



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

*FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES*

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO:

**“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS IN
VITRO PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS
A PARTIR DE TEJIDOS FOLIARES DE
CAFETO (*Coffea arabica* L.)”**

TESIS DE GRADO PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA AGRÓNOMA

RESPONSABLE:

Tania del Pilar Díaz Sigcho.

DIRECTOR:

Dr. Max Encalada Cordova

LOJA – ECUADOR
2019

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Dr. Max Encalada Córdova Mg. S.c.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO

Que el presente trabajo de investigación titulado “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS *IN VITRO* PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE TEJIDOS FOLIARES DE CAFETO (*Coffea arabica* L.)**”, de la autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica **Tania del Pilar Díaz Sigcho**, ha sido desarrollado y concluido dentro del cronograma aprobado y la planificación, metodología y requisitos exigidos por la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, por lo que autorizo su publicación y presentación a las instancias correspondientes.

Loja, 28 de agosto del 2017


.....
Dr. Max Encalada Córdova
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Una vez cumplida la reunión del tribunal de calificación del trabajo final tesis titulada **“PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS *IN VITRO* PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE TEJIDOS FOLIARES DE CAFETO (*Coffea arabica* L.)”**, de la autoría de la Señorita Tania del Pilar Díaz Sigcho, egresada de la carrera de Ingeniería Agronómica, se propuso algunas correcciones de forma, las mismas que han sido incluidas en el documento final.

En tal virtud nos permitimos certificar que el trabajo final consolidado de investigación está acorde a los requisitos de la carrera de Ingeniería Agronómica del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto se autoriza continuar con los trámites correspondientes.



.....
Ing. Simón Bolívar Peña Merino Mg.Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



.....
Dra. Mirian Capa Morocho Mg. Sc.

VOCAL



.....
Ing. Johnny Fernando Granja Mg. Sc

VOCAL

AUTORÍA

Yo, Tania del Pilar Díaz Sigcho, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autora: Tania del Pilar Díaz Sigcho

Firma: _____



Cédula: 1105375495

Fecha: Loja, 16 de enero de 2019

CARTA DE AUTORIZACIÓN

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, Tania del Pilar Díaz Sigcho, declaro ser la autora, de la tesis titulada “**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS *IN VITRO* PARA LA FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE TEJIDOS FOLIARES DE CAFETO (*Coffea arabica L.*)**”, como requisito para obtener el grado de: Ingeniera Agrónoma, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero. Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 16 días del mes de enero del 2019.

Firma:.....

Autora: Tania del Pilar Díaz Sigcho

Número de cédula: 1105375495

Dirección: Loja, Cantón Macara, Barrio “Centinela del sur”

Correo electrónico: tania.pilar@hotmail.com

Teléfono celular: 0968325793

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Dr. Max Encalada Córdova

Tribunal de Grado: Ing. Simón Bolívar Peña Merino Mg. Sc.

Dra. Mirian Capa Morocho Mg. Sc.

Ing. Johnny Fernando Granja Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todos quienes hicieron posible la culminación de la presente investigación:

A la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y a todos los docentes que compartieron sus valiosas experiencias y conocimientos para mi formación.

Al Dr. Max Encalada Córdova, director de tesis por su tiempo, guía, orientación, apoyo incondicional y asesoramiento en la realización exitosa de la presente investigación.

Al Ing. José Moreno Serrano, Mg. Sc., por su valioso apoyo y asesoramiento en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación; de manera especial a la Ing. Julia Minchala Patiño, Ing. Magali Yaguana Arévalo, por su apoyo desinteresado, por la dedicación de su tiempo, por haber compartido conmigo sus conocimientos, siempre les estaré muy agradecida.

A los señores miembros del tribunal: Ing. Simón Bolívar Peña Merino Mg. Sc., Dra. Mirian Capa Morocho Mg. Sc., Ing. Johnny Fernando Granja Mg. Sc.

Y finalmente, a mis compañeros y amigos de la Universidad, que durante cinco años de carrera supieron brindarme su apoyo y paciencia y con quienes tuve la dicha de compartir momentos inolvidables de aprendizaje.

DEDICATORIA

Este logro es una parte de mi vida, y el comienzo de otra etapa, por esto y más, la dedico a Dios que me cuida y me da fortaleza espiritual en los momentos difíciles.

A mis amados padres Francisco Díaz y Rosa Sigcho, por ser la razón principal de mi vida y brindarme su apoyo incondicional cada momento de mi vida; por sus valiosos consejos, valores y por su inmenso amor y comprensión.

A mis hermanos Luis y Jasson, quienes fueron la motivación principal de mi esfuerzo y sacrificio para cumplir la meta propuesta.

A mi esposo Jimmy que estuvo a mi lado desde el inicio de mi carrera, quien me brindó su amor y comprensión en cada momento y a mis hijas por ser la mejor compañía en todo momento y sobre todo por ser el pilar para mi superación.

¡Gracias a todos ustedes!

Tania del Pilar Díaz Sigcho.

INDICE GENERAL

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xviii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE CAFÉ	3
2.1.1. Origen	3
2.1.2. Clasificación taxonómica	3
2.1.3. Descripción botánica.	3
2.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA MICROPROPAGACION IN VITRO.	4
2.2.1. Micropropagación	4
2.2.2. Factores que intervienen en la micropropagación	4
2.3.3. Medio de cultivo	6
2.4. BIOTECNOLOGIA VEGETAL DEL CAFETO	9
2.4.1. Cultivo de tejidos.	9
2.4.2. Explante	10
2.4.3. Formación de callos	10
2.4.4. Medios de cultivo	10
2.4.5. Manejo de contaminación	11
2.4.6. Manejo de oxidación	11
III. METODOLOGÍA	12

3.1. Ubicación del Área de Estudio.....	12
3.1.1. Recolección de material en Campo.	12
3.1.2. Fase de Laboratorio.....	12
3.2. Metodología para la selección y recolección del material vegetal en campo.	13
3.3. Metodología para las fases de laboratorio	13
3.3.1. Primera fase para Evaluar la desinfección en explantes de café <i>Coffea arabica</i> L., aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión con hipoclorito de calcio.	13
3.3.1.1. Desinfección de explantes	14
3.3.1.2. Seccionado de los explantes.....	14
3.3.1.3. Preparación de medio de cultivo de implantación	14
3.3.1.4. Siembra de explantes.	15
3.3.1.5. Diseño experimental.....	15
3.3.1.6. Especificaciones del diseño experimental.	16
3.3.1.7. Croquis del diseño experimental.	16
3.3.1.8. Unidad experimental y variables de evaluación.....	17
3.3.1.9. Hipótesis del modelo.	17
3.3.1.10. Análisis estadístico de datos de desinfección <i>in vitro</i> de <i>Coffea arabica</i> L.	17
3.3.2. Segunda fase para Establecer el balance hormonal adecuado de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones para la inducción de callo embriogénico en explantes de café <i>Coffea arabica</i> L.....	18
3.3.2.1. Preparación del medio de cultivo para la formación de callos.	18
3.3.2.2. Siembra <i>in vitro</i> de explantes y condiciones de incubación.....	18
3.3.2.3. Diseño experimental para la fase de inducción a callos.....	19
3.3.2.4. Especificaciones del diseño experimental.	20
3.3.2.5. Unidad experimental y variables de evaluación.....	20
IV. RESULTADOS.....	22
4.1. Fase de desinfección <i>in vitro</i>, en explantes de <i>Coffea arabica</i> L.....	22
4.1.1. Porcentaje de contaminación promedio.	22

4.1.2. Porcentaje de contaminación según la dosis y días de evaluación.	23
4.2. Fase de formación de callos <i>in vitro</i> de explantes de <i>Coffea arabica</i> L., con la aplicación de auxinas (2,4 D) y citoquininas (BAP).	24
4.2.1. Porcentaje de formación de callo a los 30 días.	24
4.2.2. Número de días a la formación de callos.	24
4.2.3. Porcentaje apariencia de callo	25
4.3. Difusión de la información generada.	26
5.2. Fase de formación de callos <i>in vitro</i> de explantes de <i>Coffea arabica</i> L., con la aplicación de auxinas (2,4 D) y citoquininas (BAP).	28
VIII. BIBLIOGRAFÍA	32
IX. ANEXOS	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lugar donde se realizó la selección y recolección del material vegetal.	12
Figura 2. Esquema del experimento en el laboratorio mediante el diseño completamente al azar (DCA).	16
Figura 3. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Coffea arabica</i> L., para el ensayo de contaminación in vitro. Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	22
Figura 4. Porcentaje de contaminación de explantes de <i>Coffea arabica</i> L. para los diferentes momentos de evaluación dosis de desinfectante en el ensayo de contaminación in vitro. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	23
Figura 5. Efectos de la conjugación de auxina (2,4-D) y citoquinina (BAP), en la formación de callo en explantes de <i>Coffea arabica</i> L. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	24
Figura 6. Días a la formación de callos y porcentaje de encallamiento de explantes de <i>Coffea arabica</i> L., para el ensayo de encallamiento in vitro con interacción de auxinas y citoquininas.	25
Figura 7. Porcentaje de aparición de callo homogéneo y no homogéneo en explantes de <i>Coffea arabica</i> L., para el ensayo de formación de callos in vitro con la interacción de auxinas y citoquininas.	25
Figura 8. A: Selección de planta madre. B: Ramas de cafeto envueltas en papel periódico.	40
Figura 9. A: Lavado de las hojas d cafeto por el haz y el envez B: colocacion del hipoclorito de sodio en cada uno de los tratamientos. C: Aclareos con agua esteril mas antioxidantes.	40
Figura 10. A: Disolución del hipoclorito de calcio. B: Desinfección con hipoclorito de sodio en cada uno de los tratamientos.	40
Figura 11. A: Corte de bordes, zona basal, apical y nervadura central de la hoja. B: Seccionado de la hoja de café. C: Segmentos de aproximadamente 1 cm ²	41
Figura 12. A: Implantación de los segmentos de cafeto en el medio de cultivo. B: Identificación y colocación en el estante del cuarto de luces.	41
Figura 13. Preparación del medio de cultivo MS., adicionado la interacción hormonal auxinas – citoquininas.	41

Figura 14.	A: Traspaso de cada uno de los explantes. B: Explante en medio de cultivo con hormonas. C: Colocación de los tratamientos en el cuarto de luces.	42
Figura 15.	A: Contaminación de explante por ataque de hongos. B: Contaminación en explante por ataque de bacterias.	42
Figura 16.	A: Callos homogéneos obtenidos. B: Formación de callos no homogéneos	42
Figura 17.	A Y B. Difusión de Resultados de Tesis a estudiantes del Séptimo Ciclo de la Carrera de Ingeniería Agronómica.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Interacción de hipoclorito de calcio – tiempo de inmersión en la fase de desinfección de explantes de Coffea arabica L.....	14
Cuadro 2. Descripción de los diferentes tratamientos para la desinfección de hojas de Coffea arabica L.	15
Cuadro 3. Hoja de registro para evaluar: porcentaje de contaminación en la siembra in vitro de explantes de Coffea arabica L.	17
Cuadro 4. Tratamientos para evaluar la interacción de auxinas – citoquininas en la formación de callos, a partir de segmentos de Coffea arabica L.	19
Cuadro 7. Hoja de registro para evaluar las variables: porcentaje de formación, apariencia y color de callos in vitro de explantes de Coffea arabica L.	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de contaminación para el ensayo de Desinfección de explantes in vitro de Coffea arabica L.	35
Anexo 2. Análisis estadístico para el porcentaje de contaminación de explantes de Coffea arabica L, ensayo de desinfección.	36
Anexo 3. Análisis estadístico para el porcentaje de contaminación y concentración de hipoclorito de calcio y días evaluados en los explantes de Coffea arabica L.	36
Anexo 4. Tabla de toma de datos para el ensayo del balance hormonal de auxinas y citoquininas para la formación de callos, de explantes de Coffea arabica L.	38
Anexo 5. Tabla de datos para el análisis estadísticos del ensayo de balance hormonal de auxinas y citoquininas para la formación de callos, de explantes de Coffea arabica L.	39
Anexo 6. Análisis estadístico para el porcentaje de formación de callos en explantes de Coffea arabica L, ensayo de balance hormonal de auxinas y citoquininas.	39
Anexo 7. Recolección del material en el campo.	40
Anexo 8. Lavado y aclareos de las hojas de cafeto.	40
Anexo 9. Desinfección de hojas de cafeto	40
Anexo 10. Seccionado de explantes	41
Anexo 11. Siembra de explantes	41
Anexo 12. Preparación de medio de cultivo.	41
Anexo 13. Siembra in vitro de explantes.	42
Anexo 14. Explantes contaminados.	42
Anexo 15. Resultados obtenidos de encallamiento.	42
anexo 16. Difusión de los Resultados de la Investigación a los Actores Involucrados, Estudiantes del Séptimo Ciclo de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional de Loja.	43
Anexo 17. Tríptico divulgativo del presente trabajo de Investigación.....	44

**PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS *IN VITRO* PARA LA
FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE TEJIDOS FOLIARES
DE CAFETO (*Coffea arabica* L.)**

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló en el campo y una fase de laboratorio dentro el período comprendido entre mayo 2015 enero 2016. En el campo se realizó la recolección del material vegetal en un sector cafetalero de la parroquia Nambacola perteneciente al cantón Gonzanamá de la provincia Loja.

En el laboratorio de micropropagación vegetal se llevó a cabo dos fases de laboratorio las cuales comprendieron la desinfección del material vegetal traído del campo y la segunda fase en la aplicación de auxinas y citoquininas para la formación de callos.

Para la primera fase de desinfección se aplicó hipoclorito de calcio en tres concentraciones (15, 20 y 25 %) y en dos tiempos de inmersión (10 y 20 min), estableciendo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3x2, con seis tratamientos y tres repeticiones evaluando la contaminación de los explantes.

El análisis mostró interacción entre el hipoclorito de calcio y el tiempo de inmersión, obteniendo el tratamiento con menor porcentaje de contaminación el T5 (25 % Ca (ClO)₂ + 10 min) con valor de 37,62 % con diferencias significativas frente al T2 (15 % Ca (ClO)₂ + 20 min) y T4 (20 % Ca (ClO)₂ + 20 min), que presentaron una contaminación de 86,19 %; 74,76 % respectivamente. Destacando que los tratamientos T1, T3, Y T6 no mostraron diferencias significativas de porcentaje de contaminación.

En la segunda fase para a la formación de callos *in vitro* de explantes, se utilizó la mezcla de dos hormonas de crecimiento, la auxina: 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4 - D) en concentraciones de 1,0; 3,0; 3,0 y 6,0 ppm y una citoquinina: benziladenina (BAP), en tres concentraciones 3,0; 10,0; 0,0 y 0,0 ppm respectivamente, para lo cual se estableció un diseño completamente al azar, donde se evaluó la formación de callo en explantes de *Coffea arabica* L.

El tratamiento con mayor porcentaje de callo fue el T1 (1,0 ppm 2,4-D +3,0 ppm BAP), el cual se lo obtuvo mediante el análisis de varianza (ANOVA) que determino que los tratamientos presentaron alta variabilidad entre ellos. De la misma manera la prueba de Tukey, mostró diferencias significativas entre tratamientos con una $p = < 0,05$. Cabe destacar que los tratamientos sin citoquininas (BAP) no presentaron formación de callo.

Según los días evaluados la aparición de encallamiento se evidenció al veintavo día de evaluación para los tratamientos T1 y T2 con porcentajes del 60 y 20 % respectivamente, mientras que los T3 y T4 no presentaron ningún valor para este indicador. El encallamiento se estabilizó a los 30 días de evaluación en los T1 y T2 llegando a alcanzar valores de 73,33 y 26,67 % respectivamente, por otro lado los tratamientos T3 y T4 no se presentaron formación de callos.

Los callos obtenidos mostraron formación homogénea y no homogénea, tomando en cuenta solo los explantes que formaron callos presentando porcentajes en el T1 (1,0 ppm 2,4-D +3,0 ppm BAP) valores de 66,7 y 33,33 de callo homogéneo y no homogéneo respectivamente, frente al T2 (3,0 ppm 2,4-D +10,0 ppm BAP) que presentó un 100 % de callo no homogéneo.

En el presente trabajo de investigación se generaron protocolos de desinfección y propagación *in vitro* en la especie *Coffea arabica* L., para contribuir con estudios para futuras investigaciones *in vitro* en la propagación de cafeto.

Palabras clave: *Coffea arabica* L., *in vitro*, propagación.

SUMMARY

This research study included both field and laboratory work during the period between May 2015 and January 2016. The field work entailed the gathering of vegetal material from a coffee sector of the Nambacola parish, which is part of the canton of Gonzanamá in the province of Loja. In a Plant Micropropagation Laboratory, two study phases were carried out, which included the disinfection of the plant material brought from the field as well as the application of auxins and cytokinins for the formation of calluses.

In the first lab phase of disinfection, three concentrations of calcium hypochlorite were applied (15, 20 and 25%) in two immersion times (10 and 20 min), which produced a completely random design with a factorial arrangement of 3x2, six treatments, and three repetitions that evaluated the contamination of the explants.

The analysis displayed an interaction between calcium hypochlorite and the immersion time, this determined that the treatment with the lowest percentage of contamination was T5 (25% Ca (ClO) 2 + 10 min) with a value of 37.62% with significant differences compared to T2 (15% Ca (ClO) 2 + 20 min) and T4 (20% Ca (ClO) 2 + 20 min), which showed a contamination of 86.19% and 74.76% respectively. T1, T3, and T6 treatments did not show significant differences in percentage of contamination.

In the second lab phase, which was about *in vitro* callus formation of explants, a mixture of two growth hormones was used, namely, auxin: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in concentrations of 1.0; 3.0; 3.0 and 6.0 ppm and a cytokinin: benziladenine (BAP) in three concentrations of 3.0; 10.0; 0.0 and 0.0 ppm ppm respectively. Also, a completely randomized design was established, where callus formation was evaluated in explants of *Coffea arabica* L.

The treatment with the highest percentage of callus was T1 (1.0 ppm 2,4-D +3.0 ppm BAP), which was obtained through the analysis of variance (ANOVA) that determined that the treatments they presented high variability among them. In the same way the Tukey test showed significant differences between treatments with a $p = <0.05$. It should be noted that treatments without cytokinins (BAP) did not present callus formation.

According to the days evaluated, the appearance of stranding was evident on the twentieth day of evaluation for treatments T1 and T2 with percentages of 60 and 20% respectively, while T3 and T4 did not present any value for this indicator. Stranding was stabilized at 30 days of evaluation in T1 and T2 reaching values of 73.33 and 26.67% respectively, on the other hand treatments T3 and T4 did not present callus formation.

The calluses obtained showed homogenous as well as an inhomogeneous formation. For instance, the explants that formed calluses in T1 (1.0 ppm 2,4-D +3.0 ppm BAP) presented percentage values of 66.7 and 33.33 of homogenous and inhomogeneous callus respectively when comparing to T2 (3.0 ppm 2,4-D +10.0 ppm BAP) which presented a 100% non-homogeneous callus.

In the present research work, disinfection and *in vitro* propagation protocols were generated in the *Coffea arabica* L. species, to contribute toward future *in vitro* studies for the of coffee trees.

Keywords: Coffea arabica L., in vitro, spread.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de café se encuentra dentro de las principales actividades agrícolas que se realiza en el Ecuador, debido a su importancia económica y social en la generación de divisas y empleo. Se encuentra entre los diez cultivos con mayor superficie, además, es sembrado en 21 provincias del país, ya que sus semillas, tostadas, molidas y en infusión, constituyen la bebida no alcohólica más consumida actualmente (Intelectual, 2014).

El cafeto, como todo organismo vivo, mantiene relaciones con el medio que lo rodea; este medio ambiente está formado por las condiciones físicas, químicas y topográficas del suelo, factores y elementos climáticos como la temperatura y la humedad, entre otros. Un entorno propicio permite la manifestación del máximo potencial del cafeto; por el contrario, si alguno de los factores del medio ambiente no es el requerido, puede ser una limitante para el crecimiento y desarrollo, por lo que su explotación económica se ve seriamente afectada, como es el caso en nuestra provincia de Loja (FAO, 2011).

A diferencia de las técnicas de propagación tradicional, las de cultivo de tejidos permiten la micropropagación clonal de un determinado genotipo vegetal en un tiempo relativamente corto, útil en programas de mejoramiento genético convencional o por transformación genética. Estas técnicas también son poderosas herramientas para el estudio fisiológico, de crecimiento y desarrollo, morfogénesis, criopreservación, producción de semillas artificiales, producción industrial de diferentes compuestos químicos, preservación del germoplasma de genotipos elite o la producción de metabolitos secundarios (Fernández, 2010).

En el cafeto, la regeneración *in vitro* por embriogénesis ha sido descrita por varios investigadores: Dublin (1981), Pierson *et al.* (1983), Yasuda *et al.* (1985), Hatanaka *et al.* (1991) y Fuentes-Cerda *et al.* (2001). Estos estudios evidenciaron la capacidad de esta especie para llevar a cabo embriogénesis y para el desarrollo de plántulas a partir de segmentos de hojas; por lo tanto, esta técnica representa una alternativa interesante y económica para la multiplicación de plantas seleccionadas (Arias, 2002).

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), esta investigación se basará en utilizar las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales,

para así eliminar en una mínima parte la contaminación de explantes, con el propósito de obtener callos de cafeto, a base de un medio de cultivo enriquecido con reguladores de crecimiento como son las auxinas y citoquininas.

Bajo este contexto, la presente investigación tuvo como resultado la obtención de un protocolo para la formación de callos de cafeto, aportando así con técnicas que en un futuro ayudarán a la obtención de plántulas de cafeto a partir de segmentos de hojas.

Los objetivos que orientaron la presente investigación fueron los siguientes:

Objetivo General

- Contribuir al establecimiento de la metodología para la fase de desinfección e inducción de callo embriogénico *in vitro* de cafeto (*Coffea arabica* L.).

Objetivos Específicos

- Evaluar la desinfección en explantes de cafeto (*Coffea arabica* L.), aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión.
- Establecer el balance hormonal adecuado de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones para la inducción de callo embriogénico en explantes de cafeto (*Coffea arabica* L.).
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la carrera de ingeniería agronómica.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE CAFÉ

2.1.1. Origen

El cafeto es originario de África tropical. Países como Etiopía, Sudán, Kenia, Guinea o Mozambique, se señalan habitualmente como posibles centros de origen, aunque el más aceptado es Etiopia (Arvy, Gallouin y Ulbillos, 2007). Por otro lado León (2000) argumenta que *Coffea arábica* L. crece espontáneamente en las montañas de Etiopia y áreas vecinas de Sudán, sobre los 1 500 m.s.n.m, cuyo centro de mayor diversidad está en África Occidental. No hay mucha evidencia citogenética sobre su origen.

2.1.2. Clasificación taxonómica

Según Alvear (2014) el cafeto tiene la siguiente clasificación taxonómica.

Reino-----Plantae
Tipo-----Espermatofitas
Sub-tipo-----Angiospermas
Clase-----Magnoliósida
Sub-clase-----Gamopétalas inferiovariadas
Orden----- Rubiales
Familia-----Rubiáceas
Género -----Coffea
Sub-género-----Eucoffea
Especies ----- arábica, canephora, liberica

2.1.3. Descripción botánica.

Coffea arábica L. se trata de un arbusto grande, de unos 5 metros de altura, con hojas ovaladas y de color verde oscuro brillante. La floración se produce después del período de lluvias, y sus flores son blancas, de aroma dulce y están dispuestas en racimo. Los frutos, verdes y ovalados, se vuelven rojos cuando maduran, al cabo de 7-9 meses. Cada fruto contiene habitualmente dos semillas de aspecto chato y aplanado (los granos de café). *Coffea arábica* L., se cultiva en toda Latinoamérica, en África Central y Oriental, en la India y en Indonesia. Sus variedades más conocidas son típica y 'bourbon', pero a partir de éstas se han desarrollado nuevas cepas y cultivares diferentes, como “Caturra”,

“Mundo Novo”, “Tico”, “San Ramón”, “Moca”, “Maragogipe”, “Columnaris” o “Blue Mountain (Small, 2009; Waller y Bigger, 2007).

2.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA MICROPROPAGACION IN VITRO.

2.2.1. Micropropagación

Es la técnica que permite el desarrollo masivo de nuevas plantas en medios artificiales, bajo condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas (embriones, segmentos, tallos, etc.). Por otra parte, es el resultado de la proliferación de brotes, que son multiplicados en condiciones asépticas y elementos químicos para su desarrollo ideal (Hartman y Kester, 2002).

2.2.2. Factores que intervienen en la micropropagación

El éxito de establecer cultivos viables, está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante (Olmos, Luciani y Galdeano, 2004).

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión.

Los cultivos se mantienen bajo las mismas condiciones físicas y fisicoquímicas usadas para la inducción de callos. Los cultivos de órganos se puede rediferenciar hasta plantas completas (micropropagación) que luego se transfieren a invernadero (Calva y Pérez, 2005).

2.3. Factores para la micropropagación.

2.3.1. Factores externos

a) Planta donante

La selección de la planta donante es fundamental en la reproducción clonal; la planta “plus” o “élite” debe ser rigurosamente seleccionada, pues es determinante en el éxito del cultivo de células. Con un material cuidadosamente seleccionado cada especie conserva su homogeneidad y permite mantener el paso de las generaciones (Ortega, 1992).

b) Edad de la planta

Los tejidos embrionarios generalmente tienen una alta capacidad regenerativa, conforme una planta envejece su capacidad regenerativa tiende a disminuir, por lo que se tiende a utilizar material procedente de plantas jóvenes. Los vástagos se regeneran más fácilmente cuando se toman de la parte basal de un árbol, debido a que esta zona posee el carácter juvenil (Pierik, 1990).

c) Estado fisiológico

Este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. En general los fragmentos de plantas de estado vegetativo regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo, aunque se puede encontrar algunas excepciones (Ortega, 1992).

d) Estado sanitario

Existe más probabilidad de éxito en un cultivo *in vitro*, si la planta tiene un buen estado de salud en el momento del aislamiento. Si se debe elegir entre individuos de un mismo clon, se deben escoger los más sanos como material experimental, ya que esto repercute sobre el porcentaje de infección después del aislamiento, (Ortega, 1992).

2.3.2. Factores ambientales de incubación

a) Luz

El comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperiodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz. La mayoría de los cultivos se desarrollan a una intensidad luminosa entre 5 a 25 W/m² (1000 a 5000 lux). Si bien la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas, en general se utiliza luz blanca (Ramos, 2012).

b) Temperatura

La temperatura se mantiene constante de 24 a 26°C, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja 18 °C para especies bulbosas, o una temperatura más alta de 28-29 °C para especies tropicales (Pierik, 1990).

c) Humedad

Se sabe que la humedad dentro de los cultivos es alta por la condensación de las paredes de los tubos de ensayo; la humedad del aire del área de incubación solo influiría en la pérdida de agua de los tubos (Pierik, 1990). En cambio (Roca y Mronginski, 1991) señalan que la humedad dentro del área de incubación puede ser de 70 - 80%.

d) Oxígeno

Para el buen crecimiento de células y tejidos, la buena aireación es un factor importante, por esta razón es frecuente el uso de aparatos y agitadores. El suministro de oxígeno no se puede facilitar suministrando tapones metálicos, realizando inoculaciones apolares, utilizando medios líquidos, o, inocular sobre puentes de papel, bajo estas condiciones el explante obtiene el oxígeno de las moléculas que se encuentran en el agua del medio de cultivo. (Díaz, 2012).

2.3.3. Medio de cultivo.

Con el medio de cultivo se logra abastecer de nutrimentos al tejido, células u órganos que se desarrollan en él; esta alimentación exógena que requiere el explante es necesaria por el hecho de que las células son heterótrofas.

Un medio de cultivo básicamente está compuesto por carbono, nutrimentos minerales y vitaminas; sin embargo, en la mayoría de los casos los tres tipos de sustancias que anotamos antes, no son suficientes para el buen desarrollo del cultivo, por lo que se hace necesario, completar los medios con regulaciones de crecimiento (auxinas y citoquininas) y otros compuestos como aminoácidos, precursores de aminoácidos, antioxidantes, carbón activado (Roca y Mronginski, 1991).

a) Macronutrientes

Los macronutrientes están compuestos de las sales minerales del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), los que incluyen las siguientes sales: nitrato de amonio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, fosfato ácido de potasio y cloruro de calcio; sin embargo, es posible utilizar otras formulaciones como por ejemplo los macronutrientes del medio de cultivo B5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968) e incluso modificaciones de las sales minerales MS, tales como macronutrientes MS/2, MS/5 y MS/10.

b) Micronutrientes

Están compuestos de las sales minerales del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), las que incluyen las siguientes sales: sulfato de manganeso, sulfato de zinc, ácido bórico, ioduro de potasio, molibdato de sodio, sulfato de cobre, cloruro de cobalto, etilendiaminotetracético de sodio y sulfato de hierro; sin embargo, es posible utilizar otras formulaciones como por ejemplo los micronutrientes del medio de cultivo B5 (Gamborg, Miller y Ojima, 1968).

c) Carbono

Como fuente de carbono en los medios de cultivo se utiliza normalmente sacarosa, constituyendo un componente esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, en concentraciones que van desde 1 a 5%; también se puede usar glucosa y en menos medida fructuosa, dependiendo mucho del tipo del material vegetal (Pierik, 1990).

d) Reguladores de crecimiento

En el cultivo de tejidos, los reguladores de crecimiento son muy importantes, especialmente las auxinas y las citoquininas. Si a un medio de cultivo se le debe añadir una auxina o una citoquinina para conseguir la extensión y/o división celular depende

del tipo de explante y de la especie vegetal. En las plantas que producen mayor cantidad de auxinas y/o citoquininas no necesitan de ninguna aplicación exógena; desde este punto se puede hacer la siguiente división: cultivos que no necesitan ni auxinas ni citoquininas, cultivos que necesitan solo auxinas, cultivos que necesitan solo citoquininas (Lima, 2016).

- **Las auxinas.** Son un grupo de fitohormonas que tienen la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular, y al mismo tiempo, promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Además promueven la dominancia apical o inhibición del desarrollo de las yemas laterales por la yema apical (Ramos, 2012). Las auxinas más utilizadas son: el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), 2,4-D y 2, 4,5-T. De estas auxinas la que presenta mayor actividad en la formación de órganos es la AIA, pero es la más inestable frente a factores del medio como luz y temperatura (Murashige y Skoog 1962) y (Davies, 2008).

El ácido indolacético (AIA) además de presentar la ventaja de ser natural, es el único que posee el menor efecto inhibitorio en la formación del tallo. Por otro lado el ácido naftalenacético (ANA) es una auxina fuerte, muy estable y se utiliza especialmente para promover la rizogénesis, Margara (1998), en un estudio hecho en rosas, concluyó que la auxina, en combinación con la citoquinina BAP, que presenta mejores porcentajes de establecimiento y enraizamiento es el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.0 a 0.5 mg/L, en comparación con AIA y AIB.

- **Las citoquininas.-** Se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo, inducen la formación de vástagos adventicios; sin embargo, inhibe la formación de raíces, promueven la formación de vástagos axilares, además, promueve procesos de morfogénesis, la expansión foliar, y el desarrollo de los cloroplastos, mejorando el desarrollo vegetativo (Davies, 2008).
- **Ácido Abscísico (ABA).-** Su efecto principal no es la abscisión directa de órganos, sino que su contenido específico puede controlar/ disminuir los niveles endógenos de promotores. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en

cultivo *in vitro* para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citoquininas (Rosales, 2004).

e) Vitaminas

Pierik (1990) y Calva & Pérez (2005) menciona que la mayor parte de las plantas son capaces de sintetizar *in vitro* sus propias vitaminas, por lo que surge la duda de adicionar a los medios de cultivo mezclas de vitaminas. Roca y Mroginski (1991), señalan que probablemente solo se necesitan la inoculación de tiamina (vitamina B1) ya que se la considera una vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.

f) Agente Gelificante

El más utilizado es el agar, un derivado de alga marina, polisacárido, con elevada masa molecular, no contiene materiales tóxicos y resulta ser el componente más caro de los medios nutritivos sólidos. El agar disuelto forma un gel capaz de retener el agua y absorbe compuestos, la concentración usual del agar es de 0,6 a 0,8% (Pierik, 1990).

2.4. BIOTECNOLOGIA VEGETAL DEL CAFETO

2.4.1. Cultivo de tejidos.

A diferencia de las técnicas de propagación tradicional, las de cultivo de tejidos permiten la micropropagación clonal de un determinado genotipo vegetal en un tiempo relativamente corto, útil en programas de mejoramiento genético convencional o por transformación genética. Estas técnicas también son poderosas herramientas para el estudio fisiológicos, de crecimiento y desarrollo, morfogénesis, criopreservación, producción de semillas artificiales, producción industrial de diferentes compuestos químicos, preservación del germoplasma de genotipos élite o la producción de metabolitos secundarios (Fernández, 2010).

Arias (2002), Menciona que el cultivo de tejidos es el conjunto de técnicas que permiten cultivar un explante con potencial de diferenciación en un medio de cultivo de composición química definida, bajo condiciones de asepsia y bajo condiciones ambientales controladas.

2.4.2. Explante

El concepto de explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces, pétalos, etc.), un órgano (semillas, anteras, ovarios, botones florales, hojas y raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos) (Narváez, 2009).

Según Suarez (2011) el manejo de los explante se tiene que realizar de la siguiente forma:

- Preparación del explante: una vez seleccionada la planta y la parte de la planta que dará origen al material, se limpia y lava cuidadosamente, luego se elimina parte del tejido externo y posteriormente se procede a la desinfección superficial.
- Escisión del explante: se debe hacer todo dentro de la cámara de flujo y con todo el material esterilizado; después que el tejido esté lavado se puede colocar unos segundos sobre un papel filtro para que se seque un poco, luego se procede al aislamiento del explante que deseamos cultivar (embrión, meristemo, etc.) y lo introducimos en el medio destinado para su desarrollo en esta etapa.

2.4.3. Formación de callos

El callo se forma por proliferación de células en la zona de corte del explante, desarrollándose en la zona periférica de las células del parénquima esponjoso, o del mesófilo esponjoso. Es importante destacar que el rendimiento del proceso regenerativo estará influenciado por el genotipo y que el origen de los embriones en café es unicelular. El callo puede ser de dos tipos: embriogénico y no embriogénico. El primero es friable y de color amarillo, y el segundo puede ser de color blanco o marrón (Fernández, 2010).

2.4.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas, que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos los cuales proporcionan al cultivo in vitro una dieta balanceada de nutrientes y hormonas, para mantener su viabilidad, estimular su diferenciación y regular su crecimiento (Landaverde, 2002).

Se han creado numerosos medios de cultivo cuyas diferencias estriban en las cantidades y tipos de sales empleadas. Entre los más conocidos se encuentran: Murashige y Skoog (MS) (1962); Linsmaier y Skoog (LS) (1965); Borgin y Nitsch (BN) (1967); Gamborg (B5) (1970); White (1963), Miller y Oyima (1968). Los componentes de los medios de cultivo han sido objeto de estudios extensivos. Generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y micro elementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento (Amaya, 2012).

2.4.5. Manejo de contaminación

El éxito de los sistemas de micropropagación de plantas depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana. Teniendo que a pesar de una adecuada esterilización química del material vegetal se pueden producir infecciones. Estas infecciones se dan por infecciones internas del material a reproducir, por una mala asepsia en el laboratorio o por parte del operador. (Pierik, 1990).

La utilización de materiales vegetales provenientes del campo limita el éxito de la técnica de embriogénesis somática, debido a la alta contaminación por hongos y bacterias, aunque dicha contaminación es muy variable en el transcurso del año (Ramírez, 2000).

En la micropropagación de café existen varios procedimientos de desinfección que se utilizan. Para cada clima de donde se extrae el material a reproducir, y para cada tipo de explante existe un protocolo específico de desinfección. Este protocolo varía en cuanto al tipo y la concentración del agente desinfectante y el tiempo de exposición del explante a la solución desinfectante (Fernández, 2010).

2.4.6. Manejo de oxidación

Según Pierik (1990) y Ramírez (2000), la oxidación es otro factor que afecta la producción de plantas a través de micropropagación. Esta se origina a partir de compuestos polifenólicos, los que traen como consecuencia el oscurecimiento del medio; se puede reducir evitando el uso de explantes con altos compuestos polifenólicos, inhibiendo la acción de las polifenoloxidasas, disminuyendo el contenido de oxígeno y haciendo varios subcultivos.

III. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación del Área de Estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en dos fases: campo y laboratorio

3.1.1. Recolección de material en Campo.

3.1.1.1. Ubicación política.

La fase de campo se realizó en la provincia de Loja, cantón Gonzanamá, parroquia Nambacola, en donde se seleccionó y recolectó el material vegetal.

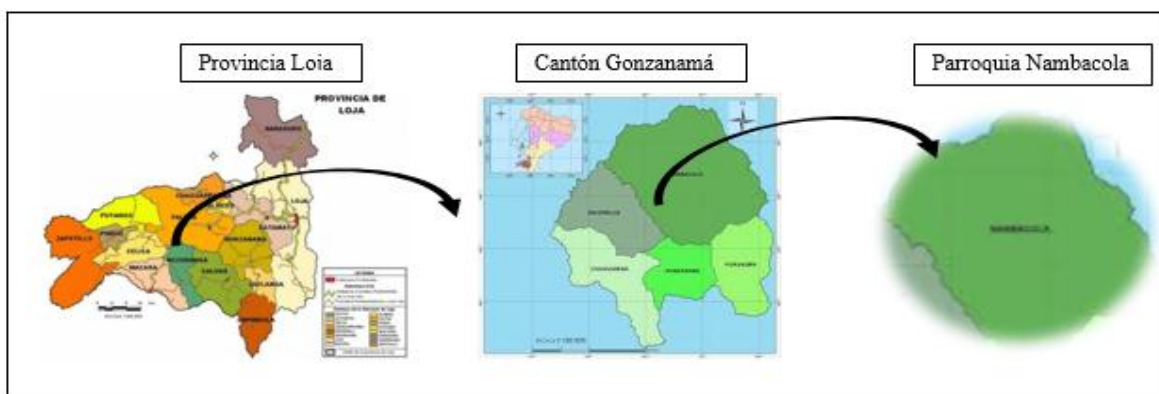


Figura 1. Lugar donde se realizó la selección y recolección del material vegetal.

3.1.1.2. Ubicación geográfica

- Latitud: 4°11'3" Sur
- Longitud: 79°32'40" Oeste.
- Altitud: 1.820 m.s.n.m.

3.1.2. Fase de Laboratorio

La fase de Laboratorio que se desarrollo en dos etapas en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, ubicado a 3 km de la ciudad de Loja.

3.1.2.1. Ubicación Geográfica

- Latitud: 04° 00'00" Sur.
- Longitud: 79° 12'00" O
- Altitud: 2135 msnm.

3.1.2.2. Ubicación Ecológica

- Temperatura media: 15.3°C anual
- Humedad relativa: 71.96 %
- Precipitación: 757.7 mm
- Zona de vida: Bosque seco-Montano bajo (bs-MB) (Guerrero y Ramírez, 2002)

3.2. Metodología para la selección y recolección del material vegetal en campo.

El material vegetal se obtuvo de plantaciones de 4 años, proporcionado por el señor Gonzalo Chamba de su finca dedicada a la producción de café variedad caturra.

La planta madre fue seleccionada aquella que contó con las mejores características como su color, vigor y limpieza, de esta se tomaron de 3 a 4 ramas plagiotrópicas de la zona media y superior de la planta por ofrecer menos índices de contaminación y por ser hojas apicales en pleno funcionamiento.

El material recolectado fue envuelto en papel periódico húmedo y colocado en fundas plásticas, se pusieron en un cooler para mantener la humedad y evitar daños. Posteriormente se trasladó al laboratorio de Micropropagación Vegetal (Anexo 7).

3.3. Metodología para las fases de laboratorio

Las fases de laboratorio comprenden el primero y segundo objetivo, en los cuales se realizó la desinfección del material vegetal, su seccionado, siembra y la aplicación de auxinas y citoquininas para la formación de callos en explantes de café.

3.3.1. Primera fase para Evaluar la desinfección en explantes de café *Coffea arabica* L., aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión con hipoclorito de calcio.

El objetivo de esta fase fue evaluar el efecto del hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ como desinfectante; en concentración de 15 %, 20 % y 25 % de hipoclorito de calcio, en dos tiempos de inmersión 10 y 20 minutos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Interacción de hipoclorito de calcio – tiempo de inmersión en la fase de desinfección de explantes de *Coffea arabica* L.

FACTORES	NIVELES
Porcentaje de Concentración de hipoclorito de calcio	1. 15 %
	2. 20 %
	3. 25 %
Tiempo de inmersión (min)	1. 10 min
	2. 20 min

3.3.1.1.Desinfección de explantes

Una vez en el laboratorio, las hojas de cafeto se lavaron el haz y el envez con jabón líquido más detergente y agua corriente de 2 a 3 veces durante 20 minutos, luego se enjuagaran con abundante agua destilada. Posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 20 % por 15 minutos, transcurrido el tiempo se realizaron aclareos con agua destilada estéril más antioxidantes (100 mg/l de ácido ascórbico + 150 mg/l de ácido cítrico) (Anexo 8).

La desinfección de las hojas de cafeto para cumplir con el primer objetivo, se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, experimentando distintos tratamientos, aplicados en distintas muestras para cada uno de ellos, los cuales varían de acuerdo a los tiempos de exposición (10 y 20 minutos) y concentración de hipoclorito de calcio (15, 20 y 25 %) respectivamente (Anexo 9).

3.3.1.2.Seccionado de los explantes.

Luego de la desinfección del material vegetal se procedió al seccionado, para ello y con el auxilio de pinzas y tijeras se eliminaron los bordes, la zona basal, apical y la nervadura central. La zona restante se dividió en segmentos de 1 cm² aproximadamente, los explantes fueron colocados sobre la superficie del medio (Murashige y Skoog, 1962) de cultivo inmediatamente después del corte de cada hoja (Anexo 10).

3.3.1.3.Preparación de medio de cultivo de implantación

Se preparó el medio de cultivo a la mitad de sus sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina, glicina) y 10 mg/l de tiamina y 100 mg/l de m-inositol, sacarosa 30 gr/l como fuente de

carbohidratos, agar 6 gr/l como agente gelificante, cisteína 25 mg/l, ergostin 1 ml/l, ácido cítrico 150 ml/l, ácido ascórbico 100 mg/l y carbón activado 1 gr/l.

Se incorporó el agar al medio de cultivo; se utilizó el microondas para diluirlo y se distribuyó 30 ml de medio de cultivo por cada frasco; para ser esterilizados en autoclave a 120 °C de temperatura y 1.5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos.

3.3.1.4.Siembra de explantes.

La siembra *in vitro* de los segmentos de hojas de cafeto se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones de total asepsia, se utilizó cajas petri, bisturí, pinzas, las cuales fueron previamente esterilizadas se realizó la siembra a razón de tres segmentos de hoja de cafeto por cada frasco (Anexo 11).

Posteriormente, se identificó cada uno de los tratamientos fueron trasladados al cuarto de incubación, donde se mantuvieron a una temperatura de ± 23 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

3.3.1.5.Diseño experimental.

Se utilizó un diseño complementa al azar (DCA), con un arreglo factorial de 3 x 2, con 6 tratamientos y 3 repeticiones.

FACTORES	NIVELES
Porcentaje de Concentración de hipoclorito de calcio	15 % (D1)
	20 % (D2)
	25 % (D3)
Tiempo de inmersión (min)	10 min (M1)
	20 min (M2)

En el cuadro 2 se muestran los tratamientos aplicados en la desinfección de hojas de *Coffea arabica* L.

Cuadro 2. Descripción de los diferentes tratamientos para la desinfección de hojas de *Coffea arabica* L.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	15 % de hipoclorito de calcio + 10 min de inmersión	T1 = D1M1
2	15 % de hipoclorito de calcio + 20 min de inmersión	T2 = D1M2
3	20 % de hipoclorito de calcio + 10 min de inmersión	T3= D2M1

4	20 % de hipoclorito de calcio + 20 min de inmersión	T4 = D2M2
5	25 % de hipoclorito de calcio + 10 min de inmersión	T5 = D3M1
6	25 % de hipoclorito de calcio + 20 min de inmersión	T6 = D3M2

3.3.1.6. Especificaciones del diseño experimental.

Unidad experimental (conjunto de frascos)	10
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número de total de frascos por tratamiento	30
Número total de unidades experimentales del ensayo	18
Número total de frascos para el ensayo	180
Número de segmentos por unidad experimental	30
Número total de segmentos	540

3.3.1.7. Croquis del diseño experimental.

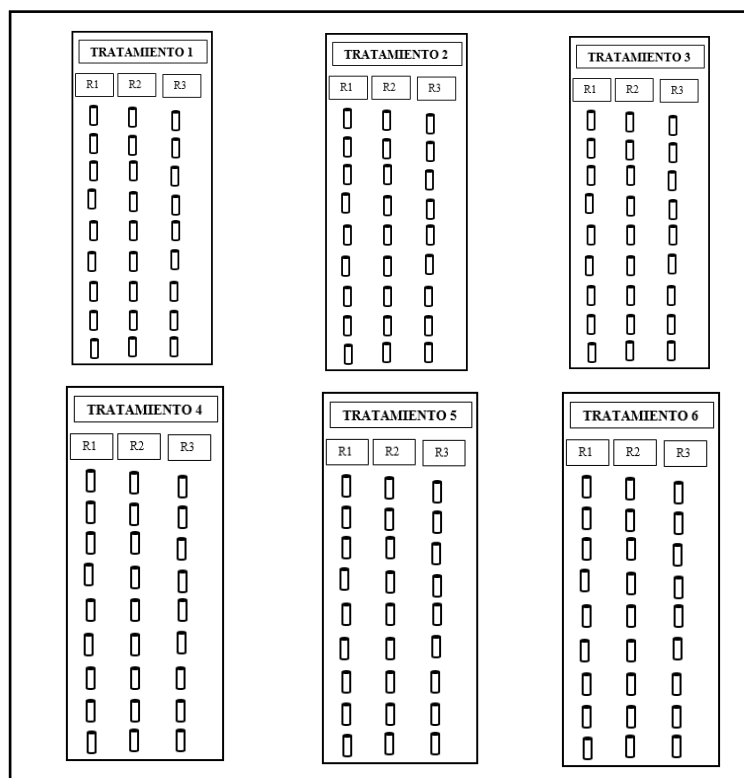


Figura 2. Esquema del experimento en el laboratorio mediante el diseño completamente al azar (DCA).

3.3.1.8. Unidad experimental y variables de evaluación.

La unidad experimental fue el conjunto de 10 frascos de vidrio, sembrando 3 explantes por frasco, dando un total de 30 explantes repetición y 90 explantes sembrados por tratamiento. Las variables que se evaluaron fueron:

- **Porcentaje de contaminación promedio.** Se evaluó el porcentaje de contaminación en base a presencia o ausencia de estructuras fungosas en el medio de cultivo en cualquier nivel de intensidad. Estas evaluaciones se realizaron cada 5 días a partir del quinto día de la siembra *in vitro* de los explantes. Posteriormente se realizó un análisis final para determinar que tratamiento mostro la menor contaminación.
- **Porcentaje de contaminación según los días evaluados.-** De la misma manera se evaluó el porcentaje de contaminación en base a las estructuras fungosas. Se realizó evaluaciones cada 10 días a partir del 5 día de la inoculación *in vitro*, realizando un análisis cada 10 días y por cada fecha de medición (Cuadro 3).

Cuadro 3. Hoja de registro para evaluar: porcentaje de contaminación en la siembra *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L.

Especie:		Fecha de siembra:	
Fecha de evaluación:		Tratamiento n°:	
% DE CONTAMINACIÓN			
# frascos	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
	Contaminación	Contaminación	Contaminación

3.3.1.9. Hipótesis del modelo.

H_0 = Las diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio en tiempos diferentes de inmersión, no disminuye el porcentaje de contaminación en segmentos de hojas de *Coffea arabica* L.

H_1 = Las diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio en tiempos diferentes de inmersión, disminuye el porcentaje de contaminación en segmentos de hojas de *Coffea arabica* L.

3.3.1.10. Análisis estadístico de datos de desinfección *in vitro* de *Coffea arabica* L.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la variable evaluada en la fase de desinfección *in vitro* de *Coffea arabica* L., se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et

al. 2008) versión 2008, en el cual se realizó en análisis de varianza ANOVA estableciendo diferencias significativas con el test de Tukey a un nivel de significancia de 0,05. Se probaron supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad para cada una de las variables en los distintos ensayos.

3.3.2. Segunda fase para Establecer el balance hormonal adecuado de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones para la inducción de callo embriogénico en explantes de cafeto *Coffea arabica* L.

El objetivo de esta fase fue evaluar el efecto de la mezcla hormonal de una auxina diclorofenoxiacético (2,4D) en concentraciones de 1,0 mg/l; 3,0 mg/l; 3,0 mg/l y 6,0 mg/l, con una citoquinina (BAP) en concentraciones de 3,0 mg/l; 10,0 mg/l; 0,0 mg/l y 0,0 mg/l respectivamente, con la finalidad de inducir a la formación de callos de cafeto, formando cuatro tratamientos. Las cuales se utilizaron rigiéndose en trabajos antes realizados para obtener un mejor porcentaje de formación de callos.

Para esta fase se utilizó los segmentos de hojas sin contaminación obtenidas de la desinfección de tal forma que no fue necesario la desinfección ya que fue material aséptico.

3.3.2.1.Preparación del medio de cultivo para la formación de callos.

El medio de cultivo de sales minerales MS (Murashige & Skoog, 1962), se suplementó con vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina, glicina) y 10 mg/l de tiamina y 100 mg/l de m-inositol, sacarosa 20 gr/l como fuente de carbohidratos, agar 6 gr/l como agente gelificante, cisteína 25 mg/l y se adicionó la combinación de dos hormonas 2,4D Y BAP en distintas concentraciones, en este medio de cultivo se ensayó cuatro tratamientos con tres repeticiones cada uno. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.2 con HCL o NaOH 1N (Anexo 12).

Se distribuyó aproximadamente 10 ml de medio de cultivo en cada tubo de ensayo para ser esterilizados en autoclave a 120 °C de temperatura y 1,5 kg/cm² de presión, durante 25 minutos.

3.3.2.2.Siembra *in vitro* de explantes y condiciones de incubación.

La inoculación *in vitro* de los explantes, se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, se utilizó cajas petri, bisturí y pinzas previamente esterilizadas

para realizar el paso de los explantes rescatados, una vez obtenidos los explantes se procedió a sembrarlos, dejando el explante en contacto con el medio de cultivo, evitando así la deshidratación del explante y la pérdida de formación de callos, inoculando un explante por cada tubo de ensayo.

Posteriormente se identificó cada uno de los tratamientos para su traslado al cuarto de incubación, en donde se mantuvieron a una temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Anexo 13).

Los tubos de ensayo con los explantes fueron cubiertos con cartulina negra para acelerar la formación de callos, ya que experimentos realizados anteriormente lo recomiendan (Parada, 2002).

3.3.2.3. Diseño experimental para la fase de inducción a callos.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 repeticiones.

En el cuadro 4 se observa la definición de los tratamientos evaluados en la interacción de auxinas – citoquininas en la formación de callos, a partir de segmentos de *Coffea arabica* L.

Se tomaron las siguientes dosis de auxinas y citoquinas ya que en ensayos realizados anteriormente demostraron que la aplicación de una auxina en bajas cantidades y una citoquinina en altas promueve la formación de callos, bajo este contexto se aplicó las siguientes dosis para la obtención de mejores resultados.

Cuadro 4. Tratamientos establecidos con diferentes dosis de auxinas – citoquininas en la formación de callos, a partir de segmentos de *Coffea arabica* L.

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	1,0 mg/l de 2,4-D + 3,0 mg/l de BAP	T1 = A1C1
2	3,0 mg/l de 2,4-D + 10,0 mg/l de BAP	T2 = A1C1
3	3,0 mg/l de 2,4-D + 0,0 mg/l de BAP	T3 = A1C1
4	6,0 mg/l de 2,4-D + 0,0 mg/l de BAP	T4 = A1C1

3.3.2.4.Especificaciones del diseño experimental.

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	5
Número de tratamientos	4
Numero de repeticiones	3
Número de unidades experimentales por tratamiento	3
Número total de tubos por tratamiento	15
Número total de unidades experimentales del ensayo	12
Número total de tubos para el ensayo	60
Numero de explantes por unidad experimental	5
Número total de explantes	60

3.3.2.5.Unidad experimental y variables de evaluación.

La unidad experimental fue el conjunto de cinco tubos de ensayo, para lo cual se sembró 5 explantes, a razón de un explante por tubo. Las evaluaciones se realizaron por observación directa, durante 30 días con frecuencia de 5 días a partir del tercer día de siembra, evaluando las siguientes variables:

- **Porcentaje de formación de callos.-** se evaluó cada 5 días después de la inoculación de los explantes, tomando en consideración la cantidad de callo formado en cada uno de los explantes. Realizando un análisis promedio para determinar que tratamiento fue el que formó mayor porcentaje de callos.
- **Días a la formación.-** Se la realizó a los cinco días después de la inoculación, en el cual mediante conteo se evidenció la aparición de un aumento diario de encañamiento en los segmentos de café lo cual nos sirve para determinar la importancia del medio de cultivo con la suplementación de vitaminas y hormonas.
- **Apariencia (homogénea y no homogénea).-** Se realizó evaluación por explante, teniendo en cuenta que los callos homogéneos son aquellos que se forman

totalmente en todo el explante y el no homogéneo se forma simplemente en algunas partes o bordes del explante (Figura 16).

Cuadro 5. Hoja de registro para evaluar las variables: porcentaje de formación, apariencia y color de callos *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L.

Especie:					Fecha de siembra:					
Fecha de evaluación:					Tratamiento N°:					
% DE DÍAS, COLOR Y APARIENCIA DE CALLOS EN SEGMENTOS DE HOJAS DE CAFETO										
T	# tubo	REPETICIÓN 1			REPETICIÓN 2			REPETICIÓN 3		
		Días F.	Apariencia	Color	Días F.	Apariencia	Color	Días F.	Apariencia	Color
% de días a la formación:										
% de apariencia del callo:										
% de color del callo:										

3.4. Metodología para la Difusión de resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la carrera de Ingeniería Agronómica.

Los resultados de la investigación fueron socializados con los estudiantes de la carrera de Ingeniería Agronómica de la UNL.

Además se elaboró un documento divulgativo para dar a conocer los resultados obtenidos en el ensayo.

Los resultados obtenidos fueron entregados en digital e impreso a la carrera de Ingeniería Agronómica de la UNL, al Laboratorio de Micropropagación y biblioteca de la facultad del AARNR.

IV. RESULTADOS

4.1. Fase de desinfección *in vitro*, en explantes de *Coffea arabica* L.

4.1.1. Porcentaje de contaminación promedio.

En lo referente a la evaluación de la variable contaminación (Anexo 1) según el análisis de varianza (ANOVA) aplicado, se pudo determinar que los datos presentaron baja variabilidad. De la misma manera, la prueba de Tukey (Anexo 2), nos muestra diferencias altamente significativas entre tratamientos con una p menor a 0,05 donde se observa que la interacción entre la concentración de hipoclorito de calcio y el tiempo de inmersión con menor porcentaje de contaminación fue el T5 (25 % $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ + 10 min) con un valor de 37,62 % con diferencias significativas frente a los demás; el T2 (15 % $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ + 20 min) presentó el mayor porcentaje de contaminación; por otro lado, los tratamiento T1, T3 y T6 no se diferenciaron entre sí y presentaron valores entre 62 y 65 % de contaminación sin diferencias significativa entre ellos (Fig. 3).

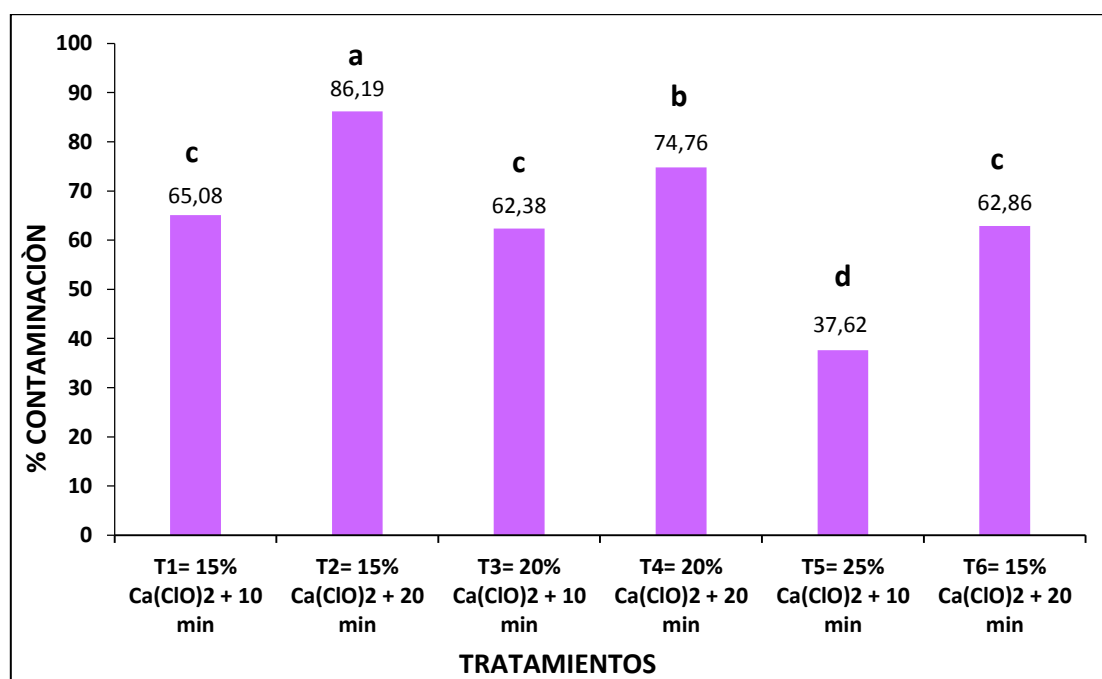


Figura 3. Porcentaje de contaminación de explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de contaminación *in vitro*. Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.1.2. Porcentaje de contaminación según la dosis y días de evaluación.

Se muestran los resultados promedios del porcentaje de contaminación de los explantes de cafeto, según las dosis de 15 %, 20 % y 25 % de hipoclorito de calcio y los días de evaluación de 5,15, 25 y 35 días, (Anexo 2).

De acuerdo con la Figura 4, a los 5 días, se evidenció contaminación en todas las dosis teniendo el mayor porcentaje de contaminación (21,67 %) en la dosis D1, mostrando que no fueron significativamente diferentes entre ellas con los primeros días evaluados.

Se observó una contaminación ascendente según como pasaban los días, así, a los 15 días de evaluación las dosis de desinfectante actuaron de manera diferenciada, presentando diferencias entre las dosis D1 (15 % Ca (ClO)₂) y D3 (25 % Ca (ClO)₂), con el menor porcentaje de contaminación en este último.

La evaluación realizada a los 35 días presentó diferencias significativas entre las dosis de D1 y D2 frente a la dosis D3 que controló de mejor manera la contaminación. La dinámica observada fue que a mayor tiempo transcurrido la contaminación fue mayor; sin embargo, la mayor concentración fue la que favoreció a los explantes frente a los patógenos a los que estuvieron expuestos.

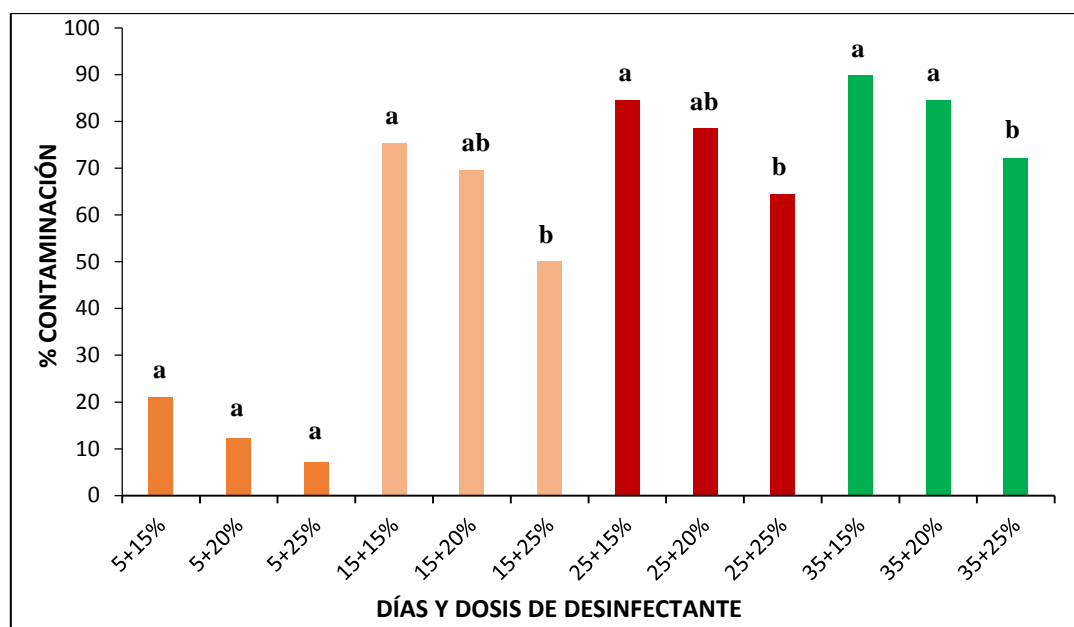


Figura 4. Porcentaje de contaminación de explantes de *Coffea arabica* L. para los diferentes momentos de evaluación dosis de desinfectante en el ensayo de contaminación *in vitro*. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.2. Fase de formación de callos *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L., con la aplicación de auxinas (2,4 D) y citoquininas (BAP).

4.2.1. Porcentaje de formación de callo a los 30 días.

Según el análisis de varianza (ANOVA) aplicado para el porcentaje de formación de callos, se pudo determinar que los tratamientos presentaron alta variabilidad. De la misma manera la prueba de Tukey, nos mostró diferencias significativas entre tratamientos con una $p = > 0,05$ donde se observó que el tratamiento con mayor porcentaje de formación de callo fue el T1 (1,0 mg/l 2,4-D +3,0 mg/l BAP) con un valor de 73,33 % con diferencias significativas frente a los demás. Cabe destacar que los tratamientos sin citoquininas (BAP) no presentaron formación de callo.

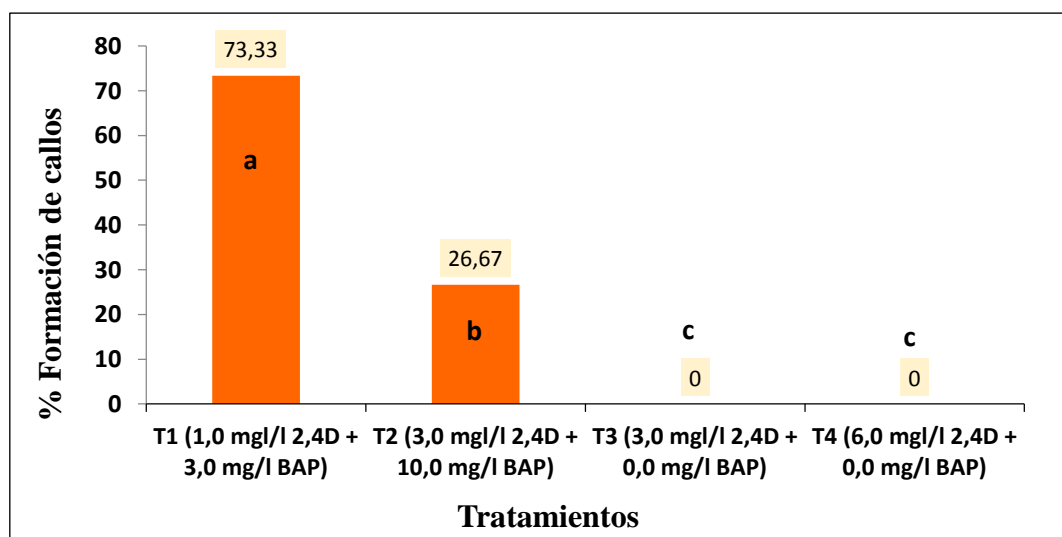


Figura 5. Efectos de la conjugación de auxina (2,4-D) y citoquinina (BAP), en la formación de callo en explantes de *Coffea arabica* L. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

4.2.2. Número de días a la formación de callos.

La aparición de encallamiento se evidenció al veintavo día de evaluación para los tratamientos T1 y T2 con porcentajes del 60 y 20 % respectivamente, mientras que los T3 y T4 no presentaron ningún valor de encallamiento.

Los valores se estabilizaron a los 30 días de evaluación en los T1 y T2 llegando a alcanzar un encallamiento total de 73,33 y 26,67 % respectivamente. Por otro lado los tratamientos T3 y T4 se mantuvieron sin la presencia de callo. (Fig. 6), (Anexo 4).

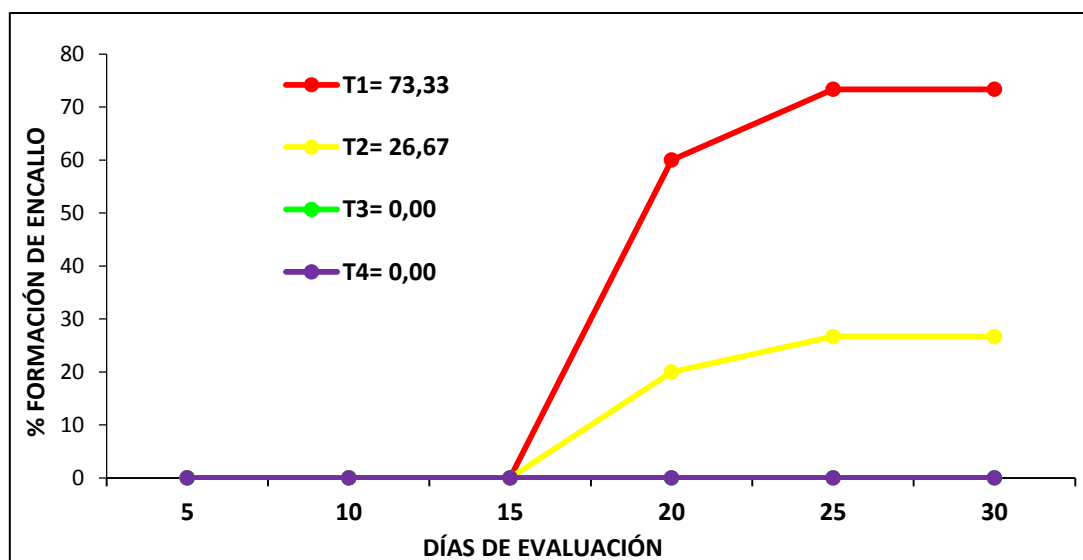


Figura 6. Días a la formación de callos y porcentaje de encallamiento de explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de encallamiento *in vitro* con interacción de auxinas y citoquininas.

4.2.3. Porcentaje apariencia de callo

Se evaluó un conteo, mostrando una presencia de apariencia de callos homogéneos y no homogéneos, tomando en cuenta solo los explantes que encallaron presentando porcentajes en el T1 (1,0 mg/l 2,4-D +3,0 mg/l BAP) valores de 66,7 y 33,33 de callo homogéneo y no homogéneo respctivamente, frente al T2 (3,0 mg/l 2,4-D +10,0 mg/l BAP) que presento un 100 % de callo no homogéneo (Fig. 7).

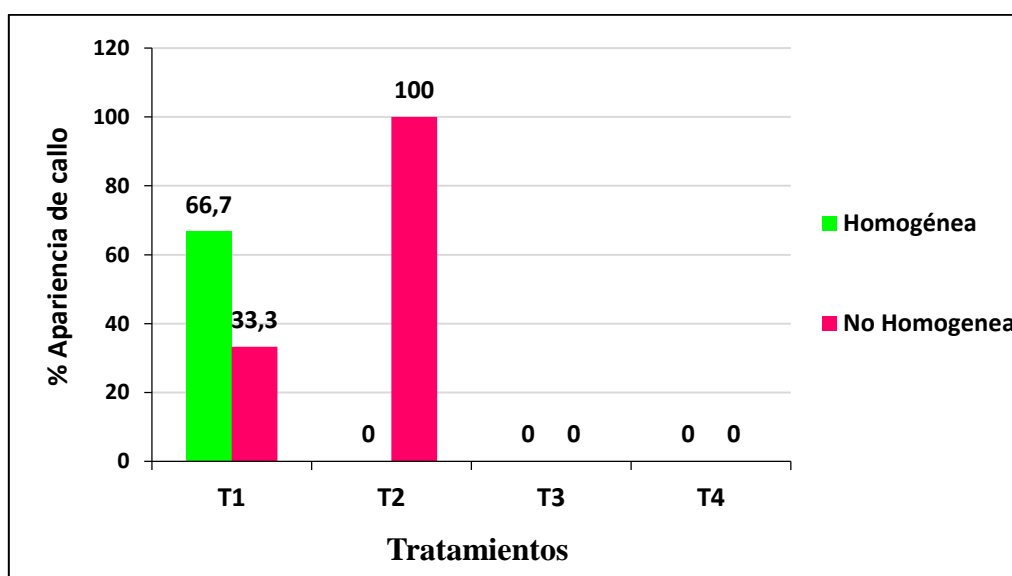


Figura 7. Porcentaje de apariencia de callo homogéneo y no homogéneo en explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de formación de callos *in vitro* con la interacción de auxinas y citoquininas.

4.3. Difusión de la información generada.

Para la difusión de la investigación se realizó una exposición de la investigación a los estudiantes del séptimo ciclo de la Carrera de Ingeniería Agronómica (Figura 17), con la finalidad de enriquecer y fortalecer sus conocimientos técnico- científico en su formación como futuros ingenieros agrónomos.

Finalmente, se elaboró y entregó un tríptico (Anexo 17), divulgativo a estudiantes y docentes de la Carrera de Ingeniería Agronómica.

V. DISCUSIÓN

5.1. Fase de desinfección *in vitro*, en explantes de *Coffea arabica* L.

En la presente investigación los explantes utilizados para la fase de desinfección de *Coffea arabica* L., se vieron afectados por agentes contaminantes que al ser analizados microscópicamente se determinó que se trata de un hongo (alternaria) y bacterias saprófitas (tejido muerto) con un 98 % y 2 % respectivamente (Anexo 6), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Parada (2002) que utilizó explantes de *Coffea arabica* L., en cuyo ensayo se presentó contaminación por hongos en un 96 % y bacteriana en un 4 %. Por su aspecto microscópico se determinó que la mayoría de contaminación por hongos fue causada posiblemente por *Penicillium* y en menor cantidad por *Fusarium* encontrados normalmente en el ambiente.

De igual manera, Roca y Mronginski (1991), citado por Pierik (1990) sostiene la existencia de microorganismos que en el campo no son patógenos, pero en el laboratorio se convierten en una fuente principal de contaminación (vitropatógenos), los cuales compiten con las plantas o explantes por nutrientes del medio causándoles daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos (fenoles o quinonas).

Para este ensayo de desinfección *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L., la combinación de dosis y tiempo de inmersión que resultó ser la más efectiva corresponde a 25 % Ca (ClO)₂ + 10 min, donde se presentó una contaminación de 37,62 %, resultados que son superiores a los obtenidos por Ramírez (2000) quien al utilizar dosis similares de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión en explantes, obtuvo excelentes efectos desinfectantes con niveles bajos de contaminación, que están en un rango de 0 % y 21 % de contaminación de explantes, por otro lado demostró que los tiempos de inmersión mostraron diferencias significativas lo cual influye para controlar la contaminación *in vitro* de explantes.

Parada (2002), también menciona que al utilizar dosis similares de hipoclorito de calcio en explantes de *Coffea arabica* L., obtuvo los mejores resultados en la combinación del Ca (ClO)₂ y tiempo de inmersión (10 % y 8 % Ca (ClO)₂ en 20 y 10 minutos) y obtuvo resultados de 49 % en la contaminación, es decir que la combinación

de dosis altas de hipoclorito de calcio en el menor tiempo de inmersión resulta ser efectiva para controlar la contaminación *in vitro* de explantes.

La FAO (1990) señala que el porcentaje de contaminación es alto cuando se utiliza tejidos de plantas que crecen en el campo. Los resultados observados en este ensayo podrían ser reflejo de lo expresado anteriormente debido que los explantes foliares obtenidos fueron tomados de una finca en condiciones de campo.

5.2. Fase de formación de callos *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L., con la aplicación de auxinas (2,4 D) y citoquininas (BAP).

En la presente investigación en el ensayo de formación de callo *in vitro* de explantes de *Coffea arabica* L., la concentración hormonal de auxina y citoquinina T1 (1,0 mg/l 2,4-D +3,0 mg/l BAP) resultó ser la más efectiva permitiendo la formación del mayor porcentaje de callo del 73,33 %, seguido del T2 T1 (3,0 mg/l 2,4-D +10,0 mg/l BAP) el cual obtuvo un porcentaje de encallamientos del 26,67 %, los cuales coinciden con los obtenidos por Lozano (2014) quien utilizó una auxina (ANA) y una citoquinina (BAP) para la obtención de callos en meristemos de cafeto, en concentraciones de 0,19 mg/l y 2,25 mg/l respectivamente similares a nuestra combinación de hormonas en el T1, obteniendo como resultados el 21 % de callos, lo cual sustenta que la combinación de una auxina en bajas cantidades y una citoquinina en altas concentraciones estimulan a la formación de callos en explantes y meristemas de cafeto.

De la misma manera Moncada (2002) menciona que al utilizar combinaciones similares de hormona, en este caso auxinas y citoquininas (2,4 D y BAP) en cafeto *Coffea Arabica* L., obtuvo los mejores resultados en tratamiento III en el cual utilizó una combinación de (2.7 mg / l BAP + 0.3 mg / l 2,4-D) teniendo como resultado un encallamiento embriogénico del 38,4 % el cual da concordancia con nuestros resultados y los obtenidos por Lozano (2014), ratificando que la conjugación de una concentración baja de auxinas y una alta de citoquininas promueve al desarrollo de callos embriogénicos.

Pierik (1990) y Moncada (2002) sostienen que para obtener callos embriogénicos deben cumplir con las características de color y apariencia adecuadas (carmelita translúcida y homogéneos), los cuales solo mencionan las características mas no los porcentajes óptimos. En el ensayo realizado los callos obtenidos fueron en gran parte embriogénicos

los cuales del 73,33 % de callos obtenidos el 66,7 % fueron callos homogéneos y el 77,8 obtuvieron un color carmelita translúcido (Anexo 7), designándolos así como callos embriogénicos listos para poder ser reproducidos, cumpliendo con las características exigidas por autores antes mencionados.

VI. CONCLUSIONES

- En la fase de desinfección de *Coffea arabica* L., alcanzó el mínimo porcentaje de contaminación en el T5 (25 % Ca (ClO)₂ + 10 min), concluyendo que las concentraciones altas de hipoclorito de calcio que se utilizó en los tratamientos aplicados, son las más efectivas para disminuir la contaminación de esta especie, ya que a mayor porcentaje de concentración de hipoclorito de calcio en menor tiempo de inmersión se obtiene mejores resultados en porcentajes de contaminación en explantes de cafeto.
- La mezcla de auxina y una citoquinina promovió el más alto desarrollo de callos en el T1 (1,0 mg/l 2,4 D + 3,0 mg/l BAP), lo cual indica que la mezcla entre una auxina y una citoquinina en bajas y altas concentraciones respectivamente nos ayudan a la obtención de resultados favorables para la formación de callo.

VII. RECOMENDACIONES

- Utilizar material vegetal para la propagación *in vitro*, previamente controlado en un invernadero, para así eliminar en parte la contaminación del material vegetal antes de que este ingrese al laboratorio de micropropagación vegetal.
- Se recomienda el uso de hipoclorito de calcio en mayores concentraciones para obtener material vegetal mas aseptico para el momento de su propagación, asi como también de probar otros posibles desinfectantes como es el cloro el cual ha sido utilizado en ensayos similares mostrando resultados satisfactorios.
- Utilizar mezclas de auxinas en bajas concentraciones con una citoquinina en altas concentraciones para así promover la formación de callos *in vitro*, lo cual ha demostrado que estas mezcla tienen muy buenos resultados logrando obtener más del 50 % en la formación de callos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (INIAP-EET-PICHILINGUE), I. S. (1993). *Manual del cultivo de café*. QUEVEDO , ECUADOR.
- alimentación., O. d. (septiembre de 2011). <http://www.coffee-ota.org>. Obtenido de <http://www.coffee-ota.org>.
- ALVEAR, E. B. (2014). *capacitación e Implementación de viveros de café con variedad resistente a la roya y las buenas prácticas agrícolas*. La Argentina Huila vereda el pensil.
- AMAYA, J. E. (2012). *AVANCES DE LA MICROPROPAGACIÓN in vitro DE PLANTAS LEÑOSAS*. BOGOTA.
- ARIAS, A. G. (2002). *REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CAFÉ (Coffea arabica cv. Caturra y Catuai) POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA A PARTIR DE SEGMENTOS DE HOJA*. Cartago.
- Arvy, M., Gallouin, F., & Ulbillos, M. y. (2007). Especies, aromatizantes y condimentos. *Mundi-Prensa*.
- Berrido, M. d. (1967). *Fundamentos Botánicos, Ecológicos Y Fisiológicos Del Cultivo Del Café (Instituto Salvadoreño de investigaciones del Café)*. salvador .
- Calva, C., & Pérez, J. (2005). *Cultivo de células y tejidos vegetales*. México.
- COFENAC. (2011). Produccion de café en El Ecuador.
- Davies, P. (2008). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic.
- Díaz, G. (2012). *Procesos Morfogénicos in vitro de Cedro (Cedrela montana Moritz Ex Turcz.) Inducidos, a partir de semillas, para Propagación y Conservación de Germoplasma*. Tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniera Forestal. 90 pp.
- Dijkman, M., & Wehlborg. (1986). *Cultivo y mejora de plantas tropicales y subtropicales*. Mexico.
- Ecuador, G. T. (30 de septiembre de 2011). *scribd*. Recuperado el 17 de febrero de 2016, de <http://www.scribd.com/doc/66975990/guia-tecnica-del-cafe-en-Ecuador#scribd>
- ECUADOR, S.-I.-M. (2002). http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Mejora_Gen%C3%A9tica_caf%C3%A9_experiencias_Ecuador%20%281%29.pdf. Obtenido de

- http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Mejora_Gen%C3%A9tica_caf%C3%A9_experiencias_Ecuador%20%281%29.pdf.
- Eric Moncada, M. V. (2002). *Inducción in vitro de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de Coffea arábica L.*
- Etienne, h., & anthony, F. (2002). *Biotechnological applications for the improvement of coffe* .
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, I. (1990). Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales: Métodos asépticos.
- FAO. (SEPTIEMBRE de 2011). <http://www.coffee-ota.org>. Obtenido de <http://www.coffee-ota.org>.
- Gamborg, O., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean root cells. 151-158.
- Girón, I. E. (1998). Desarrollo y maduración de embriones somáticos. *tesis*.
- Hartman, H., & Kester, D. (2002). *Propagación de plantas*. Mexico: Continental.
- infoagro. (2002). <http://www.infoagro.com/> . Obtenido de <http://www.infoagro.com/> .
- Intelectual, I. E. (18 de JULIO de 2014). *Ecuador con aroma de café*.
- Laboratorio de Genética, I. d. (2009). *Ingeniería genética aplicada al café*. venezuela.
- Leon, J. (1997). *Botánica de los cultivos tropicales*. Costa Rica.
- Leon, J. (2000). *Botánica de los Cultivos Tropicales*. Costa Rica.
- Lozano, G. A. (2014). Propagación in vitro de café (Coffea arabica) -variedad Lempira- a partir de meristemas.
- Melvin Alvarado, G. R. (1997). *cultivo y veneficiado del café*. costa rica.
- Mercurio, E. (29 de 10 de 2014). <http://www.elmercurio.com.ec/453676-80-del-cafe-en-loja-afectado-por-la-roya/#.VjIOLSn5ct>.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 473-497.
- Narváez, S. (2009). *Regeneración de brotes a partir de hojas provenientes de plantas in vitro de Rosa, Variedad Akito (Rosa sp. Var Akito)*. Departamento de Ciencias de la Vida de Ciencias Agropecuarias- I.A.S.A. Gral Carlo Magno Andrade Paredes.
- nations, F. a. (septiembre de 2011). <http://www.coffee-ota.org>.
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2004). *Métodos de propagación y conservación de germoplasma*. Argentina.

- Ortega, R. (1992). *Metodología para la propagación in vitro de Carica papaya L.* Santa Clara, Cuba: Universidad Central Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro de Biotecnología Ingeniería Genética de plantas.
- Parada, V. L. (2002). ESTUDIO DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO EN VARIEDADES COMERCIALES DE CAFÉ (*Coffea arabica*) DE EL SALVADOR. *San Salvador*.
- Pierik, R. (1990). *Cultivos in vitro de plantas superiores*. Madrid: Mundi-prensa.
- Pierik, R. (1990). *In vitro. culture of higher plants*.
- PROCAFE. (1997). *Boletín Estadístico de la caficultura Salvadoreña*. San Salvador.
- Rafael Fernández, Z. D. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación N° 71 Vol 34*.
- Ramírez, A. A. (2000). *Inducción de embriogénesis somática in vitro*. Honduras.
- Roca, W., & Mronginski, L. (1991). *Cultivos de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia.
- Rosales, F., G., P., & M., S. (2004). Estudio del efecto de tres retardantes de crecimiento sobre la regeneración in vitro de tres genotipos de ajo (*Allium sativum* L.).
- Salazar, R. (2010). *Historia del cultivo de tejidos vegetales*. Obtenido de www.calameo.com/subscriptions/632868.
- Santacreo. (1992). multiplicación vegetativa.
- Small, E. (2009). *Top 100 Food Plants*.
- Suarez, F. (2011). *Micropropagación in vitro de Piña (Ananas comosus L. Merrill) Híbrido Md-2, A partir de cortes de yemas laterales y apicales*. Previa a la obtención de grado o título. Escuela Politécnica del Ejército. 82 p.
- Tobar, C. (24 de 09 de 2011). <http://www.buenastareas.com/ensayos/Totipotencialidad/1499061.html>.
- Vilma Landaverde, A. L. (2002). *Estudio de Inducción a Callo Embriogénico en variedades comerciales de café (Coffea arabica) DE EL Salvador*. El Salvador.
- Waller, J., & Bigger, M. y. (2007). *Coffee Pests, Diseases and Their Management*.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de contaminación para el ensayo de Desinfección de explantes *in vitro* de *Coffea arabica* L.

Tratamiento	Tiempo	Dias de toma de datos en porcentajes						
		5	10	15	20	25	30	35
T1	10 min	13,33	50,00	76,67	86,67	86,67	93,33	96,67
T1	10 min	6,67	46,67	70,00	76,67	76,67	86,67	90,00
T1	10 min	3,33	43,33	63,33	70,00	70,00	80,00	80,00
T2	20 min	40,00	83,33	96,67	100,00	100,00	100,00	100,00
T2	20 min	36,67	76,67	90,00	100,00	100,00	100,00	100,00
T2	20 min	30,00	70,00	86,67	100,00	100,00	100,00	100,00
T3	10 min	6,67	40,00	70,00	70,00	73,33	76,67	76,67
T3	10 min	3,33	36,67	56,67	63,33	90,00	96,67	96,67
T3	10 min	3,33	43,33	53,33	73,33	83,33	96,67	100,00
T4	20 min	26,67	50,00	90,00	100,00	100,00	100,00	100,00
T4	20 min	20,00	46,67	83,33	93,33	93,33	96,66	96,66
T4	20 min	13,33	40,00	73,33	83,33	83,33	90,00	90,00
T5	10 min	3,33	16,67	30,00	50,00	66,67	70,00	70,00
T5	10 min	0,00	16,67	30,00	46,67	53,33	56,67	60,00
T5	10 min	3,33	10,00	26,67	30,00	40,00	53,33	56,67
T6	20 min	16,67	33,33	80,00	83,33	90,00	90,00	90,00
T6	20 min	13,33	36,67	76,67	80,00	80,00	80,00	83,33
T6	20 min	6,67	26,67	63,33	70,00	73,33	73,33	73,33

Anexo 2. Análisis estadístico para el porcentaje de contaminación de explantes de *Coffea arabica* L, ensayo de desinfección.

Análisis de varianza para los factores A=tiempo de inmersión y B= concentraciones de hipoclorito de calcio

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje de contaminación	126	0,93	0,92	12,95	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	107028,76	11	9729,89	138,18	<0,0001
Tratamientos	14434,32	2	7217,16	102,49	<0,0001
Tiempo	12071,27	1	12071,27	171,43	<0,0001
Días medidos	79618,14	6	13269,69	188,45	<0,0001
Tiempo*tratamientos	905,04	2	452,52	6,43	0,0023
Error	8027,47	114	70,42		
Total	115056,23	125			

Prueba de interacción entre tratamientos, tiempo de inmersión y comparación de medias con el test de Tukey, Alfa=0,05 DMS=7,09493.

Tratamientos	Tiempo Inmersión	Medias	N	E.E	
T2	20	86,19	21	1,73	A
T4	20	74,76	21	1,73	B
T1	10	65,08	21	1,73	C
T6	20	62,86	21	1,73	C
T3	10	62,38	21	1,73	C
T5	10	37,62	21	1,73	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 3. Análisis estadístico para el porcentaje de contaminación y concentración de hipoclorito de calcio y días evaluados en los explantes de *Coffea arabica* L.

Análisis de varianza para los factores A=concentraciones de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y B= días medidos.

➤ **Análisis realizado cada 15 días, resultados analizados estadísticamente a los 5 días.**

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje de contaminación	18	0,25	0,15	82,78	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	645,73	2	322,87	2,51	0,1148
Tratamientos	645,73	2	322,87	2,51	0,1148
Error	1930,05	15	128,67		
Total	2575,78	17			

- **Tukey, Alfa=0,05 DMS=16,75**

Desinfectante	Medias	n	E.E	
Ca(ClO)2 %				
15%	21,67	6	4,63	A
20%	12,22	6	4,63	A
15%	7,22	6	4,63	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis estadístico a los quince días.**

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
Porcentaje de contaminación	18	0,35	0,27	26,94	
F.V.	SC	GI	CM	F	P-valor
Modelo	2712,36	2	1356,10	4,09	0,0382
Tratamientos	2712,36	2	1356,10	4,09	0,0382
Error	4972,31	15	331,49		
Total	7684,67	17			

- **Tukey, Alfa=0,05 DMS=27,30**

Desinfectante	Medias	n	E.E		
Ca(ClO)2 %					
15%	80,56	6	7,43	A	
20%	71,11	6	7,43	A	B
15%	51,11	6	7,43		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Análisis estadístico a los veinte y cinco días**

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R²	R² Aj	CV	
Porcentaje de contaminación	18	0,34	0,26	17,25	
F.V.	SC	GI	CM	F	P-valor
Modelo	1477,91	2	738,96	3,94	0,0423
Tratamientos	1477,91	2	738,96	3,94	0,0423
Error	2816,72	15	187,78		
Total	4294,63	17			

- Tukey, Alfa=0,05 DMS=20,5

Desinfectante	Medias	N	E.E		
Ca(ClO)2 %					
15%	88,89	6	5,59	A	
20%	82,22	6	5,59	A	B
15%	67,22	6	5,59		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

➤ **Análisis estadístico a los treinta y cinco días**

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje de contaminación	18	0,55	0,49	11,78	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	1881,63	2	940,81	9,03	0,0027
Tratamientos	1881,63	2	940,81	9,03	0,0027
Error	1562,66	15	104,18		
Total	3444,29	17			

- Tukey, Alfa=0,05 DMS=15,30

Desinfectante	Medias	N	E.E		
Ca(ClO)2 %					
15%	94,45	6	4,17	A	
20%	93,33	6	4,17	A	
15%	72,22	6	4,17		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 4. Tabla de toma de datos para el ensayo del balance hormonal de auxinas y citoquininas para la formación de callos, de explantes de Coffea arabica L.

Formación de callo (%) de explantes							
Tratamiento	Días						
	5	10	15	20	25	30	Total
T1	0,00	0,00	0,00	60,00	73,33	73,33	73,33
T2	0,00	0,00	0,00	20,00	26,67	26,67	26,67
T3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Anexo 5. Tabla de datos para el análisis estadísticos del ensayo de balance hormonal de auxinas y citoquininas para la formación de callos, de explantes de *Coffea arabica* L.

Auxinas (mg/l)	Citoquininas (mg/l)	% Formación de callo
1,0	3,0	80,00
1,0	3,0	80,00
1,0	3,0	60,00
3,0	10,00	20,00
3,0	10,00	20,00
3,0	10,00	40,00
3,0	0,0	0,00
3,0	0,0	0,00
3,0	0,0	0,00
6,0	0,0	0,00
6,0	0,0	0,00
6,0	0,0	0,00

Anexo 6. Análisis estadístico para el porcentaje de formación de callos en explantes de *Coffea arabica* L, ensayo de balance hormonal de auxinas y citoquininas.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA					
VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV	
Formación de callo	12	0,95	0,91	37,71	
F.V.	SC	Gl	CM	F	P-valor
Modelo	10766,67	5	2153,33	24,23	0,0007
Tratamientos	10766,67	3	3588,89	40,38	0,0002
Repeticiones	0,00	2	-1,5E-12	0,00	0,9999
Error	533,33	6	88,89		
Total		11			

Prueba de interaccion entre tratamientos y comparacion de medias con el test de Tukey, Alfa=0,05 DMS=26,64827.

Tratamientos	Medias	n	E.E	
T1	73,33	3	5,44	A
T2	26,67	3	5,44	B
T3	0,00	3	5,44	C
T4	0,00	3	5,44	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7. Recolección del material en el campo.



Figura 8. A: Selección de planta madre. B: Ramas de cafeto envueltas en papel periódico.

C: Colocación de la funda en culer para evitar la deshidratación de las hojas.

Anexo 8. Lavado y aclareos de las hojas de cafeto.

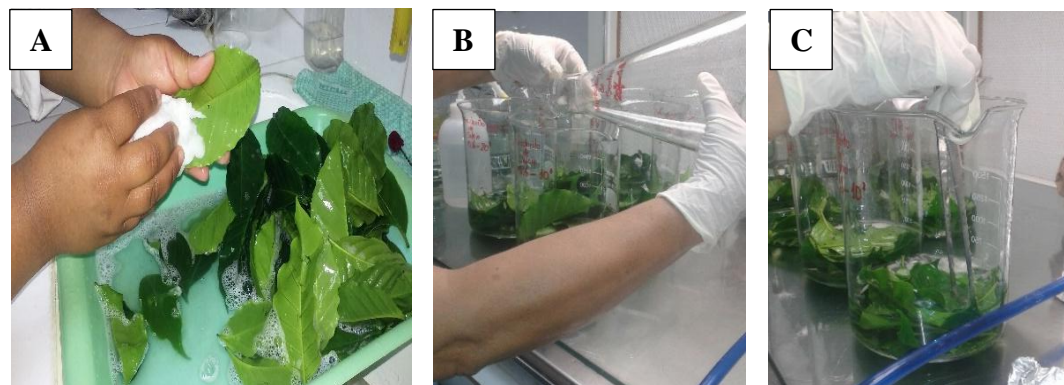


Figura 9. A: Lavado de las hojas d cafeto por el haz y el envez B: Colocación del hipoclorito de sodio en cada uno de los tratamientos. C: Aclareos con agua esteril mas antioxidantes.

Anexo 9. Desinfección de hojas de cafeto

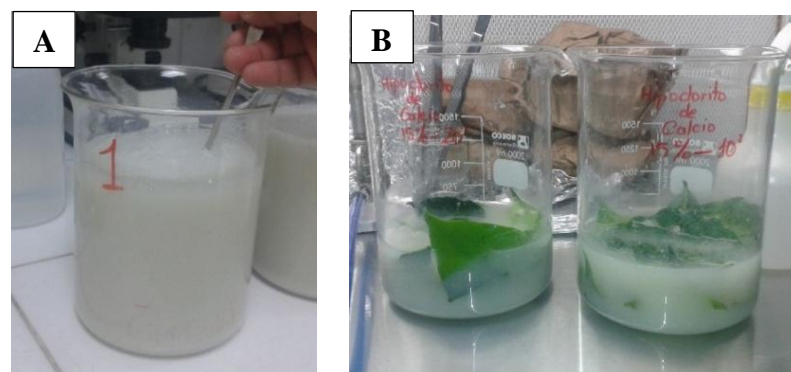


Figura 10. A: Disolución del hipoclorito de calcio. B: Desinfección con hipoclorito de sodio en cada uno de los tratamientos.

Anexo 10. Seccionado de explantes.

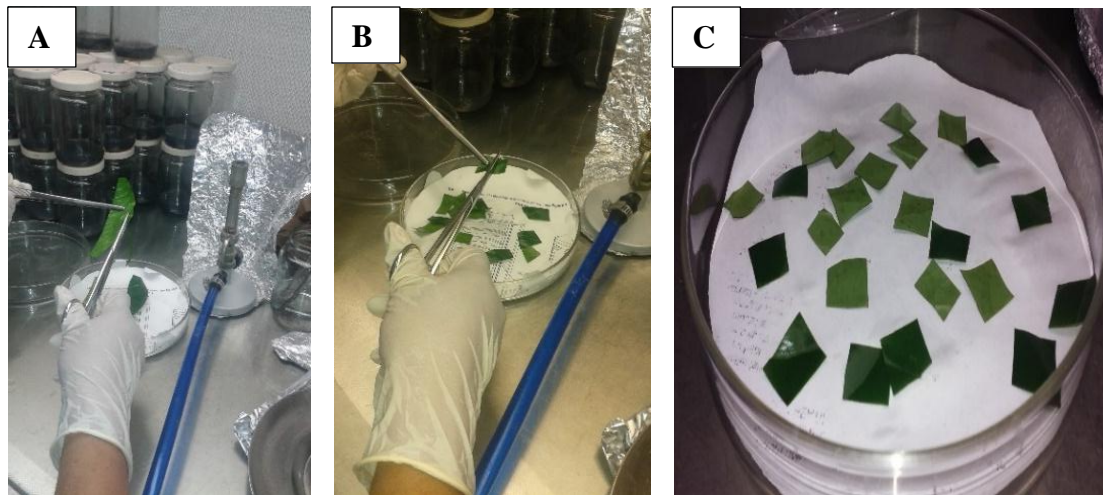


Figura 11. A: Corte de bordes, zona basal, apical y nervadura central de la hoja. B: Seccionado de la hoja de café. C: Segmentos de aproximadamente 1 cm².

Anexo 11. Siembra de explantes

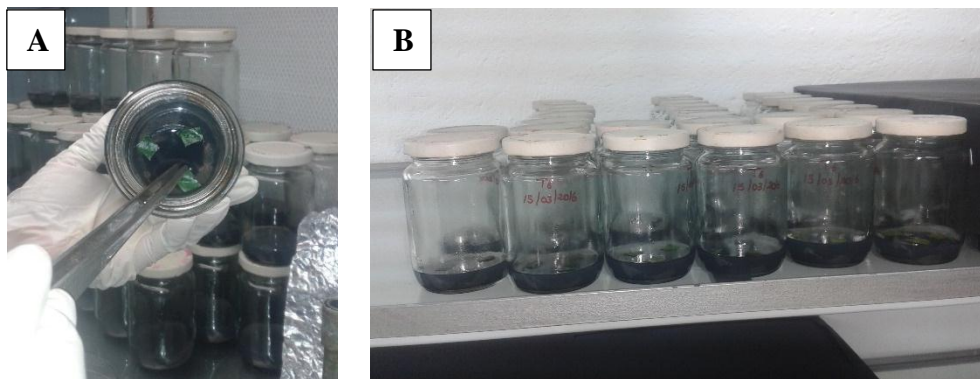


Figura 12. A: Implantación de los segmentos de cafeto en el medio de cultivo. B: Identificación y colocación en el estante del cuarto de luces.

Anexo 12. Preparación de medio de cultivo.



Figura 13. Preparación del medio de cultivo MS., adicionado la interacción hormonal auxinas – citoquininas.

Anexo 13. Siembra in vitro de explantes.

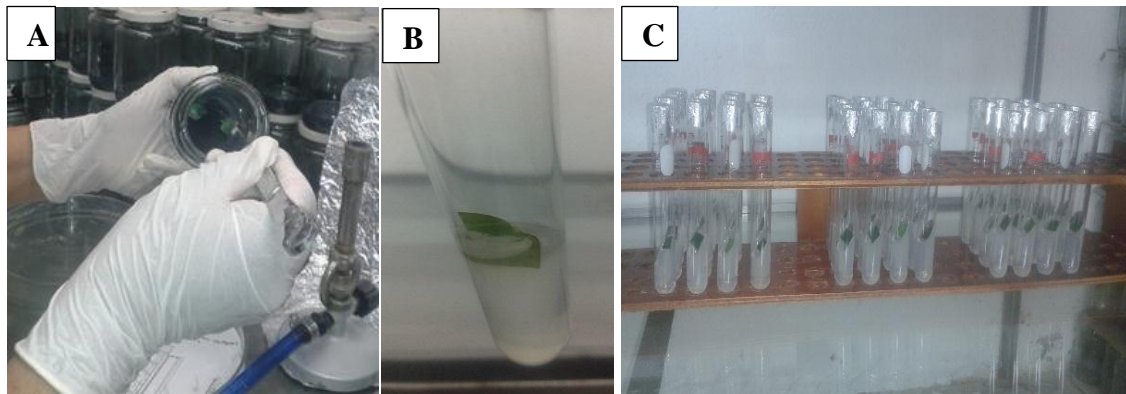


Figura 14. A: Traspaso de cada uno de los explantes. B: Explante en medio de cultivo con hormonas. C: Colocación de los tratamientos en el cuarto de luces.

Anexo 14. Explantes contaminados.

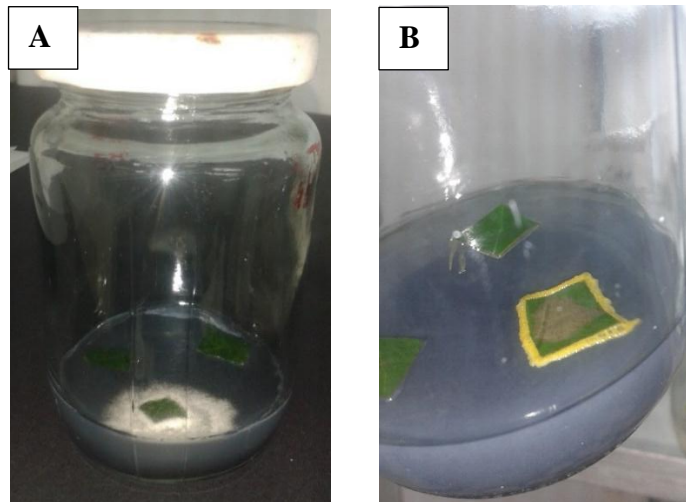


Figura 15. A: Contaminación de explante por ataque de hongos. B: Contaminación en explante por ataque de bacterias.

Anexo 15. Resultados obtenidos de encallamiento.

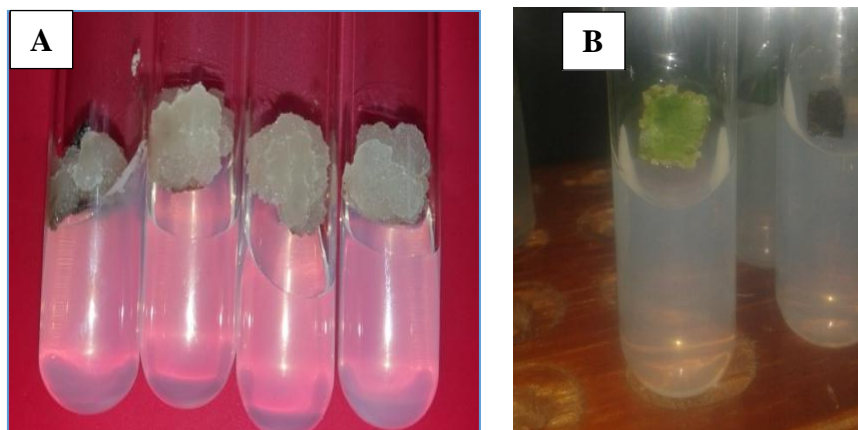


Figura 16. A: Callos homogéneos obtenidos. B: Formación de callos no homogéneos

Anexo 16. Difusión de los Resultados de la Investigación a los Actores Involucrados, Estudiantes del Séptimo Ciclo de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional de Loja.



Figura 17. A Y B. Difusión de Resultados de Tesis a estudiantes del Séptimo Ciclo de la Carrera de Ingeniería Agronómica.

Anexo 17. Tríptico divulgativo del presente trabajo de Investigación.



RESULTADOS

Porcentaje de contaminación según las dosis y tiempo de inmersión.

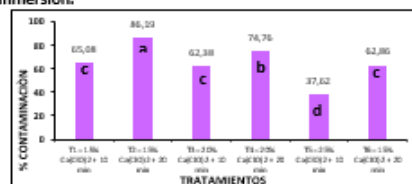


Figura 1. Porcentaje de contaminación de explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de contaminación in vitro. Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Porcentaje de contaminación según la dosis y días de evaluación.



Figura 2. porcentaje de contaminación de explantes *Coffea arabica* L., para los diferentes momentos de evaluación dosis de desinfectante en el ensayo de contaminación in vitro. Medias con letra común no son significativamente diferentes. ($p > 0,05$).

Fase de formación de callos in vitro de explantes de *Coffea arabica* L., con la aplicación de auxinas (2,4 D) y citoquininas (BAP).

Porcentaje de formación de callo a los 30 días.

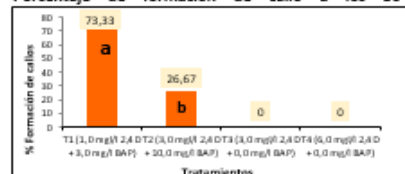


Figura 3. Efectos de la conjugación de auxina (2,4-D) y citoquinina (BAP), en la formación de callo en explantes de *Coffea arabica* L. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Número de días a la formación de callos.



Figura 11. Días a la formación de callos y porcentaje de encallamiento de explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de encallamiento in vitro con interacción de auxinas y citoquininas.

Porcentaje apariencia de callo

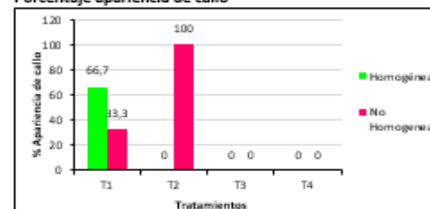


Figura 12. Porcentaje de apariencia de callo homogéneo y no homogéneo en explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de formación de callos in vitro con la interacción de auxinas y citoquininas.

Porcentaje color de callo.

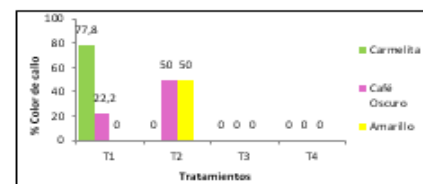


Figura 13. Porcentaje de colores presentados en los callos en explantes de *Coffea arabica* L., para el ensayo de formación de callos in vitro con la interacción de auxinas y citoquininas.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE TESIS:

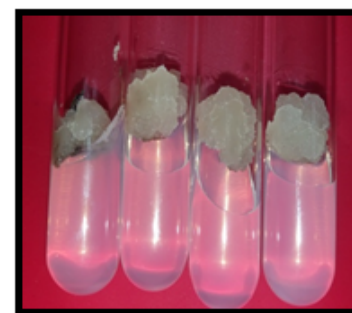
"PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS IN VITRO PARA LA
FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE TEJIDOS FOLIARES
DE CAFETO (*Coffea arabica* L.)"

AUTORA

TANIA DEL PILAR DÍAZ SIGCHO

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Max Encalada Córdova



LOJA – ECUADOR
2016

INTRODUCCIÓN

El café tiene una gran importancia económica a nivel mundial, ya que sus semillas, tostadas, molidas y en infusión, constituyen la bebida no alcohólica más consumida actualmente. Su cultivo supone una actividad económica clave en muchos países en desarrollo y se estima que su procesamiento y comercialización moviliza muchos millones de dólares al año y dan trabajo a millones de personas (Intelectual, 2014).

A diferencia de las técnicas de propagación tradicional, las de cultivo de tejidos permiten la micropropagación clonal de un determinado genotipo vegetal en un tiempo relativamente corto, útil en programas de mejoramiento genético convencional o por transformación genética. Estas técnicas también son poderosas herramientas para el estudio fisiológico, de crecimiento y desarrollo, morfogénesis, criopreservación, producción de semillas artificiales, producción industrial de diferentes compuestos químicos, preservación del germoplasma de genotipos élite o la producción de metabolitos secundarios (Fernández, 2010).

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), esta investigación se basará en utilizar las técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales, para así eliminar en una mínima parte la contaminación de explantes, con el propósito de obtener callos de café, a base de un medio de cultivo enriquecido con reguladores de crecimiento como son las auxinas y citoquininas.

Bajo este contexto y contando con los conocimientos y experiencias de cada uno de los técnicos del laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, la presente investigación tuvo como resultado la obtención de un protocolo para la formación de callos de café, aportando así con técnicas que en un futuro ayudarán a la obtención de plántulas de café a partir de segmentos de hojas.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Contribuir al establecimiento de la metodología para la fase de desinfección e inducción de callo embriogénico in vitro de café (*Coffea arabica* L.).

Objetivos Específicos

- Evaluar la desinfección en explantes de café (*Coffea arabica* L.), aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión.
- Establecer el balance hormonal adecuado de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones para la inducción de callo embriogénico en explantes de café (*Coffea arabica* L.).
- Difundir los resultados de la investigación a los actores sociales interesados, docentes y estudiantes de la carrera de ingeniería agronómica.

METODOLOGÍA

Metodología para la selección y recolección del material vegetal en campo.

El material vegetal se obtuvo de plantaciones de 4 años, proporcionado por el señor Gonzalo Chamba de su finca dedicada a la producción de café variedad caturra.

El material recolectado fue envuelto en papel periódico húmedo y colocado en fundas plásticas, se pusieron en un culer para mantener la humedad y evitar la deshidratación y daños de traslado al laboratorio de Micropropagación Vegetal.

Metodología para Evaluar la desinfección en explantes de café (*Coffea arabica* L.), aplicando distintas concentraciones y tiempos de inmersión con hipoclorito de calcio.

- Desinfección de explantes
- Seccionado de los explantes

- Preparación de medio de cultivo de implantación
- Siembra de explantes

Diseño experimental para la fase de desinfección de explantes de café (*Coffea arabica* L.). Se utilizó un diseño complementa al azar (DCA), con un arreglo factorial de 3 x 2, con 6 tratamientos y 3 repeticiones.

Cuadro 1. Descripción de los diferentes tratamientos para la desinfección de hojas de *Coffea arabica* L.

T	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	15 % Ca(ClO) ₂ + 10 min de inmersión	T1 = D1M1
2	15 % Ca(ClO) ₂ + 20 min de inmersión	T2 = D1M2
3	20 % Ca(ClO) ₂ + 10 min de inmersión	T3 = D2M1
4	20 % Ca(ClO) ₂ + 20 min de inmersión	T4 = D2M2
5	25 % Ca(ClO) ₂ + 10 min de inmersión	T5 = D3M1
6	25 % Ca(ClO) ₂ + 20 min de inmersión	T6 = D3M2

Metodología para Establecer el balance hormonal adecuado de auxinas y citoquininas en diferentes concentraciones y combinaciones para la inducción de callo embriogénico en explantes de café (*Coffea arabica* L.).

- Preparación de medio de cultivo.
- Siembra in vitro de explantes de café

Diseño experimental para la fase de enraizamiento de explantes de café (*Coffea arabica* L.). Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 repeticiones.

T	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO
1	1,0 mg/l de 2,4-D + 3,0 mg/l de BAP	T1 = A1C1
2	3,0 mg/l de 2,4-D + 10,0 mg/l de BAP	T2 = A1C1
3	3,0 mg/l de 2,4-D + 0,0 mg/l de BAP	T3 = A1C1
4	6,0 mg/l de 2,4-D + 0,0 mg/l de BAP	T4 = A1C1