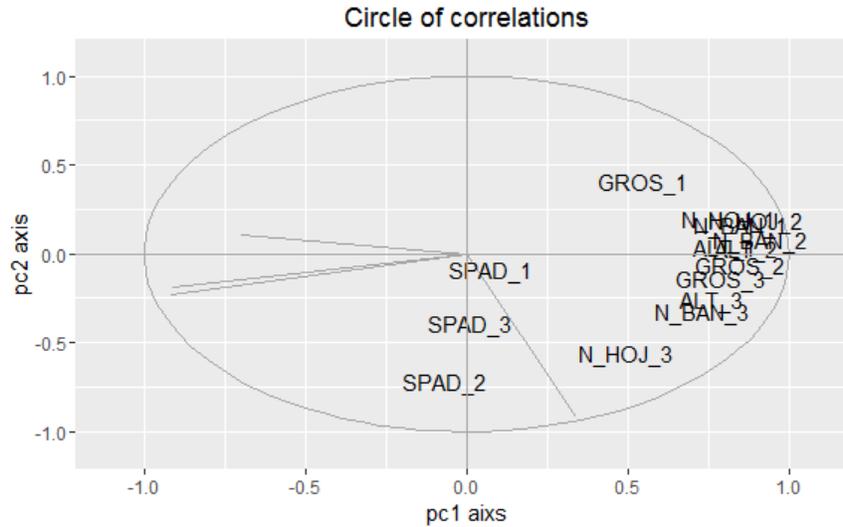


Figura 24. Círculo de correlaciones del análisis de componentes principales de las variables evaluadas en la población de plantas.

Dichas plantas seleccionadas por medio del PCA como diferentes dentro de la población, además de los resultados generados por medio de la incidencia y severidad de la roya y lo observado en campo con potenciales en productividad, pueden ser tomadas en cuenta dentro de programas de mejoramiento genético.

Conclusiones

Las plantas tuvieron un ritmo de crecimiento para la altura de 5 cm, de 1 piso u horqueta y de 15 hojas en promedio por mes. El diámetro del tallo (grosor), entre la primera a la segunda evaluación, crece en 0,55cm y de la segunda a la tercera evaluación crece en 0,1 cm.

Se determinaron características a nivel visual en cuanto a la morfología, que presentaron un diferencial con respecto a las plantas del resto de la población, la variable que tiene mayor importancia agronómica es la planta que presenta tres ejes plagiotrópicos (bandolas) por nudo ortotrópico.

En la población de plantas un 5% presentan valores inferiores de las 40 unidades SPAD, condición que puede afectar el adecuado funcionamiento del fotosistema II (PSII). La conductancia estomática en la población de plantas se presentó alrededor de un 5% de plantas con un rango de 86,98 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, entre las plantas no se observan diferencias significativas. El CRA no mostró diferencias entre las plantas de las muestra de la población.

De la muestra de plantas bajo observación en laboratorio, las que tienen valores de cero son: 16, 179, 240, 631 y 156T, esta última como variedad Costa Rica 95, resistente a la roya. Al comparar los datos de laboratorio con respecto a los datos de campo, las que tienen valores de cero incidencia en ambos casos son: 179, 240 y 631.

Las variables de morfología, están altamente correlacionadas entre sí, donde predomina la relación entre la altura de la planta con el número de ejes plagiotrópicos (bandolas), número de hojas y diámetro del tallo (grosor), con valores cercanos al 0,80 de correlación. En cuanto a las variables relacionadas con la incidencia y severidad de roya, no tienen valores altamente relacionados, los que tienen una tendencia más alta incidencia de la roya y el diámetro del tallo (grosor) y entre la severidad y el valor de las unidades SPAD.

El análisis de componentes principales (PCA), mostró un grupo homogéneo de plantas donde las que difieren para el total de la población son las plantas: 30,

89, 201, 258, 580, 605, 642. Y para la muestra de 155 plantas de la población, las plantas que difieren son: 22, 56, 109, 123 y 135.

Recomendaciones

Se recomienda realizar las inoculaciones de roya en campo cuando haya mayor precipitación y humedad, para lograr generar el ambiente adecuado para el desarrollo del ciclo de vida de la enfermedad.

Se recomienda darle el seguimiento a las plantas que tienen diferenciales en cuanto al comportamiento morfológico, variable de crecimiento y fisiológico, y de susceptibilidad a la roya, además de las que presentan diferenciales por medio del PCA.

Se recomienda realizar nuevos ensayos del contenido relativo de agua, conductancia estomática, área foliar, para la verificación y el seguimiento de las plantas, de esta forma generar una mayor cantidad de datos y poder analizar de esta forma, la presencia de diferencias por medio de estas variables, ya que se requiere una mayor cantidad de repeticiones y datos que muestren el comportamiento de las plantas en el tiempo y delimitar las variables que afectan la medición.

Se recomienda evaluar la cantidad de estomas por área, tanto para plantas que presentan mayor incidencia a la roya, como las que tienen los valores más bajos, además de tomar en cuenta otras variables como la responsabilidad de los estomas, como mecanismo de respuesta a diferentes condiciones que puedan alterar el estoma, por ejemplo a la entrada de hifas del hongo de la roya.

Se recomienda darle seguimiento a las plantas que mostraron un comportamiento diferencial en cuanto a la susceptibilidad a la roya, por medio de marcadores moleculares y el seguimiento en campo, por medio de la observación, además de que las siguientes generaciones de estas plantas sean llevadas a ensayos de regionalización.

Referencias

- Adamu A.K., Aliyu H. 2007. Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Science world journal. 2(4): 9-12.
- Al-Qurainy F., Khan S. 2009. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. World Applied Science Journal. 6 (12): 1589-1601.
- Alzate N. 2015. Importancia del gen SH3 y su relación con la resistencia a la enfermedad roya del cafeto *Hemileia vastatrix* bajo la modalidad de compilación bibliográfica. TFG. Universidad nacional abierta y a distancia: ECAPMA. Medellín, Colombia.
- Avelino J., Cristancho M., Georgiou S., Imbach P., Aguilar L., Bornemann G., Laderach P., Anzueto F., Hruska A.J. Morales C. 2015. The coffee rust crisis in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Security. 7: 303-321.
- Avelino J., Rivas G. 2014. La roya anaranjada del cafeto. 47. HAL Id: hal-01071036
- Avelino J., Romero-Gurdián A., Cruz-Cuellar H., Declerck F. 2012. Landscape context and scale differentially impact coffee leaf rust, coffee Berry borer, and coffee root-knot nematodes. Ecological Applications. 22(2): 584-596.
- Avelino J., Willocquet L., Savary S. 2004. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. Plant Pathology. 53: 541-547.
- Barquero M. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto. ICAFE. San José, Costa Rica. Tercera edición.
- Blanco M., Hagggar J., Moraga P., Madriz JC., Pavón G. 2003. Morfología del café (*Coffea arabica* L.), en lotes comerciales. Nicaragua. Agronomía Mesoamericana. 14 (1): 97-103.
- Bobadilla R., Cenci A., Guyot R., Bertrand B., Georget F., Dechamp E., Herrera J.C., Aribi J., Lashermes P., Etienne H. 2015. Assessment of genetic and

- epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 122: 517-531.
- Bote A.B. Struik P.C. 2011. Effects of shade on growth, production and quality of coffee (*Coffea Arabica*) in Ethiopia. *Journal of horticulture and forestry*. 3 (11): 336-341.
- Breitler J.C., Dechamp E., Campa C., Zebral L.A., Guyot R., Marraccini P., Etienne H. 2018. CRISPR/Ca9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potencial to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. *Plant cell, Tissue and Organ culture*.
- Bustillo A., Villacorta A. 1994. Manejo de las principales plagas del café en plantaciones de altas densidades. CENICAFE, Colombia. Simposio internacional sobre café adensado. IAPAR. Brasil. Pp. 185-196.
- Capucho AS., Zambolim L., Duarte HSS., Vaz GRO. 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea Arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* (60). 1144-1150 pp.
- Carvalho C.R., Fernandes R., Almeida G.M., Barreto R., Evans H. 2011. Cryptosexuality and the genetic diversity paradox in coffee rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE*. 6(11), e26387.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551-560.
- Craparo A.C.W., Steppe K., Van Asten P.J.A., Läderach P., Jossogne L.T.P., Grab S.W. 2017. Application of thermography for monitoring stomatal conductance of *Coffea arabica* under different shading systems. *Science of the total environment*. 609: 755-763.
- Cristancho M.A., Escobar C., Ocampo J.D. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. *Cenicafé*. 58(4): 340-359.

- Escobar C., Cristancho MA. 2007. Estudio de metodologías para la conservación de urediniosporas de la roya del cafeto. *Cenicafé*. 58 (4): 324-332.
- Eskes A.B. 2005. Phenotypic expression of resistance to coffee leaf rust and its possible relationship with durability. En: Zambolin L., Zambolin E.M., Pinto V.M. Durable resistense to coffee leaf rust. Universidade Federal de Vicosa. Vicosa (Brasil). Pp 305-331.
- Etienne H., Bertrand B. 2003. Somaclonal variation in Coffee arabica: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology*. 23: 419-426.
- Fazuoli L.C., Baiao de Oliveira A.C., Toma-Braghini M., Silvarolla M.B. 2005. Identification and use of sources of durable resistance to coffee leaf rust at the IAC En: Zambolin L., Zambolin E.M., Pinto V.M. Durable resistense to coffee leaf rust. Universidade Federal de Vicosa. Vicosa (Brasil). Pp 137-185.
- Ferraz R., Magalhães I., Beltrão N., Melo A., Brito Neto J., Rocha M. 2015. Photosynthetic pigments, cell extrusion and relative leaf water content of the castor vean under silicon and salinity. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*.19 (9): 841-848.
- Franca A.C., Carvalho F.P. 2016. Correlations between spad readings, chlorophyll and leaf nitrogen in coffee cultivars during fruting stage.*Revista Agrarian*. 9 (34): 319-325.
- Franca F., Freitas J., Medeiros J., Messias M. 2004. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondonia. Porto Velho: Embrapa Rondonia. 21 p.
- Gordillo F., Zárate F., Mejía C., Rivera LY., Ariza H. 2008. Análisis de la actividad fotosintética de plantas de café utilizando la técnica fotoacustica. *Revista Colombiana de Física*. 40 (1): 186-189.

- Granados E. 2015. Evaluación de la incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en plantas de café bajo diferentes intensidades de sombra y estrategias de manejo. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Turrialba. Costa Rica.
- Gutiérrez A.; Santacruz F.; Cabrera J; Rodríguez B. 2003. Mejoramiento genético vegetal in Vitro. e-Gnosis. México 1 (1): 1-19.
- Herrera JC., Camayo GC. 2008. Caracterización morfológica y citológica de árboles de *Coffea arabica* L., regenerados por cultivo in vitro de polen aislado. Cenicafé. 59 (2): 143-154.
- Ignacio S. 2007. Caracterización morfológica y agronomía de la colección núcleo de café (*Coffea Arabica* L.) del CATIE. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba. Costa Rica.
- Ilbas A.I., Eroglu Y., Eroglu H.E. 2005. Effects of the application of different concentrations of NaN₃ for different times on the morphological and cytogenetic characteristics of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. Journal of Integrative Plant Biology. 47(9): 1101-1106.
- Jiménez A. 2013. El café en Costa Rica: gran modelador del costarricense. Editorial UCR. San Jose. Costa Rica.
- Kham S., Al-Qurainy F., Anwar F. 2009. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. Environment and wean International journal of science and technology. 4: 1-21.
- Laskar R.A., Chaudhary C., Khan S., Chandra A. 2016. Induction of mutagenized tomato populations for investigation on agronomic traits and mutant phenotyping. Journal of the Saudi Society of Agriculture Sciences.

- Laskar R.A., Chaudhary C., Khan S., Chandra A. 2016. Induction of mutagenized tomato populations for investigations on agronomic traits and mutant phenotyping. *Journal of the Saudi society of agricultural sciences*.
- Marias D.E., Meinzer F.C., Still C. Impacts of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea Arabica*. *Ecology and Evolution*. 17: 1297-1310.
- McDonald B., Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 40: 349-379.
- Miniussi M., Del Terra L., Savi T., Pallavicini A. 2015. Aquaporins in *Coffea arabica* L.: Identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. *Plant physiology and Biochemistry*.
- Moncada P., McCouch S. 2004. Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome* 47: 501-509.
- Morais H., Medri M.E., Marur C.J., Caramuri P.H., Arruda R.A., Gómez J.C. 2004. Modifications on leaf anatomy of *Coffea arabica* L., caused by shade of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Braz archbiol technol*. 47 (6): 863-871.
- Mosquera LP., Riaño NM., Arcila J., Ponce CA. 1999. Fotosíntesis, respiración y fotorespiración en hojas de café *Coffea* sp. *Cenicafé*. 50(3): 215-221.
- Netto A., Campostrini E., Goncalves de Oliveira J., Bressan-Smith R.E. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*. 104: 199-209.
- Rodríguez L., Valdés R., Verdecia J., Arias L., Medina R., Velasco E. 2001. Growth, Relative water content, transpiration and photosynthetic pigment content in coffee trees (*Coffea arabica* L.) growing at different sunlight regimes. *Cultivos tropicales*. 22 (4): 37-41.
- Rodríguez L.A., Guevara F., Gómez H., Fonseca M., Gómez J.C., Pinto R. 2016. Anatomía foliar relacionada con la ruta fotosintética en árboles de café

- (*Coffea arabica* L. Caturra Rojo) expuestos a diferentes niveles de radiación solar en la Sierra Maestra, Granma, Cuba. *Acta Agronómica*. 66(3): 248-254.
- Rodríguez M.N., Alcántar G., Aguilar A., Etchevers J.D., Santizó J.A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra*. 16 (2): 135-141.
- Romero G., Alvarado G., Cortina H., Ligarreto G., Galeano N., Herrera J.C. 2010. Partial resistense to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in coffee (*Coffea arabica* L.): genetic analysis and molecular characterization of putative candidate genes. *Mol Breeding*. 25: 685.697.
- Rozo YI., Cristancho MA. 2010. Evaluación de la susceptibilidad de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., a fungicidas del grupo de los triazoles. *Cenicafé*. 61 (4): 297-314.
- Sakiyama N.S., Toledo E.A., Baiao A.C., Teixeira E., Zambolin L., Prieto H.E., Alves A. 2017. Triple plagiotropic branch in coffee: a new promising mutant?. *Crop breeding and applied biotechnology*. 17: 408-411.
- Sera G., Sera T., Ito D., Alves de azevedo J., Sequeira da Mata J., Dói D., Filho C., Kanayama S. 2007. Resistance to leaf rust in coffee carrying S_H3 gene and other S_H gene. *Brazilian archives of biology and technology*. 50 (5): 753-757.
- Silva M.B., Zambolin L., Pereira A.A., Sakiyama N.S., Vale F.X. 2000. Resistência à ferrugem do cafeeiro de progênies de híbridos de Catuaí e Mundo Novo com o Híbrido de Timor In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, I, Poços de Caldas. Brasília, EMBRAPA CAFÉ. 1: 599-605.
- Silva P., Cavette P., Morais L., Medina E., DaMatta F. 2013. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed

- at improving drought tolerance. *Environmental and experimental botany*. 87: 49-57.
- Singh S.K., Reddy K.R. 2011. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *Journal of photochemistry and photobiology B: biology*. 105: 40-50.
- Srivastava P., Marker S., Pandey P., Tiwari D.K. 2011. Mutagenic effect of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Asian Journal of Plant Science*. 10 (3): 190-201.
- Teulat B., Monneveux P., Wery J., Borries C., Souyris I., Charrier A., this D. 1997. Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *The new phytologist*. 137: 99-107.
- Thioun E., McCarthy J., Gallagher T., Osborne B. 2017. A humidity leads to rapid, temperature dependent changes in coffee leaf physiology and gene expression. *Tree Physiology*. 37: 367-379.
- Torres A.T., Campostrini E., Gonçalves de Oliveira J., Bressan-Smith R.E. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia Horticulturae*. 104: 199-209.
- Vargas C. 2016. Generación de un protocolo para inducir variantes genéticas en café (*Coffea arabica* L.) mediante inducción de mutaciones con el uso de agentes químicos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica.
- Virginio E., Astorga C. 2015. Prevención y control de la roya del café: manual de buenas prácticas técnicas y facilitadores. CATIE. Manual técnico. No. 131.
- Widjaja-Putra D.T., Soni P. 2018. Enhanced broadband greenness in assessing chlorophyll a and b, carotenoid, and nitrogen in robusta coffee plantations using a digital camera. *Precision Agriculture*. 19: 238-256.

Yang G.L., Lu W.H., Lin Y., Luo J.Z., Wang C.B., Meder R., Warburton P., Arnold R.J. 2017. Monitoring water potential and relative water content in *Eucalyptus camaldulensis* using near infrared spectroscopy. *Journal of tropical forest science*. 29: 121-128.

Anexos

Anexo 1. Análisis de suelo de la FEIMA (A) y del suelo utilizado para la composición del sustrato para las plantas (B).

													
CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES REPORTE DE ENSAYO SC12-LSF-I01-R01 (v12)													
Nº DE REPORTE:		61998											
USUARIO:	EMMANUEL LOPEZ GAMBOA												
SUBCLIENTE	TESIS GRADUACION LICENCIATURA FITOTECNIA												
RESPONSABLE:	EMMANUEL LOPEZ GAMBOA												
CORREO	emmlg.05@gmail.com												
TELÉFONO:	8955-4227												
PROVINCIA:	CARTAGO	ANÁLISIS:	QC,CT,NT,C/N										
CANTÓN:	TURRIALBA	FECHA RECEPCIÓN:	31/03/2017										
		EMISIÓN DE REPORTE:	07/04/2017										
		Nº DE MUESTRAS TOTAL:	2										
CULTIVO:	SIN CULTIVO	PÁGINA:	1/2										
ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS													
Solución Extractora:		pH	cmol(+)/L					%	mg/L				
KCI-Olsen Modificado		H ₂ O	ACIDEZ	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn
ID USUARIO	ID LAB	5.5	0.5	4	1	0,2	5		10	3	1	10	5
MUESTRA A - FEIMA	S-17-05613	5.0	0.83	2.97	0.41	0.23	4.44	19	3	1.1	32	195	8
MUESTRA B - FEIMA	S-17-05614	5.5	0.47	9.08	4.55	0.12	14.22	3	6	3.4	19	177	27
Los valores debajo de cada elemento corresponden con los Niveles Críticos generales para la solución extractora usada CICE=Capacidad de intercambio de Cationes Efectiva=Acidez+Ca+Mg+K SA=Porcentaje de Saturación de Acidez=(Acidez/CICE)*100													

Anexo 2. Lista de la muestra de 155 plantas representativas de la población M1 tratada con el agente mutagénico azida de sodio y de plantas testigo no tratadas con el mutagénico (marcadas en gris).

Planta de Población	No. Muestra						
2	1	207	41	383	81	583	121
15	2	213	42	384	82	589	122
16	3	218	43	388	83	601	123
21	4	220	44	398	84	606	124
25	5	221	45	399	85	609	125
27	6	224	46	400	86	618	126
36	7	227	47	409	87	628	127
38	8	230	48	410	88	631	128
42	9	236	49	412	89	636	129
43	10	238	50	415	90	637	130
51	11	240	51	422	91	645	131
68	12	243	52	427	92	646	132
71	13	247	53	436	93	648	133
73	14	250	54	439	94	650	134
78	15	254	55	442	95	652	135
83	16	256	56	443	96	653	136
98	17	266	57	449	97	661	137
100	18	268	58	453	98	668	138
106	19	270	59	455	99	672	139
111	20	274	60	466	100	674	140
127	21	278	61	471	101	689	141
130	22	288	62	476	102	691	142
132	23	290	63	477	103	694	143
134	24	294	64	493	104	696	144
149	25	299	65	495	105	698	145
150	26	302	66	502	106	699	146
153	27	306	67	514	107	703	147
155	28	309	68	522	108	704	148
157	29	310	69	524	109	706	149
158	30	314	70	526	110	714	150
159	31	317	71	527	111	715	151
164	32	328	72	528	112	716	152
165	33	339	73	536	113	721	153
177	34	341	74	541	114	739	154
179	35	344	75	544	115	740	155
180	36	349	76	546	116		
182	37	353	77	549	117		
185	38	356	78	566	118		
188	39	365	79	570	119		
193	40	368	80	575	120		

Anexo 3. Análisis de varianza para las evaluaciones 1, 2 y 3 de la altura de la planta, de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

Altura 1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Valor	776	0.08	0.08	22.28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4041.11	1	4041.11	68.17	<0.0001
Altura	4041.11	1	4041.11	68.17	<0.0001
Error	45885.54	774	59.28		
Total	49926.65	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.68795

Error: 59.2836 gl: 774

Altura	Medias	n	E.E.
Altura_EV1-T	45.39	33	1.34 A
Altura_EV1	34.08	743	0.28 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Altura 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Valor	776	0.06	0.05	19.85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3731.97	1	3731.97	45.93	<0.0001
Altura	3731.97	1	3731.97	45.93	<0.0001
Error	62890.07	774	81.25		
Total	66622.04	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.14684

Error: 81.2539 gl: 774

Altura	Medias	n	E.E.
Altura_EV2-T	55.82	33	1.57 A
Altura_EV2	44.95	743	0.33 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Altura 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Valor	776	0.05	0.05	18.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3840.91	1	3840.91	38.41	<0.0001
Altura	3840.91	1	3840.91	38.41	<0.0001
Error	77388.99	774	99.99		
Total	81229.90	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.49078

Error: 99.9858 gl: 774

Altura	Medias	n	E.E.
Altura_EV3-T	64.82	33	1.74 A
Altura_EV3	53.79	743	0.37 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 4. Análisis de varianza para la evaluación 1, 2 y 3 del diámetro del tallo (Diámetro del tallo (grosor)), de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

Grosor 1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores1	743	2.3E-03	9.2E-04	35.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.09	1	0.09	1.69	0.1946
grosor1	0.09	1	0.09	1.69	0.1946
Error	40.52	741	0.05		
Total	40.61	742			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07946

Error: 0.0547 gl: 741

grosor1 Medias n E.E.

Gr-1-T 0.70 35 0.04 A

Gr-1 0.65 708 0.01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Grosor 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores2	743	0.01	0.01	27.65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.10	1	1.10	10.13	0.0015
grosor2	1.10	1	1.10	10.13	0.0015
Error	80.21	741	0.11		
Total	81.31	742			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11179

Error: 0.1082 gl: 741

grosor2 Medias n E.E.

Gr-2-T 1.36 35 0.06 A

Gr-2 1.18 708 0.01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Grosor 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores3	743	0.02	0.02	25.69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.41	1	1.41	12.38	0.0005
grosor3	1.41	1	1.41	12.38	0.0005
Error	84.26	741	0.11		
Total	85.67	742			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11458

Error: 0.1137 gl: 741

grosor3 Medias n E.E.

Gr-3-T 1.51 35 0.06 A

Gr-3 1.30 708 0.01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 5. Análisis de varianza para las evaluaciones 1, 2 y 3 del número de ejes plagiotrópicos (bandolas) de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

No. Bandola 1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	0.01	0.01	74.63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	43.45	1	43.45	6.66	0.0100
no.bandola	43.45	1	43.45	6.66	0.0100
Error	5049.91	774	6.52		
Total	5093.36	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.89171

Error: 6.5244 gl: 774

no.bandola	Medias	n	E.E.
No. Bandola_EV1-T	4.55	33	0.44 A
No. Bandola_EV1	3.37	743	0.09 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

No. Bandola 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	4.8E-03	3.5E-03	41.25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	100.66	1	100.66	3.73	0.0538
no.bandola	100.66	1	100.66	3.73	0.0538
Error	20892.47	774	26.99		
Total	20993.13	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.81375

Error: 26.9929 gl: 774

no.bandola	Medias	n	E.E.
No. Bandola_EV3-T	14.30	33	0.90 A
No. Bandola_EV3	12.52	743	0.19 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

No. Bandola 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	4.8E-03	3.5E-03	41.25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	100.66	1	100.66	3.73	0.0538
no.bandola	100.66	1	100.66	3.73	0.0538
Error	20892.47	774	26.99		
Total	20993.13	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.81375

Error: 26.9929 gl: 774

no.bandola	Medias	n	E.E.
No. Bandola_EV3-T	14.30	33	0.90 A
No. Bandola_EV3	12.52	743	0.19 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 6. Análisis de varianza para las evaluaciones 1, 2 y 3 del número de hojas de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

No. Hojas1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Valores	776	0.03	0.03	39.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15274.58	1	15274.58	25.09	<0.0001
No.hojas	15274.58	1	15274.58	25.09	<0.0001
Error	471191.39	774	608.77		
Total	486465.97	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.61354

Error: 608.7744 gl: 774

No.hojas	Medias	n	E.E.
----------	--------	---	------

No. Hojas_EV3-T	83.55	33	4.30 A
-----------------	-------	----	--------

No. Hojas_EV3	61.56	743	0.91 B
---------------	-------	-----	--------

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

No. Hojas 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Valores	776	0.03	0.03	39.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15274.58	1	15274.58	25.09	<0.0001
No.hojas	15274.58	1	15274.58	25.09	<0.0001
Error	471191.39	774	608.77		
Total	486465.97	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.61354

Error: 608.7744 gl: 774

No.hojas	Medias	n	E.E.
----------	--------	---	------

No. Hojas_EV3-T	83.55	33	4.30 A
-----------------	-------	----	--------

No. Hojas_EV3	61.56	743	0.91 B
---------------	-------	-----	--------

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

No. Hojas 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Valores	776	0.03	0.03	39.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15274.58	1	15274.58	25.09	<0.0001
No.hojas	15274.58	1	15274.58	25.09	<0.0001
Error	471191.39	774	608.77		
Total	486465.97	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.61354

Error: 608.7744 gl: 774

No.hojas	Medias	n	E.E.
----------	--------	---	------

No. Hojas_EV3-T	83.55	33	4.30 A
-----------------	-------	----	--------

No. Hojas_EV3	61.56	743	0.91 B
---------------	-------	-----	--------

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 7. Análisis de varianza para las evaluaciones 1, 2 y 3 del número de nudos ortotrópicos (pisos) de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

No. Pisos 1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	0.01	0.01	78.22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11.91	1	11.91	5.41	0.0203
no.pisos	11.91	1	11.91	5.41	0.0203
Error	1703.84	774	2.20		
Total	1715.75	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.51796

Error: 2.2013 gl: 774

no.pisos	Medias	n	E.E.
No. Pisos-T	2.48	33	0.26 A
No. Pisos	1.87	743	0.05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

No. Pisos 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	4.5E-03	3.2E-03	39.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10.41	1	10.41	3.48	0.0624
no.pisos	10.41	1	10.41	3.48	0.0624
Error	2314.64	774	2.99		
Total	2325.05	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.60370

Error: 2.9905 gl: 774

no.pisos	Medias	n	E.E.
No. Pisos-T	4.97	33	0.30 A
No. Pisos	4.40	743	0.06 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

No. Pisos 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	0.01	0.01	27.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26.21	1	26.21	8.01	0.0048
no.pisos	26.21	1	26.21	8.01	0.0048
Error	2533.91	774	3.27		
Total	2560.12	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.63165

Error: 3.2738 gl: 774

no.pisos	Medias	n	E.E.
No. Pisos-T	7.52	33	0.31 A
No. Pisos	6.60	743	0.07 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 8. Análisis de varianza para las evaluaciones 1, 2 y 3 de las unidades SPAD de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

SPAD 1

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores	776	3.4E-04	0.00	19.23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24.15	1	24.15	0.26	0.6082
spad1	24.15	1	24.15	0.26	0.6082
Error	71081.53	774	91.84		
Total	71105.69	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.34550

Error: 91.8366 gl: 774

spad1 Medias n E.E.

EV1	49.88	743	0.35	A
-----	-------	-----	------	---

EV1-T	49.01	33	1.67	A
-------	-------	----	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

SPAD 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores2	776	0.02	0.02	20.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3285.12	1	3285.12	18.11	<0.0001
Spad2	3285.12	1	3285.12	18.11	<0.0001
Error	140379.32	774	181.37		
Total	143664.44	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.70148

Error: 181.3686 gl: 774

Spad2 Medias n E.E.

EV2-T	76.97	33	2.34	A
-------	-------	----	------	---

EV2	66.77	743	0.49	B
-----	-------	-----	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

SPAD 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
valores3	776	3.4E-03	2.1E-03	16.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	248.68	1	248.68	2.61	0.1069
spad3	248.68	1	248.68	2.61	0.1069
Error	73861.82	774	95.43		
Total	74110.50	775			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.41030

Error: 95.4287 gl: 774

spad3 Medias n E.E.

EV3-T	62.38	33	1.70	A
-------	-------	----	------	---

EV3	59.57	743	0.36	A
-----	-------	-----	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 9. Análisis de varianza para el Contenido relativo de agua (prueba de Tukey para un $p > 0.05$), de la muestra de 155 plantas de la población M1 tratadas con el agente mutagénico azida de sodio.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CRA	465	0.60	0.41	5.16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11450.10	154	74.35	3.08	<0.0001
Planta	11450.10	154	74.35	3.08	<0.0001
Error	7490.57	310	24.16		
Total	18940.67	464			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=17.33377

Error: 24.1631 gl: 310

Planta	Medias	n	E.E.				
14.00	105.18	3	2.84	A			
23.00	105.15	3	2.84	A			
26.00	104.73	3	2.84	A	B		
52.00	104.28	3	2.84	A	B		
36.00	103.96	3	2.84	A	B		
94.00	103.91	3	2.84	A	B		
21.00	103.02	3	2.84	A	B	C	
49.00	102.45	3	2.84	A	B	C	
30.00	102.28	3	2.84	A	B	C	
13.00	102.15	3	2.84	A	B	C	
53.00	101.94	3	2.84	A	B	C	
84.00	101.53	3	2.84	A	B	C	
54.00	101.36	3	2.84	A	B	C	
29.00	101.35	3	2.84	A	B	C	
24.00	101.20	3	2.84	A	B	C	
9.00	101.16	3	2.84	A	B	C	
27.00	101.13	3	2.84	A	B	C	
60.00	100.76	3	2.84	A	B	C	
3.00	100.41	3	2.84	A	B	C	
37.00	100.41	3	2.84	A	B	C	
31.00	100.41	3	2.84	A	B	C	
28.00	100.21	3	2.84	A	B	C	D
32.00	100.15	3	2.84	A	B	C	D
25.00	99.65	3	2.84	A	B	C	D
10.00	99.64	3	2.84	A	B	C	D
147.00	99.33	3	2.84	A	B	C	D
8.00	99.14	3	2.84	A	B	C	D
82.00	99.14	3	2.84	A	B	C	D
47.00	99.08	3	2.84	A	B	C	D
79.00	98.94	3	2.84	A	B	C	D
19.00	98.82	3	2.84	A	B	C	D
18.00	98.81	3	2.84	A	B	C	D
11.00	98.76	3	2.84	A	B	C	D
42.00	98.68	3	2.84	A	B	C	D
103.00	98.56	3	2.84	A	B	C	D
17.00	98.55	3	2.84	A	B	C	D
2.00	98.54	3	2.84	A	B	C	D
50.00	98.50	3	2.84	A	B	C	D
106.00	98.36	3	2.84	A	B	C	D
62.00	98.34	3	2.84	A	B	C	D
45.00	98.22	3	2.84	A	B	C	D
55.00	98.12	3	2.84	A	B	C	D
44.00	98.07	3	2.84	A	B	C	D
48.00	97.62	3	2.84	A	B	C	D
5.00	97.52	3	2.84	A	B	C	D
75.00	97.46	3	2.84	A	B	C	D
109.00	97.29	3	2.84	A	B	C	D
61.00	97.27	3	2.84	A	B	C	D
35.00	97.14	3	2.84	A	B	C	D
4.00	97.13	3	2.84	A	B	C	D
6.00	97.04	3	2.84	A	B	C	D
138.00	97.00	3	2.84	A	B	C	D
46.00	96.95	3	2.84	A	B	C	D
16.00	96.66	3	2.84	A	B	C	D
41.00	96.59	3	2.84	A	B	C	D
65.00	96.52	3	2.84	A	B	C	D
125.00	96.50	3	2.84	A	B	C	D
15.00	96.32	3	2.84	A	B	C	D
119.00	96.21	3	2.84	A	B	C	D
22.00	96.14	3	2.84	A	B	C	D

7.00	96.12	3	2.84	A	B	C	D
57.00	96.10	3	2.84	A	B	C	D
110.00	95.97	3	2.84	A	B	C	D
72.00	95.90	3	2.84	A	B	C	D
111.00	95.90	3	2.84	A	B	C	D
100.00	95.83	3	2.84	A	B	C	D
51.00	95.69	3	2.84	A	B	C	D
139.00	95.56	3	2.84	A	B	C	D
56.00	95.51	3	2.84	A	B	C	D
126.00	95.40	3	2.84	A	B	C	D
39.00	95.31	3	2.84	A	B	C	D
116.00	95.29	3	2.84	A	B	C	D
34.00	95.16	3	2.84	A	B	C	D
90.00	95.05	3	2.84	A	B	C	D
20.00	95.00	3	2.84	A	B	C	D
59.00	94.99	3	2.84	A	B	C	D
115.00	94.98	3	2.84	A	B	C	D
71.00	94.79	3	2.84	A	B	C	D
81.00	94.72	3	2.84	A	B	C	D
130.00	94.62	3	2.84	A	B	C	D
129.00	94.61	3	2.84	A	B	C	D
120.00	94.60	3	2.84	A	B	C	D
135.00	94.48	3	2.84	A	B	C	D
124.00	94.42	3	2.84	A	B	C	D
38.00	94.37	3	2.84	A	B	C	D
137.00	94.33	3	2.84	A	B	C	D
33.00	94.25	3	2.84	A	B	C	D
93.00	94.19	3	2.84	A	B	C	D
92.00	94.19	3	2.84	A	B	C	D
85.00	94.19	3	2.84	A	B	C	D
98.00	94.18	3	2.84	A	B	C	D
136.00	94.16	3	2.84	A	B	C	D
154.00	94.03	3	2.84	A	B	C	D
128.00	94.02	3	2.84	A	B	C	D
97.00	94.01	3	2.84	A	B	C	D
131.00	93.89	3	2.84	A	B	C	D
117.00	93.87	3	2.84	A	B	C	D
63.00	93.85	3	2.84	A	B	C	D
108.00	93.82	3	2.84	A	B	C	D

91.00	93.78	3	2.84	A	B	C	D
78.00	93.77	3	2.84	A	B	C	D
123.00	93.61	3	2.84	A	B	C	D
40.00	93.57	3	2.84	A	B	C	D
152.00	93.45	3	2.84	A	B	C	D
112.00	93.44	3	2.84	A	B	C	D
96.00	93.43	3	2.84	A	B	C	D
66.00	93.32	3	2.84	A	B	C	D
67.00	93.22	3	2.84	A	B	C	D
64.00	93.15	3	2.84	A	B	C	D
12.00	92.99	3	2.84	A	B	C	D
58.00	92.99	3	2.84	A	B	C	D
143.00	92.92	3	2.84	A	B	C	D
145.00	92.84	3	2.84	A	B	C	D
77.00	92.67	3	2.84	A	B	C	D
74.00	92.62	3	2.84	A	B	C	D
114.00	92.57	3	2.84	A	B	C	D
132.00	92.56	3	2.84	A	B	C	D
70.00	92.52	3	2.84	A	B	C	D
69.00	92.28	3	2.84	A	B	C	D
149.00	92.19	3	2.84	A	B	C	D
43.00	92.18	3	2.84	A	B	C	D
121.00	91.93	3	2.84	A	B	C	D
118.00	91.90	3	2.84	A	B	C	D
127.00	91.89	3	2.84	A	B	C	D
155.00	91.62	3	2.84	A	B	C	D
153.00	91.61	3	2.84	A	B	C	D
148.00	91.50	3	2.84	A	B	C	D
141.00	91.48	3	2.84	A	B	C	D
68.00	91.46	3	2.84	A	B	C	D
134.00	91.45	3	2.84	A	B	C	D
102.00	91.37	3	2.84	A	B	C	D
150.00	91.34	3	2.84	A	B	C	D
142.00	91.32	3	2.84	A	B	C	D
122.00	91.21	3	2.84	A	B	C	D
151.00	91.17	3	2.84	A	B	C	D
86.00	91.12	3	2.84	A	B	C	D
99.00	90.97	3	2.84	A	B	C	D
107.00	90.97	3	2.84	A	B	C	D

121.00	91.93	3	2.84	A	B	C	D
118.00	91.90	3	2.84	A	B	C	D
127.00	91.89	3	2.84	A	B	C	D
155.00	91.62	3	2.84	A	B	C	D
153.00	91.61	3	2.84	A	B	C	D
148.00	91.50	3	2.84	A	B	C	D
141.00	91.48	3	2.84	A	B	C	D
68.00	91.46	3	2.84	A	B	C	D
134.00	91.45	3	2.84	A	B	C	D
102.00	91.37	3	2.84	A	B	C	D
150.00	91.34	3	2.84	A	B	C	D
142.00	91.32	3	2.84	A	B	C	D
122.00	91.21	3	2.84	A	B	C	D
151.00	91.17	3	2.84	A	B	C	D
86.00	91.12	3	2.84	A	B	C	D
99.00	90.97	3	2.84	A	B	C	D
107.00	90.97	3	2.84	A	B	C	D
89.00	90.86	3	2.84	A	B	C	D
76.00	90.59	3	2.84	A	B	C	D
88.00	90.32	3	2.84	A	B	C	D
105.00	90.29	3	2.84	A	B	C	D
87.00	89.93	3	2.84	A	B	C	D
144.00	89.86	3	2.84	A	B	C	D
133.00	89.74	3	2.84	A	B	C	D
104.00	89.67	3	2.84	A	B	C	D
73.00	89.67	3	2.84	A	B	C	D
140.00	89.51	3	2.84	A	B	C	D
101.00	89.41	3	2.84	A	B	C	D
113.00	89.40	3	2.84	A	B	C	D
146.00	87.65	3	2.84	A	B	C	D
95.00	87.63	3	2.84	A	B	C	D
80.00	86.51	3	2.84	A	B	C	D
83.00	82.98	3	2.84	A	B	C	D
1.00	59.35	3	2.84	A	B	C	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 10. Análisis de varianza para los datos de área foliar (prueba de Tukey para un $p > 0.05$) de una muestra de 155 plantas de la población M1 tratadas con el mutagénico azida de sodio.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Area foliar	465	0.65	0.48	25.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	87486.85	154	568.10	3.75	<0.0001
Planta	87486.85	154	568.10	3.75	<0.0001
Error	46925.15	310	151.37		
Total	134412.00	464			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=43.38487
Error: 151.3714 gl: 310
Planta Medias n E.E.

94.00	88.19	3	7.10	A
113.00	85.12	3	7.10	A B
46.00	84.28	3	7.10	A B C
32.00	81.35	3	7.10	A B C D
86.00	78.83	3	7.10	A B C D E
104.00	76.83	3	7.10	A B C D E F
40.00	76.09	3	7.10	A B C D E F G
33.00	74.77	3	7.10	A B C D E F G H
75.00	74.54	3	7.10	A B C D E F G H I
39.00	73.32	3	7.10	A B C D E F G H I J
134.00	71.79	3	7.10	A B C D E F G H I J K
45.00	71.36	3	7.10	A B C D E F G H I J K L
70.00	70.85	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M
23.00	69.45	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
29.00	68.94	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
30.00	68.70	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
136.00	68.67	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
112.00	68.02	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
101.00	67.42	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
93.00	67.31	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
31.00	66.01	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N
76.00	65.99	3	7.10	A B C D E F G H I J K L M N

28.00	65.39	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
126.00	64.95	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
102.00	64.59	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
122.00	64.56	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
133.00	63.12	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
95.00	62.65	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
43.00	62.22	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
20.00	61.22	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
22.00	61.13	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
106.00	60.83	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
103.00	60.62	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
62.00	60.04	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
110.00	58.85	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
38.00	58.40	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
19.00	57.80	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
111.00	57.79	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
44.00	57.64	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
21.00	57.28	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
73.00	56.75	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
132.00	56.38	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
61.00	56.29	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
56.00	55.69	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
140.00	55.44	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
89.00	55.16	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
55.00	54.78	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
15.00	53.57	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
87.00	53.11	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
47.00	52.46	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
96.00	52.20	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
150.00	52.13	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
90.00	51.98	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
4.00	51.75	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
88.00	51.67	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
153.00	51.40	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
68.00	51.32	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
109.00	51.05	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
127.00	50.70	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
146.00	50.62	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
7.00	50.55	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N

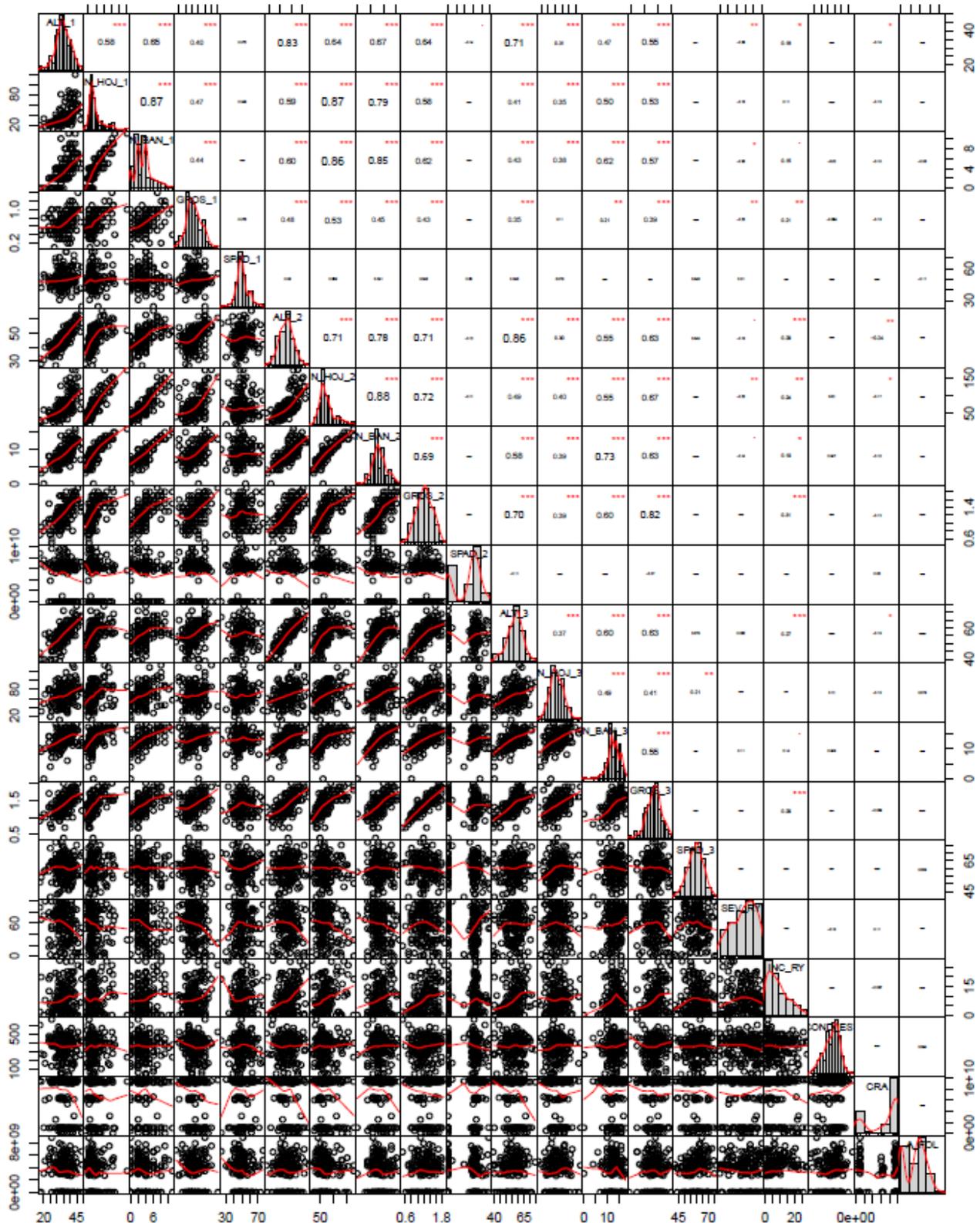
12.00	50.49	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
80.00	50.00	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
71.00	49.81	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
69.00	49.60	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
151.00	49.27	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
82.00	48.95	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
121.00	48.83	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
77.00	48.52	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
118.00	48.51	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
143.00	48.20	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
131.00	47.33	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
139.00	47.26	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
145.00	47.15	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
124.00	46.74	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
54.00	46.40	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
72.00	46.04	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
100.00	45.59	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
37.00	45.52	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
42.00	45.32	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
105.00	45.27	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
135.00	45.17	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
81.00	44.98	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
74.00	44.79	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
36.00	44.64	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
10.00	44.60	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
85.00	44.57	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
53.00	44.54	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
41.00	44.08	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
152.00	43.56	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
18.00	43.48	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
3.00	43.31	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
35.00	43.29	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
84.00	43.23	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
24.00	42.98	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
5.00	42.51	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
148.00	42.33	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
67.00	42.18	3	7.10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N

149.00	41.84	3	7.10	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
79.00	41.66	3	7.10	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
92.00	41.53	3	7.10	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
155.00	41.44	3	7.10	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
25.00	41.23	3	7.10	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
138.00	41.16	3	7.10	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
141.00	41.15	3	7.10	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
119.00	40.89	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
27.00	40.74	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
49.00	40.50	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
16.00	40.49	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
9.00	40.48	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
120.00	40.29	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
63.00	40.06	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
34.00	40.02	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
2.00	39.98	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
8.00	39.86	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
128.00	39.75	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
11.00	39.61	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
154.00	38.74	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
52.00	38.73	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
98.00	38.48	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
144.00	38.15	3	7.10	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		
116.00	37.45	3	7.10	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N			
50.00	37.20	3	7.10	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N			
14.00	36.83	3	7.10	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N			
60.00	36.68	3	7.10	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N			
13.00	36.03	3	7.10	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N			
108.00	35.60	3	7.10	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N			
91.00	35.33	3	7.10	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
129.00	35.17	3	7.10	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
142.00	34.97	3	7.10	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
123.00	34.39	3	7.10	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
78.00	33.74	3	7.10	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
6.00	33.71	3	7.10	F	G	H	I	J	K	L	M	N				
137.00	33.44	3	7.10	G	H	I	J	K	L	M	N					
59.00	33.16	3	7.10	G	H	I	J	K	L	M	N					
17.00	33.12	3	7.10	G	H	I	J	K	L	M	N					

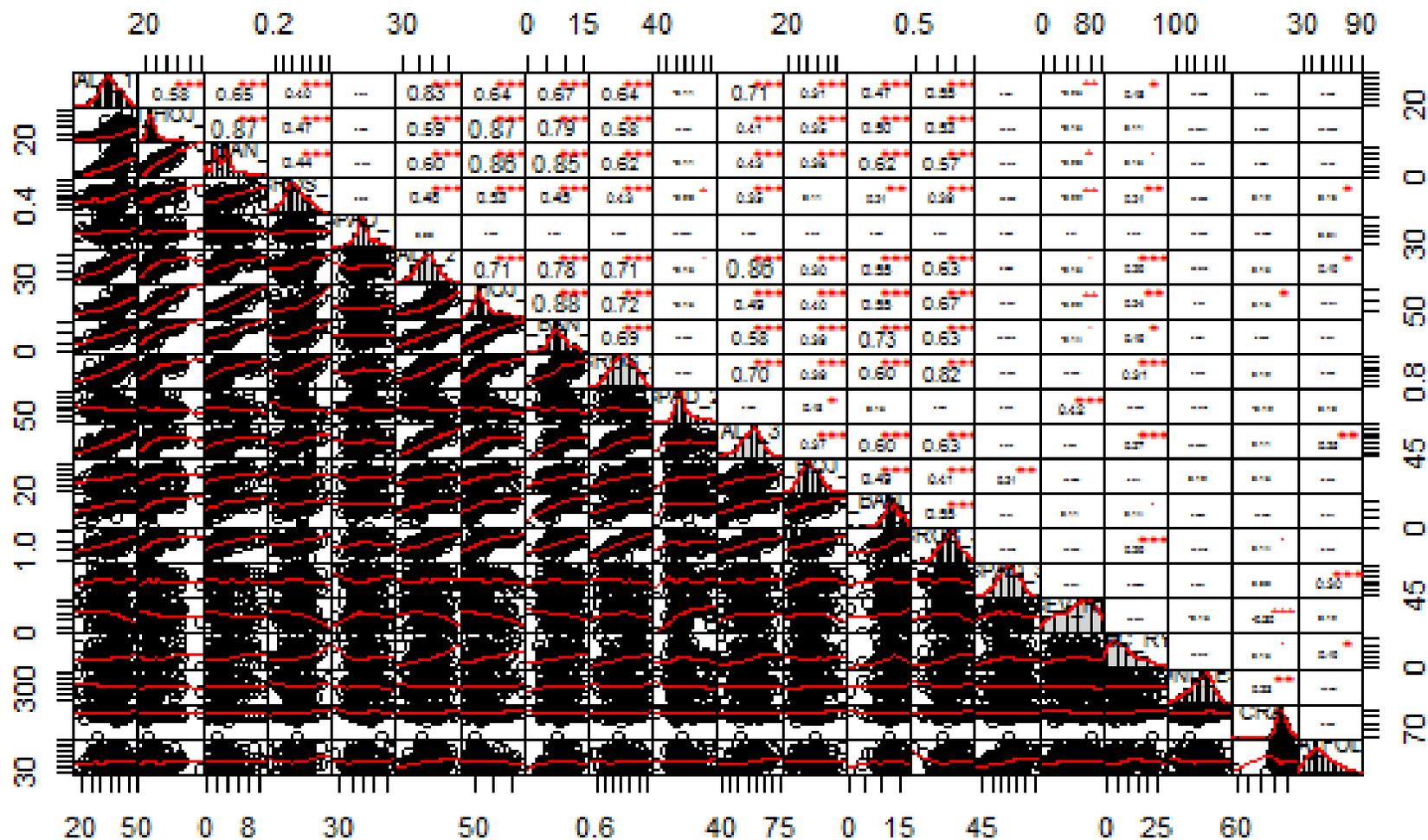
17.00	33.12	3	7.10	G	H	I	J	K	L	M	N					
97.00	32.65	3	7.10	H	I	J	K	L	M	N						
64.00	32.63	3	7.10	H	I	J	K	L	M	N						
125.00	32.60	3	7.10	H	I	J	K	L	M	N						
1.00	32.49	3	7.10	H	I	J	K	L	M	N						
48.00	32.16	3	7.10	H	I	J	K	L	M	N						
115.00	31.35	3	7.10	I	J	K	L	M	N							
66.00	31.23	3	7.10	I	J	K	L	M	N							
51.00	30.42	3	7.10	J	K	L	M	N								
130.00	30.28	3	7.10	J	K	L	M	N								
147.00	30.27	3	7.10	J	K	L	M	N								
107.00	29.59	3	7.10	K	L	M	N									
58.00	29.53	3	7.10	K	L	M	N									
65.00	29.16	3	7.10	K	L	M	N									
114.00	28.40	3	7.10	L	M	N										
83.00	27.49	3	7.10	M	N											
57.00	27.04	3	7.10	N												
99.00	27.04	3	7.10	N												
117.00	26.58	3	7.10	N												

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 11. Análisis de correlación para las variables de crecimiento de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.



Anexo 12. Análisis de correlación para las variables de crecimiento de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio, relacionadas con el la incidencia y la severidad de la roya.



Anexo 13. Análisis de varianza para las evaluaciones 1, 2, 3, 4 y 5 de la incidencia de la roya en segmentos de hoja, en una muestra de la población M1 de plantas tratadas con el mutagénico azida de sodio.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
datos	785	0.35	0.35	67.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	327051.36	4	81762.84	107.16	<0.0001
evaluaciones	327051.36	4	81762.84	107.16	<0.0001
Error	595132.36	780	762.99		
Total	922183.72	784			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.51974

Error: 762.9902 gl: 780

evaluaciones	Medias	n	E.E.	
4.00	59.05	157	2.20	A
3.00	55.59	157	2.20	A
5.00	55.24	157	2.20	A
2.00	29.43	157	2.20	B
1.00	6.25	157	2.20	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)