



Determinación de la concentración de tetrazolio y tiempo de tinción adecuado para el análisis de viabilidad en semillas de café

Determination of tetrazolium concentration and adequate staining time for viability analysis in coffee seeds

Carolina Calla Tola, Juan Carlos Huarcacho Ninacanchi y David Cruz Choque

RESUMEN: El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del INIAF La Paz, dependiente de la Dirección Nacional de Semillas INIAF, teniendo como objetivo obtener una concentración de tetrazolio y tiempo de tinción adecuado para el análisis de viabilidad de semillas de café. Este análisis corresponde a una de varias pruebas que se realizan para certificar un tipo de semilla. Se analizaron 3 concentraciones de tetrazolio y 4 tiempos de tinción como factores independientes, la variable de respuesta para ambos fue el número de embriones viables. Se hizo un Análisis de Varianza trifactorial: concentración de tetrazolio, tiempo de tinción y variedad. Los resultados fueron validados mediante el análisis de correlaciones, dos tratamientos fueron los más adecuados para la prueba de viabilidad, que corresponden al 0,5% de concentración de tetrazolio con 3 horas de tinción y al 0,1% de concentración de tetrazolio con 5 horas de tinción.

PALABRAS CLAVE: Café, viabilidad, tetrazolio.

ABSTRACT: The research work was carried out at the INIAF La Paz Laboratory, under the National Directorate of INIAF Seeds, with the objective of obtaining an adequate concentration of tetrazolium and staining time for the analysis of the viability of coffee seeds. This analysis corresponds to one of several tests that are performed to certify a type of seed. Three analyzes of tetrazolium and 4 staining times were analyzed as independent factors, the response variable for both was the number of viable embryos. A three-factor analysis of variance was made: tetrazolium concentration, staining time and variety. The results were validated by correlation analysis, two treatments were the most suitable for the viability test, corresponding to 0.5% of tetrazolium concentration with 3 hours of staining and 0.1% of tetrazolium concentration with 5 staining hours.

KEYWORDS: Coffee, viability, tetrazolium.

AUTORES: **Carolina Calla Tola:** Carrera Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. carolinacalla@yahoo.es

Juan Carlos Huarcacho Ninacanchi: Dirección de Semillas La Paz. Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal. japaz@iniaf.gob.bo

David Cruz Choque: Docente Carrera Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. davidcruzchoque@yahoo.com.ar

Presentado: 07/09/19. **Aprobado:** 25/10/19.



INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de control de calidad contamos con diferentes métodos que permiten obtener resultados uniformes y comparables entre diferentes análisis y analistas, por esta razón, es imprescindible la disponibilidad de instalaciones adecuadas, personal entrenado, métodos uniformes y un programa de investigación y análisis de semillas como el

Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF) que trabaja en nuestro país,

La prueba de viabilidad revela una serie de aspectos esenciales que permite conocer la cantidad de semillas que están vivas y pueden llegar a convertirse en plantas; las semillas de café no pueden ser almacenadas por mucho tiempo porque son consideradas de vida corta (Clemente et al, 2012), y su almacenamiento

cuando es realizado en condiciones adversas, induce a una rápida pérdida de viabilidad.

A su vez, la germinación es muy lenta, siendo necesario de 30 a 45 días para una prueba de germinación (MAPA, 2007). Según Días y Silva (1998), la lenta germinación de las semillas de café, además de la pérdida del poder germinativo, llega a crear situaciones en que, cuando se obtienen los resultados de la prueba de germinación, éste ya no refleje el verdadero estado fisiológico de las semillas de aquel momento dado.

El ISTA (International Seed Testing Association) es la institución que normaliza los métodos y técnicas para evaluar semillas en laboratorio, pero aún no cuenta con normas reglamentadas para el análisis de semillas de *Coffea spp.*, razón por la cual existen variaciones en las metodologías utilizadas para las pruebas de viabilidad y germinación en países con producción de café.

Con los resultados del trabajo de investigación, se pretende dar a conocer una metodología para la prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas de café, que contempla cantidades de tetrazolio y tiempos de tinción que fueron sometidos a un análisis independiente y luego a comparaciones, para obtener su validez con la prueba de germinación que es la que permitió aceptar los resultados encontrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento fue realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Semillas del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF La Paz) ubicada en la ciudad de La Paz a 3600 m.s.n.m.

Se utilizó semillas de aproximadamente un mes de cosecha, de la propiedad del productor cafetalero David Chambi, de la colonia Amor de Dios perteneciente al cantón Taipiplaya. Este cantón se encuentra ubicado a 1500 m.s.n.m. y

temperatura promedio de 27°C (Callisaya, 2011). Fueron tres variedades, criolla, caturra y catuaí.

El equipo utilizado en laboratorio: medidor de humedad G600, calibrado en café pergamino (rango 64%), cámara húmeda Cristal Lake IL 20014.USA., balanza digital marca ADAM (Max 450 g d=0,001g), diafanoscopio, lente de aumento, estereoscopio. También el siguiente material: bandejas de diferente tamaño con tapa, cajas Petri, termómetro, gotero, coladera pequeña, alcohol al 70%, agua destilada, sal de tetrazolio (2,3,5-trifenil clorato de tetrazolio), tres frascos de color ámbar, arena esterilizada, bisturí, estilete, juego de pinzas y papel toalla.

La metodología empleada se basa en Hernández *et al.* (1991) para considerar la aplicación de normas de calidad y principios de laboratorio en la prueba de viabilidad con tetrazolio y germinación, identificación de variables de respuesta y análisis estadístico. Se empleó en el experimento el Diseño Completamente al Azar para la concentración de tetrazolio, el análisis del tiempo y la relación concentración de tetrazolio, tiempo y variedad. Los factores de estudio: Variedad, %Tetrazolio y Tiempo. Se combinaron 36 tratamientos.

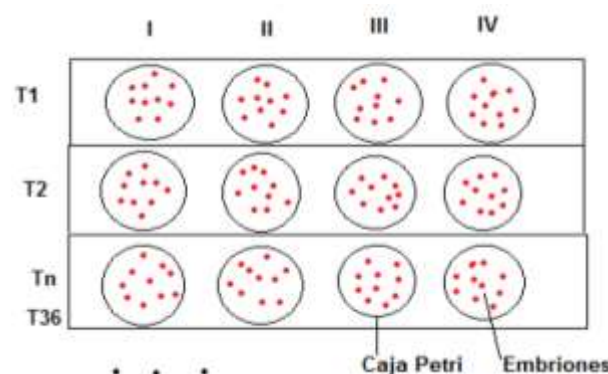


Figura 1. Distribución de las unidades experimentales.

Cada uno de los 36 tratamientos tuvo cuatro repeticiones, cada repetición se la colocó en una caja Petri y fue denominada unidad experimental, a cada unidad experimental se le

asignó 10 semillas de café de las que sólo los embriones fueron analizados. En resumen, se analizaron 40 semillas por tratamiento, haciendo un total de 1440 semillas como se presenta en la Figura 1.

Las variables de repuesta fueron: Número de embriones viables, Porcentaje de viabilidad (%), Porcentaje de germinación (%).

Para la prueba de viabilidad

Preparación de la muestra

Fueron evaluadas 40 semillas por cada tratamiento, 4 submuestras de 10, cada submuestra fue equivalente a una unidad experimental. El tamaño de la muestra corresponde para pruebas no oficiales (1673ías y Silva, 1998), debido a que no sólo se hizo una evaluación sino 36 evaluaciones.

Pre-acondicionamiento

Se retiró manualmente el pergamino, después las semillas fueron colocadas en recipientes con agua para que se produzca la hidratación durante 48 horas a una temperatura de 30°C en cámara húmeda como recomienda Días y Silva (1998).

Preparación de las semillas

Las semillas ablandadas, fueron cortadas de acuerdo al procedimiento recomendado por 1673 (Días y Silva, 1998), hasta extraer el embrión que fue depositado en cajas Petri, manteniéndolas con agua destilada hasta ser cambiadas por la solución de tetrazolio, además de identificar el tratamiento y el número de repetición.

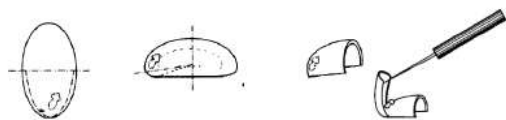


Figura 2. Extracción del embrión de la semilla de café,

Fuente: Días y Silva (1998).



Figura 3. Extracción del embrión.

Preparación de la solución

Se prepararon tres concentraciones de tetrazolio, al 0,1%, 0,5% y 1%, se utilizó agua destilada para mantener el pH entre 6 y 8 como recomienda Días y Silva (1998), Fueron acondicionados en frascos de vidrio oscuros (ámbar) y guardadas en un lugar oscuro hasta su empleo.

Coloración

Después de extraídos los embriones, se cambió el agua destilada por la solución de tetrazolio, fueron llevadas a una cámara húmeda con temperatura constante de 35°C en ausencia de luz como recomienda Días y Silva (1998). En este procedimiento se realizó el control de los tiempos de estudio.

Evaluación

Después de la coloración según el tiempo establecido, la muestra fue retirada de la cámara húmeda y lavada en agua corriente con ayuda de un tamizador para devolverla a la caja Petri conteniendo también agua corriente. Las tapas de las bandejas sirvieron de base para extender papel toalla asegurando los extremos con mazquin, luego se colocó en la superficie los embriones que fueron sometidos a la coloración, separándolos uno de otros con ayuda de una pinza; se utilizó un lente de aumento para observar las áreas coloreadas en los tejidos del embrión en base al Patrón de viabilidad de

embriones de café (Días y Silva, 1998) Figura 4, marcando una “X” los embriones no viables.

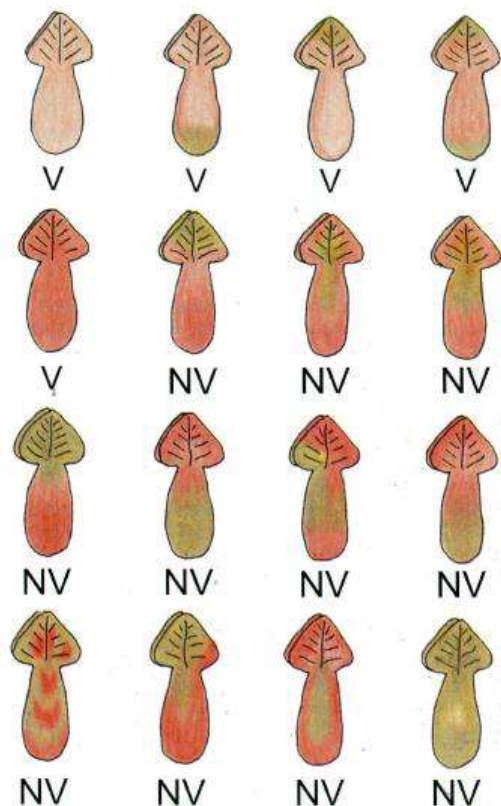


Figura 4. Patrón de viabilidad de embriones de café. Prueba de viabilidad con tetrazolio en semillas de café. V: Viable NV: No viable. Fuente: Días y Silva (1998).

Se observó también la turgencia de los tejidos, la ausencia de fracturas en regiones vitales de la semilla y de su formación morfológica, teniendo cuidado de aquellas semillas sin embrión o con presencia de más de un embrión como lo recomienda Días y Silva (1998). Las muestras fueron aprobadas cuando el porcentaje de viabilidad fue mayor al 80% como recomienda. INIAF (2014)

Para la prueba de germinación

Para esta prueba, se prepararon bandejas esterilizadas con hipoclorito de sodio. El sustrato elegido fue arena como lo recomienda MAPA

(2009), tuvo que ser esterilizado en horno caliente a una temperatura de 180°C por 3 horas.

Tamaño de la muestra

Fueron evaluadas 150 semillas por cada variedad, tres submuestras de 50, cada submuestra fue equivalente a una unidad experimental. El tamaño de la muestra se encuentra según las normas del INIAF (2014).

Siembra

Se prepararon 3 bandejas altas con arena para cada variedad, en cada una se sembraron 3 submuestras de 50 semillas, el sustrato fue humedecido con agua destilada (MAPA, 2009). Después de asegurar la bandeja con su tapa, se los llevó a la cámara húmeda con temperatura alterna de 15 a 30°C.

Observación

Se observó el desarrollo de las plántulas a los 15, 30, 45 y 61 días.

Evaluación

Se hizo el conteo del número de semillas que desarrollaron como plántulas normales. El INIAF (2014), determina que una muestra es aprobada cuando el porcentaje de germinación es mayor al 70%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Concentración de tetrazolio

Las diferentes concentraciones de tetrazolio (0,1%, 0,5% y 1%) que se utilizaron para determinar cuál o cuáles serían las más adecuadas, se evaluaron mediante el número de embriones viables según la tabla 1.

Con el análisis de varianza se comprueba lo anterior, porque los resultados indican que no existe diferencia significativa debido a que la probabilidad (0,6709) es mayor a 0,1, lo que demuestra que los niveles de concentración de

tetrazolio no tienen diferencia. (ver tabla 2, en anexos)

Tabla 1. Número de embriones viables por concentración aplicada.

Concentración de tetrazolio (%)	Nro de embriones viables	
	Prom (10)	%
0,1	9,83	98
0,5	9,85	99
1	9,89	99

Comparando las medias de cada tratamiento, puede observarse que de 10 semillas analizadas entre 9,83 y 9,90 embriones presentaron viabilidad, por tanto, se observa que no hubo diferencia significativa. Por esta razón se acepta que las tres concentraciones de 0,1%, 0,5% y 1% de tetrazolio son adecuadas para el análisis de viabilidad en semillas de café.

Tiempo de tinción

Los diferentes tiempos de tinción (3, 5, 16 y 24 horas) que se utilizaron para determinar el tiempo más adecuado, se consiguió mediante el número de embriones viables. La cantidad de embriones viables correspondiente a 36 unidades experimentales, cada una con 10 semillas.

Tabla 3. Número de embriones viables por tiempo de tinción.

Tiempo (hr)	Nro de embriones viables	
	Prom (10)	%
3	9,80	98
5	9,88	99
16	9,83	98
24	9,91	99

Puede observarse que la mayor cantidad de embriones viables responde a las 24 horas y le sigue a 5 horas, por lo que a mayor tiempo no siempre se obtendrá la mayor cantidad de embriones viables. Así también, los porcentajes de viabilidad respaldan lo anterior.

Respaldando lo anterior, el análisis de varianza de la tabla 4 (ver anexos), indica que el factor tiempo no presenta significancia, dado que

la probabilidad encontrada (0,5155) es mayor a 0,1, es decir, que no hay diferencia entre los tratamientos estudiados que corresponden a 3, 5, 16 y 24 horas.

El coeficiente de variación (CV) presentó un valor de 1,9%, inferior al 8% que se utiliza en laboratorio (Arteaga, 2011), por tanto, este valor indica que existió un buen manejo y los datos son confiables y cuantificables. La comparación de las medias de cada tratamiento, indica que de 10 semillas analizadas entre 9,80 y 9,92 embriones presentaron viabilidad, por tanto, no se observa diferencia significativa.

Relación entre variedad, concentración de tetrazolio y tiempo de tinción

La tabla 5, presenta los datos registrados en el análisis de viabilidad considerando la variedad, concentración de tetrazolio y tiempo de tinción. Cada tratamiento tuvo 4 unidades experimentales, cada una con 10 semillas. El cuadro presenta el promedio del número de embriones viables y el porcentaje respectivo. El ANVA con tres factores de estudio (variedad, concentración de tetrazolio y tiempo de tinción) permitió conocer la relación de dependencia en la interacción “Tetrazolio x Tiempo”, como se observa en la tabla 6 en anexos.

Por tanto, al no presentar significancia en los efectos principales sino en la interacción, Vicente (2014) recomienda un análisis de efectos simples como se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Cuadro simple: Interacción Tetrazolio x Tiempo.

% Tetrazolio	Tiempo				
		3	5	16	24
	0,1	9,67	9,83	9,83	10,00
	0,5	9,83	10,00	9,75	9,83
	1	9,92	9,83	9,92	9,92

En el cuadro se puede observar que los valores más altos corresponden a las interacciones de 0,1% de tetrazolio con 24 horas y 0,5% de tetrazolio con 5 horas, sin

menospreciar los otros resultados que se alejan con una mínima diferencia.

Tabla 5. Número de embriones viables, en relación a tres factores de estudio.

Var	%Tz	T (hr)	Viabiles				Nro de embriones viables	
			I	II	III	IV	Prom (10)	%
c1	0,1	3	10	9	10	10	9,75	98
c1	0,1	5	9	10	10	10	9,75	98
c1	0,1	16	10	10	10	10	10	100
c1	0,1	24	10	10	10	10	10	100
c1	0,5	3	10	10	9	10	9,75	98
c1	0,5	5	10	10	10	10	10	100
c1	0,5	16	9	10	10	10	9,75	98
c1	0,5	24	10	10	10	10	10	100
c1	1	3	9	10	10	10	9,75	98
c1	1	5	10	10	10	10	10	100
c1	1	16	10	10	10	10	10	100
c1	1	24	10	10	10	10	10	100
c2	0,1	3	10	10	10	9	9,75	98
c2	0,1	5	10	10	10	10	10	100
c2	0,1	16	10	10	10	9	9,75	98
c2	0,1	24	10	10	10	10	10	100
c2	0,5	3	9	10	10	10	9,75	98
c2	0,5	5	10	10	10	10	10	100
c2	0,5	16	9	10	10	10	9,75	98
c2	0,5	24	10	10	10	9	9,75	98
c2	1	3	10	10	10	10	10	100
c2	1	5	10	10	10	9	9,75	98
c2	1	16	10	10	9	10	9,75	98
c2	1	24	10	10	10	10	10	100
c3	0,1	3	9	10	10	9	9,5	95
c3	0,1	5	10	9	10	10	9,75	98
c3	0,1	16	10	9	10	10	9,75	98
c3	0,1	24	10	10	10	10	10	100
c3	0,5	3	10	10	10	10	10	100
c3	0,5	5	10	10	10	10	10	100
c3	0,5	16	10	9	10	10	9,75	98
c3	0,5	24	10	10	9	10	9,75	98
c3	1	3	10	10	10	10	10	100
c3	1	5	10	9	10	10	9,75	98
c3	1	16	10	10	10	10	10	100
c3	1	24	10	9	10	10	9,75	98

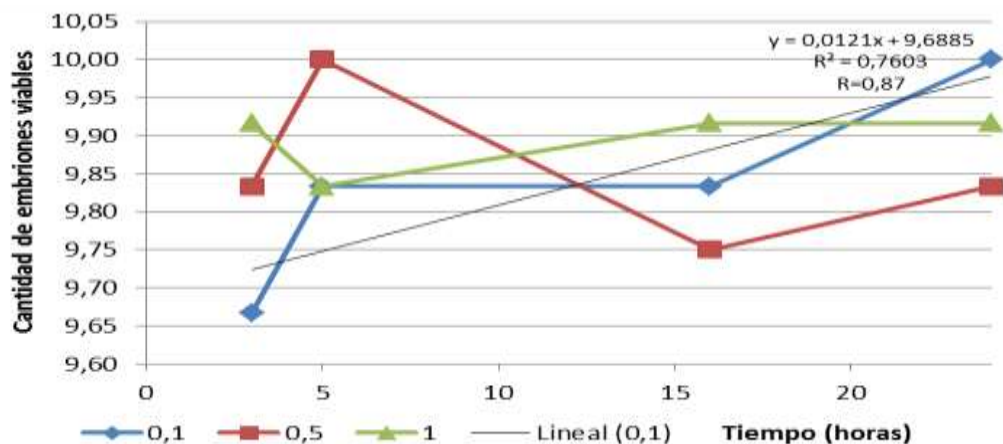


Figura 5. Análisis de correlación de la interacción Tetrazolio x Tiempo.

En la Figura 5, se observa que el factor concentración de tetrazolio (0,1%, 0,5% y 1%) actúa de diferente manera en la coloración de los embriones a través del tiempo.

Con dos de las tres interacciones, se deduce que a mayor concentración de tetrazolio menor tiempo empleado. Esta conclusión fue practicada por algunos investigadores que obtuvieron buenos resultados, entre ellos: Días y Silva (1998) que realizaron la prueba de tetrazolio en semillas de café con la solución de tetrazolio al 1% de concentración durante 14 y 16 horas de tinción; Zonta *et al.* (2009) que trabajo con una concentración de tetrazolio a 0,1% durante 16 horas; Clemente *et al.* (2011) y Freitas (2013) que trabajaron a una concentración de tetrazolio al 0,5% durante 2 y 3 horas de tinción.

No obstante, la tercera interacción indica que la mayor concentración de tetrazolio no requiere mayor tiempo del que se emplea en las anteriores, porque la cantidad de embriones

viabiles será semejante al de los otros tratamientos debido a que tienen la misma edad de almacenamiento. Así Días y Silva (1998) mencionan que, según el tiempo de almacenamiento o post cosecha de las semillas, puede requerir diferentes tiempos de permanencia en la solución de tetrazolio para la coloración de los embriones.

Relación entre porcentaje de viabilidad y porcentaje de germinación

La relación entre el porcentaje de viabilidad con el porcentaje de germinación, indica la coherencia de los resultados encontrados en relación al comportamiento de las semillas de café, resultados que pueden ser aceptados o rechazados. Los resultados del porcentaje de germinación de las tres variedades de estudio se muestran en la tabla 8, los valores registrados corresponden sólo a plántulas normales.

Tabla 8. Resultados de germinación de semillas de café en laboratorio.

Variedad	Nro de Semillas Germinadas				Porcentaje de Germinación (%)
	I	II	III	Promedio	
Criolla	45	43	47	45	90
Caturra	43	44	43	43	87
Catuaí	41	40	43	41	83

Tabla 9. Análisis de correlación entre Germinación y Viabilidad según los factores de estudio (variedad, tetrazolio, tiempo).

Variedad	Tetrazolio (%)	Tiempo (hr)	-1 < r < 1	Correlación
Criolla	0,1	5	0,82	Alta correlación positiva
Criolla	0,5	3	-0,82	Alta correlación negativa
Caturra	0,5	3	0,47	Baja correlación positiva
Caturra	0,5	16	0,47	
Caturra	1	16	0,47	
Catuaí	0,1	5	0,71	Correlación media positiva
Catuaí	0,1	16	0,71	
Catuaí	0,5	16	0,71	
Catuaí	1	5	0,71	
Catuaí	1	24	0,71	
Catuaí	0,5	24	-0,89	Alta correlación negativa

Se puede observar la mínima diferencia entre las tres variedades en el promedio del número de semillas germinadas, es casi homogéneo, la misma que puede deberse a que vinieron de la semilla pura, aun así, la variedad que presenta el mayor porcentaje es la Criolla con un 90%, y la mínima a la variedad Catuaí con 83%.

Para entender mejor la correspondencia entre los resultados de viabilidad y germinación, se hizo el análisis por variedad de café. En la tabla 9 se analizan los resultados de correlación de la variable “r” que fueron significantes para la asociación cualitativa del porcentaje de germinación y el porcentaje de viabilidad para las tres variedades.

Por lo tanto, nuestros resultados indican:

Para la variedad Criolla, al 0,1% de tetrazolio y 5 horas de tinción, presenta una alta correlación ($r=0,82$) entre la germinación y viabilidad, que indica que a medida que aumenta la germinación la viabilidad también aumentará. Caso contrario al 0,5% de tetrazolio y 3 horas de tinción, el valor de $r=-0,82$ que representa una alta correlación negativa, indica que a medida que aumenta la germinación la viabilidad disminuye comportamiento que no es coherente con el comportamiento de las semillas, por lo que se rechaza este resultado.

Para la variedad Caturra fue indiferente la concentración de tetrazolio y el tiempo de imbibición, lo que permitió elegir el menor gasto en cuanto a ambos factores; se eligió al 0,5% de tetrazolio y 3 horas de tinción, que presenta una baja correlación ($r=0,47$) entre la germinación y viabilidad, lo que indica que a medida que aumenta la germinación la viabilidad también aumentará.

Para la variedad Catuaí fue indiferente la concentración de tetrazolio y el tiempo de imbibición, lo que permitió elegir el menor gasto en cuanto a ambos factores; se eligió al 0,1% de tetrazolio y 5 horas de tinción que presenta una

correlación media ($r=0,71$) entre la germinación y viabilidad, lo que indica que a medida que aumenta la germinación la viabilidad también aumentará. Caso contrario al 0,5% de tetrazolio y 24 horas de tinción, indica que a medida que aumenta la germinación la viabilidad disminuye comportamiento que no es coherente con el comportamiento de las semillas, por lo que se rechaza este resultado.

En general, se puede afirmar que los valores propuestos para la concentración de tetrazolio y tiempo de tinción corresponden a tratamientos en los que se utilizó una interacción de 0,1% de tetrazolio con 5 horas de tinción y 0,5% de tetrazolio con 3 horas de tinción, valores que fueron especificados para el análisis de viabilidad con tetrazolio por autores como Freitas (2013), Pereira *et al.* (2013), Clemente *et al.* (2012), Barbosa (2011), Clemente *et al.* (2011), Zonta *et al.* (2009), Diaz y Silva (1998).

El IICA (1980) indica que en la prueba de tetrazolio en semillas de café (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*), existe correlación entre la prueba de germinación y los resultados de tetrazolio, si los lotes tienen alta viabilidad. En el rango de 30 al 70 por ciento aproximadamente de germinación, los resultados de la prueba de tetrazolio dan generalmente valores más altos. Zonta *et al.* (2009) indica que generalmente hay diferencia entre germinación y viabilidad.

Rodríguez *et al.* (2008), indica que es importante la relación entre viabilidad y germinación por lo que una prueba de tetrazolio que no se combine con una prueba de germinación, solo permitirá definir el porcentaje de semillas viables, es decir, la tasa máxima de germinación que se puede obtener, sin tener en cuenta las semillas débiles o latentes que no germinarán en condiciones de campo.

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados permiten establecer las siguientes conclusiones.

Los niveles de concentración de tetrazolio analizados como un factor independiente no tienen diferencia significativa.

Los tiempos de tinción analizados como un factor independiente no presentan diferencia significativa.

Cada factor cuando es analizado por separado no presentará ninguna diferencia, por otro lado, se pudo observar la diferencia significativa en la interacción de “Tetrazolio x Tiempo”, esta relación indica que ambos factores presentan dependencia de correspondencia.

La cantidad de embriones viables es igual a 9,85 cuando la concentración de tetrazolio interactúa con el tiempo, fue comprobado para tres interacciones: al 0,5% en 3 horas, al 0,1% en 5 horas y a 1% en 5 horas. La tercera interacción indica que la mayor concentración de tetrazolio no requiere mayor tiempo del que se emplea en las anteriores, porque la cantidad de embriones viables será semejante al de los otros tratamientos debido a que tienen la misma edad de almacenamiento.

La validación de los resultados de viabilidad y germinación permitió confirmar que el porcentaje de viabilidad siempre será mayor al porcentaje de germinación. Los niveles de concentración de tetrazolio relacionados con los tiempos de tinción que fueron analizados y aceptados corresponden a tratamientos en los que interactuó la concentración de 0,1% de tetrazolio con 5 horas de tinción y la concentración de 0,5% de tetrazolio con 3 horas de tinción.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez, J. (2004). Técnicas y manejo de Café (entrevista) Consultor, Proyecto MAPA-Yungas, Caranavi - Bolivia.

Asociación Nacional de Productores del Café (ANPROCA) – Hoja Volante Enero, 2014. 60 años del Café en Bolivia.

Arteaga, Y. (2011). Apuntes de Bioestadística. UMSA. La Paz, Bolivia.

Barrientos, Z. R. (2000). El cultivo de café en la región de los Yungas. La Paz, Bolivia. 192 p.

Barbosa D. F. (2011). Avaliação de métodos para o monitoramento da qualidade do café. Universidade Federal de Lavras, Brasil. <http://www.scielo.br>

Berjak, P.; Pammenter, N. W. (2012). Semillas ortodoxas y recalcitrantes. Unidad de Investigación de Biología Celular de Plantas. Universidad de Natal, Durban Sudáfrica. 143-145pp.

Callisaya, D. A. (2011). Proyecto: Programa de Desarrollo Agroecoturístico em Taupiplaya. UMSA. La Paz, Bolivia. 34 p.

Clemente, A. C.; Carvalho, M.L. y Guimarães, R. M. (2012). Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. Universidade Federal de Lavras. Brasil. vol.36 (4)

Clemente, A. C; Carvalho, M. L.; Guimarães, R. M. y Zeviani, M. W. (2011). Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira Sementes*. Vol. 33(1) Londrina. Consultado en agosto, 2015. <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-31222011000100004>

Cuba, N. (s/f). Manual para el cultivo de café en Yungas. La Paz, Bolivia. 151 p.

Dias, M. C. y Silva, W. R. (1998). Teste de tetrazólio em sementes de café. Instituto Agrônômico do Paraná - Londrina. Brasil. 13 p.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). (1998). El test de tetrazolio en semillas de soya. Brasil. 72 p.

- Federación de Caficultores Exportadores de Bolivia (FECAFEB). (2006). Manual de Calidad de Café para las familias cafetaleras de FECAFEB. La Paz, Bolivia. pp 5-29.
- Freitas, M. N. (2013). Métodos Fisiológicos, Bioquímicos e Análise de imagem para avaliar a Qualidade do café. Universidade Federal de Lavras. 167 p.
- Gálvez, R. C. (2006). Almacenamiento y Conservación de Semillas. RUTA, Unidad Regional de Asistencia Técnica-Consejo Agropecuario Centroamericano. http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/5_ALMACENAMIENTO_Y_CONSERVACION_DE_SEMILLAS.PDF
- Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA). (1980). Semilleros y almacigos. Gilberto Gutiérrez. Departamento de Fitotecnia. Turrialba, Costa Rica.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). (2012). Censo Nacional de Café 2011/2012. Bolivia. 27, 35 p.
- Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF). (2014). Normas específicas de certificación de semillas. Bolivia. 5, 164 p.
- International Seed Testing Association. (ISTA). (2003). Evaluación de Plántulas.
- ISTA. (2007). International Rules for Seed Testing Edition 2007. Switzerland. (5):1-7, (6)1-45.
- Magnitskiy, S. V. y Plaza, G. A. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*. Vol. 25. No.1 Bogotá Jan./June 2007. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652007000100011
- Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. (MAPA). (2009). Regras para Análise de Sementes (RAS). Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília – Brasil.
- Pereira C. C.; Nunes, F. M.; Saúde, A. y Cirilo, M. A. (2013). Imagens digitais do teste de tetrazólio para avaliar a qualidade de grãos de café. SALVADOR-BA. VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, novembro 2013.
- Puerta, J. (2005). Diseños experimentales manual de ejercicios. UMSA. La Paz, Bolivia 39 p.
- Rodriguez, I.; Adam, G. y Duran, J. M. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. Revista digitalizada: Agricultura revista agropecuaria, ISSN: 0002-1334 Universidad Politécnica de Madrid. España. pp.7
- Ruiz, MA. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: Cebadilla chaqueña. E.E.A. INTA Anguil. Publicación Técnica N, 77. Argentina.
- Hernández, S. R.; Fernández, C. C. y Baptista, L. P. (1998). Metodología de la investigación. Segunda Edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. México, D.F. 500 p.
- SEED NEWS. (2015). Desafios e oportunidades na produção de sementes de hortaliças no Brasil. Nacimiento, WM; Melo, TPC. Rep. may/jun (3). *Revista internacional de sementes*. http://www.seednews.inf.br/html/site/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=224

Vicente, R. JJ. (2014). Apuntes de diseños experimentales II. UMSA. La Paz, Bolivia.

Zamora, R. B. (2000). El cultivo del café en la región de los Yungas. La Paz, Bolivia.

Zonta, J. B; Souza, L. T.; Dias, D. C. y Alvarenga, E. M. (2009). Comparação de metodologias do teste de tetrazólio para sementes de cafeeiro. Idesia vol. 27(2). <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000200002>

ANEXOS

Tabla 2. Análisis de varianza para la concentración de tetrazolio.

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr >F	Sig.
Concentración de tetrazolio	2	0,003	0,0013	0,40	0,6709	NS
Error Experimental	141	0,451	0,0032			
Total	143	0,454				

$$CV=1,8\text{Media} = 9,9$$

Tabla 4. Análisis de varianza para el tiempo de tinción.

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr >F	Sig.
Tiempo de tinción	3	0,007	0,0024	0,77	0,5155	NS
Error Experimental	140	0,446	0,0032			
Total	143	0,454				

$$CV = 1,9\%\text{Media}=9,9$$

Tabla 6. Análisis de Varianza de los factores de estudio

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr >F	Sig.
Variedad	2	0,002	0,0012	0,36	0,6971	NS
Tetrazolio	2	0,002	0,0012	0,36	0,6971	NS
Tiempo	3	0,007	0,0023	0,69	0,5603	NS
Variedad x Tetrazolio	4	0,004	0,0010	0,28	0,8875	NS
Variedad x Tiempo	6	0,009	0,0015	0,43	0,8568	NS
Tetrazolio x Tiempo	6	0,022	0,0036	1,05	0,3963	Sig.
Variedad x Tetrazolio x Tiempo	12	0,023	0,0019	0,56	0,8692	NS
Error Experimental	108	0,371	0,0034			
Total	143	0,441				

$$CV = 1,87\text{Media} = 9,86$$