



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGRÍCOLA**

**MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ ARÁBIGO  
DE ALTO VALOR GENÉTICO EN EL CANTÓN BOLÍVAR, MANABÍ.**

**AUTORA:**

**ROXANNA MARIBEL MACÍAS VIDAL**

**TUTOR:**

**ING. LUIS ALBERTO DUICELA GUAMBI, MG**

**CALCETA, NOVIEMBRE DE 2021**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo **Roxanna Maribel Macías Vidal**, con cédula de ciudadanía **1315430940**, declaro bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **Multiplicación *in vitro* de híbridos F1 de café arábigo de alto valor genético en el cantón Bolívar, Manabí** es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que se ha consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedo a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a mi favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.



---

Roxanna M. Macías Vidal  
1315430940

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

**Roxanna Maribel Macías Vidal**, con cédula de ciudadanía **1315430940**, autorizo a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la Institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **Multiplicación *in vitro* de híbridos F1 de café arábigo de alto valor genético en el cantón Bolívar, Manabí**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

A handwritten signature in blue ink that reads "Roxanna Macías". The signature is written in a cursive style with a vertical line extending downwards from the end of the name.

---

Roxanna M. Macías Vidal  
1315430940

## **CERTIFICACIÓN DEL TUTOR**

**ING. LUIS ALBERTO DUICELA GUAMBI MG.** certifica haber tutelado el proyecto **“MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ ARÁBIGO DE ALTO VALOR GENÉTICO EN EL CANTÓN BOLÍVAR, MANABÍ”** que ha sido desarrollada por **ROXANNA MARIBEL MACÍAS VIDAL**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

ING. Luis Alberto Duicela Guambi MG

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de Integración Curricular titulado: “**MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ ARÁBIGO DE ALTO VALOR GENÉTICO EN EL CANTÓN BOLÍVAR, MANABÍ**” que ha sido desarrollado por **ROXANNA MARIBEL MACÍAS VIDAL**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

ING. SERGIO VELEZ ZAMBRANO, Mg. Sc.

**MIEMBRO**

---

ING. CRISTHIAN VALDIVIESO LÓPEZ, Mg. Sc

**MIEMBRO**

---

ING. GALO CEDEÑO GARCÍA, Mg. Sc.

**PRESIDENTE**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecer en primer lugar a Dios, por darme la oportunidad de la vida y permitirme llegar hasta donde hoy estoy, haciendo realidad el sueño tan anhelado de llegar hasta el final de mi carrera.

A mis padres, por ser el pilar fundamental en toda esta etapa realizada, por brindarme su apoyo incondicional haciendo todo el esfuerzo por brindarme una buena educación; a mis hermanos Pedro y Víctor, por su ayuda en los momentos que los necesité, en especial a mi hermana Gabriela, por estar en cada momento brindándome su ayuda y apoyo en el trabajo realizado.

A la Escuela Superior Politécnica de Manabí, por abrirme las puertas y darme la oportunidad de formarme como profesional.

Mi agradecimiento profundo al Ing. Luis Duicela Guambi, tutor de esta investigación, por sus conocimientos impartidos durante toda esta etapa; a la Ing. Fátima Macías, por brindarme asesoría durante el trabajo realizado de esta investigación; a la Ing. Sofía Velásquez, por siempre estar pendiente de que esta investigación saliera adelante; de la misma manera, un agradecimiento especial al Ing. Piero Fajardo Navarrete, por su apoyo incondicional, por la orientación, seguimiento y la supervisión continua de la misma, por la dedicación de su tiempo, pero sobre todo, por la motivación y su ayuda recibida a lo largo de este proceso.

A mis amigos que siempre estuvieron presente y brindarme su ayuda en momentos que necesité, a mi amiga Carmen y Tanya, que siempre estuvieron pendiente y me brindaron su apoyo en todo momento.

Roxanna M. Macías Vidal

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, Antonio y Herminia, ya que ellos fueron la razón principal de lo que hoy en día soy, por su apoyo incondicional en toda mi educación, tanto académica como de la vida; por sus consejos, por todo el trabajo que hicieron y lucharon para poder ayudarme a salir adelante, sin su ayuda no hubiese sido posible esta meta alcanzada.

A la carrera de Ingeniería Agrícola, a todos los docentes que impartieron sus conocimientos y valores día a día e hicieron que me forme como profesional para servir a la comunidad.

Roxanna M. Macías Vidal

## CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN .....	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA .....	vii
CONTENIDO GENERAL .....	viii
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.4. HIPÓTESIS, PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER .....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. ORIGEN DEL CAFÉ EN ECUADOR.....	6
2.2. VARIEDADES DE CAFÉ ARÁBIGO.....	6
2.3. HÍBRIDOS F1 DE <i>Coffea arabica</i> L. ....	7
2.4. VARIEDADES DE CAFÉ UTILIZADAS EN EL ENSAYO .....	8
2.5. CULTIVO DE TEJIDOS .....	9
2.6. MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFÉ Y CULTIVO <i>in vitro</i> .....	15
2.7. CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN EL CULTIVO <i>in vitro</i> .....	15
2.8. REGULADORES DE CRECIMIENTO .....	17
2.9. FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS PROCESOS DE CULTIVO <i>in vitro</i> .	

<b>CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. UBICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. ETAPAS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4. FACTORES EN ESTUDIO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6. VARIABLES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>23</b>
<b>3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO DE DESINFECCIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>3.8. ENSAYO DE PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. ENSAYO DE DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES .....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>51</b>

## CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro 1.</b> Diseño de los tratamientos en desinfectantes. ....	22
<b>Cuadro 2.</b> Procedimiento para la siembra de explantes de hojas del híbrido F1 de café arábigo .....	28
<b>Cuadro 3.</b> Procedimiento para la siembra de embriones de semillas del híbrido F1 de café arábigo .....	30
<b>Cuadro 4.</b> Evolución de la sobrevivencia de los explantes foliares de café en función de los desinfectantes a nivel de laboratorio. ....	34
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de varianza de las siembras con explantes foliares de café arábigo.....	35
<b>Cuadro 6.</b> Número de explantes de embriones de café sembrados por frasco (ES) con medio de cultivo <i>in vitro</i> , explantes vivos (EV) y sobrevivencia (SVV). ....	36
<b>Cuadro 7.</b> Número de explantes de embriones de café sembrados por frasco (ES) con medio de cultivo <i>in vitro</i> , explantes vivos (EV) y sobrevivencia (SVV) a agosto 11 del 2021.....	37
<b>Cuadro 8.</b> Crecimiento máximo registrado en los brotes de embriones de café sembrados por frasco (ES) con medio de cultivo <i>in vitro</i> a agosto 6 del 2021. ....	38
<b>Cuadro 9.</b> Promedio y errores estándar de las variables crecimiento, vigor y coloración de las plantitas <i>in vitro</i> .....	41
<b>Figura 1.</b> Evolución de la contaminación de los explantes foliares de café.....	35
<b>Figura 2.</b> Evolución del crecimiento de los brotes en relación a las fechas de siembra de los explantes de embriones de híbridos F1 de café arábigo, hasta agosto 6 de 2021. ....	38
<b>Figura 3.</b> Crecimiento del explante de embriones de café (CE) en relación a los días después de la siembra (dds). ....	40
<b>Figura 4.</b> Crecimiento promedio de las plantitas <i>in vitro</i> y rango de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). ....	41
<b>Figura 5.</b> Evolución de la contaminación de explantes en relación a días después de la siembra. ....	42
<b>Figura 6.</b> Simetría del crecimiento de los brotes <i>in vitro</i> y asimetría del vigor y coloración de las plantitas. ....	43
<b>Figura 7.</b> Relación entre coloración y vigor vegetal de los brotes <i>in vitro</i> .....	43

## RESUMEN

La baja producción nacional de café se debe, entre otras causas, a la falta de cultivares mejorados. El desarrollo de híbridos a partir de cruzamientos intervarietales, la selección individual y clonación usando técnicas *in vitro* constituye una alternativa para la rápida propagación y establecimiento de nuevos cafetales. Esta situación motivó a realizar un ensayo con el objetivo de multiplicar híbridos F1 de café arábigo de alto valor genético, seleccionados en el campo experimental de la ESPAM mediante técnicas *in vitro* para su difusión entre los caficultores del litoral ecuatoriano. Este estudio se realizó en dos etapas: 1) para identificar la alternativa de desinfección de explantes probándose dos desinfectantes y tres tiempos de inmersión; y, 2) para comparar dos métodos de propagación, una con explantes foliares y otra con embriones de semillas. Se realizó un análisis descriptivo y un análisis de varianza en un diseño completamente al azar. Los resultados indican que en el cultivo de los explantes foliares no hubo efecto directo de los factores en estudio ( $p>0,05$ ). Los tiempos de inmersión de los explantes tienen mayor impacto que los tipos de desinfectantes. La mayor sobrevivencia se alcanzó con hipoclorito de sodio al 1% y un tiempo de inmersión de 10 minutos. El cultivo *in vitro* de explantes foliares tuvo una sobrevivencia reducida (22%) a los 25 días después de la siembra, concluyendo que el método de cultivo *in vitro* de embriones de catimor ECU x bourbón rojo resulta el más adecuado.

**PALABRAS CLAVES:** híbrido, cultivo *in vitro*, explante foliar, mejora genética, embrión.

## ABSTRACT

The low national coffee production is due, among other causes, to the lack of improved cultivars. The development of hybrids from intervarietal crosses, individual selection and cloning using *in vitro* techniques constitutes an alternative for the rapid propagation and establishment of new coffee plantations. This situation led to a trial with the objective of multiplying F1 hybrids of Arabica coffee of high genetic value, selected in the experimental field of ESPAM by means of *in vitro* techniques for their dissemination among the coffee growers of the Ecuadorian coast. This study was carried out in two stages: 1) to identify the alternative of disinfection of explants, testing two disinfectants and three immersion times; and, 2) to compare two propagation methods, one with foliar explants and the other with seed embryos. Descriptive analysis and analysis of variance were performed in a completely randomized design. The results indicate that in the cultivation of foliar explants there was no direct effect of the factors under study ( $p > 0.05$ ). The immersion times of the explants have a greater impact than the types of disinfectants. The longest survival was achieved with 1% sodium hypochlorite and an immersion time of 10 minutes. *In vitro* culture of foliar explants had a reduced survival (22%) at 25 days after sowing, concluding that the *in vitro* culture method of catimor ECU x bourbon red embryos is the most appropriate.

**KEYWORDS:** hybrid, *in vitro* culture, foliar explant, genetic improvement, embryo.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El café y la caficultura para los ecuatorianos tiene relevante importancia económica, social y ambiental, que actualmente atraviesa una crisis de producción y de precios (Ponce *et al.*, 2018). En el género *Coffea* se han reconocido 104 especies, siendo las de mayor importancia económica real: *Coffea arabica* L., o arábigo, y *Coffea canephora* o robusta (Missouri, Botanical Garden, 2010). Al café arábigo le corresponde del 60 al 70% de la producción mundial y al robusta del 30 al 40 por ciento (Duicela y Enríquez, 2014). El Ecuador es uno de los 14 países del mundo donde se cultiva café arábigo (*Coffea arabica* L.) y café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), las dos especies del género *Coffea* de mayor importancia en el mundo (Loor *et al.*, 2017).

La caficultura ecuatoriana cruza una crisis de producción que constituye el problema central para el sector. La baja producción nacional tiene varias causas como: reducción del área cafetalera, prevalencia de cafetales improductivos, baja productividad y comportamiento errático del clima. En lo que respecta a la baja productividad, hay varios aspectos que lo originan, entre ellos: el uso de cultivares no mejorados, las deficientes prácticas de cultivo, la alta incidencia de problemas fitosanitarios como broca del fruto (*Hypothenemus hampei* Ferr.) y roya anaranjada (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.). Las variedades no mejoradas, usadas en el Ecuador, generalmente son de baja producción de grano por planta y susceptibles a la roya, que han sido severamente afectados tornándose en improductivos.

En estas circunstancias, la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí implementó un proyecto institucional orientado al desarrollo de híbridos intervarietales, a partir del cruzamiento de variedades resistentes a la roya como Catimor (Caturra x Híbrido de Timor), Cavimor (Catuaí x Catimor) y Sarchimor (Villa Sarchí x Híbrido de Timor) con variedades arábigas puras (Caturra, Pache y Bourbon) para tratar de generar nueva variabilidad donde se puedan identificar y seleccionar individuos que reúnan las características de alta producción por planta, morfológicamente de porte bajo y con cierto grado de resistencia a la roya.

A partir de la identificación de los individuos con aproximación al “ideotipo” deseado por los caficultores se formuló el presente proyecto de investigación, en la perspectiva de iniciar el proceso de propagación masiva, usando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. En un primer momento se realizaron ensayos de desinfección y un segundo momento se comparó los métodos de cultivo de explantes foliares y de cultivo de embriones.

Con estos antecedentes se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿La multiplicación *in vitro* de híbridos F1 de café arábigo contribuirá significativamente a eficiente propagación clonal?

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

La utilización de la biotecnología en la multiplicación de plantas de café, ofrece muchas posibilidades para mejorar cualidades específicas del cafeto, ya sean relacionadas con su comportamiento agronómico o reproducción de plantas. En la actualidad muchos científicos consideran al género *Coffea*, como un modelo lineal para la mejora mediante cultivo de tejidos y transformación genética (Cevallos *et al.*, 2002).

En el cultivo del café esta técnica permite la rápida propagación vegetativa del material genéticamente estable y escaso para la producción masiva de plantas. También es ventajosa por la disminución del área necesaria para el establecimiento de vivero y en la reducción de costos de producción al tratarse de plantas resistentes y tolerantes a factores ambientales y biológicos (Landaverde *et al.*, 2002). Al establecer métodos de propagación *in vitro* de este cultivo, se puede hacer una propagación masiva de estas variedades y se puede seleccionar la planta que obtenga las mejores características ya que con este método se adquieren plantas genéticamente iguales. Al utilizar esta técnica de propagación se podrá en un tiempo más corto aumentar la cantidad de plántulas de variedades élite (Lozano, 2014).

El sector cafetalero ecuatoriano requiere incrementar la producción nacional, para lo cual tendrá que superar las limitaciones, promoviendo la recuperación del área cultivada sembrando nuevos cafetales con variedades mejoradas y eficientes prácticas de manejo fitosanitario del cultivo, incluyendo acciones de adaptación al cambio climático. El desarrollo y uso masivo de variedades de alta producción por planta y rendimiento por hectárea, con características de porte bajo, apropiadas características físicas del grano y organolépticas de la bebida y con cierto grado de resistencia a la roya contribuirán a elevar la productividad, actualmente estimada en 0,230 t ha<sup>-1</sup> (Monteros, 2017). La recuperación de una parte del área cafetalera, sembrando variedades mejoradas como los nuevos híbridos y con buenas prácticas agrícolas posibilitará incrementar la producción nacional con beneficios económicos para los productores porque permitirá un incremento de los ingresos, un aumento de las exportaciones de café en grano e industrializado que generará ingresos significativos de divisas, reduciría la migración del campo

hacia las ciudades. En esta perspectiva, el desarrollo de alternativas de propagación *in vitro* que permitan avanzar rápidamente en esta dirección, justifica plenamente el presente trabajo de investigación.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Multiplicar híbridos F1 de Café arábigo de alto valor genético, seleccionados en el campo experimental de la ESPAM mediante técnicas *in vitro* para su difusión entre los caficultores del litoral ecuatoriano.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el procedimiento adecuado para la desinfección de explantes provenientes de órganos del cafeto para su posterior propagación asexual *in vitro*
- Determinar el método de propagación *in vitro*, de los híbridos F1 de café arábigo que asegure una mayor sobrevivencia.

### **1.4. HIPÓTESIS, PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER**

Los híbridos F1 de café arábigo de alto valor genético, seleccionados en el campo experimental de la ESPAM, se multiplican mediante una técnica *in vitro* que es significativamente más ventajosa comparada con otras alternativas.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ORIGEN DEL CAFÉ EN ECUADOR

El café es la bebida que proviene de los granos tostados y molidos, cosechados en plantas que se identifican como cafetos. En África y Madagascar se han encontrado 104 especies del género *Coffea* (Missouri Botanical Garden, 2010), siendo las especies de mayor importancia económica *Coffea arabica* L (arábigo) y *Coffea canephora* Pierre ex Frohener (robusta) que tienen diferencias morfológicas y genéticas (Charrier y Berthaud, 1985).

La caficultura en Ecuador empezó alrededor de los años 1830 en la provincia de Manabí, con una variedad típica (MAG, 1987). En 1951 ingresa la especie robusta, que alcanzó gran difusión en zonas tropicales húmedas de la Costa y en los años 70 se propagó a la Amazonía (Loor *et al.*, 2017). En la actualidad, se cultiva café en 23 de las 24 provincias del país y tiene significativa importancia en los órdenes económico, social y ambiental (Ponce *et al.*, 2018).

### 2.2. VARIETADES DE CAFÉ ARÁBIGO

Las principales variedades de café arábigo son: Bourbon, Pache, Sarchimor, Catuai y Catimor.

**Bourbón.** - La planta de la variedad Bourbon en comparación con la planta de la variedad Típica tiene forma cónica menos acentuada, ya que muestra ramas secundarias más abundantes, entrenudos mucho más cortos y mayor cantidad de axilas florales. Los brotes son de color verde, sus hojas son más anchas con bordes ondulados, el fruto presenta menor tamaño, un poco más corto, de color rojo en su estado de madurez y excelente calidad en taza (ANACAFE, 2016).

**Catuai.** - Es el resultado del cruzamiento artificial de las variedades Mundo Novo y Caturra, realizado en Brasil; es una variedad de porte bajo, pero un poco más alta que Caturra, con una altura promedio de 2.25 metros, la maduración de los frutos es tardía y no se desprenden fácilmente de las bandolas, lo que es una gran ventaja para las zonas donde la maduración coincide con períodos de lluvias intensas (ANACAFE, 2016).

**Catimor.** - Es un híbrido desarrollado por el Centro Internacional de las Royas del Café resultado del cruce de la variedad Caturra x Híbrido de Timor. El H. Timor, es un genotipo arabicoide de naturaleza tetraploide ( $2n=44$ ), considerado como fuente de resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*) y a los nemátodos del género *Meloidogyne*. Tiene por característica porte bajo, grosor intermedio de tronco, abundante número de ramas laterales, entrenudos cortos y estructura compacta. Además de su alta producción, muestra tolerancia a la roya amarilla del cafeto (Anzueto, 2014).

**Pache.** - Es una variedad que fue descubierta en Jalapa, Guatemala, en 1987, se la considera una mutación de la variedad Típica. El porte de la planta es bajo, con una estructura muy compacta, con entrenudos cortos y ramificación frondosa. Las ramas tienden a formar un ángulo de 60 grados con respecto al eje principal. El color de los brotes en estado tierno son verdes bronceados y esta variedad es susceptible a la roya (Anzueto, 2014).

**Sarchimor.** - Se originaron del cruce del Híbrido de Timor CIFC 832/2 (resistente a roya) y plantas de la variedad Villa Sarchí. De este cruce se derivaron progenies que originaron variedades con características estables en diferentes países. Los Sarchimores, son plantas de porte bajo, con brotes verdes o bronce, vigor y producción alta, bien adaptado en zonas de baja y media altitud y buena calidad en taza. Dentro de estos materiales hay variedades prometedoras por su adaptación agronómica, tamaño de grano y calidad de taza, en algunos casos superiores a los Catimores (ANACAFE, 2016).

### **2.3. HÍBRIDOS F1 DE *Coffea arabica* L.**

Los híbridos F1 son más productivos que las variedades convencionales, tanto en sistemas agroforestales (58%) como a pleno sol (34%). El tamaño del grano es similar o superior que en las variedades tradicionales. Estos híbridos se recomiendan por presentar tolerancia a la roya, aunque pueden ser susceptibles a otras enfermedades y plagas, dependiendo del híbrido y de las condiciones de cultivo (CATIE, 2007).

Los híbridos F1 son una nueva generación de variedades de café creados por el cruce de dos padres Arábica, genéticamente distintos. Muchas de estas nuevas variedades fueron creadas para combinar las mejores características de los dos padres, incluyendo una alta calidad de la taza, alto rendimiento y resistencia a enfermedades. Los híbridos son notables porque tienden a tener una producción significativamente mayor que los no híbridos (Rica y Salvador, 2018).

Los mismos autores mencionan, los híbridos F1 se reproducen solamente por micropropagación. Las semillas tomadas de plantas híbridas no tendrán las mismas características que las plantas madre. Esto se conoce como la “segregación”. Esto significa que la planta hijo no se ve o se comportan de la misma manera que la de los padres, con posibles pérdidas de rendimiento, resistencia a enfermedades, calidad, u otros rasgos de comportamiento agronómico. Es importante que los caficultores sepan que los híbridos se deben comprar en viveros de confianza.

Los híbridos F1 son plantas muy vigorosas y de ramas largas, se sugiere mantener densidades iguales o levemente superiores a 4.000 plantas por hectárea (2,2 m entre hileras x 1,1 m entre plantas). Presentan tronco grueso, tallo de porte medio, copa cónica, ramas largas, entrenudos cortos y follaje abundante. Las ramas son agudas con ramificación secundaria y terciaria muy marcada. El fruto es rojo, maduración media y la producción promedio superior en 27% (CATIE, 2007).

#### **2.4. VARIEDADES DE CAFÉ UTILIZADAS EN EL ENSAYO**

**Catimor x Catuaí rojo.** - El varietal de café Catimor, estas variedades son muy precoces, productivas y exigentes en el manejo agronómico, especialmente en la nutrición. Evidencian una mayor susceptibilidad a la enfermedad ojo de gallo (*Mycena citricolor*). Una de las características atribuidas a los Catimores es la calidad inferior de taza, debido a que se evaluaron plantas de progenies cultivadas en regiones de baja altitud y en proceso de depuración antes de obtener variedades estables. Esta característica ha sido mejorada a través de la selección de plantas en la conformación de variedades estables y con la introducción de estas en regiones de mayor altitud (ANACAFE, 2016).

**Catuaí.** - Es el resultado del cruzamiento de las variedades Mundo Novo y Caturra, realizado en Brasil. Las selecciones de las cuatro primeras generaciones dieron líneas con frutos rojos y amarillos. Es una variedad de porte bajo con una altura promedio de 2.25 metros; además es muy vigorosa, que desarrolla mucho crecimiento lateral con ramas secundarias o también conocidas como “palmillas”. Esta variedad produce frutos de color rojo y amarillo, tiene alta capacidad de producción, en condiciones óptimas podría llegar a un promedio de 55 quintales de café pergamino por manzana o sean 79 quintales por hectárea, pero requiere de un manejo adecuado de las diferentes actividades agronómicas, especialmente de la nutrición. La maduración de los frutos es tardía y se desprenden fácilmente de las bandolas, lo que es una ventaja para las zonas donde la maduración coincide con periodos de lluvias intensas; además, produce una excelente calidad de bebida (ANACAFE, 2016).

## **2.5. CULTIVO DE TEJIDOS**

Para Sánchez (2018), el cultivo de tejidos es el conjunto de técnicas que permiten que un explante, con potencial de diferenciación, se desarrolla al estar en contacto con un medio de cultivo de composición química definida, bajo condiciones de asepsia y condiciones ambientales controladas. Por este método, se puede aumentar la tasa de multiplicación de genotipos élite de café en un tiempo relativamente corto.

Una de las contribuciones más importantes del cultivo de tejidos vegetales, es la demostración de la capacidad única de las células vegetales de regenerar una planta completa, vía organogénesis o embriogénesis, independientemente de la fuente del tejido utilizado (raíz, tallo, partes florales, endospermo) (Rueda, 2019).

De acuerdo a Loyola y Ochoa (2012), el cultivo *in vitro* permite explorar la totipotencia celular de las plantas para un gran número de aplicaciones prácticas, y ofrece la posibilidad de mejorar cultivos, propagar plantas clonadas (micropropagación), eliminación de virus (cultivo de meristemas apicales), conservación de germoplasma, producción de fitoquímicos industriales, regeneración de plantas transgénicas y fusión celular.

Los medios de cultivo vegetales contienen todos los nutrientes requeridos para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Estos están compuestos principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, otros compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento, fuente de carbono y algunos agentes solidificantes, en el caso de los medios de cultivo sólidos. El medio Murashige y Skoog (1962), es el medio más extensamente usado para la propagación vegetativa *in vitro* de muchas especies de plantas. El pH del medio de cultivo es muy importante, ya que éste afecta tanto al crecimiento de las plantas como a la actividad de los reguladores del crecimiento, este se debe de ajustar a valores entre 5.4 y 5.8. Para el cultivo del material vegetal se pueden emplear tanto medios líquidos como sólidos. Los componentes del medio de cultivo que tienen un mayor efecto en la respuesta inicial del material vegetal son la fuente de nitrógeno y los reguladores del crecimiento (Morales *et al.*, 2016).

**Macronutrientes:** son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de gramos/litro (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Quizá los requerimientos minerales más obvios son los de fósforo (necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos), de azufre (aminoácidos, cisteína y metionina) o nitrógeno (el segundo elemento tras el carbono entre los que forman la célula). Aunque se pueden utilizar fuentes orgánicas, es común usar como fuente de fósforo un fosfato, la de azufre como un sulfato y la de nitrógeno como nitrato o una sal de amonio (Sharry, 2015).

**Micronutrientes:** (nutrientes necesarios en pequeñas cantidades) son elementos que la planta requiere en cantidades del orden de mg/litro (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B): Son esenciales para el funcionamiento de varias enzimas, y deben estar incluidos en el medio de cultivo. Su requerimiento en muy baja cantidad determina que frecuentemente no sea necesario añadirlos expresamente: es suficiente su presencia como contaminantes de otros componentes (Sharry, 2015).

Bhojwani y Dantu (2013), mencionan las principales ventajas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales:

- La necesidad de un tamaño pequeño del explante como material inicial (la porción utilizada para la reproducción).
- La producción de múltiples plantas sin necesitar semillas o polinizadores.
- La producción de plantas maduras en un espacio pequeño y en corto tiempo.
- Cultivo que minimiza la posibilidad de transmitir enfermedades, plagas o patógenos.
- Producción de plantas a partir de semillas que poseen una proporción de germinación baja.
- Permite la regeneración de plantas completas a partir de células modificadas genéticamente.
- Fácil mantenimiento, movimiento y almacenamiento sencillo, independientemente de la estación o el clima y finalmente esta técnica de reproducción vegetal se caracteriza por aumentar el rendimiento y la calidad de los cultivos, lo que lleva a una posible disminución de costos de producción en comparación con los métodos de reproducción tradicional.

### **2.5.1. MICROPROPAGACIÓN**

Rueda (2019), señala que la propagación clonal de plantas, se refiere a la multiplicación de individuos genéticamente idénticos por medio de métodos de regeneración asexual a partir de tejidos somáticos u órganos. Esta es una práctica común en la agricultura que permite conservar las características deseables de genotipos o variables de interés comercial. Sin lugar a dudas la micropropagación es una de las aplicaciones comerciales más utilizada en la actualidad en el cultivo de tejidos vegetales, puesto que presenta una excelente herramienta para la multiplicación sexual de especies que son reproducidas de forma asexual en la naturaleza. Adicionalmente, es una buena alternativa para la multiplicación de plantas recalcitrantes. Aunque el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales puede ser aplicado para la micropropagación de casi todas las especies vegetales, se recomienda solamente para aquellas que son de importancia económica.

### **2.5.2. MICROESTACAS**

La propagación *in vitro* por microestacas, consiste en el cultivo de un nudo o entrenudo proveniente de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas, idénticas a la planta madre. Comprende tres fases: instalación del material vegetal *in vitro*, obtención de microtallos provenientes de la inducción de yemas axilares, multiplicación de los microtallos y enraizamiento *in vitro* de los microtallos y su aclimatación a condiciones de invernadero (Sánchez, 2018).

### **2.5.3. CULTIVO DE EMBRIONES**

Perea (2009), da a conocer que el cultivo de embriones se ha utilizado para diferentes propósitos, entre otros para estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos que se hayan derivado de cruzamientos interespecíficos, producir monoploides y superar la latencia en semillas de algunas especies recalcitrantes. El desarrollo de los embriones en plantas se caracteriza por presentar dos estados: el estado temprano, heterotrófico, y el estado tardío, autotrófico. Los embriones globulares heterotróficos se desarrollan a expensas del endosperma y poseen una baja capacidad de síntesis; el crecimiento de los embriones en fase de corazón depende de nutrientes como hormonas, aminoácidos, carbohidratos, proteínas y vitaminas que se encuentran en el saco embrionario. Otra aplicación práctica del cultivo de embriones es el rescate del material de propagación con baja viabilidad, además de la obtención de híbridos en especies en las cuales el embrión presenta aborto con mucha frecuencia.

### **2.5.4. CULTIVO DE MERISTEMAS**

En la yema apical se encuentran un grupo de células que conforman el meristema apical (tiene un tamaño entre 0,01 y 0,3 mm), tejido embrionario que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta. A partir de ellos se pueden regenerar plantas completas (Segretín, 2006).

El mismo autor menciona que el cultivo de meristemas tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes es la obtención de plantas libres de

virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos vegetales. Otra muy importante es la multiplicación vegetal. La potencialidad de la técnica se demuestra con un ejemplo: a partir de una yema apical, se pueden obtener 4.000.000 de claveles en un año. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa (como las orquídeas) o acelerar la producción de plantas bianuales.

#### **2.5.5. SEGMENTOS NODALES**

Este sistema consiste en aislar los segmentos nodales del tallo de la planta y transferirlos a un medio apropiado para su desarrollo. En ocasiones, la micropropagación por esta vía permite sembrar explantes con más de un segmento, para activar todos los puntos meristemáticos que se encuentren en el tejido y obtener un mayor número de plantas. A través de este sistema es posible diseñar medios de cultivo empleando concentraciones hormonales balanceadas adecuadas para obtener la proliferación de brotes, es decir que a partir del punto de crecimiento se obtenga un gran número de plántulas idénticas a la planta madre (Perea, 2009).

Mantell *et al.* (1993), indican que esta técnica se emplea para propagar rápidamente las plántulas que se producen mediante el cultivo de meristemas apicales. Aproximadamente 250 días después de excisión de las puntas meristémicas, las plántulas ramificadas producidas se cortan en segmentos nodales y cada segmento se trasfiere a un medio fresco. El proceso puede repetirse en un lapso de 30 días hasta que se obtenga el número deseado de plantas.

#### **2.5.6. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.**

Según Sánchez y Cabrera (2019), la embriogénesis somática es un proceso biológico por el cual células somáticas desarrollan embriones semejantes a los embriones cigóticos, estos embriones se regeneran en plantas genéticamente iguales a la planta madre. Los embriones somáticos se pueden formar a partir de células del explante y previa formación de callo, estas dos vías diferentes se denominan embriogénesis somática directa e indirecta, respectivamente.

La técnica de usar embriogénesis somática, también permite realizar estudios posteriores relacionados al mejoramiento genético; debido a que el cafetal es una planta semiperenne, tomaría más de 30 años obtener cultivares tolerantes a estrés biótico y abiótico mediante el mejoramiento clásico, por ello, con la embriogénesis somática, se liberarían variedades en menor tiempo que por el método convencional (Sánchez y Cabrera, 2019).

La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento (Sánchez y Pliego, 2015).

### **2.5.7. EMBRIOGÉNESIS DIRECTA E INDIRECTA**

Los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del explante está formado de células somáticas determinadas proembriogénicas o células somáticas no embriogénicas, términos que fueron planteados por Evans y colaboradores en 1981. Si el tejido del explante está formado de células somáticas determinadas un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante (Merkle *et al.*, 1995). Este proceso es llamado comúnmente embriogénesis directa. Los explantes con este tipo de embriogénesis experimentan un mínimo de proliferación antes de formar los embriones somáticos, formándose en explantes en que todas o algunas de las células están predeterminadas como células embriogénicas, por haber retenido alguna de las propiedades de las células meristemáticas parentales de las que derivaron (Halperin, 1995).

En el caso de la embriogénesis indirecta, las células no embriogénicas tienen que llevar a cabo varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción al estado de células embriogénicas, formándose los callos. En este proceso la fase de formación de callo se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos (Merkle *et al.*, 1995).

## **2.6. MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFÉ Y CULTIVO *in vitro***

Para Etienne *et al.* (2002), de acuerdo, a que dadas las características del café en cuanto a crecimiento (planta semi-perenne de crecimiento lento que produce la primera cosecha a partir de los 3 años de edad), el mejoramiento mediante métodos tradicionales basados en la selección, cruces con individuos seleccionados y propagación de dichos individuos, puede implicar largos periodos de tiempo; por ello, la combinación de métodos de mejoramiento tradicional y métodos de transformación genética ofrece una alternativa para lograr el mejoramiento de esta planta.

Las técnicas de cultivo de tejidos están bien establecidas en algunas especies de cafeto, resaltando *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, a partir de muestras obtenidas de la mayoría de los órganos. La propagación puede ser mediante microesquejes (por organogénesis) o por embriogénesis somática, siendo esta última la principal vía de regeneración por presentar la mayor tasa de multiplicación (De Guglielmo, 2009).

## **2.7. CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN EL CULTIVO *in vitro***

Hernández y González (2010), mencionan que la contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes: microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio. Los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras, aunque también existen otros menos frecuentes como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips).

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación microbiana. Existen varias estrategias para controlar y manejar la contaminación, que incluyen la prevención mediante la selección y el tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial del explante y la identificación de los microorganismos

contaminantes, el control de la contaminación a través del uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemas (Niedz y Bausher, 2002).

### **2.7.1. FORMAS Y MÉTODOS DE DESINFECCIÓN**

Los métodos de desinfección utilizados en la fase de establecimiento no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*. Algunos son capaces de permanecer en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y así quedan protegidos de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos, se propagan con el material vegetal y pueden manifestarse sobre los medios de cultivo en la fase de establecimiento o permanecer sin expresarse por largos períodos de tiempo (Hernández y González, 2010).

Los mismos autores aluden, para la desinfección del explante inicial, se han empleado comúnmente soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) en concentraciones entre 0.5 y 5%. Las soluciones de hipoclorito de calcio (CaOCl) son tan efectivas como las de sodio. De forma general, se plantea que la escisión del explante es recomendable realizarla después de la desinfección, para eliminar tejidos que han sido dañados por la solución de hipoclorito.

Pincay (2017), sugiere que para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas, a pesar de esto, el material puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos.

Jhong y Pintado (2019), en su trabajo de inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares; utilizaron diferentes dosis de NaClO en diferentes tiempos de inmersión, donde indican que el tratamiento 2 que corresponde a 1,0% NaCl x 10 min y el tratamiento 4 que corresponde a ácido ascórbico (0,1 g/L) +1,0% NaClO x 10 min, presentó el 94% de explantes sanos.

## 2.8. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Alcántara *et al.* (2019), menciona que una hormona vegetal o fitohormona es un compuesto producido internamente por una planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control. Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales.

Los fitorreguladores juegan un papel muy importante en las vías de desarrollo de las células y tejidos en medios de cultivo. Las auxinas, las citoquininas y la giberilinas son de gran importancia en cultivo *in vitro*; sin embargo, el tipo y la concentración de los fitorreguladores dependen principalmente de la especie, el tejido u órgano y el objetivo del experimento (Adobkar *et al.*, 2012).

**AUXINAS.** Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y son las encargadas de promover el crecimiento y alargamiento celular siendo las más empleadas el ácido indol acético AIA, ácido naftalenacético ANA, las principales auxinas endógenas en la mayoría de las plantas. Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular y promoción de la dominancia apical (Aguilar *et al.*, 2010).

El 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), es uno de los fitorreguladores, con mayor reporte de actividad callogénica; actuando a nivel genético, al desreprimir o reprimir la expresión de los genes; ligándose a un receptor de naturaleza proteica, para luego formar un complejo receptor-hormona de carácter reversible, específico, con alta afinidad y saturable; encargado de activar un promotor que controla la expresión de los genes que codifican la síntesis de las enzimas catalizadoras de los compuestos de la pared, que conlleva a la formación de callos (Peterson *et al.*, 2016).

Viltres *et al.* (2021), menciona que a los tratamientos a los cuales se les aplicó diferentes concentraciones de auxina 2,4-D, inducen callos potencialmente embriogénicos.

**CITOQUININAS.** Este tipo de regulador es el encargado de procesos de división celular, entre estos se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular, además del control de varios procesos vegetales como el retardo de la de la senescencia y la transducción de señales (Aguilar *et al.*, 2010).

Aguilar *et al.* (2010), señalan que el BAP es una citoquinina de primera generación encargada de provocar el crecimiento de las plantas y las respuestas de desarrollo, el establecimiento de flores y estimular la generación de frutos a través de la estimulación de la división celular. También es un inhibidor de la quinasa respiratoria en las plantas, por lo tanto, aumenta la vida después de la cosecha en vegetales verdes.

Montes (2019), determinó para la fase de establecimiento de embriones de café, un medio MS suplementado con 0,5 mg/L de 6-BAP, donde se logró cumplir la germinación que se completó en un mes, cuando las vitroplantas ya presentaban dos pares de hojas verdaderas.

**GIBERELINAS.** Las giberelinas (GAs) son fitohormonas implicadas en el crecimiento de las plantas. Hay dos tipos principales de GAs, un primer grupo que agrupa las moléculas con 20 carbonos que no presentan bioactividad conocida (C20-GAs) y otro grupo formado por GAs que han perdido un carbono y muestran una lactona (C19-GAs) donde se encuentran tanto GAs con y sin bioactividad conocida, es decir, no cumplen ninguna función en el desarrollo de la planta (Castro, 2019).

Pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas, tales como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción de flores y frutos, siendo la más utilizada el ácido giberélico (AG<sub>3</sub>). Las GAs controlan aspectos importantes en el desarrollo de las plantas, actuando como estimulantes del crecimiento, por lo que se obtiene un mayor tamaño. Una de las funciones

más importantes de las GAs es la promoción del crecimiento del tallo, hojas y raíces, esto se debe a la inducción de la división celular (López *et al.*, 2017).

**VITAMINAS.** Las plantas superiores sintetizan las vitaminas esenciales que contribuyen a su crecimiento y desarrollo, pues estas se insertan en las células vegetales para contribuir a su normal progreso y además, pueden cumplir funciones catalizadoras durante las reacciones enzimáticas (Perea *et al.*, 2009).

Según Sánchez (2014), las vitaminas más empleadas para medios de cultivo son:

- Tiamina (vitamina B1): se añade como hidrocloreto de tiamina y constituye una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Es una coenzima de la descarboxilación es esencial para el crecimiento radical pues interviene en la síntesis de citocininas.
- Ácido Nicotínico: forma parte de las coenzimas NAD y NADP que intervienen en la transferencia de hidrógeno, tiene un efecto sinérgico con el AIA en la producción de raíces y ejerce acción inhibitoria en el desarrollo de yemas axilares.
- Piridoxina (Vitamina B6): Es añadida como hidrocloreto de Piridoxina (Piridoxina-HCl). Participa como coenzima en el metabolismo de los aminoácidos, entre ellos el triptófano, precursor de AIA y ácido nicotínico, además de favorecer la formación de raíces.
- Myo-inositol: No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.
- Agentes gelificantes, el agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee el medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al explante.
- El agua es de vital importancia la calidad del agua empleada para realizar los medios de cultivo la cual debe ser destilada.

## **2.9. FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS PROCESOS DE CULTIVO *in vitro*.**

### **2.9.1. AGENTES CONTAMINANTES**

De acuerdo con Hernández y González (2010), las principales fuentes de contaminación son los hongos, bacterias, provocando grandes pérdidas en el cultivo *in vitro* establecido. Las bacterias son uno de los patógenos más frecuentes en causar contaminaciones, ya que no son fáciles de erradicar, resistentes a la esterilización superficial, éstas pueden localizarse en los materiales para el cultivo *in vitro*, en los explantes, tanto interna como externamente. La presencia de hongos en los cultivos *in vitro*, se ha convertido en una causa común de contaminación, siendo *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Fusarium*, los más frecuentes en los experimentos, ocasionando la pérdida de semillas, explantes, plantas.

### **2.9.2. EL MEDIO DE CULTIVO**

Para Morales (2016), una de las principales causas de contaminación es la presencia de microorganismos como anteriormente se ha mencionado, no obstante, estas especies son resistentes incluso a temperaturas mayores comprendidas entre 100 a 120 °C, recomendando que una vez servido el medio debe almacenarse durante unos días para verificar la presencia o no de agentes contaminantes.

Es un factor químico, y el éxito del cultivo depende en gran medida de la selección del medio de cultivo, por lo que su composición química y forma física es muy importante. Los explantes se desarrollan dentro de los medios de cultivo *in vitro*, que se define como un conjunto de elementos abióticos (físicoquímicos) que conforman una sustancia nutritiva de diversa consistencia (sólida, semisólida o líquida) y le proporciona al explante, nutrición y estimulación de su desarrollo (Cruz *et al.*, 2021).

### **2.9.3. EL EXPLANTE**

Según Morales (2016), el explante al provenir de una planta madre, puede llevar consigo microorganismos que es posible erradicar con soluciones de desinfección, sin embargo, cuando éstos están localizados internamente son

difíciles de eliminar, siendo inhibidos con componentes fúngicos o bactericidas.

Los explantes tomados de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado del tejido que se va implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (Jacinto, 2018).

#### **2.9.4. EL ÁREA DE TRABAJO**

Pincay (2017), señala otra de las formas de propagación de los contaminantes en biotecnología, incluye el área de trabajo, debido a que existen partículas, esporas de organismos patógenos que se localizan en las corrientes de aire, éstas son impulsadas por los acondicionadores de aire, accediendo a los cultivos *in vitro*. Una vía de control para la contaminación a nivel del área de trabajo, es la erradicación de los materiales vegetales en mal estado, aplicar desinfecciones adecuadas con productos de alta efectividad. El establecimiento de los cultivos *in vitro* debe realizarse en cámara de flujo laminar, con materiales e instrumentos correctamente esterilizados.

#### **2.9.5. EL OPERADOR**

Según García (2019), dando a conocer que la falta de asepsia por parte del operador se convierte en una de las causas de contaminación en el cultivo *in vitro*. Dentro de las condiciones asépticas del operador están el uso de mandil o bata, mascarillas, cofia, guantes, y lavado de manos con jabón previo al trabajo con el cultivo, rosearse las manos con alcohol.

Las personas que estén involucradas con el trabajo en cultivos celulares y tisulares deben tener las uñas de las manos cortas y limpias, evitar el uso de pantalones cortos o faldas, ya que las piernas quedan desprotegidas de cualquier salpicadura, deben tener el cabello corto o recogido y usar zapatos que cubran totalmente el pie con suela anti-derrapante (Beltrán y González, 2016).

## CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

### 3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología vegetal de la carrera de Ingeniería Agrícola en el Campus Politécnico “El Limón” de la ESPAM MFL, posicionado geográficamente en las coordenadas 0° 49' 23° latitud sur y 80° 11' 01° latitud oeste, a una altitud de 15 msnm.

### 3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo se realizó entre los meses de septiembre de 2020 y agosto de 2021

### 3.3. ETAPAS DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en dos etapas: la primera orientada a identificar la alternativa de desinfección de los explantes más adecuada en café arábigo y la segunda, la prueba de dos métodos de propagación *in vitro*, usando explantes foliares y embriones de semillas, enmarcado en el proyecto institucional (CUP 382546): “Selección de híbridos F1 de café arábigo y propagación clonal usando herramientas biotecnológicas”.

### 3.4. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores en estudio fueron: dos desinfectantes de explantes (factor A) y tres tiempos de inmersión (factor B), que equivalen a seis tratamientos (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Diseño de los tratamientos en desinfectantes.

Tratamientos	A) Desinfectantes (sustancias y concentraciones)	B) Tiempo de inmersión de explante (minutos)	Código
1	Hipoclorito de sodio 1%	5	A1B1
2	Hipoclorito de sodio 1%	10	A1B2
3	Hipoclorito de sodio 1%	15	A1B3

4	Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico 0,1 g/L	5	A1B1
5	Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico 0,1 g/L	10	A1B2
6	Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico 0,1 g/L	15	A1B3

### 3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

El ensayo se planeó como diseño completamente al azar de seis tratamientos con tres frascos con explantes foliares cada uno en tres repeticiones. Esto significa que cada tratamiento estaba conformado por nueve frascos, que generaban nueve datos.

### 3.6. VARIABLES EXPERIMENTALES

Las variables experimentales evaluadas fueron: sobrevivencia y contaminación.

**Sobrevivencia:** La sobrevivencia se tomó directamente en los frascos conteniendo los explantes. Con los datos de explantes sobrevivientes se calculó el porcentaje, considerando que cada repetición constaba de tres frascos y que tratamiento estaba conformado por 3 repeticiones, eso equivale  $n = 9$  observaciones/tratamiento.

**Contaminación:** La contaminación se valoró con una lectura directa, explante contaminado que equivale a explante muerto y no contaminado a explante vivo.

#### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis descriptivo y un análisis de varianza, considerando un diseño completamente al azar con arreglo factorial de dos desinfectantes (hipoclorito de sodio y una mezcla de este producto con ácido ascórbico en tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos). Como no hubo diferencia estadística significativa, al analizar el número de explantes contaminados, no se requirió la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO DE DESINFECCIÓN

- **Condiciones ambientales del laboratorio.** El laboratorio debe estar en buenas condiciones de asepsia, libre de polvo, evitar la entrada de algún insecto, al momento de ingresar los estudiantes deben quitarse los zapatos y desinfectarse.
- **Limpieza del laboratorio.** Éste debe desinfectarse, desde el piso hasta los mesones de trabajo, se utiliza el cloro comercial para su respectiva desinfección.
- **Desinfección de cristalería e instrumentos**
  - Los frascos, pipetas, se desinfectaron en la autoclave, a una temperatura de 121°C durante 20 minutos.
  - Pinzas, bisturí, cajas *petri*, se esterilizaron en la estufa, a una temperatura de 200°C durante 2 horas, éstos se los envuelve en papel para que no estén en contacto directo con el calor y se mantengan esterilizados los materiales.
  - Se llenaron frascos con agua destilada y se esterilizaron en la autoclave, a una temperatura de 121 ° C durante 20 minutos.
- **Preparación de medio de cultivo**
  - Se preparó en medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS).
  - Se colocó en un matraz erlenmeyer con capacidad de 1000 mL, 300 mL de agua destilada estéril.
  - Seguidamente se agregaron los macro y micronutrientes, los quelatos.
  - Se enraza el erlenmeyer a 1000 mL con agua destilada estéril.
  - A continuación, se agregan las vitaminas y se ajusta el pH a 5,7.
  - Se añadió la sacarosa y por último el gellam gum.
  - Posteriormente el medio se calentó en una plancha agitadora magnética durante 20 minutos aproximadamente para disolverlo totalmente.

- Los recipientes utilizados fueron frascos de vidrio con capacidad de 250 mL, aplicando un volumen de 20 mL de medio de cultivo por cada frasco.
- **Proceso de desinfección del explante**
  - Se desinfectaron los explantes conformados por segmentos de hojas del híbrido F1 de café arábigo. Éstos se desinfectaron con alcohol, usando algodón limpiando suavemente ambos lados de las hojas.
  - Se colocaron sobre una caja petri y se disectaron explantes de aproximadamente 0,5 cm excluyendo la nervadura central y los márgenes.
  - Luego se colocaron en cada una de las soluciones de cada tratamiento, en agitación constante.
  - Pasado el tiempo de cada tratamiento, se trasladaron a la cabina de flujo laminar y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada, para luego ser cultivados en los medios.
- **Proceso de siembra del explante**
  - Dentro de la cámara de flujo laminar previamente limpia y desinfectada, se realizó la siembra (inoculación), debe estar encendida una hora antes de realizar la siembra.
  - Se colocaron los explantes dentro de los frascos, utilizando pinzas, se taparon y sellaron con parafilm.
  - Se llevaron al cuarto de crecimiento dejándolos en total oscuridad y a una temperatura de aproximadamente 26°C.

### **3.8. ENSAYO DE PROPAGACIÓN *in vitro***

El experimento se orientó a comparar dos métodos de propagación *in vitro*: de explantes foliares y de embriones de semillas.

#### **3.8.1. MÉTODO DE SIEMBRA DE EXPLANTES DE HOJAS DEL CAFETO**

- **Procedimiento para la desinfección de la cristalería e instrumentos**

- Los frascos, pipetas, se desinfectaron en la autoclave, a una temperatura de 121°C durante 20 minutos.
- Pinzas, bisturí, cajas *petri*, se esterilizaron en la estufa, a una temperatura de 200°C durante 2 horas, éstos se los envuelve en papel para que no estén en contacto directo con el calor y se mantengan esterilizados los materiales.
- Se llenaron frascos con agua destilada y se esterilizaron en la autoclave, a una temperatura de 121 ° C durante 20 minutos.
- **Procedimiento para la preparación del medio de cultivo**
  - Se preparó el medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS).
  - Se colocó en un matraz erlenmeyer con capacidad de 1000 mL, 300 mL de agua destilada estéril.
  - Seguidamente se agregaron los macro y micronutrientes, los quelatos.
  - Se enrasa el erlenmeyer a 1000 mL con agua destilada estéril.
  - A continuación, se agregan las vitaminas y se ajusta el pH a 5,7.
  - Se añadió la sacarosa y por último el gellam gum.
  - Posteriormente el medio se calentó en una plancha agitadora magnética durante 20 minutos aproximadamente para disolverlo totalmente.
  - Se aplicaron las hormonas BAP y 2,4-D en diferentes cantidades por tratamiento, ya que se realizaron 9 tratamientos por 6 repeticiones con diferentes dosis de BAP y 2,4-D. Se las aplicó una vez terminado el medio MS, luego se dividió el medio en 9 frascos, ubicando 110 ml por cada frasco y a continuación se agregó las hormonas en sus dosis respectivas a cada frasco. Luego se dividieron en tubos, 10 ml por tubo (repeticiones).
  - Finalmente, los contenedores se taparon y se colocaron en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión.

- **Procedimiento para la desinfección del material vegetal**
  - Se desinfectaron los explantes conformados por segmentos de hojas del híbrido F1 de café arábigo. Éstos se desinfectaron con alcohol, usando algodón limpiando suavemente ambos lados de las hojas.
  - Se colocaron sobre una caja Petri y se disectaron explantes de aproximadamente 0,5 cm excluyendo la nervadura central y los márgenes.
  - Se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos en agitación constante.
  - Pasado los 10 minutos, se trasladaron a la cabina de flujo laminar y se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril.
- **Procedimiento para siembra de los explantes**
  - Dentro de la cámara de flujo laminar previamente limpia y desinfectada, se realizó la siembra (inoculación), debe estar encendida una hora antes de realizar la siembra.
  - Se colocaron los explantes dentro de los frascos, utilizando pinzas, se taparon y sellaron con parafilm.
  - Se llevaron al cuarto de crecimiento dejándolos en total oscuridad y a una temperatura de aproximadamente 26°C.
- **Procedimiento para la medición de la sobrevivencia y otras variables biológicas**
  - Se realizó un control de los explantes una vez por semana.
  - Se estableció la siembra de los explantes en la fecha del 5 de octubre de 2020; a los cinco días después de la siembra, el 50% frascos presentaron contaminación por hongos, por lo cual éstos se desecharon.
  - A los 17 días después de la siembra, los demás explantes, presentaron fenolización.

**Cuadro 2.** Procedimiento para la siembra de explantes de hojas del híbrido F1 de café arábigo

Nombre del producto	Unidad	Cantidad	Descripción
Macronutrientes	mL.L <sup>-1</sup>	40	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Nitrato de amonio) KNO <sub>3</sub> (Nitrato de potasio) MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de magnesio) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Cloruro de calcio) H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato)
Micronutrientes	mL.L <sup>-1</sup>	4	KI (Yoduro de potasio) H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido bórico) MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (Sulfato de manganeso) ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de zinc) Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (Molibdato de sodio) CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (Sulfato de cobre) CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Cloruro de cobalto)
Quelatos de hierro	mL.L <sup>-1</sup>	4	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de hierro) EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
Vitaminas	mL.L <sup>-1</sup>	1	Tiamina C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS+ Glicina C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> Ácido nicotínico C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> Piridoxina C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> Myo-inositol C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Sacarosa Gellan gum	g/L g/L	30 3	La sacarosa ( C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ) se adiciona al medio de cultivo de las plantas in vitro para permitir un rápido crecimiento heterotrófico. El gellan gum se utiliza normalmente en 2 a 4 g/L para gelificar los medios de cultivo.
BAP	μL	2 4 6	El BAP es una citoquinina y el 2,4-D es una auxina, éstas promueven el crecimiento de explantes <i>in vitro</i> estimulando la división celular.
2,4-D	μL	1 2 3	

### **3.8.2. MÉTODO DE SIEMBRA DE EMBRIONES PROVENIENTES DE SEMILLAS DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÈ ARÀBIGO**

- Se realizó los mismos procedimientos mencionados anteriormente, la única diferencia fue que para el proceso de desinfección de explantes.
- Las semillas fueron lavadas con agua y jabón por 3 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada.
- Posteriormente se sometieron a una desinfección con cloro comercial (5,25%) al 1% por 10 minutos.
- Después se llevaron a la cabina de flujo laminar y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.
- **Procedimiento para siembra de los explantes**
  - Dentro de la cámara de flujo laminar previamente limpia y desinfectada, se realizó la siembra (inoculación), debe estar encendida una hora antes de realizar la siembra.
  - Se procedió a extraer los embriones con mucho cuidado utilizando pinzas y bisturí respectivamente esterilizados.
  - Se colocó un embrión por frasco, éstos fueron tapados y sellados con parafilm.
  - Los embriones fueron transferidos al cuarto de crecimiento a condiciones de oscuridad.
  - Al germinar los embriones, se transfirieron a condiciones de luz con temperatura promedio de 26°C.
- **Procedimiento para la medición de la sobrevivencia y otras variables biológicas**
  - Se estableció la siembra de los explantes en varias fechas.
  - Se realizó un control de los explantes una vez por semana.
  - Cada vez que hubo un frasco contaminado, éste se desechó al instante.

**Cuadro 3.** Procedimiento para la siembra de embriones de semillas del híbrido F1 de café arábigo

Nombre del producto	Unidad	Cantidad	Descripción
Macronutrientes	mL.L <sup>-1</sup>	40	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Nitrato de amonio) KNO <sub>3</sub> (Nitrato de potasio) MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de magnesio) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Cloruro de calcio) H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato)
Micronutrientes	mL.L <sup>-1</sup>	4	KI (Yoduro de potasio) H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido bórico) MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (Sulfato de manganeso) ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de zinc) Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (Molibdato de sodio) CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (Sulfato de cobre) CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (Cloruro de cobalto)
Quelatos de hierro	mL.L <sup>-1</sup>	4	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de hierro) EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
Vitaminas	mL.L <sup>-1</sup>	1	Tiamina C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS+ Glicina C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> Ácido nicotínico C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> Piridoxina C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> Myo-inositol C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Sacarosa Gellan gum	g/L g/L	20 3	La sacarosa ( C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ) se adiciona al medio de cultivo de las plantas in vitro para permitir un rápido crecimiento heterotrófico. El gellan gum se utiliza normalmente en 2 a 4 g/L para gelificar los medios de cultivo.
BAP ANA AG <sub>3</sub>	μL μL μL	0,045 0,02 0,05	El BAP es una citoquinina, promueve el crecimiento de explantes <i>in vitro</i> . La auxina (ANA) es una hormona de crecimiento que estimula el desarrollo de raíces y el AG <sub>3</sub> , ácido giberélico es una simple giberelina, que promueve el crecimiento y la elongación celular.

### 3.8.3. MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizó embriones de semillas de café correspondiente al cruzamiento Catimor ECU x Bourbon rojo proveniente del ensayo de híbridos de café arábigo localizado en la ESPAM, carrera de Ingeniería Agrícola.

### 3.8.4. VARIABLES DE RESPUESTA PARA EL ESTUDIO DE EMBRIONES DE SEMILLAS

**Número de explantes sembrados.** - Es el indicativo de los explantes sembrados, provenientes de semillas de sembrar.

**Número de explantes contaminados.** - Se evaluó el número de explantes que se contaminaron después de la siembra, usando la escala nominal: 0=muerte, 1=sobrevive.

**Sobrevivencia.** - Esta variable se realizó en base si el explante se encuentra vivo.

**Crecimiento de la plantita.** - Se midió en milímetros, usando una regla milimétrica

**Vigor vegetal.** - Se evaluó de acuerdo a la escala ordinal de 1 a 5, que se describe a continuación:

- 1= vigor bajo o muy reducido
- 2= medio bajo vigor
- 3= mediano vigor
- 4= mediano alto vigor
- 5= muy alto vigor

**Color de la plantita.** - Se evaluó en base a la escala ordinal siguiente:

- 1= pálido
- 2= semipálido
- 3= verde
- 4= verde intenso

Los datos ordinales de vigor y coloración fueron transformados a porcentaje usando la fórmula de TOWSEND Y HEUBERBERG (1943), que se indica a continuación:

$$\% \text{ de desinfección foliar} = \frac{\sum \cdot n \cdot v}{4 \cdot N} \times 100$$

Donde n. es el número de hojas en cada grado; v. el grado de desinfección y N número de hojas totales.

### **3.8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se aplicaron las técnicas de la estadística descriptiva con énfasis en el cálculo de las medias y error típico, así como la distribución empírica. Por otra parte, se enfatizó en el análisis de regresión para explicar la relación de los tiempos de evaluación después de la siembra con el comportamiento biológico de los explantes de embriones del híbrido F1 Catimor ECU x Bourbon rojo.

Se consideró que no era necesario realizar un análisis de varianza en circunstancia de que, en esta etapa, con el tratamiento de desinfección seleccionado (T2), hipoclorito de sodio al 1% de concentración con un tiempo de inmersión de 10 minutos, se probaron con los métodos por explantes foliares y explantes de embriones. Con los explantes foliares la mortalidad alcanzó el 100% a causa de la contaminación, por lo que se descartó del análisis estadístico comparativo.

Se enfatizó en el análisis descriptivo y en el análisis de regresión que permitió una explicación del fenómeno biológico relacionado con la propagación *in vitro* de embriones de café arábigo.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ENSAYO DE DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES

La comparación entre los dos desinfectantes, con la prueba t, se determinó que no había diferencia significativa ( $p=0,211$ ), para la variable sobrevivencia. A los 25 días después de la siembra, donde, con el hipoclorito de sodio, la sobrevivencia fue:  $25 \pm 3\%$  y con hipoclorito de sodio + ácido ascórbico fue  $16 \pm 5\%$  ( $A1=A2$ ).

El resultado de sobrevivencia de los explantes, respecto de los tiempos de inmersión, fueron estadísticamente iguales,  $B1=B2=B3$ , cuyas medias y errores estándar fueron:

- 5 minutos:  $17 \pm 5\%$
- 10 minutos:  $24 \pm 6\%$
- 15 minutos:  $20 \pm 5\%$

Considerando que la mayor sobrevivencia se alcanzó usando hipoclorito de sodio al 1% con un tiempo de inmersión de 10 minutos, se seleccionó como el tratamiento idóneo para los procesos de desinfección de explantes vegetales de café arábigo.

Según los resultados expuestos en el cuadro 4, los explantes de hojas que sobrevivieron a los 25 días después de la siembra presentaron la mayor tasa de sobrevivencia (4 explantes), que corresponde al tratamiento 2 (NaCl 1% x 10 min); mientras que los demás tratamientos demuestran baja tasa de sobrevivencia. La contaminación fue causada por hongos y bacterias (Anexo 5).

Resultados de Jhong y Pintado (2019), en su trabajo de inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café; utilizaron diferentes dosis de NaClO en diferentes tiempos de inmersión para la prueba de desinfección, donde indican que el tratamiento 2 que corresponde a 1,0% NaCl x 10 min y el tratamiento 4 que corresponde a ácido ascórbico (0,1 g/L) +1,0% NaClO x 10 min, presentaron el 94% de explantes sanos.

A pesar que se seleccionó hojas libres de daños por patógenos, se presentó

contaminación por hongos y bacterias. Muchos microbios e insectos se encuentran en la superficie de las plantas sin afectar su crecimiento y desarrollo, e incluso en algunos casos favoreciendo el desempeño vegetal. Sin embargo, una vez en contacto con las condiciones *in vitro* se convierten en vitropatógenos. La mayoría de los microorganismos se localizan en pequeñas cavidades de la corteza de los tallos y órganos donde se hace más difícil la penetración de las soluciones desinfectantes y consecuentemente su eliminación; adicionalmente, algunas plantas tienen microbios asociados a su sistema vascular, que hacen aún más complicado el proceso de desinfección (Suárez, 2020).

**Cuadro 4.** Evolución de la sobrevivencia de los explantes foliares de café en función de los desinfectantes a nivel de laboratorio.

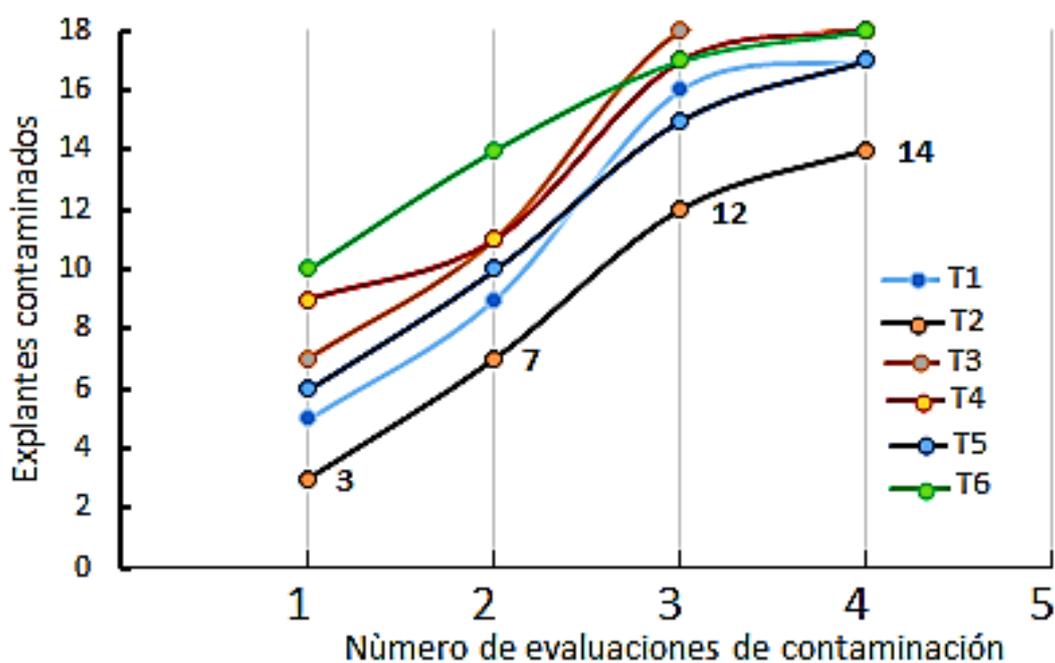
Tratamientos	Desinfectantes (sustancias y concentraciones)	Tiempo de inmersión minutos	Explantes foliares sembrados <i>in vitro</i>	Explantes sobrevivientes en relación a distintos días después de la siembra (dds)			
				10 dds	15 dds	20 dds	25 dds
1	Hipoclorito de sodio 1%	5	18	13	9	2	1
2	Hipoclorito de sodio 1%	10	18	15	11	6	4
3	Hipoclorito de sodio 1%	15	18	11	7	0	0
4	Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico 0,1 g/L	5	18	9	7	1	0
5	Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico 0,1 g/L	10	18	12	8	3	1
6	Hipoclorito de sodio 1% + Ácido ascórbico 0,1 g/L	15	18	8	4	1	0

En el cuadro 5, se indica el análisis de varianza de la variable contaminación de los explantes, determinándose que no hubo efecto directo de los factores en estudio, donde la mayor causa de la variación es el error experimental, que se atribuye básicamente a los aspectos del mantenimiento del laboratorio (variaciones en el voltaje que repercuten en los cambios de temperatura), otra causa importante se relaciona con los tiempos de inmersión y en un tercer nivel los tipos de desinfectantes.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza de las siembras con explantes foliares de café arábigo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	F 0,05	F0,01	p de F	Variación (%)
Desinfectantes (D)	1	26,04	26,04	1,08	4,41	8,29	0,312	5,05
Tiempos de inmersión (T)	2	53,58	26,79	1,11	3,55	5,66	0,350	10,38
Interacción D x T	2	3,08	1,54	0,06	3,55	5,66	0,938	0,60
Error experimental	18	433,25	24,07					83,97
Total	23	515,95						100,00

El coeficiente de variación del 39% indica que la influencia de las causas del error experimental es alta y que es factible de mejorar los parámetros biológicos.

**Figura 1.** Evolución de la contaminación de los explantes foliares de café.

Ortiz *et al.* (2017), consideran que las mejores variantes para la desinfección de hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro* resultaron ser las combinaciones del hipoclorito de sodio al 1,5 % en 15 y 20 min, al 2 % en 15 min, al 2,5 % en 15 min y al 3 % en 15 min, donde se logró un aumento significativo de la supervivencia de los explantes superior al 86%.

Resultados de Aguilar *et al.* (2020), lograron obtener callos de color verde amarillo y aspecto granuloso en explantes foliares de *Coffea arabica* en un 100% en medio MS enriquecido con 1,5 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0,5 mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a los 20 días de la introducción *in vitro*. Al respecto Viltres *et al.* (2021), afirma, a los tratamientos los cuales se les aplicó diferentes concentraciones de auxina 2,4-D y la citoquinina 6-BAP inducen callos potencialmente embriogénicos, donde alcanzó un valor del 94,13%.

Autores aportan que añadir la auxina 2,4-D permite la inducción de callo, así lo declararon Jhong y Pintado (2019), Riviello *et al.* (2021) y Cruz (2019), al usar diferentes concentraciones de 2,4-D, solo o con una citoquinina, para obtener 100% de explantes con callogénesis en diferentes variedades de café.

**Cuadro 6.** Número de explantes de embriones de café sembrados por frasco (ES) con medio de cultivo *in vitro*, explantes vivos (EV) y sobrevivencia (SVV).

Frascos sembrados con explantes de embriones de café														
Fechas de siembra	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	ES	EV	EV	SVV
												15 dds	11/08/2021	(%)
Mayo 4/2021	11	11	11	2	2						37	33	3	8,11%
Mayo 11/2021	2	11	11	2	11	11	2	2	2		54	46	4	7,41%
Junio 2/2021	7	7	7	8	8	8	8				53	38	5	9,43%
Junio 3/2021	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	80	80	10	12,50%
Junio 4/2021	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	80	68	8	10,00%
<b>Total</b>											304	265	30	9,87%

En el cuadro 6, se observa una sobrevivencia general del 9,87%, de los 304 explantes sembrados en los frascos con medios de cultivo, sobrevivieron 30 explantes. Los explantes que se contaminaron y murieron durante el período del experimento fueron 274, que equivale al 90,13%. La germinación de los embriones comenzó a partir de los 10 días de siembra y fueron transferidos a condiciones de luz (Anexo 14).

Castilla *et al.* (2020), determinaron para la fase de establecimiento de embriones de café, un medio MS suplementado con 25 mg/L de cisteína, donde se logró cumplir la germinación, cuando las plántulas contaban con el primer par de hojas verdaderas.

Al respecto, Montes (2019), para la fase de establecimiento de los embriones, el

medio de cultivo utilizado fue un MS suplementado con 0,5 mg/L de 6-BAP (6-N-Bencilaminopurina), con un pH de 5,7. La germinación de los embriones comenzó a partir de los 13 días de siembra en la fase de establecimiento y se completó al cumplir un mes, cuando las vitroplantas ya presentaban dos pares de hojas verdaderas.

**Cuadro 7.** Número de explantes de embriones de café sembrados por frasco (ES) con medio de cultivo *in vitro*, explantes vivos (EV) y sobrevivencia (SVV) a agosto 11 del 2021.

Fechas de siembra	EV 11/08/2021	Días después de la siembra	Crecimiento promedio (mm)	Crecimiento		Vigor vegetal (1-5)		Color del brote (1-4)	
				Min	Max	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Mayo 4/2021	3	98	13	6	16	1	5	1	4
Mayo 11/2021	4	91	10	3	15	1	5	1	4
Junio 2/2021	5	70	10	6	16	3	5	3	4
Junio 3/2021	10	69	11	3	15	3	5	3	4
Junio 4/2021	8	68	11	2	22	3	5	2	4
Total	30								

El comportamiento de los brotes *in vitro*, provenientes de embriones de híbridos F1 de café arábigo se expone el cuadro 7, a distintos días después de la fecha de siembra, donde se evidencia que el crecimiento varía en función del tiempo transcurrido, el vigor vegetal, medido con la escala ordinal de 1 a 5, tienen respuestas diferenciadas al igual que el color del brote, medido en la escala ordinal de 1 a 4. Estos resultados indican que hay una respuesta favorable del proceso de cultivo *in vitro* de embriones de híbridos F1 de café arábigo.

Según Amaro (2018), la micropropagación es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica, puesto que permite cultivar células de diversos tipos celulares (tejidos, órganos, semillas, embriones) produciendo plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada, gracias a la totipotencialidad de dichos tipos celulares.

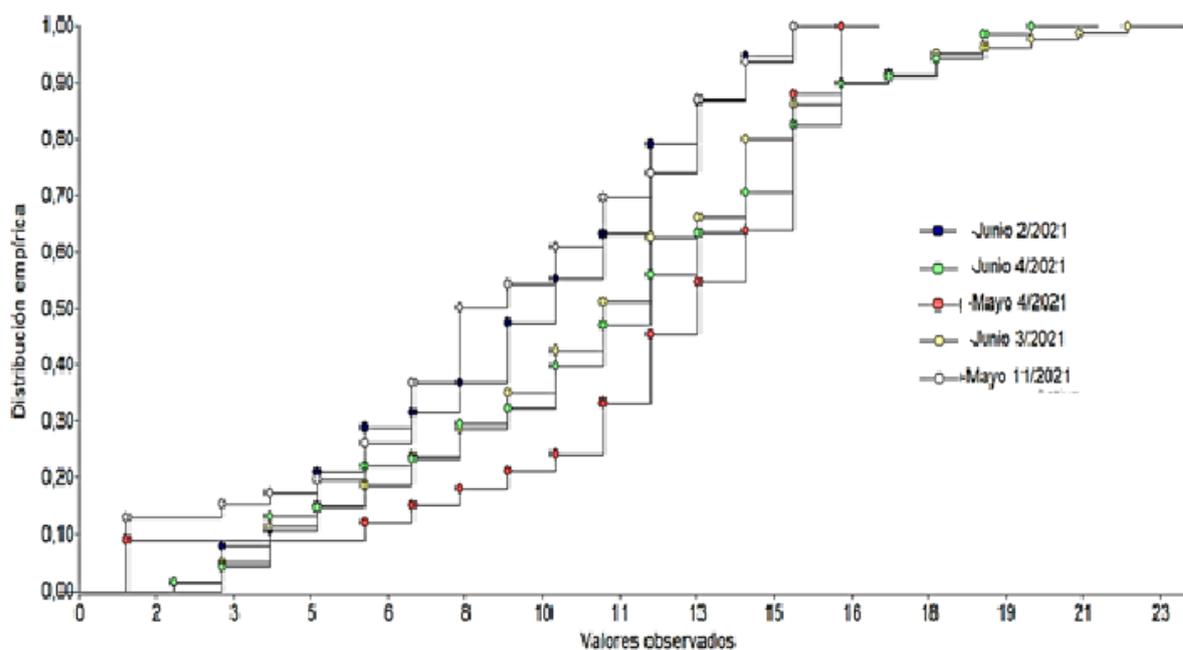
Castañeda *et al.* (2015), en su ensayo, introducción *in vitro* de *Theobroma cacao* L. mediante cultivo de embriones sexuales, utilizaron un medio de cultivo en base con agua destilada, agua de coco 50mL/L y solución nutritiva hidropónica, donde logaron observar que a los 4 días de sembrado los

embriones ya habían germinado y desarrollado los ápices radiculares y obtuvieron como resultado el 37,5% de embriones libre de contaminantes y con un buen crecimiento.

**Cuadro 8.** Crecimiento máximo registrado en los brotes de embriones de café sembrados por frasco (ES) con medio de cultivo *in vitro* a agosto 6 del 2021.

Frascos sembrados con explantes de embriones de café											
Fechas de siembra	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	Crecimiento (mm)
Mayo 4/2021	16	13	16								16
Mayo 11/2021	1	11	8	1	15	15					15
Junio 2/2021	10	12	13	3	15	14					15
Junio 3/2021	11	15	22	15	15	12	18	19	14	20	22
Junio 4/2021		19	19	16	15	15	16	12	15	20	20

Los brotes de café *in vitro* tienden a mostrar un comportamiento similar en crecimiento, medido en milímetros, notándose que las siembras de junio/2021, presentan los valores superiores a los 18 mm, mientras que los brotes de las plantitas *in vitro* sembradas en mayo/2021, alcanzan máximo los 18 mm (cuadro 8).



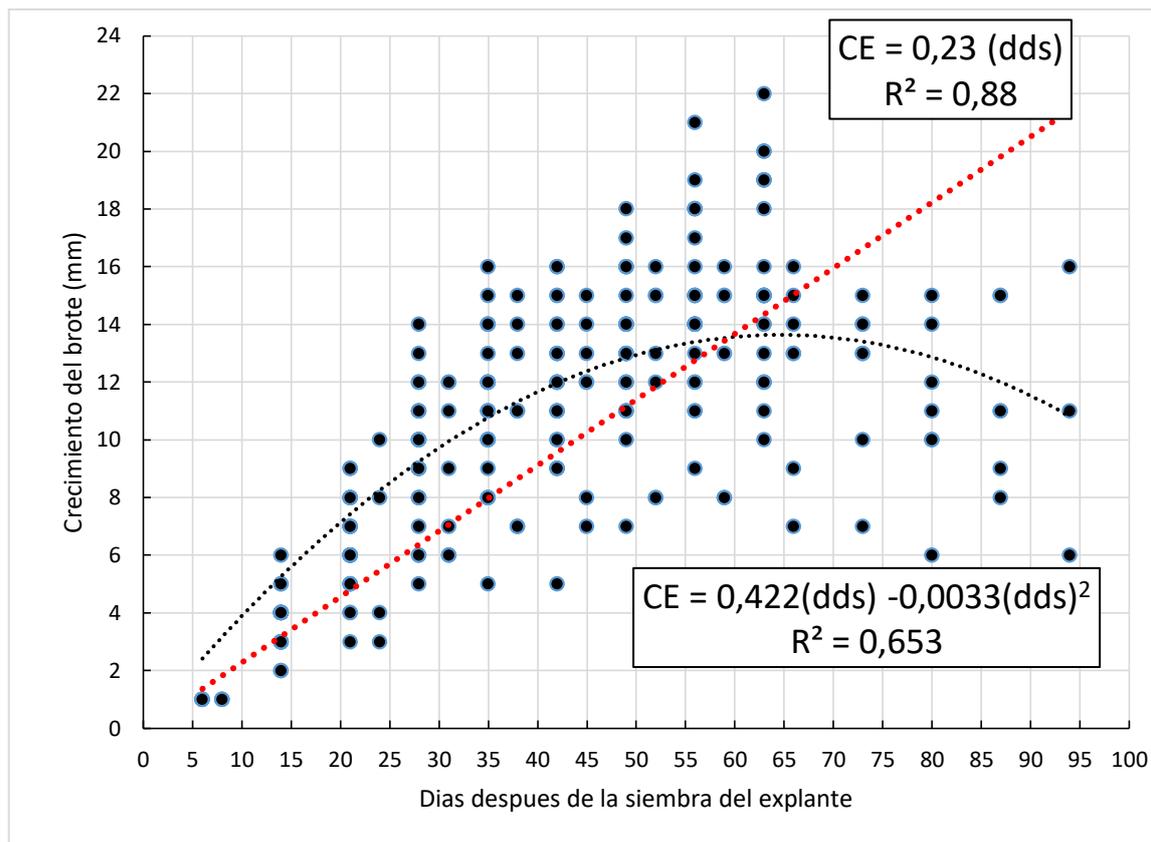
**Figura 2.** Evolución del crecimiento de los brotes en relación a las fechas de siembra de los explantes de embriones de híbridos F1 de café arábigo, hasta agosto 6 de 2021.

El modelo lineal de la regresión explica el 88% del crecimiento de los explantes, evidenciándose que diariamente, los brotes crecen a razón de 0,23 milímetros, hasta los 60 días después de la siembra en los frascos con medios de cultivo (intersección de las líneas de las funciones lineal y cuadrática (figura 2).

Estudios realizados por *Pereira et al.* (2019), indican que la adición de ácido bórico al agua de remojo de semillas, es necesaria y proporciona plántulas más vigorosas, después del cultivo de los embriones.

Según *Alcántara et al.* (2017), la temperatura ideal para el crecimiento de cultivos vegetales por lo general puede oscilar entre los 25 - 30°C, ideal para que el crecimiento de estos tejidos se pueda dar; también indican que los cultivos vegetales *in vitro* necesitan una humedad relativa entre el 50% y el 80 % frente al ambiente, para que la planta pueda desarrollarse. Según el tipo de características que requiera la planta la humedad puede variar.

Montiel (2017), indica que el fotoperiodo y la intensidad de la luz son factores que influyen en el control de la velocidad de crecimiento, la mayoría de los cultivos se desarrollan a una intensidad lumínica entre 5 a 25 W/m<sup>2</sup> (1000 a 5000 lux), si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfológicas, en general se utiliza luz blanca, pobre en longitudes de onda larga. El fotoperiodo habitualmente utilizado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad



**Figura 3.** Crecimiento del explante de embriones de café (CE) en relación a los días después de la siembra (dds).

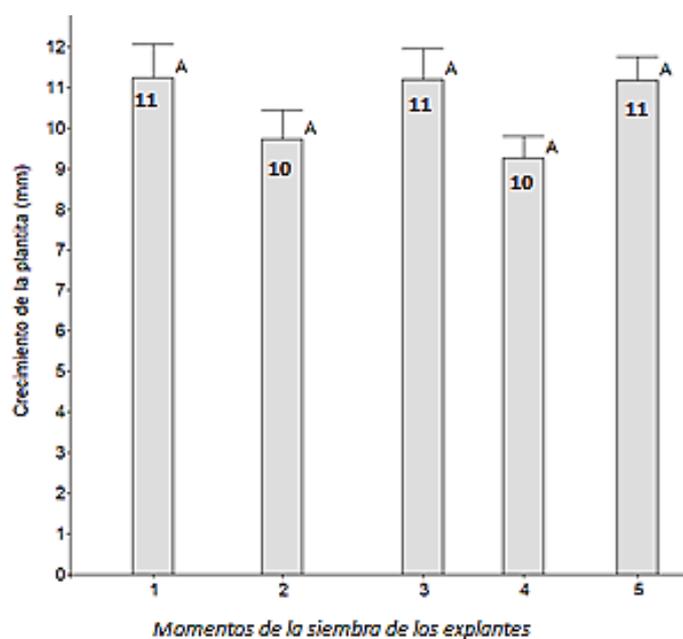
Considerando las fechas de siembra como cinco momentos de siembra de los explantes de embriones y calculando los promedios y errores estándar, se observa que prácticamente las diferencias fueron reducidas, lo que indica que el procedimiento aplicado es consistente (Figura 3).

En el cuadro 9 se presenta los errores estándar, en todas las variables resultaron mayores en el momento 3 (junio 2/2021), sin embargo, al realizar los análisis de varianza, los promedios resultaron estadísticamente iguales ( $p > 0,05$ ). En la figura 4, se expone las medias de crecimiento en relación a los momentos de siembra, corroborando que los rangos de Tukey son iguales, por tanto, no hay diferencias en los procesos de siembra de explantes y manejo a nivel de laboratorio.

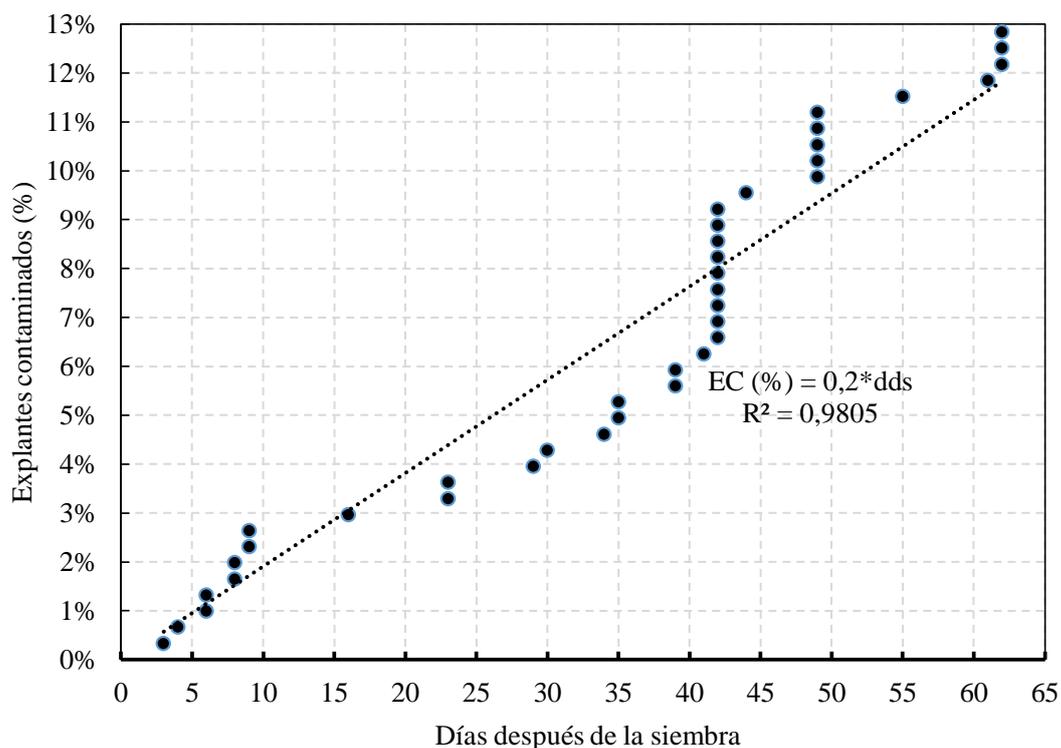
**Cuadro 9.** Promedio y errores estándar de las variables crecimiento, vigor y coloración de las plantitas *in vitro*.

Momentos de la siembra	Observaciones	Crecimiento del brote (mm)			Vigor vegetal (%)			Coloración de la plantita (%)		
		Media	± error típico	error	Media	± error típico	error	Media	± error típico	error
Mayo 4/2021 (1)	33	11	0,68		93	2,3		92	2,6	
Mayo 11/2021 (2)	46	10	0,71		93	1,9		90	2,0	
Junio 2/2021 (3)	38	11	0,68		85	4,2		84	3,9	
Junio 3/2021 (4)	80	10	0,52		84	2,5		84	2,4	
Junio 4/2021 (5)	68	11	0,52		90	1,7		89	1,8	
	265	11			88			88		

Nota: Los análisis de varianza indicaron que las medias de las tres variables fueron estadísticamente iguales.

**Figura 4.** Crecimiento promedio de las plantitas *in vitro* y rango de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

La contaminación de los explantes fue progresiva, en relación con los días después de la siembra (dds). A los 62 dds se contaminaron 40 explantes de los 304 sembrados, que equivale al 13% del total (figura 5). El análisis de regresión lineal permitió determinar que durante los primeros 62 días después de la siembra, la contaminación provocó la muerte de los explantes a razón de 1% cada 5 días (Anexo 15).



**Figura 5.** Evolución de la contaminación de explantes en relación a días después de la siembra.

En la figura 6 se exponen los diagramas de caja (también se conocen como diagramas de caja y bigote) de las variables: crecimiento del brote, vigor vegetal y coloración de las plantitas *in vitro*. El crecimiento de las plantitas muestra cierta simetría durante todos momentos de evaluación. El ligero sesgo hacia la derecha, desde el cuartil Q3=14 hasta el límite máximo es un indicativo de que había explantes con buen desarrollo vegetativo. En el vigor vegetal y en la coloración de los brotes es evidente sesgos intensos hacia el lado izquierdo lo que indica que existe una alta proporción de brotes tienden a deteriorarse y perder esos atributos.

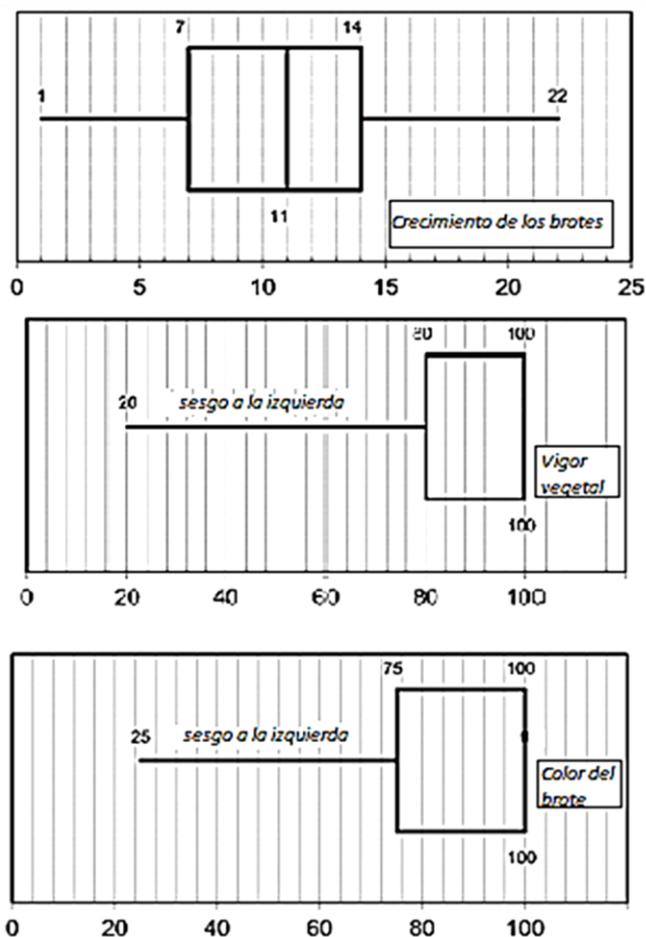


Figura 6. Simetría del crecimiento de los brotes *in vitro* y asimetría del vigor y coloración de las plantitas.

Otro aspecto que se valoró es la relación entre la coloración y vigor vegetal de los brotes *in vitro*, observándose que hay una tendencia lineal, esto significa que los brotes con coloración verde intensa también son muy vigorosos (figura 7).

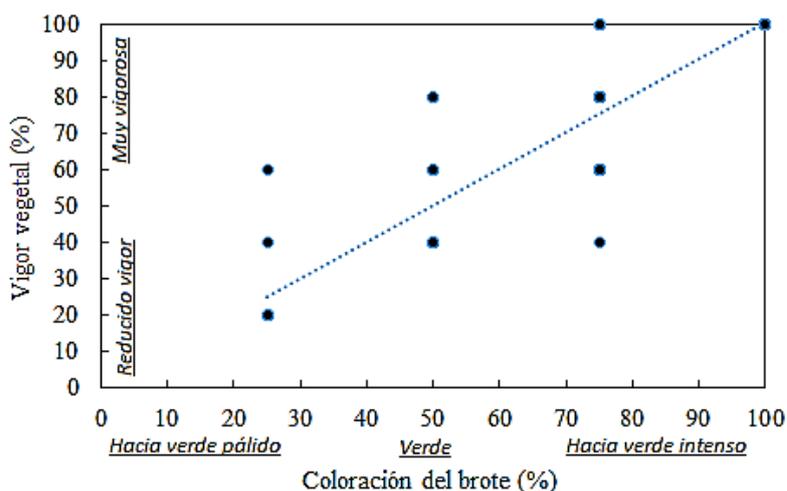


Figura 7. Relación entre coloración y vigor vegetal de los brotes *in vitro*.

Puicón (1997), menciona que el cultivo *in vitro* de embriones es mejor cuando estos provienen de plantas crecidas bajo condiciones controladas en invernadero porque producen un mejor desarrollo del endospermo. Para Romero (2004), el cultivo de embriones se origina en semillas no acabadas de madurar, sin que se haya completado el desarrollo del embrión; además, menciona que este tipo de cultivo se utiliza sobre todo para impedir la muerte prematura el embrión, con el fin de obtener una planta viable.

Se consideró que no era necesario realizar un análisis de varianza en circunstancia de que, en esta etapa, con el tratamiento de desinfección seleccionado (T2), hipoclorito de sodio al 1% de concentración con un tiempo de inmersión de 10 minutos, se probaron con los métodos por explantes foliares y explantes de embriones. Con los explantes foliares la mortalidad alcanzó el 100% a causa de la contaminación, por lo que se descartó del análisis estadístico comparativo.

# CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- En el cultivo de los explantes foliares no hubo efecto directo de los factores en estudio ( $p > 0,05$ ) y que la mayor causa de la variación fue el error experimental. Las variaciones en el voltaje, parecen repercutir en los cambios de temperatura y luminosidad en el laboratorio
- Los tiempos de inmersión de los explantes tienen mayor impacto que los tipos de desinfectantes en sí mismo.
- La mayor sobrevivencia se alcanzó usando hipoclorito de sodio al 1% con un tiempo de inmersión de 10 minutos, tratamiento que se seleccionó como idóneo para los procesos de desinfección de explantes vegetales de café arábigo.
- El cultivo *in vitro* de explantes foliares tuvo una sobrevivencia muy reducida (22% a los 25 días después de la siembra), adoptándose el método de cultivo *in vitro* de embriones del híbrido F1 de Catimor ECU x Bourbon rojo.

## RECOMENDACIONES

- Ofrecer un manejo fitosanitario adecuado a las plantas donadoras de materia vegetal en los híbridos de café arábigo del área de agrícola, para evitar contaminación por hongos a nivel de laboratorio.
- Ampliar estudios relacionados al cultivo *in vitro* de embriones de híbridos F1 de café arábigo para proyectar la propagación por microestacas y posterior validación en las principales localidades cafetaleras del país.
- Mejorar la implementación de materiales, equipos y reactivos que brinden un mejor desempeño en el desarrollo de tesis y trabajos de investigación en el laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adobkar, I.M. Saad y Ahmed, M. Elshahed. (2012). *Plant tissue culture media*. Annarita Leyva and Laura M.R. Rinaldi (ed) In: Recent advances in plant *in vitro* culture. ISBN 978-953-51-0787-3
- Aguilar, M; Melgarejo, L.M.; Romero, M. (2010). Fito-hormonas. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.
- Aguilar, M. Q., Yafac, N., Garavito-Salini, R., y Principe, L. (2020). Desdiferenciación celular *in vitro* de *Coffea arabica* L. "Café" var. Caturra a partir de explantes foliares. *Scientia*, 22(22), 141-148.
- Alcántara Cortes, J. S., Castilla Pérez, M. G., y Sánchez Mora, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1 (1).
- Alcántara, C. J. S., Acero, G. G., Alcántara, C. J. D. y Sánchez, M. R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129.
- Amaro, M. R. (2018). Cultivo *in vitro*: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. Universidad Complutense.
- ANACAFE (Asociación Nacional del Café). (2016). *Guía de variedades de café Guatemala*.  
<https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%C3%ADa-de-variedades-Anacaf%C3%A9.pdf>
- Anzueto, F. (2014). Variedades de café. Guatemala. *Revista CEDICAFE*. p. 2-9.
- Beltrán, N. y Gonzáles, C. (2016). Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bhojwani, S. S. y Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text* (No. 574.0724/B575). India: Springer.
- Castañeda, S., Gutarra, B., y La Rosa, R. (2015). Introducción *in vitro* de *Theobroma cacao* L. mediante cultivo de embriones sexuales. Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM
- Castilla, Y., González, M. y Espinosa, L. (2020). Conservación *in vitro* de cafeto (*Coffea arabica* L.) mediante la disminución de sales minerales en el medio de cultivo. *Cultivos Tropicales*, 41(1).
- Castro Puntero, J. (2019). Simulación de la producción de giberelinas en *Saccharomyces cerevisiae* mediante COBRAPy. (Bachelor's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya)
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). (2007). Propagación de los híbridos F1 de café. Turrialba. C.R. p. 15.

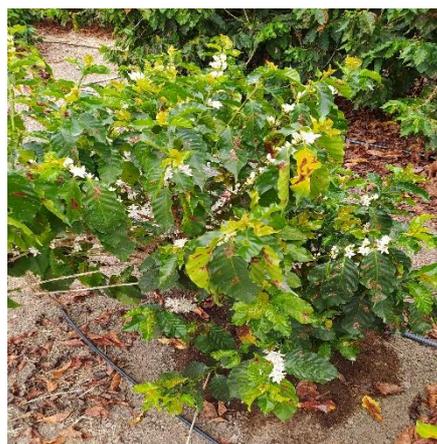
- Cevallos, M., Sánchez, I., Montes, S. (2002). Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* P. var. Robusta; *Rev. Protección veg.*, 17, (1); 14-19
- Charrier, A. and Berthaud. (1985). *Botanical classification of coffee*. En: *Coffee "Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage"*. Edited by M.N. Clifford and K.C. Willson. Wesport, Connecticut. pp: 13-47.
- Cruz, J. F. (2019). Efecto de fitohormonas en la callogénesis *in vitro* de café-variedad Obatá. (Tesis de ingeniería, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano).
- Cruz, N., Morante, J., Carranza, M. (2021). *Biotecnología de plantas*. Aplicaciones en Ecuador. Editorial Grupo Compás.
- De Guglielmo Cróquer, Z. (2009). Ingeniería genética aplicada al café. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(3), 475-486.
- Duicela, L., Enríquez, G. (2014). *Guía técnica para la producción y poscosecha del café arábigo*. Portoviejo. Ecuador: CGRAF.
- Etienne, H., Anthony, F., Dussert, S., Fernandez, D., Lashermes, P., y Bertrand, B. (2002). Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *in vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 38(2), 129-138.
- García Balón, R. E. (2019). Respuesta morfológica en explantes de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., bajo la influencia de diferentes concentraciones de citocininas (Bachelor's thesis. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2019.).
- Halperin, W. (1995). *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 1-16). Springer, Dordrecht.
- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultrop*, 31(4), 58-69.
- Jacinto Alcazar, M. E. (2018). Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa sp.*) variedad freedom en condiciones *in vitro* (Doctoral dissertation, Universidad Mayor de San Andrés).
- Jhong, S., y Pintado, R. C. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259-264.
- Landaverde, V., López, A., Vásquez, T., (2002). Estudio de inducción a callo embriogénico en variedades comerciales de café (*Coffea arabica*) de El Salvador (Tesis. Ingeniero Agrónomo, Universidad de El Salvador).
- Loor, R., De Bellis, T., Leroy, T., Plaza, L., Guerrero, H. y López, D. (2017). Revealing the diversity of introduced *Coffea canephora* germplasm in Ecuador: Towards a national strategy to improve robusta. *The Scientific World Journal.*, 1-12.

- López Medina, E., López Zavaleta, A., y De la Cruz Castillo, A. (2017). Efecto del ácido giberélico en la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni," *estevia*". *Arnaldoa*, 24(2), 599-608.
- Loyola, V. M. y Ochoa, N. (2012). *An introduction on Plant Cell Culture: The Future Ahead*. (M. I. M. B. I. TM Series, Ed.) (3rd ed.).
- Lozano, G. (2014). Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) - variedad Lempira – a partir de meristemas. (Proyecto especial, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano). Honduras.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 1987. Primer Diagnóstico Cafetero. Programa Nacional del Café. Portoviejo, Manabí, Ecuador. pp. 6-12, 18, 31.
- Mantell, S. H., Mague, S. Q. y Chandler, F. L. (1993). Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*, 481-494.
- Merkle, S. A., Parrott, W. A., & Flinn, B. S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 155-203). Springer, Dordrecht.
- Missouri Botanical Garden. (2010). *Coffea: Species in Coffea*. <http://www.theplantlist.org./browse/A/Rubiaceae/Coffea/>
- Monteros Guerrero, A. 2017. Rendimientos de café grano seco en el Ecuador. Dirección de Análisis y Procesamiento de la Información. Quito, Ecuador. MAGAP. p. 8.
- Montes-de Godoy, M. E. (2019). Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (*Coffea arabica*) resistente a roya (*Hemileia vastatrix*). *Cultivos Tropicales*, 40(2).
- Montiel Frausto, L. B. (2017). Conservación *in vitro* de pitahaya (*Hylocereus* spp.) mediante cultivo de mínimo crecimiento. (Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca).
- Morales, J. (2016). Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de la semilla de *Solanum caripense* Dunal, para la obtención de plantas libres de bacterias y hongos. (Tesis. Ingeniero en biotecnología, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito).
- Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C. A. y Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *OmniaScience Monographs*.
- Niedz, R. P., y Bausher, M. G. (2002). Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. *in vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 38(5), 468-471.
- Ortiz-Gómez, N., Turiño-Peña, M., y Jiménez-Ferrer, L. (2017). Efecto de diferentes variantes para la desinfección en hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro*. *Café Cacao*, 16(1), 9-14.

- Perea Dallos, M, González, T, Campos Mosos, H, Guillot Monroy, G y Cogua Suárez, J. (2009). Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*: manual de prácticas de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia.
- Perea, M. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Editorial. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 95.
- Pereira, C. C., Souza, A. C. D., Rosa, S. D. V. F. D., Fantazzini, T. B., Stéphanho Filho, R., Ricaldoni, M. A., y Figueiredo, M. A. D. (8-11 de Octubre 2019). Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de café utilizando solução de ácido bórico. X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil
- Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., y Stahlman, P. W. (2016). 2, 4-D past, present, and future: a review. *Weed Technology*, 30(2), 303-345.
- Pincay Bajaña, V. J. (2017). Multiplicación *in vitro* de café caturra rojo Coffea arábica L. con la interacción de dos fitohormonas (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil).
- Ponce, L., Orellana, K., Acuña, I., Alfonso, J. y Fuentes, T. (2018). Situación de la caficultura ecuatoriana: perspectivas. *Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina*, 15 (1), 307-325.
- Puicón A, CA. 1997. Aplicación de técnicas *in vitro* en el mejoramiento genético del arroz (*Oryza sativa* L): Cultivo de anteras y embriones inmaduros. (Tesis Mag. Sc. Lima, PE, UNALM.) 115 p.
- Riviello-Cogco, E., Robledo-Paz, A., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Suárez-Espinosa, J., y Mascorro-Gallardo, J. O. (2021). Maduración y germinación de embriones somáticos de *coffea arabica* CV. COLOMBIA. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 44(2), 161-161.
- Rica, C. y Salvador, E. (2018). Las Variedades del Café Arábica. Recuperado de: <https://worldcoffeeresearch.org/work/coffee-varieties-mesoamerica-and-caribbean>.
- Romero Morales, M. A. (2004). Factores que controlan la germinación en semillas de palma dulce, *Brahea dulcis* (HBK) Mart. (Tesis, Estado de México, MX, Universidad Autónoma Chapingo).
- Rueda Chacón, N. (2019). Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas. (Monografía, Universidad de Santander, Bucaramanga).
- Sánchez Benítez, C. C. (2014). Efecto del bap y 2.4 d en el establecimiento in vitro de láminas foliares y segmento nodales de *moringa oleífera* Lam (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Sánchez, C. y Pliego, A. (2015). Embriogénesis Somática en Guayabo (*Psidium guajava* L.) (Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Maracaibo). Venezuela.
- Sánchez, K. (2018). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. (Tesis. Ingeniero agrónomo, Universidad Agraria la Molina). Lima-Perú.

- Sánchez, S. y Cabrera, R. C. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259-264.
- Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*, 2, 5-8.
- Sharry, S. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Suárez Padrón, I. (2020.). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Ed. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Townsend, G.R. y Heuberger, J.W. (1943). Métodos para estimar pérdidas causadas por enfermedades en experimentos con fungicidas. *The Plant Disease Reporter*, 27, 340-343.
- Viltres-Barbán, D., Pérez-Pérez, J. L., y Robles-Pastrana, J. (2021). Efecto de reguladores de crecimiento en la embriogénesis somática del híbrido de café Velazco-5. *Hombre, Ciencia y Tecnología*, 25(1), 84-91.

## **ANEXOS**



**Anexo 1:** Híbrido F1 Catimor ECU x Bourbon rojo



**Anexo 2.** Ensayo de desinfección de explantes foliares

**Foto 2.1.** Preparación de los explantes de hojas

**Foto 2.2.** Explantes sumergidos en NaCl 1%



**Anexo 3.** Siembra de explantes foliares para prueba de desinfección



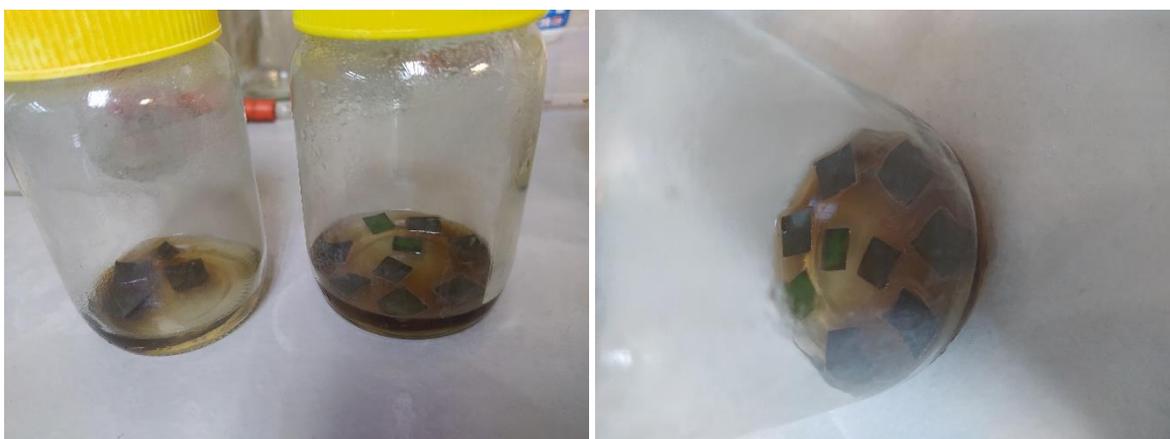
**Anexo 4.** Tratamientos de la prueba de desinfección



**Foto 5.1.** Explantes contaminados por hongo

**Anexo 5.** Explantes contaminados

**Foto 5.2.** Explantes contaminados por bacterias



**Anexo 6.** Explantes fenolizados



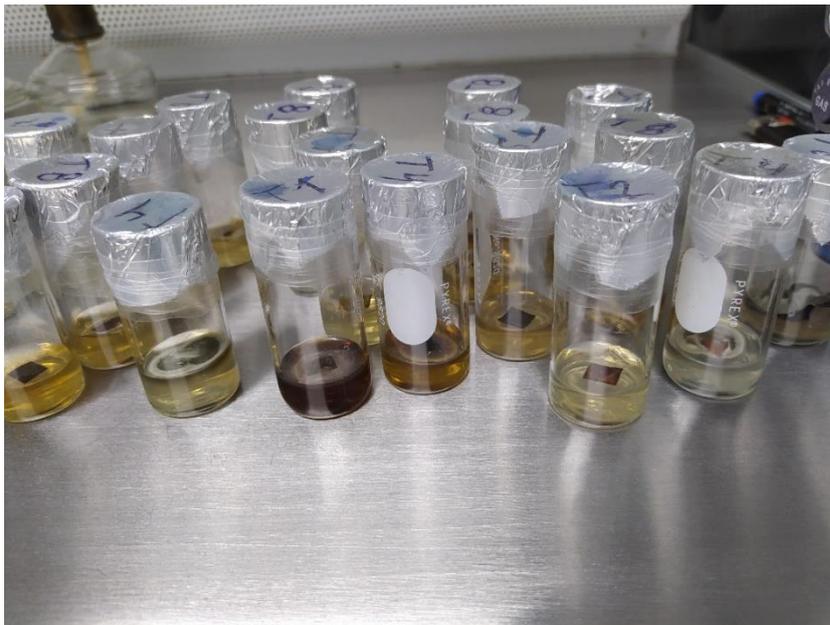
**Anexo 7.** Siembra de ensayo de explantes foliares



**Anexo 8.** Tratamientos del ensayo de explantes foliares



**Anexo 9.** Contaminación causada por hongos



**Anexo 10.** Pérdida total del ensayo, explantes contaminados y fenolizados



**Anexo 11.** Ensayo de explantes de embriones de semillas

**Foto 11.1.** Frutos recolectados

**Foto 11.2.** Limpieza de las semillas

**Foto 11.3.** Lavado con agua y jabón



**Anexo 12.** Desinfección con NaCl 1% x 10 min



Foto 13.1. Extracción del embrión



Foto 13.2. Siembra del embrión en frascos

**Anexo 13. Siembra de embriones**



**Anexo 14. Embriones germinados a los 10 días**



Foto 15.1. Explante contaminado por hongo



Foto 15.2. Explante contaminado por bacterias

**Anexo 15. Explantes contaminados**



**Anexo 16.** Plántulas formadas con sus dos pares de hojas.