



1859

unl

Universidad
Nacional
de Loja

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Efecto del fotoperíodo en la inducción de estructuras callogénicas en explantes de *Coffea arabica* L., a partir de plántulas de invernadero, a nivel de laboratorio.

Trabajo de Titulación Previa a la
Obtención del Título de
Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Olger Vinicio Cueva Jiménez

DIRECTOR:

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

LOJA-ECUADOR

2022



**UNIVERSIDAD
NACIONAL DE LOJA**

**FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES CARRERA DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA**



Loja, 18 de mayo de 2022

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.
DIRECTOR DE TITULACIÓN

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo proceso de la elaboración del trabajo de Integración Curricular del grado titulado: **“Efecto del fotoperíodo en la inducción de estructuras callogénicas en explantes de *Coffea arabica* L., a partir de plántulas de invernadero, a nivel de laboratorio”** de autoría del estudiante **Olger Vinicio Cueva Jiménez**, previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja para el efecto, autorizo la presentación para la respectiva sustentación y defensa.



Firmado digitalmente por:
**VÍCTOR HUGO
ERAS GUAMAN**

Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.
DIRECTOR DE TITULACIÓN

Ciudad Universitaria “Guillermo Falconí Espinosa” Casilla
letra “S”
Teléfono: 2547 - 252 Ext. 101: 2547-200

AUTORÍA

Yo, Olger Vinicio Cueva Jiménez declaro ser autor del presente trabajo de titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente, acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mí del trabajo de integración en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**OLGER VINICIO
CUEVA JIMENEZ**

Cédula de Identidad: 1105795775

Fecha: 21 de junio de 2022.

Correo electrónico: olger.cueva@unl.edu.ec

Celular: 0979299624

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

Yo, Olger Vinicio Cueva Jiménez declaro ser autor, del trabajo de titulación denominado “Efecto del fotoperíodo en la inducción de estructuras callogénicas en explantes de *Coffea arabica* L., a partir de plántulas de invernadero, a nivel de laboratorio”, como requisito para optar al grado de: Ingeniero Agrónomo, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

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

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del trabajo de titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veintidós días del mes de junio de dos mil veintidós.

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**OLGER VINICIO
CUEVA JIMENEZ**

Autor: Olger Vinicio Cueva Jiménez

Número de cédula: 1104621261

Dirección: La Tebaida. (Calle México y Bolivia)

Correo electrónico: olger.cueva@unl.edu.ec

Celular: 0979299624

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director de Tesis: Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán, Mg. Sc.

Tribunal de Grado: Klever Iván Granda Mora, PhD, **Presidente.**

Ing. Marlene Lorena Molina Muller, PhD, **Vocal.**

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión, PhD, **Vocal.**

DEDICATORIA

A Dios, por haberme regalado salud para cumplir cada uno de mis propósitos en especial este maravilloso logro que tanto anhelaba, por haberme orientado y haber puesto personas tan maravillosas que siempre supieron apoyarme.

Esta meta se la dedico a mi madre *Elvia Narcisa Jiménez Álvarez*, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por el ejemplo de perseverancia, dedicación y entrega, y a mi queridos ángeles: mi padre *Carlos Manuel Cueva Salazar* y mi sobrina *Jenny Sharick Cueva Manzaba*, y aunque nunca pensé que me faltarían este día, sé que estarían muy orgullosos de mi porque eso era lo que deseaban, los quiero y los extraño.

A mis hermanos, por apoyarme, aconsejarme y motivarme directa o indirectamente, en especial a mi hermano *Walter*, quien compartió estos duros años de esfuerzo, permitiéndome lograr esta importante meta.

A mis sobrinos y demás familiares, en especial a mi prima **Amparo Navarro**, por apoyarme en la cristalización de mi formación profesional.

A todos mis amigos y en especial a *Antonio Jiménez y Juana Jiménez*, por su lealtad y cariño, porque a pesar de la distancia estuvieron pendientes de mi en todo momento, motivandome cada día, los quiero.

AGRADECIMIENTO

Agradecer primeramente a Dios, por su amor y bondad a lo largo de toda mi vida, por hacerme más fuerte en estos últimos años para poder soportar cualquier dificultad presentada en mi camino, gracias a él he podido culminar esta maravillosa etapa universitaria.

A la Universidad Nacional de Loja, al Departamento de Bienestar Estudiantil, a la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Ingeniería Forestal y a todos los docentes por haber compartido sus conocimientos, su confianza, apoyo y sobre todo su amistad.

A mi director de tesis, Ing. Víctor Hugo Eras Guamán, y al Ing. José Moreno, ex director de tesis, por su confianza y entrega en esta ardua tarea como directores, por su tiempo y paciencia ante mi inconsistencia, por aceptarme en su grupo de investigación, gracias por depositar en mí su conocimiento y experiencia, a través de sus consejos y sabiduría me dieron la oportunidad de crecer como estudiante y han sido mi fuente de motivación durante estos años.

De igual manera, a la Ing. Magaly Arévalo, responsable del Laboratorio de Micropropagación Vegetal, por enseñarme todos los procesos que conlleva el trabajo en el laboratorio, por su apoyo desinteresado, por la dedicación de su tiempo y haber compartido conmigo sus conocimientos, al Ing. Galo por su amistad incondicional, pues les estaré eternamente agradecido, muchas gracias.

A mis padres, infinitas gracias por su apoyo incondicional, por su amor que a pesar de la distancia supieron como guiarme y hacer de mi un buen hijo, gracias por motivarme en cada uno de mis malos días, por no dejarme caer en ningún momento. A mis hermanos, gracias por ser mis amigos, por consolarme, escucharme y motivarme.

Por ultimo y no menos importante a Juana Jiménez, por apoyarme en estos años, por todos los maravillosos momentos, por la complicidad y carisma que la define.

A todos ustedes infinitas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINAS
PORTADA	i
CERTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
AUTORÍA	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1 TÍTULO	1
2 RESUMEN	2
2.1 ABSTRACT	3
3 INTRODUCCIÓN	4
4 MARCO TEÓRICO	6
4.1 Origen del café.....	6
4.2 Descripción taxonómica y botánica de <i>Coffea arabica</i> L.	6
4.3 Ubicación geográfica y distribución de <i>Coffea arabica</i> L.	6
4.4 Erosión genética del café.....	7
4.5 Métodos de propagación de las plantas.....	7
4.5.1 Propagación sexual.....	7
4.5.2 Multiplicación asexual.....	7
4.6 Historia del cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	8
4.6.1 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> en café.....	8
4.6.2 Ventajas del cultivo <i>in vitro</i>	8
4.6.3 Desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	9
4.6.4 Elementos fundamentales del cultivo <i>in vitro</i>	9
4.6.5 Problemas del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.	11
4.7 Calogénesis <i>in vitro</i>	12
4.7.1 Fotoperíodo.....	14
5 METODOLOGÍA	15
5.1 Ubicación del área de estudio.....	15
5.2 Metodología para la evaluación del balance hormonal auxina-citocinina en la formación de estructuras calogénicas, en explantes de <i>Coffea arabica</i> L., obtenidos en invernadero.....	15
5.2.1 Obtención y selección del material vegetal.....	15
5.2.2 Desinfección del material vegetal.....	16

5.2.3	Aislamiento de los explantes.....	16
5.2.4	Preparación del medio de cultivo.....	16
5.2.5	Siembra <i>in vitro</i> de los explantes.....	17
5.2.6	Diseño experimental.....	17
5.2.7	Especificaciones del diseño experimental.....	19
5.2.8	Parámetros de evaluación.....	19
5.2.9	Análisis estadísticos de datos.....	20
5.3	Metodología para determinar la influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas de <i>Coffea arabica</i> L.....	20
5.3.1	Obtención del material vegetal.....	20
5.3.2	Preparación del medio de cultivo.....	20
5.3.3	Proliferación de callos.....	21
5.3.4	Diseño experimental.....	21
5.3.5	Especificaciones del diseño experimental.....	22
5.3.6	Parámetros de evaluación.....	23
5.3.7	Análisis estadístico de datos.....	23
6	RESULTADOS	24
6.1	Fase de inducción de callos de <i>Coffea arabica</i> L., a partir de explantes obtenidos de plántulas de invernadero.....	24
6.1.1	Porcentaje de formación de callo en explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	24
6.1.2	Días a la formación de callos en explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	24
6.1.3	Color del callo en explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad a los 90 días de evaluación.....	25
6.1.4	Friabilidad del callo en total oscuridad.....	26
6.1.5	Porcentaje de contaminación de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	26
6.1.6	Días a la contaminación de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	27
6.1.7	Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	27
6.1.8	Días a la oxidación fenólica de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	28
6.1.9	Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	28
6.1.10	Días a la sobrevivencia de los explantes de <i>Coffea arabica</i> L., en total oscuridad.....	29
6.2	Influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas a partir de callos de <i>Coffea arabica</i> L.....	29

6.2.1	Proliferación de estructuras callogénicas en <i>Coffea arabica</i> L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo.....	30
6.2.2	Días a la proliferación de estructuras callogénicas en <i>Coffea arabica</i> L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo.....	30
6.2.3	Color del callo en explantes de <i>Coffea arabica</i> L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo.....	31
6.2.4	Friabilidad del callo bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo.....	32
6.2.5	Porcentaje de oxidación fenólica en callos de explantes de <i>Coffea arabica</i> L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo.....	32
6.2.6	Porcentaje de sobrevivencia de callos de <i>Coffea arabica</i> L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo.....	33
7	DISCUSIÓN	34
7.1	Efecto del balance hormonal auxina-citocinina en la formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de plántulas de invernadero de <i>Coffea arabica</i> L.....	34
7.2	Influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas de <i>Coffea arabica</i> L.....	36
8	CONCLUSIONES	38
9	RECOMENDACIONES	39
10	BIBLIOGRAFÍA	40
11	ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 1. Distribución del cultivo de café por especies, en las provincias del territorio ecuatoriano.	7
Figura 2. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.....	15
Figura 3. Preparación de medio de cultivo, A: Sales MS, vitaminas, ergostim y hormonas utilizadas y B: Tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D y KIN. C) Distribución de los tratamientos en los tubos de ensayo.....	17
Figura 4. Implementación del primer objetivo, A: Materiales utilizados, B: Desinfección de las hojas con Na(ClO) ₂ , C: Eliminación de bordes de la hoja de café, D: Disección del material vegetal, E: siembra de los explantes y F: Tubos de ensayo en cuarto de incubación.	18
Figura 5. Porcentaje de formación de callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., medias con letras distintas indican diferencia significativa entre ellas (p-valor = 0.0073).	24
Figura 6. Días a la formación de callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., letras distintas indican diferencias significativas entre sus medias, test Kruskal Wallis (p-valor = 0.0073).	25
Figura 7. Callos formados, A-E: Tratamiento T4 (1.0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L ⁻¹ KIN) y F-G: Tratamiento T5 (2.0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L ⁻¹ KIN).....	25
Figura 8. Color de los callos, A: Porcentaje de color del callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., y B: Número de explantes según el color del callo.....	26
Figura 9. Friabilidad de los callos, A: Porcentaje de friabilidad de callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., y B: Número de explantes según friabilidad del callo.	26
Figura 10. Porcentaje de contaminación en <i>C. arabica</i> L.....	27
Figura 11. Días a la contaminación de explantes inoculados de <i>C. arabica</i> L.	27
Figura 12. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de <i>C. arabica</i> L.....	28
Figura 13. Días a la oxidación fenólica de explantes inoculados de <i>C. arabica</i> L.	28
Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de <i>C. arabica</i> L.	29
Figura 15. Días a la sobrevivencia de explantes inoculados de <i>C. arabica</i> L., medias con letras distintas indican diferencias significativas entre ellas (p < 0.05) ..	29
Figura 16. Porcentaje de formación de callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., medias con letras distintas representa diferencia significativa (p-valor del fotoperíodo = 0.0084).....	30
Figura 17. Días a la proliferación de estructuras callogénicas en explantes de <i>C. arabica</i> L., letras distintas indican diferencias significativas entre sus medias (p-valor = 0.0084).	31
Figura 18. Callos con diferentes colores, A: Blanco, B: Amarillo, C: Crema (amarillo cremoso), D: Café beige y E-H: Colores según sistema de Munsell.....	31
Figura 19. Color de los callos, A: Porcentaje de color del callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., y B: Número de explantes según el color del callo en total oscuridad y fotoperíodo.....	32

Figura 20. Friabilidad de los callos, A. Porcentaje de friabilidad de callo en explantes de <i>C. arabica</i> L., y B: Número de explantes según friabilidad del callo en total oscuridad y fotoperíodo.....	32
Figura 21. Porcentaje de oxidación fenólica en callos de <i>C. arabica</i> L.....	33
Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia en callos de <i>C. arabica</i> L.	33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS		PÁGINAS
Tabla 1.	Taxonomía de <i>C. arabica</i> L.	6
Tabla 2.	Formulación de macro y micronutrientes de cuatro medios de cultivos.....	10
Tabla 3.	Tratamientos para evaluar la interacción de las concentraciones hormonales en la inducción de callos en explantes de hoja en <i>Coffea arabica</i> L.....	18
Tabla 4.	Distribución espacial del diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial.....	18
Tabla 5.	Tratamientos para evaluar la interacción de hormonas en la proliferación de estructuras callogénicas de <i>Coffea arabica</i> L.....	22
Tabla 6.	Distribución espacial del diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial.....	22

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS	PÁGINAS
Anexo 1. Hoja de campo para la toma de datos del ensayo de inducción de callos para los parámetros: contaminación, oxidación fenólica y sobrevivencia de explantes de <i>Coffea arabica</i> L.....	44
Anexo 2. Hoja de campo para la toma de datos del ensayo de inducción de callos para los parámetros: formación de callo de <i>C. arabica</i> L.	45
Anexo 3. Datos recolectados del ensayo en el primer objetivo.	46
Anexo 4. Datos recolectados del ensayo en el segundo objetivo.....	47
Anexo 5. Porcentaje de las variables de color y friabilidad de los callos del primer objetivo.....	47
Anexo 6. Porcentaje de las variables de color y friabilidad de los callos del segundo objetivo.....	47
Anexo 7. Resultados obtenidos para el parámetro porcentaje formación de callos en explantes de <i>C. arabica</i> L., durante 90 días de evaluación.	48
Anexo 8. Certificación de traducción del resumen del trabajo de titulación	49

**EFFECTO DEL FOTOPERÍODO EN LA INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS
CALLOGÉNICAS EN EXPLANTES DE *Coffea arabica* L., A PARTIR DE
PLÁNTULAS DE INVERNADERO, A NIVEL DE LABORATORIO.**

2 RESUMEN

Coffea arabica L., es una especie nativa de África Oriental, cultivada a nivel mundial. En Ecuador es importante en el ámbito económico, social y ambiental, pero enfrenta desafíos como la baja productividad y cultivos envejecidos.

La presente investigación se desarrolló con el propósito de generar información para la propagación *in vitro* de café, en la formación de estructuras callogénicas a partir de explantes foliares, evaluando el efecto del fotoperíodo y de las hormonas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y KIN (Kinetina).

En el primer ensayo, los explantes foliares, de un centímetro cuadrado, fueron obtenidos de plántulas de café cultivadas en invernadero; las cuales, se trataron con Benomil y Kasumin. Posteriormente, los explantes se sembraron en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con el complejo vitamínico B5 (tiamina, myo-inositol, piridoxina, ácido nicotínico, glicina), Ergostim, sacarosa y agar; y, con distintas concentraciones de 2,4-D (auxina) y Kinetina (citocinina), de acuerdo a los 8 tratamientos. En el segundo ensayo, los callos *in vitro* fueron sembrados en el mejor medio de cultivo obtenido previamente, pero con las hormonas reducidas a la mitad (2,4-D y KIN), la mitad del ensayo se sometió a fotoperíodo (16 horas luz) y el resto a total oscuridad, de acuerdo a los 4 tratamientos. Cada ensayo contó con un diseño completamente al azar bifactorial y 3 repeticiones.

Finalmente, la combinación 1.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} KIN alcanzó la mayor formación de callos, con 15.56 %; mientras que, la combinación 0.5 mg L^{-1} 2,4-D + 0.25 mg L^{-1} KIN en total oscuridad obtuvo la mayor proliferación, con 43.3 %, comprobándose la capacidad de *C. arabica* L., para generar tejido callogénico en presencia de fitorreguladores.

Palabras clave: Callogénesis, Rubiaceae, horas día, fitorregulador, inducción, proliferación.

2.1 ABSTRACT

Coffea arabica L. is a species native to East Africa, cultivated worldwide. In Ecuador it is important economically, socially and environmentally, but faces challenges such as low productivity and ageing crops.

The present research was developed with the purpose of generating information for the *in vitro* propagation of coffee, in the formation of callogenic structures from leaf explants, evaluating the effect of photoperiod and the hormones 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and KIN (Kinetin).

In the first trial, leaf explants of one square centimetre, were obtained from coffee seedlings grown in greenhouses, which were treated with Benomil and Kasumin. Subsequently, the explants were sown in MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with vitamin B5 complex (thiamine, myo-inositol, pyridoxine, nicotinic acid, glycine), Ergostim, sucrose and agar; and, with different concentrations of 2,4-D (auxin) and Kinetin (cytokinin), according to the 8 treatments. In the second trial, the *in vitro* explants were sown in the best culture medium previously obtained, but with the hormones reduced by half (2,4-D and KIN), half of the trial was subjected to photoperiod (16 hours of light) and the rest to total darkness, according to the 4 treatments. Each trial had a completely randomised bifactorial design and 3 replications.

Finally, the combination 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN reached the highest callus formation, with 15.56 %; while the combination 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN in total darkness obtained the highest proliferation, with 43.3 %, proving the capacity of *C. arabica* L. to generate callus tissue in the presence of phytohormones.

Key words: Callogenesis, Rubiaceae, daylight hours, phytohormone, induction, proliferation.

3 INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es una especie de la familia Rubiaceae, nativa de África Oriental, exactamente de Kaffa, de cuyo nombre se deriva el café. En la edad media, marineros africanos llevaron semillas a la península Arábiga, desde donde se desarrolló el cultivo del café y se distribuyó a Europa (Echeverri *et al.*, 2005). De acuerdo a Aguilar *et al.* (2018), el café llegó a América Latina en el siglo XVIII, región que actualmente produce el 80 % de la exportación mundial de café. La producción se basa en dos especies, *C. arabica* y *C. canephora* con un 70 y 30 %, respectivamente; los principales países latinoamericanos productores de café son Brasil, Colombia, Honduras, Perú, Guatemala, México, Nicaragua y Costa Rica.

Ecuador es un país megadiverso en cuanto a número de especies por área y a los diferentes ecosistemas (Bravo, 2014). El sector cafetero es muy importante en Ecuador, ya que en el ámbito económico crea fuentes de ingresos y aporta divisas al Estado; en lo social, genera empleo e inversión multiétnica y, en lo ecológico, por su amplia adaptabilidad a distintos suelos y climas, contribuye a la conservación de la flora y fauna nativa (Ponce *et al.*, 2018), siendo reconocida como una fuente de diversidad genética de interés (Engelmann *et al.*, 2007). Vanegas *et al.* (2018) y Astudillo *et al.* (2021) indican que, en Ecuador existen 199 215 hectáreas cultivadas, el 68 % de esta área corresponde a *C. arabica* y el 32% a *C. Canephora*; de las cuales, según Pincay (2017) el 85 % de la superficie cultivada se maneja bajo un sistema tradicional, este opera mediante deficientes técnicas agronómicas, ocasionando bajos rendimientos en la producción (250 kg de café oro/hectárea) y solo el 15% se lo hace de manera semitecnificada y tecnificada (750 kg de café oro/hectárea).

En el país, las causas de la baja producción y deficiente calidad del grano de café son múltiples, como cafetales envejecidos, fenómenos naturales y deficiente manejo agronómico (Vanegas *et al.*; 2018; Setiawan *et al.*, 2020), las fluctuaciones del precio en el mercado y políticas económicas nacionales (Montes de Godoy, 2019), erosión genética (Engelmann *et al.*, 2007), reducción del área cultivada y limitada asistencia técnica (Ponce *et al.*, 2018). No obstante, es primordial buscar estrategias que permitan obtener plántulas sanas en tiempos relativamente cortos, con esto se potencia a las variedades más productivas, de alto vigor y de calidad para la comercialización en el mercado nacional e internacional.

El cultivo de tejidos *in vitro*, mediante la técnica de la callogénesis, permite en primera instancia la desdiferenciación (callo) y luego la formación de estructuras *de novo*, y con ello es posible la propagación de grandes volúmenes de plantas de café en menor tiempo y en espacios reducidos. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos y homocigotas, para garantizar el material a nivel genético, se pueden hacer análisis

moleculares. Para el éxito de esta técnica es necesario proporcionar las condiciones adecuadas, como el fotoperíodo, que es la principal fuente de energía de las plantas; en ese sentido, al fotoperíodo se lo define como la duración del día o la noche al que está sometido un organismo vivo. La respuesta morfogénica de un explante puede variar según si se le proporciona luz o no. Para estimular la formación de callo, es común que se prefiera la oscuridad. El suministro de luz favorece la diferenciación de órganos (Camarena *et al.*, 2014; Levitus *et al.*, 2017)

Hoy en día, el empleo de la biotecnología permite obtener plantas por embriogénesis somática mediante el cultivo de tejidos vegetales y a pesar que el cultivo de café arábico es de importancia económica, aún se emplean deficientes métodos de propagación; por este motivo, el presente trabajo de investigación pretende generar información sobre los procesos de formación de callos y su desarrollo, dejando las bases para que en futuras investigaciones se continúe con los procesos de obtención de brotes *de novo* y se puedan obtener plántulas *in vitro* sanas y libres de patógenos, para ello se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Contribuir a generar información sobre procesos biotecnológicos para la inducción de estructuras callogénicas en explantes de *Coffea arabica* L., obtenidos a partir de plántulas de invernadero.

Objetivos Específicos

- Evaluar el balance hormonal auxina-citocinina en la formación de estructuras callogénicas en explantes de *Coffea arabica* L., obtenidos a partir de plántulas de invernadero.
- Determinar la influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas de *Coffea arabica* L.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Origen del café

El café es originario de África tropical, se señalan como posibles centros de origen a países como Sudán, Kenia, Guinea, Mozambique y Etiopía, este último es el más aceptado (Rojo *et al.*, 2014), donde aún se encuentra en estado silvestre a los alrededores de Etiopía; además, esta especie es autógama y tetraploide, con $2n = 44$ cromosomas (Ecet *aL.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2018).

4.2 Descripción taxonómica y botánica de *Coffea arabica* L.

Según Figueroa *et al.* (2015) el café tiene la siguiente clasificación:

Tabla 1. Taxonomía de *C. arabica* L.

Nombre común	Café
Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rubiales
Familia	Rubiaceae
Género	<i>Coffea</i>
Especie	<i>Coffea arabica</i> L. (1973).

Fuente: Figueroa *et al.* (2015).

Elaboración: Autor

Es un arbusto grande de 5 m de altura, logran vivir hasta 50 años (Echeverri *et al.*, 2005). Las hojas son de color verde oscuro brillante, ovaladas, de peciolo corto, estípulas pequeñas, aparecen en pares y el envés presenta pequeñas cavidades, llamadas domotia. Las flores son blancas, de aroma dulce, dispuestas en racimos y tiene una autofecundación de 90 a 95 %. Los frutos son drupas de color verde y al madurar de color rojo, posee epicarpio carnoso y doble semilla de aspecto aplanado, (Rojo *et al.*, 2014). Las variedades más conocidas son: Típica, Bourbon, Mundo Novo, Catuai Vermelho, Caturra (rojo y amarillo), Blue Mountain, Lempira, Castillo, Tupí (López *et al.*, 2016; Romero y Camilo, 2019).

4.3 Ubicación geográfica y distribución de *Coffea arabica* L.

C. arabica L., tiene una amplia adaptabilidad a las condiciones ecológicas (Encalada *et al.*, 2016), según Piloza *et al.* (2022) en Ecuador se cultiva café en 23 de las 24 provincias, el 61.17 % de los cafetales se encuentran el litoral ecuatoriano, dominando con el 24.25 % la provincia de Manabí. La sierra ecuatoriana cubre el 30.77 % del total de café, siendo Loja el mayor productor aportando el 13.9 %. La Amazonía produce el 6.67 %, del cual el 2.14 % proviene de Zamora Chinchipe. La Región Insular tributa con el 0.04 % (Figura 1).



Figura 1. Distribución del cultivo de café por especies, en las provincias del territorio ecuatoriano.

Fuente: Pozo, 2014.

4.4 Erosión genética del café

El consumo de café es a gran escala, esto lo constituye una fuente de crecimiento para países en desarrollo (Rojo *et al.*, 2014); sin embargo, los recursos genéticos de la especie se están perdiendo de manera acelerada (WCR, 2018). Por otra parte, las semillas no se pueden guardar en bóvedas, porque al ser recalcitrantes o intermedias deben conservarse como plantas vivas en el campo; sin embargo, los bancos de germoplasma enfrentan enormes desafíos como escaso financiamiento, plantas y personal envejecido, deforestación e invasión ilegal, como consecuencia provoca la erosión genética de la especie (Pérez *et al.*, 2014).

4.5 Métodos de propagación de las plantas

Es pertinente propagar plantas con características selectivas, como la resistencia a enfermedades, rendimiento, calidad, contenido de cafeína, entre otras, (Suárez, 2020).

4.5.1 Propagación sexual

Los principales problemas de las semillas es su conservación a mediano y largo plazo, porque pierden calidad y poder germinativo, al ser recalcitrantes o intermedias (Cruz y Irigoyen, 2005; González *et al.*, 2015; Nápoles-Vinent *et al.*, 2022); además, la germinación (semillas secas) es lenta y asincrónica (Coa *et al.*, 2014) y puede transmitir enfermedades, como el virus CoRSV (Dicorhavirus de la mancha anular del café) (Sastry *et al.*, 2019).

4.5.2 Multiplicación asexual

Esta se da por simple fragmentación de la planta, donde las plantas hijas son idénticas a la planta madre, porque no existe intercambio genético. Las formas más comunes de multiplicación vegetativa son: por estacas, esquejes, injertos, acodos, raíces y cultivo de tejidos (Cruz y Irigoyen, 2005).

4.6 Historia del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El desarrollo de cultivos de tejidos vegetales (CTV) se origina a partir de un suceso de descubrimientos; es así que, Duo Monceau al extraer un anillo de la corteza de planta de Olmo observó un tejido amorfo para cicatrizar la herida (callo); posteriormente, Hooke (1665) describió la célula, luego Schleiden (1838) y Schwann (1839) demostraron que las células tienen una vida independiente y formularon la “teoría de la totipotencia celular”, al final Haberlandt (1902) realizó el primer intento fallido de CTV *in vitro* (Camarena *et al.*, 2014; Suárez, 2020). White y Gautheret (1934) descubrieron el primer regulador de crecimiento (hormona) vegetal llamada “auxina IAA” (ácido 3-indolacético) y las vitaminas del complejo B respectivamente, luego Miller (1955) descubrió la segunda hormona llamada “cinetina”, estas dos hormonas forman el balance hormonal descubierto por Skoog y Miller (1957), responsables de la diferenciación del callo (Sharry *et al.*, 2015).

4.6.1 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en café

El cultivo *in vitro* consiste en regenerar plantas a partir de explantes inoculados en medios de cultivo. Tiene dos características fundamentales: la asepsia; es decir, en ausencia de gérmenes; y, el control de los factores que afectan al crecimiento (Sharry *et al.*, 2015). La base para los cultivos *in vitro* es la “teoría de la totipotencia celular”, que se refiere a la capacidad de la célula para regenerar una nueva planta, gracias a que las células tienen la información necesaria para regenerar otras células u otro organismo entero (Villavicencio *et al.*, 2012; Sharry *et al.*, 2015; Suárez, 2020). En ese contexto, Quiñones *et al.* (2020) realizaron experimentos exitosos usando explantes foliares jóvenes de café arábico, en medio de cultivo suplementado con 2,4-D y Kinetina; además, López-Gómez *et al.*, (2010) indican que los explantes proveniente de hojas inmaduras y hojas jóvenes de café presentan mejor capacidad de respuesta callogénica.

4.6.2 Ventajas del cultivo *in vitro*

La práctica del cultivo *in vitro* posee grandes ventajas como:

- Permite obtener plantas libres de patógenos y de forma masiva
- Facilita el intercambio de material genético e introducción cuarentenaria.
- Permite ampliar la base genética de una especie.
- Reduce el riesgo de pérdidas genéticas
- Facilita la producción y extracción de productos químicos valioso en volumen.
- Obtiene plántulas resistentes a factores de salinidad, temperaturas bajas o altas (Camarena *et al.*, 2014; Sharry *et al.*, 2015).

4.6.3 Desventajas del cultivo *in vitro*

Según Camarena *et al.* (2014) algunas deventajas de esta técnica son:

- Requiere de personal especializado.
- Requiere de infraestructura y de equipamientos especiales.
- La adquisición de productos químicos es costosa y difícil.
- Propensión del tejido a oxidación y crecimiento anómalo.
- Existen pérdidas durante todo el proceso.
- Necesitan hacer una evaluación constante

4.6.4 Elementos fundamentales del cultivo *in vitro*.

4.6.4.1 Explante

Es un fragmento de tejido u órgano (hoja, tallo, raíz, yemas, capítulos florales, anteras, etc.) separada del vegetal (Camarena *et al.*, 2014). Para elegir el explante se recomienda: un pretratamiento de la planta donante, partes de la planta en crecimiento activo, sano y considerar la época del año, ya que el explante constituye la principal fuente de contaminación. De acuerdo a Levitus *et al.* (2017), si el explante es muy grande existe mayor posibilidad de obtener callos; sin embargo, se corre el riesgo de una mayor contaminación; por otro lado, si el explante es muy pequeño se requiere un medio de cultivo más complejo.

4.6.4.2 Asepsia

Según Levitus *et al.* (2017) las pérdidas por contaminación en laboratorios de micropropagación se estiman alrededor del 10 %, debido a la dificultad de tener cultivos totalmente asépticos. En un cultivo aséptico no se produce la proliferación de hongos y bacterias. Generalmente, son dos las fuentes de contaminaciones más incidentes: a) microorganismos presentes en el interior o superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio (Sharry *et al.*, 2015).

4.6.4.3 Condiciones ambientales para la incubación

Es un factor trascendental en el CTV; por tal motivo, se ejecuta en condiciones controladas de temperatura, luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene. Para ello, se requiere de: cámaras climatizadas o cuartos con aire acondicionado (frío-calor), temperaturas entre 21 a 28 °C, elevada humedad atmosférica de 80 a 90 %, fotoperíodo de 16 horas luz y una radiación entre 50 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sharry *et al.*, 2015; Levitus *et al.*, 2017; Suárez, 2020).

4.6.4.4 Medios de cultivo

Un medio de cultivo es una solución nutritiva, con compuestos orgánicos y sales inorgánicas, necesarios para la nutrición, desarrollo y manipulación de los cultivos (Levitus *et*

al., 2017). Existen diferentes formulaciones (Suárez, 2020), a los medios de cultivo se le suministran fuentes de: carbono, nutrientes minerales, vitaminas, reguladoras del crecimiento y agente gelificante, este último responsable de la consistencia del medio de cultivo (sólido, semisólido o líquido). El medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) es el más práctico (Tabla 2). En ocasiones se emplea carbón activado, cuya función es absorber compuestos tóxicos de la micro atmósfera gaseosa o el exceso de reguladores del crecimiento (Levitus *et al.*, 2017).

Tabla 2. Formulación de macro y micronutrientes de cuatro medios de cultivos.

COMPUESTOS	MEDIOS BÁSICOS (mg L ⁻¹)				
	MS	WHITE	B5	N6	WPM
NH ₄ NO ₃	1650	400
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	300	556
KNO ₃	1900	80	2500	2830
KCl	65
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	463
K ₂ SO ₄	990
KH ₂ PO ₄	170	400	170
CaCl ₂ 2H ₂ O	333	150	166	96
MgSO ₄ 7H ₂ O	181	720	250	185	370
KH ₂ PO ₄	170
FeNa EDTA	36.7
H ₃ BO ₃	6.2	1.5	3	1.60	6.2
MnSO ₄ H ₂ O	16.9	7	10	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	3	2	1.50	8.6
KL	0.83	0.75	0.75	0.8
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.025	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	27.8	27.85	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.25	37.3
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	200	150
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5

MS = Medio de Murashige y Skoog (Plant Physiology. 15: 473 - 497.1962)

N6 = Medio de Chu,C.C. *et al.*. (Sci. Sinica 18: 659 - 668. 1975)

B5 = Medio de Gamborg, *et al.*. (Exp.Cell Res. 50: 151 - 158. 1968)

WHITE=Medio de White (Plant Physiology 9:585-600. 1934)

WPM= Medio de Lloyd y McCown (International Societies 30:421-427. 1980)

Fuente: (Sharry *et al.*, 2015; Levitus *et al.*, 2017; Suárez, 2020).

Elaboración: Autor

4.6.4.5 Vitaminas

Los complejos vitamínicos contienen elementos esenciales para los explantes, favorecen el crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular. Las principales vitaminas son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina, etc. (Sharry *et al.*, 2015).

4.6.4.6 Reguladores de crecimiento

Según Suárez (2020), los reguladores de crecimiento son compuestos naturales (hormonas) o sintéticos, que a muy bajas concentraciones, afectan los procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. Los tejidos *in vitro* no cuentan con todos los nutrientes necesarios; por esa razón, a los medios de cultivos se los suplementa con reguladores de crecimiento. Los reguladores de crecimiento clásicos son las auxinas, citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno. Existe una relación entre los reguladores de crecimiento y el genotipo (Levitus *et al.*, 2017).

a) Auxinas

Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular, promover la división celular, el desarrollo meristemático, la dominancia apical e incita la formación de raíces adventicias y embriones somáticos (Alcántara *et al.*, 2019; Ryavalad *et al.*, 2019;). Según Suárez (2020), las principales auxinas sintetizadas por las plantas son: ácido indolacético (AIA) y ácido indol butírico (AIB), y en laboratorio: ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y el picloram; además, Sharry *et al.* (2015) indica que las auxinas se utilizan de forma individual en la fase de enraizamiento o combinadas con citocininas en la fase de multiplicación.

b) Citocininas o citoquininas

Hormonas que inducen la división celular, iniciación y elongación de las raíces, desarrollo de yemas axilares, retardo de la senescencia de hojas, obstaculizan la dominancia apical; y, promueven la multiplicación y proliferación de tallos y yemas laterales. Las principales citocininas naturales son la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP), y en laboratorios se produce la benzilaminopurina (BAP), la kinetina (KIN) y el tidiazuron (TDZ) (Sharry *et al.*, 2015; Alcántara *et al.*, 2019;).

c) Giberelinas

Estas hormonas promueven la floración, alargamiento de los entrenudos mediante la división y elongación celular, interrumpen la dormancia de embriones aislados o semillas. La síntesis generalmente ocurre en las hojas jóvenes. La giberelina más usada es el ácido giberélico (GA3) (Alcántara *et al.*, 2019; Suárez, 2020).

4.6.5 Problemas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

4.6.5.1 Contaminación de los explantes

Un contaminante es cualquier microorganismo introducido en un cultivo o medio de cultivo. Las plantas en su ambiente natural están asociadas a una fauna y flora bacteriana sin verse afectados (simbiosis); sin embargo, en condiciones de cultivo *in vitro*, estos

microorganismos se convierten en contaminantes o agentes facilitadores de contaminación para los explantes (Suárez, 2020). Además, el ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación, es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos, que pueden provocar la destrucción de los cultivos, los principales microorganismos son: hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus (Sharry *et al.*, 2015).

4.6.5.2 Oxidación fenólica

Es un oscurecimiento del tejido vegetal, por efecto de los radicales libres de los componentes celulares, genera daño, inhibe el crecimiento e incluso provoca necrosis y muerte del tejido vegetal, la segregación de fenoles depende de tipo de explante y está estrechamente relacionada con el nivel oxidativo y nitrosativo que sufren las células cultivadas. A nivel de laboratorio existen varias estrategias para controlar la oxidación fenólica: usar explantes en estado juvenil o crecimiento activo, disminuir la intensidad de la luz de cultivo y agregar adsorbentes como carbón activado al medio de cultivo, entre otras técnicas (Sharry *et al.*, 2015).

4.6.5.3 Vitrificación

Según Sharry *et al.* (2015), los brotes *in vitro* presentan aspecto vítreo, transparente, turgente y fragilidad en hojas y tallos; está regulado por la humedad relativa, potencial de agua, fotosíntesis y la transpiración, esto conlleva a desordenes fisiológicos (mayor absorción de agua, menor contenido de clorofila, menor capacidad fotosintética, hipo lignificación), anatómicos (epidermis y cutículas delgadas, grandes espacios intercelulares, estomas anormales) y morfológicos (entrenudos cortos, color anormal, hojas más gruesas elongadas y arrugadas, tallos de mayor diámetro) en condiciones de cultivo *in vitro*. Este problema se controla con la disminución de carbohidratos, buena ventilación y emplear altos niveles de CO₂.

4.7 Callogénesis *in vitro*

Callo, es un grupo de células no diferenciadas en continua división, para formar una masa celular desorganizada (Razdan, 2003; Setiawan *et al.*, 2020). En el explante se desencadena una serie de procesos en el metabolismo de las células, provocando una división activa y desdiferenciación celular (George, 2008). La callogénesis tiene tres fases; una fase inicial (Lag.), donde predominan las células alargadas y redondeadas, estas últimas en mayor proporción; en la fase exponencial proliferan células redondas y alargadas en etapa de división celular; finalmente, en la fase de muerte, las células presentan necrosis y pérdida de la integridad de la membrana celular, así como falta de turgencia (Sánchez y Alvarenga, 2015).

Según Rodríguez *et al.* (2014) la callogénesis es dependiente del explante y de las fitohormonas; de acuerdo a Córdova *et al.* (2014), las auxinas se unen a receptores externos e internos (células blanco), mediante el proceso quimiosmótico de transporte polar, los que a la

vez inducen la expresión de genes que codifican factores proteicos que aumentan la plasticidad y ablandan la pared celular, generando la dilatación de la célula (turgencia); mientras que, las citocininas se unen a receptores tipo histidina quinasa que activan a las histidinas fosfotransferasas. Estas enzimas transmiten la señal de los receptores a los reguladores nucleares de respuesta, que activan o reprimen la transcripción de genes, que median las acciones fisiológicas de las células.

Levitus *et al.* (2017) indica que, durante la desdiferenciación se pueden alterar los procesos celulares, que resultan en cambios genómicos (variación somaclonal) de los tejidos de plantas regeneradas, uno de los más frecuentes es la inestabilidad cromosómica. Son varios los factores que influyen en la aparición de variación somaclonal, entre los cuales están: el tipo de explante, el estado físico del medio de cultivo, la vía de regeneración, estrés, genotipo; y, tipo y concentración de las fitohormonas, siendo la auxina 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), un inductor de inestabilidad, ya que puede alterar la estructura de la cromatina, sobre todo en la fase de crecimiento del callo y la iniciación de los vástagos.

Para determinar la variación somaclonal entre las plantas donadoras con los callos y entre callos se puede usar la técnica de los AFLP (Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados); en ese sentido, un estudio en el cultivo de *Hevea brasiliensis* (árbol del caucho) demostró que puede existir una similitud máxima y mínima entre callos del 93 y 74 %, respectivamente (Medina *et al.*, 2007).

Las nuevas células que aparecen adquieren diferentes colores y así mismo aporta información de que están constituidos, el callo blando de color crema amarillado contiene células elongadas (friables), este color aparece en los primeros días de formación. El color marrón (café), suelen aparecer después de los 50 días de evaluación, debido al estrés ambiental o por la presencia de las enzimas oxidadas, y en este tipo de callo ya no existe proliferación de células vegetales, en ocasiones aparece un callo de color amarillo brillante cuya apariencia es compacta (Roca y Mroginski, 1993; Liu *et al.*, 2015).

La textura de callo puede ser friable o compacta. El término friabilidad se refiere a la capacidad de disgregación, ya que parecen granos, los callos de textura friable son translucidos, se pueden observar visualmente, presenta un gran espacio intercelular y enlaces tenues de célula a célula; es decir, se rompe fácilmente; mientras que, un callo de textura compacta no son translucidos y tiene un enlace denso de célula a célula; por lo que, el espacio entre las células no es visible y las partículas de los callos no se separan fácilmente (Setiawan *et al.*, 2020).

Generalmente, para formar brotes (caulogénesis) se requiere una relación elevada de citocinina-auxina. Al cultivar callos *in vitro* manteniendo una alta relación de citoquininas-

auxinas, se producen células meristemáticas que se dividen y generan otras que se diferencian para formar yemas, tallos y hojas; mientras que, si se invierte esta proporción, se favorece la formación de raíces (rizogénesis); sin embargo, el resultado final no solo depende de las cantidades de reguladores del crecimiento exógenos agregadas al medio de cultivo, sino del balance entre las hormonas exógenas y las endógenas de los tejidos vegetales (Godoy *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2014). Finalmente, formadas las plántulas *in vitro* con 2 a 5 pares de hojas se transfirieron a condiciones *ex vitro* para su aclimatación (Ramos *et al.*, 2009).

4.7.1 Fotoperíodo

Según Balcazar (2016), el fotoperiodismo es la respuesta a las variaciones estacionales de la longitud del día y fue descubierto hace unos 70 años por Garner y Allard. La luz es fundamental en el proceso de la fotomorfogénesis, debido a que induce el rápido cambio de la expresión genética que conduce al patrón normal de desarrollo en los callos. La inducción y proliferación de callo puede darse en condiciones de oscuridad, luz continua o en fotoperíodo regular, dependiendo de la especie; generalmente, los cultivos de callos se inician sin la presencia de luz y la oscuridad puede beneficiar su proliferación.

El fotoperíodo influye en la fisiología de las plantas, porque permite la regularización de sus funcionamientos biológicos (Pérez y Martínez-Laborde, 1994); mientras que, en el cultivo de tejidos cumple un rol específico en la morfogénesis, varios estudios realizados indican que longitudes de onda entre 300 y 900 nm son capaces de influenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas; además, la luz tiene un efecto en la multiplicación y formación de embriones somáticos (Casierra-Posada y Peña-Olmos 2015).

5 METODOLOGÍA

5.1 Ubicación del área de estudio

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal (LMV) de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, el cual se encuentra ubicado al sur de la ciudad de Loja, con las siguientes coordenadas geográficas: 04° 00' 00" S, 79° 12' 00" O a una altitud de 2 135 m.s.n.m.

Según Holdridge (1983) ecológicamente corresponde a la zona de vida Bosque húmedo Montano Bajo (Bs-MB), con una temperatura media anual de 15.3 °C, precipitación de 900 mm por año y una humedad relativa del 71.96 %. El clima es templado lluvioso (Ron, 2020).

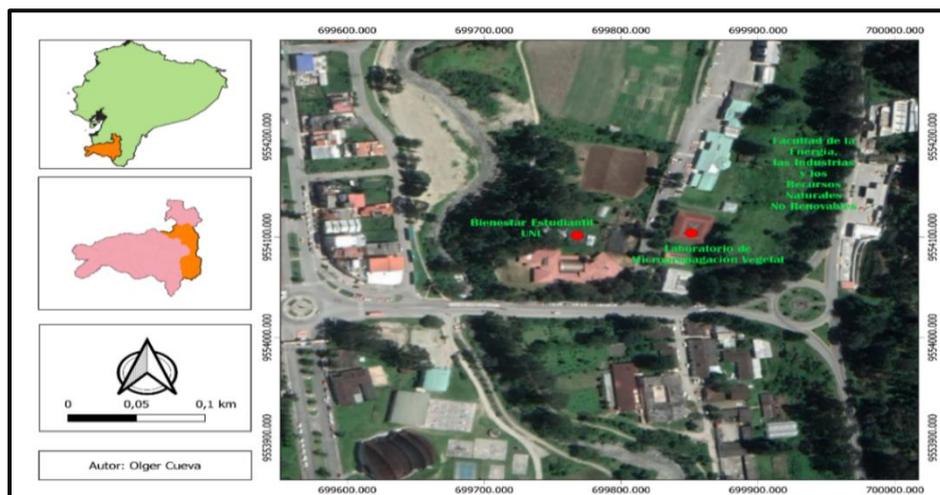


Figura 2. Ubicación espacial del Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

5.2 Metodología para la evaluación del balance hormonal auxina-citocinina en la formación de estructuras callogénicas, en explantes de *Coffea arabica* L., obtenidos en invernadero

La metodología empleada en la evaluación del balance hormonal auxina-citocinina fue la utilizada en el LMV de la Universidad Nacional de Loja, la misma que se detalla a continuación.

5.2.1 Obtención y selección del material vegetal

Las plántulas fueron obtenidas del vivero, seleccionando las que presentaron mejores características fenotípicas (tamaño y estado fitosanitario). Posteriormente, se las ingresó al cuarto de aclimatación del LMV en donde se realizó un tratamiento de desinfección mediante la aplicación de una solución de fungicida-bactericida (2 g L⁻¹ Benomil + 2 mL L⁻¹ Kasumin), para reducir la carga patógena, las aspersiones se aplicaron cada semana durante dos meses.

5.2.2 Desinfección del material vegetal

Se seleccionaron y colectaron hojas del estrato medio de la plántula (hojas jóvenes) que presentaron el mejor estado fitosanitario (hojas bien desarrolladas, de buena coloración y libres del ataque de patógenos e insectos).

Se inició con el lavado del material vegetal (hojas) en una solución de detergente y/o jabón líquido más agua destilada estéril, tanto por el haz y el envés, y se finalizó aplicando tres enjuagues con agua destilada estéril.

Posteriormente, las hojas prelavadas se colocaron en vasos de precipitación y se llevaron a la cámara de flujo laminar para desinfectarlas en condiciones asépticas, en donde, las hojas se sumergieron en alcohol al 70 % durante 1 minuto, y se enjuagaron con agua destilada estéril. Seguidamente, las hojas fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio $\text{Na}(\text{ClO})_2$ al 25 % más 3 gotas de Tween 80 por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se hicieron tres enjuagues o aclareos con agua destilada estéril más antioxidantes (100 mg L^{-1} ácido ascórbico + 150 mg L^{-1} ácido cítrico), para evitar la oxidación fenólica de los tejidos vegetales.

5.2.3 Aislamiento de los explantes

Luego de la desinfección del material vegetal, se procedió a obtener los explantes foliares de café. Para ello, con la tijera quirúrgica se eliminaron los bordes, la zona basal, apical y la nervadura central de la hoja. Con un bisturí, se dividió la zona restante en segmentos de 1 cm^2 aproximadamente; posteriormente, los explantes fueron sembrados sobre la superficie del medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (MS, 1962).

5.2.4 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal estuvo constituido con sales minerales de Murashige y Skoog (1962), y enriquecido por el complejo vitamínico B5 (tiamina 10 mg L^{-1} , myo-inositol 100 mg L^{-1} , piridoxina 1 mg L^{-1} , ácido nicotínico 2 mg L^{-1} , glicina 1 mg L^{-1}), cisteína 25 mg L^{-1} , sacarosa 2 %, agar 0.6 %, Ergostim 1.5 mg L^{-1} y 2,4-D (auxina) y Kinetina (citocinina) en diferentes concentraciones, de acuerdo a los tratamientos (Tabla 2).

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 ± 0.2 con NaOH 1 N o HCl 1N. El medio de cultivo preparado se distribuyó en tubos de ensayo, dosificando un volumen de 10 mL en cada uno. Finalmente, se taparon con papel aluminio, y fueron esterilizados en la autoclave a 120°C de temperatura y 1.5 kg cm^{-2} de presión, durante 20 minutos.



Figura 3. Preparación de medio de cultivo. **A)** Sales MS, vitaminas, ergostim y hormonas utilizadas. **B)** Tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D y KIN. **C)** Distribución de los tratamientos en los tubos de ensayo.

5.2.5 *Siembra in vitro de los explantes*

En la fase de inducción de callos, la siembra *in vitro* de los explantes foliares de café se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones de total asepsia, colocando un explante por tubo de ensayo. Los materiales que se utilizaron en el proceso fueron: bisturí, pinzas, caja Petri y mechero Bunsen. Finalmente, se identificó cada tubo con su respectivo tratamiento, y fueron llevados a la sala de incubación, donde permanecieron a ± 23 °C, en oscuridad, por un lapso de 90 días (Figura 4).

5.2.6 *Diseño experimental*

En esta fase se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial, donde los factores fueron dos reguladores del crecimiento, resultando ocho tratamientos, con tres repeticiones. En la Tabla 3, se describen los tratamientos con las concentraciones hormonales (auxina-citocinina) empleadas en el ensayo inducción de estructuras callogénicas en explantes de hojas en *C. arabica* L., provenientes de plántulas de invernadero. La fórmula correspondiente al diseño experimental fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + e_{ij}$$

En donde los parámetros se estimaron de la siguiente manera:

Y_{ij} = Variable a evaluarse.

μ = Promedio general del ensayo.

T_i = Efecto de la auxina.

β_j = Efecto de la Kinetina.

(Tβ)_{ij} = Efecto producido por la interacción entre T x β.

e_{ij} = Error experimental en cada observación.

i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 t (Tratamientos).

j = 1, 2, 3 r (Repeticiones).

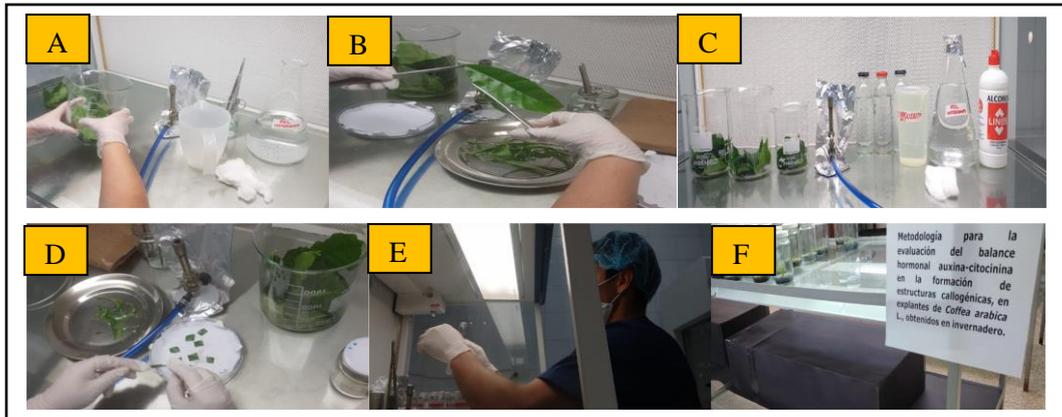


Figura 4. Implementación del primer objetivo. **A)** Materiales utilizados. **B)** Desinfección de las hojas con $\text{Na}(\text{ClO})_2$. **C)** Eliminación de bordes de la hoja de café. **D)** Disección del material vegetal. **E)** siembra de los explantes y **F)** Tubos de ensayo en cuarto de incubación.

Tabla 3. Tratamientos para evaluar la interacción de las concentraciones hormonales en la inducción de callos en explantes de hoja en *Coffea arabica* L.

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO		CÓDIGO
	2,4-D (mg L^{-1})	KINETINA (mg L^{-1})	
T0	0.0	0.0	A0C0
T1	1.0	0.0	A1C0
T2	2.0	0.0	A2C0
T3	3.0	0.0	A3C0
T4	1.0	0.5	A1C1
T5	2.0	0.5	A2C1
T6	3.0	0.5	A3C1
T7	0.0	0.5	A0C1

Leyenda: A: Auxina y C: Citocinina.

Tabla 4. Distribución espacial del diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial.

A0C0	A1C0	A2C0	A3C0	A1C1	A2C1	A3C1	A0C1
A2C0	A0C0	A3C0	A1C1	A1C0	A0C1	A2C1	A3C1
A1C0	A2C0	A2C1	A0C1	A1C1	A3C1	A0C1	A0C0
A0C1	A3C0	A0C0	A2C1	A2C0	A1C0	A0C1	A3C1
A2C0	A0C1	A1C0	A3C0	A2C1	A0C0	A1C1	A0C1
A1C1	A0C0	A1C1	A0C1	A3C1	A1C0	A2C0	A0C0
A0C0	A3C1	A2C1	A3C0	A0C0	A2C0	A1C1	A2C1
A2C0	A1C0	A3C0	A0C0	A1C1	A1C0	A0C1	A2C0
A0C1	A0C0	A2C0	A1C1	A3C0	A3C1	A1C0	A1C1
A3C0	A1C1	A1C0	A2C1	A0C1	A0C0	A3C1	A3C1
A1C0	A3C1	A3C0	A2C1	A1C1	A3C0	A3C1	A2C0
A3C1	A3C1	A2C0	A0C0	A0C1	A1C0	A2C1	A3C0
A2C1	A1C0	A3C1	A3C0	A0C1	A3C0	A2C1	A2C0
A3C0	A0C0	A1C1	A2C0	A1C0	A1C1	A2C1	A0C1
A1C0	A2C1	A3C1	A3C0	A1C1	A2C0	A2C1	A0C0

Leyenda: A: Auxina y C: Citocinina.

5.2.7 Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue el tubo de ensayo, en el cual se sembró 1 explante por tubo, dando un total de 45 explantes por tratamiento y 360 unidades experimentales para todo el ensayo, se realizaron tres repeticiones, así:

• Unidad experimental:	Un tubo de ensayo
• Unidad de muestreo:	Un explante.
• Número de explantes por tubos de ensayo:	1
• Número de tratamientos:	8
• Número de repeticiones:	3
• Número de tubos de ensayo por repetición:	15
• Número total de tubos de ensayo por tratamiento:	45
• Número total de tubos de ensayo del experimento:	360
• Número total de explantes del experimento:	360

5.2.8 Parámetros de evaluación

La evaluación de los parámetros se realizó cada cinco días, se inició en el tercer día después de la inoculación *in vitro* de los explantes, hasta finalizar el período de control de 90 días. La contaminación, oxidación fenólica y friabilidad se evaluó por observación directa, con ayuda del estereoscopio binocular, de acuerdo con la experiencia en el laboratorio; mientras que, para la variable color del callo se codificaron según la tabla de colores de Munsell (Munsell, 1912), mediante observación directa. Los parámetros de evaluación fueron:

- Porcentaje de formación de callos.
- Días a la formación del callo.
- Color del callo.
- Número de explantes que formaron callo.
- Friabilidad del callo.
- Porcentaje de contaminación.
- Días a la contaminación.
- Porcentaje de oxidación fenólica.
- Días a la oxidación fenólica.
- Porcentaje de sobrevivencia.
- Días a la sobrevivencia.

La hoja de campo, para la toma de datos estuvo compuesta por un código **TnRnTen** significando; **Tn** el tratamiento, **Rn** la repetición y **Ten** tubo de ensayo evaluado (Anexo 1).

Para evaluar la formación de callo se elaboró la ficha, en donde estuvo especificado el porcentaje de formación de callos (%), el color del callo (CL) y la friabilidad del callo (CN) (Anexo 2).

5.2.9 Análisis estadísticos de datos

Para evaluar la interacción del balance hormonal auxinas (2,4-D) y citocininas (Kinetina) en la fase de inducción de callos, se analizó los datos de las diferentes variables evaluadas del ensayo en el programa estadístico InfoStat versión 2020, donde se realizó un análisis de homogeneidad (Levene) y normalidad (Shapiro Wilk); además, se realizó una prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis y el test de comparación Bonferroni al 5 % de probabilidad, con el objetivo de identificar y analizar si existen diferencias en sus medias y varianzas; y, así conocer que tratamiento alcanzó el mejor resultado.

5.3 Metodología para determinar la influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas de *Coffea arabica* L.

En la presente investigación científica, la metodología aplicada en el ensayo de influencia del fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, fue la empleada en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, la cual se detalla a continuación.

5.3.1 Obtención del material vegetal

Los callos del primer objetivo se seleccionaron para inocularlos y someterlos a las dos condiciones planteadas, de total oscuridad y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Las características de los callos inoculados fueron: coloración crema (indicativo de poseer células embriogénicas) y consistencia disgregable (friable), según lo descrito por Deo *et al.* (2009), Espinoza *et al.* (2012), Hernández *et al.* (2021), y de acuerdo con la experiencia en el laboratorio.

5.3.2 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo basal fue elaborado con las sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), enriquecido por el complejo vitamínico B5 (tiamina 10 mg L⁻¹, myo-inositol 100 mg L⁻¹, piridoxina 1 mg L⁻¹, ácido nicotínico 2 mg L⁻¹, glicina 1 mg L⁻¹), cisteína 25 mg L⁻¹, sacarosa 2 %, agar 0.6 % ergostim 1.5 mg L⁻¹ y reguladores de crecimiento 2,4-D (auxina) y Kinetina (citocinina) en diferentes concentraciones. En esta fase se utilizó la mitad de la concentración de las dosis hormonales del mejor tratamiento obtenido en la evaluación del primer objetivo; es decir, se empleó una concentración de 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.25 mg L⁻¹ de KIN (Kinetina) (Tabla 4). Finalmente, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 ± 0.2 con NaOH 1N o HCl 1N.

El medio de cultivo preparado fue distribuido a razón de 10 mL en cada tubo de ensayo, a los cuales se les colocó tapas de papel aluminio y fueron esterilizados en la autoclave a 120 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión, durante 20 minutos.

5.3.3 Proliferación de callos

La siembra *in vitro* de los callos se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia. Los materiales utilizados en el proceso de inoculación fueron: bisturí, pinzas, caja Petri y mechero Bunsen. Utilizando las pinzas y el bisturí, se obtuvieron los explantes, mismos que se inocularon a razón de un callo por tubo de ensayo. Posteriormente, se incubaron en el cuarto de luces. Dos de los tratamientos estuvieron sometidos a fotoperíodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura de ± 23 °C, durante 45 días; mientras que, los dos tratamientos restantes estuvieron en condiciones de total oscuridad, bajo la misma temperatura y tiempo.

5.3.4 Diseño experimental

El diseño experimental aplicado fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial, donde los factores fueron: el fotoperíodo y los reguladores del crecimiento, con dos niveles cada uno, resultado cuatro tratamientos y tres repeticiones, los tratamientos fueron divididos en dos grupos: el primero grupo estuvo en condiciones de total oscuridad y el otro en fotoperíodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), los grupos contaron con un testigo y con un tratamiento enriquecido con hormonas reducidas a la mitad del mejor tratamiento del primer ensayo (A1C1). En la Tabla 5, se describen los tratamientos con las concentraciones hormonales (auxina-citocinina) usadas en el ensayo inducción de estructuras callogénicas en explantes de *C. arabica* L., provenientes de plántulas de invernadero, el modelo experimental empleado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + e_{ij}$$

En donde los parámetros se estimaron de la siguiente manera:

Y_{ij} = Variable a evaluarse.

μ = Promedio general del ensayo.

T_i = Efecto del fotoperíodo.

β_j = Efecto del regulador de crecimiento

$(T\beta)_{ij}$ = Efecto producido por la interacción entre T x β

e_{ij} = Error experimental en cada observación.

$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ t (Tratamientos).

$j = 1, 2, 3$ r (Repeticiones).

Tabla 5. Tratamientos para evaluar la interacción de hormonas en la proliferación de estructuras callogénicas de *Coffea arabica* L.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIONES		CÓDIGO
	2,4-D (mg L ⁻¹)	KINETINA (mg L ⁻¹)	
T0	0.0	0.0	SHFOT
T1	0.5	0.25	A1C1FOT
T2	0.0	0.0	SHOSC
T3	0.5	0.25	A1C1OSC

Leyenda: SHFOT: Sin hormonas y con fotoperíodo, A: auxina, C: citocinina, FOT: fotoperíodo, SHOSC: Sin hormonas y a oscuridad; y, OSC: oscuridad.

Tabla 6. Distribución espacial del diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial.

A1C1FOT	A1C1OSC	SHFO	A1C1FOT	SHOSC
A1C1OSC	SHFO	SHOSC	A1C1OSC	A1C1FOT
SHFO	A1C1FOT	A1C1OSC	A1C1OSC	SHFO
A1C1OSC	SHFO	SHOSC	A1C1FOT	SHOSC
A1C1FOT	A1C1OSC	SHOSC	A1C1OSC	SHFO
SHOSC	SHFO	A1C1OSC	SHOSC	A1C1FOT
A1C1OSC	SHFO	A1C1OSC	A1C1FOT	SHOSC
A1C1FOT	SHFO	A1C1OSC	SHOSC	SHFO
A1C1OSC	SHOSC	A1C1FOT	SHFO	A1C1FOT
A1C1FOT	SHOSC	A1C1FOT	SHFO	SHOSC
SHOSC	A1C1OSC	SHFO	A1C1OSC	SHOSC
A1C1FOT	SHFO	SHOSC	SHFO	A1C1FOT

Leyenda: A: Auxina y C: Citocinina.

5.3.5 Especificaciones del diseño experimental

La unidad experimental fue el callo, con un total de 15 callos por tratamiento y 60 unidades experimentales para todo el ensayo como se muestra a continuación:

- Unidad experimental: Tubo de ensayo
- Unidad de muestreo: Un callo
- Número de callos por tubos de ensayo: 1
- Número de tratamientos: 4
- Número de repeticiones: 3
- Número de tubos de ensayo por repetición: 5
- Número total de tubos de ensayo por tratamiento: 15
- Número total de tubos de ensayo del experimento: 60
- Número total de callos del experimento: 60

5.3.6 *Parámetros de evaluación*

La evaluación de los parámetros se realizó por observación directa, cada cinco días, a partir del tercer día después de la inoculación *in vitro* de los callos, hasta los 45 días. Los parámetros de evaluación fueron:

- Porcentaje de estructuras callogénicas.
- Días a la formación de estructuras callogénicas.
- Proliferación de callos.
- Color del callo.
- Friabilidad del callo.
- Porcentaje de contaminación.
- Porcentaje de oxidación fenólica.
- Porcentaje de sobrevivencia.

El modelo de hoja de campo estuvo compuesto por un código TnRnTen significando; **Tn** el tratamiento, **Rn** la repetición y **Ten** tubo de ensayo evaluado (Anexo 1).

5.3.7 *Análisis estadístico de datos*

Para evaluar la influencia del fotoperíodo en la proliferación de los callos se probaron dos reguladores del crecimiento: la auxina (2,4-D) y citocinina (Kinetina), y dos niveles de fotoperíodo: 16 horas de luz y otro en total oscuridad, los datos de las diferentes variables se evaluaron a través del programa estadístico InfoStat versión 2020, donde se realizó un análisis de homogeneidad (Levene) y normalidad (Shapiro Wilk), con el objetivo de identificar y analizar si existieron diferencias significativas en sus medias, varianzas y conocer que tratamiento fue el mejor.

6 RESULTADOS

6.1 Fase de inducción de callos de *Coffea arabica* L., a partir de explantes obtenidos de plántulas de invernadero

6.1.1 Porcentaje de formación de callo en explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

En la fase de inducción de callos de *Coffea arabica* L., respecto a la variable formación de callos en total oscuridad, los tratamientos que formaron callos fueron T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) donde se obtuvo 15.6 % y 8.9 %, respectivamente; los demás tratamientos no formaron callos (Figura 5). Al aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se encontró que existen diferencias significativas (p-valor = 0.0073) a la formación de callos en explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad.

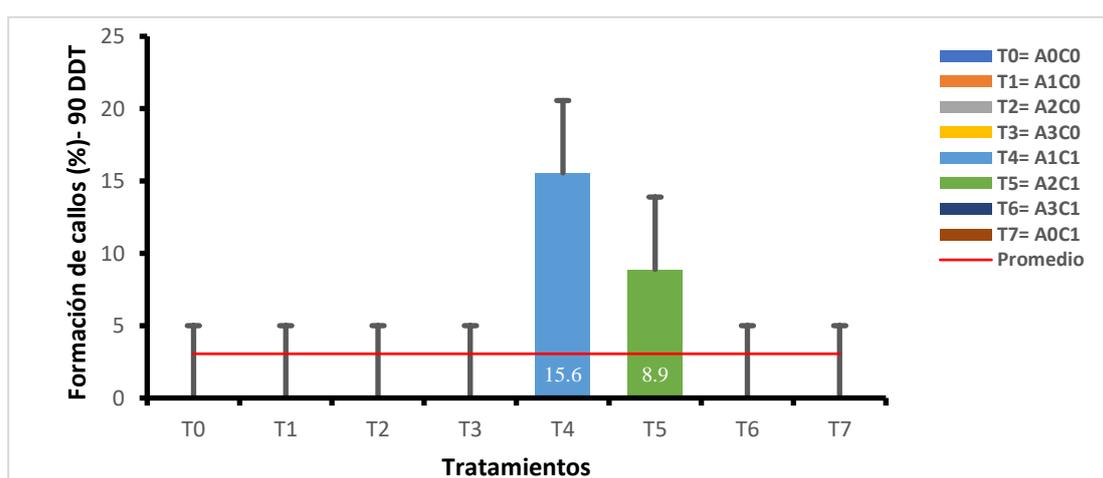


Figura 5. Porcentaje de formación de callo en explantes de *C. arabica* L., medias con letras distintas indican diferencia significativa entre ellas (p-valor = 0.0073).

6.1.2 Días a la formación de callos en explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

La formación de callos en los explantes inoculados en total oscuridad, empezó a partir de los 20 y 25 días después del tratamiento (DDT) en los tratamientos T4 y T5 respectivamente, T4 presentó 8.9 % de formación de callo equivalente a 4 explantes y hasta los 90 DDT de evaluación un explante formó un callo nuevo, donde alcanzó un máximo de 15.6 %; mientras que, T5 inició estos cambios con 6.7 % equivalente a 3 y se estabilizó a partir de los 55 DDT, donde alcanzó un máximo de 8.9 % (Figura 6).

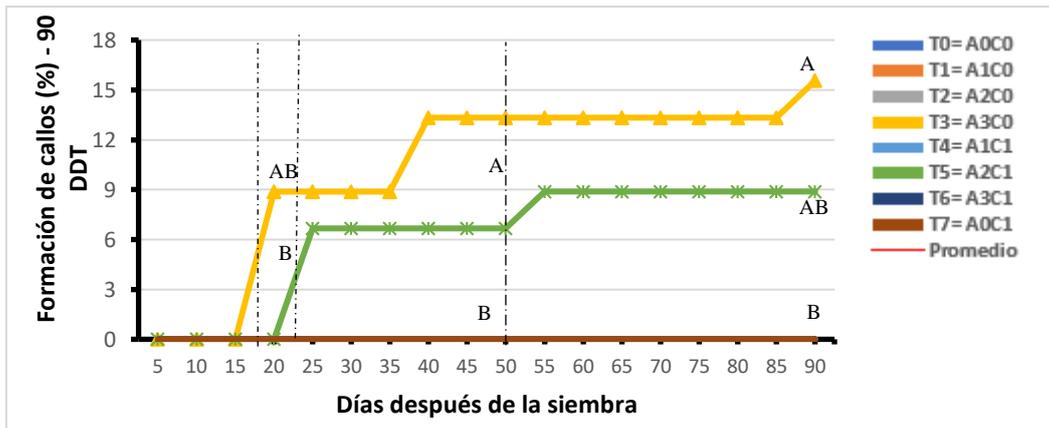


Figura 6. Días a la formación de callo en explantes de *C. arabica* L., letras distintas indican diferencias significativas entre sus medias, test Kruskal Wallis (p-valor = 0.0073).

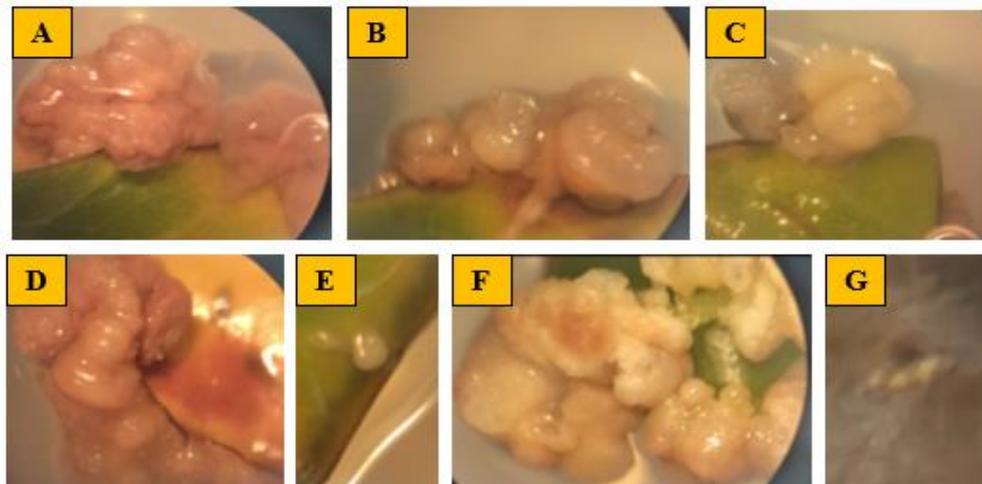


Figura 7. Callos formados, **A-E:** Tratamiento T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y **F-G:** Tratamiento T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN).

6.1.3 Color del callo en explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad a los 90 días de evaluación

El color de los callos de explantes de *C. arabica* L., que se presentaron en la investigación fueron diversos, ya que los callos adquirieron diferentes tonalidades. El color dominante fue el crema en los tratamientos T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) alcanzando 57.1 y 75 % respectivamente, le sigue el color café beige (carmelita) 28.6 y 25 % respectivamente; cabe mencionar que, el color amarillo únicamente se presentó en el T4 con 14.3 %. En consecuencia, en el T4 y T5 hubo 8.9 % y 6.7 % de explantes que generaron callos color crema, 2.2 % y 4.4 % de explantes que generaron callos color café beige respectivamente. Finalmente, en T4 2.2 % de explantes generó callo color amarillo (Figura 8).

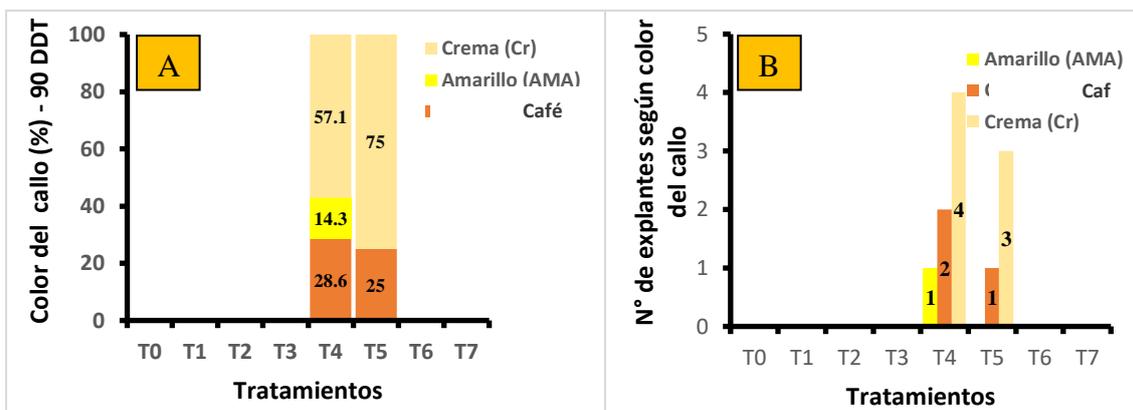


Figura 8. Color de los callos, **A:** Porcentaje de color del callo en explantes de *C. arabica* L., y **B:** Número de explantes según el color del callo.

6.1.4 Friabilidad del callo en total oscuridad

Para continuar la fase de inducción de callos de *C. arabica* L., dentro de los parámetros evaluados, también está la friabilidad del callo, que se define como la capacidad del callo para disgregarse. Todos los callos del T5 fueron friables (F) (100 %); mientras que, T4 presentó 86 % de friabilidad y el resto de callos no fueron friable (NF) (Figura 9).

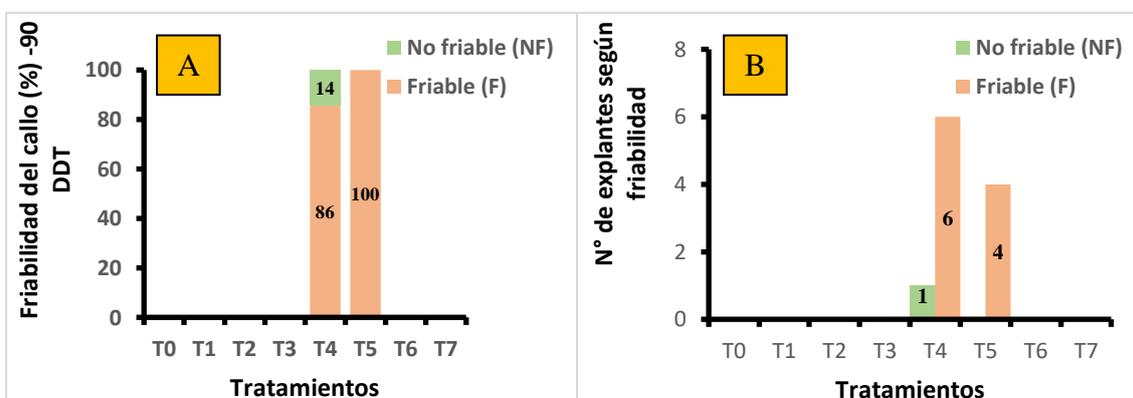


Figura 9. Friabilidad de los callos, **A:** Porcentaje de friabilidad de callo en explantes de *C. arabica* L., y **B:** Número de explantes según friabilidad del callo.

6.1.5 Porcentaje de contaminación de los explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

El análisis de varianza mostró que no existe diferencias significativas entre los tratamientos, ni interacción entre las hormonas (p -valor = 0.2493); además, el mayor porcentaje de contaminación presentaron los tratamientos T0 (testigo) y T2 (2.0 mg L^{-1} 2,4-D) con 6.7 %; mientras que, los tratamientos T3 (3.0 mg L^{-1} 2,4-D) y T5 (2.0 mg L^{-1} 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} KIN) no presentaron contaminación. Finalmente, la media general de contaminación fue de 3.61 % (Figura 10).

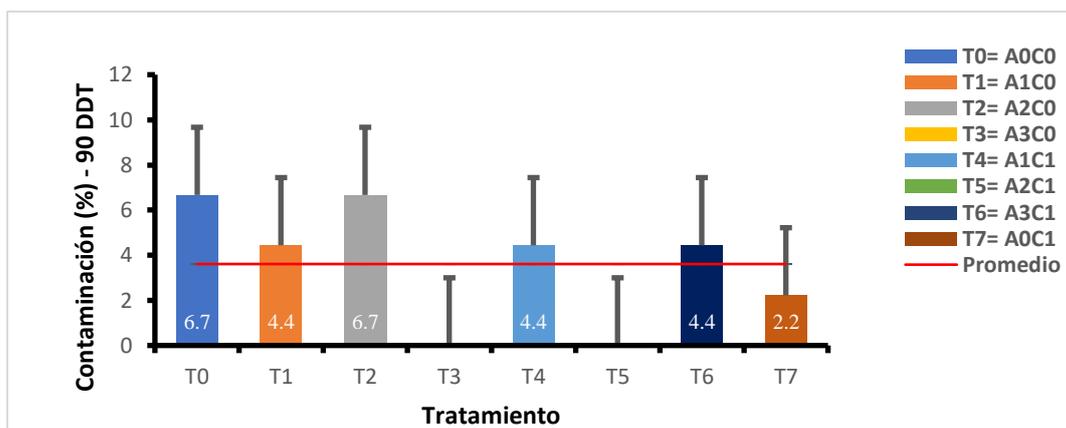


Figura 10. Porcentaje de contaminación en *C. arabica* L.

6.1.6 Días a la contaminación de los explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

Durante la evaluación, los explantes *in vitro* expresaron contaminación a partir de los 10 días en los tratamientos T2 y T6, con 4.4 y 2.2 %, a los 20 y 30 días presentaron 2.2 % T7 y T4 respectivamente, a los 40 días T0 presentó 4.4 % de contaminación; mientras que, T3 y T5 no presentaron contaminación. Finalmente, a los 50 días todos los tratamientos se estabilizaron. (Figura 11).

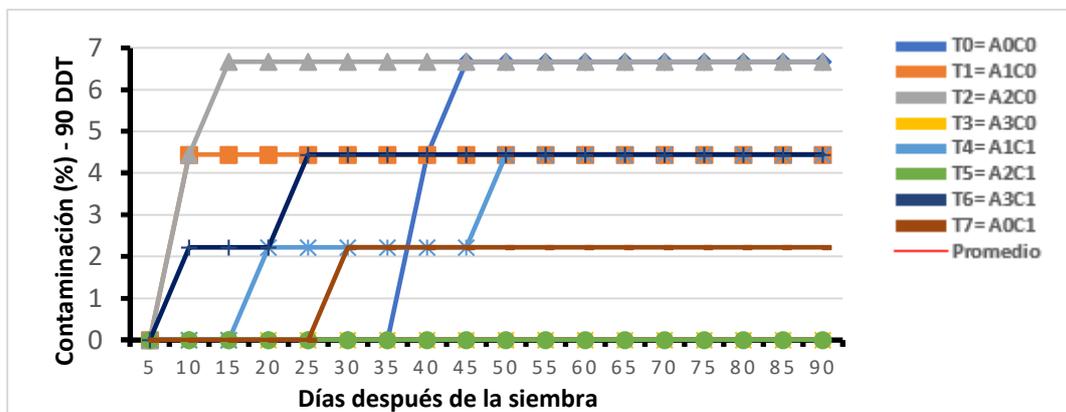


Figura 11. Días a la contaminación de explantes inoculados de *C. arabica* L.

6.1.7 Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

A los 90 días de evaluación no se observó interacción (p-valor = 0.1356) entre las hormonas, tampoco hubo diferencias significativas en la hormona 2,4-D (p-valor = 0.2258), ni en la Kinetina (p-valor = 0.0673); sin embargo, se observó que T3 (3.0 mg L⁻¹ 2,4-D) y T7 (0.5 mg L⁻¹ KIN) alcanzaron la mayor fenolización con 95.6 %, le siguen T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y T6 (3.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) con 88.9 y 84.4 % respectivamente;

por otra parte, T0 (testigo) y T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 g L⁻¹ KIN) presentaron menor oxidación fenólica con 73.3 % en ambos casos. Finalmente, la media general fue 78.7 % (Figura 12).

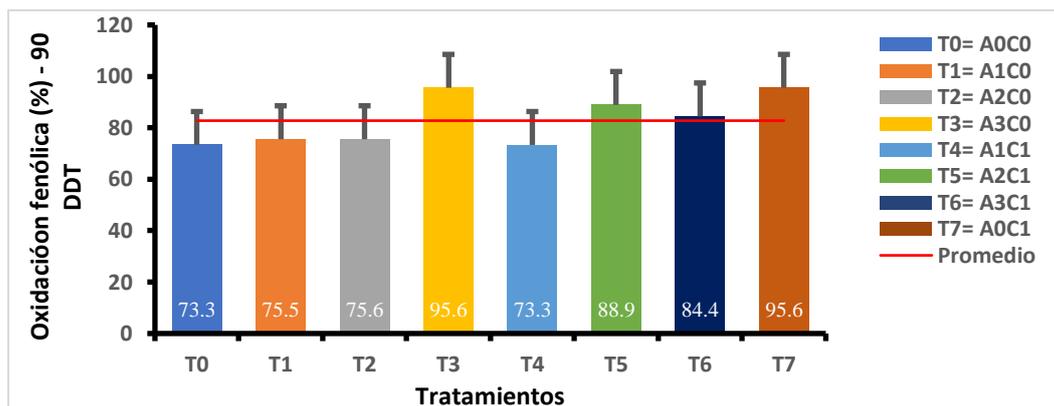


Figura 12. Porcentaje de oxidación fenólica en explantes de *C. arabica* L.

6.1.8 Días a la oxidación fenólica de los explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

Durante la evaluación los explantes expresaron oxidación fenólica a partir de 10 DDT donde T1 alcanzó 2.2 %, a los 15 DDT los tratamientos T0 y T4 presentaron 4.4 y 2.2 % respectivamente, a los 40 DDT T7 presentó 53.3 % sin diferencia significativa con T0, pero si con el resto de los tratamientos; de igual forma, a los 45 DDT, T7 y T0 con 62.2 y 44.4 % presentaron diferencias estadísticas al resto de los tratamientos. Finalmente, a los 90 días todos los tratamientos presentaron oxidación fenólica, sin presentar diferencias significativas entre los mismos (Figura 13).

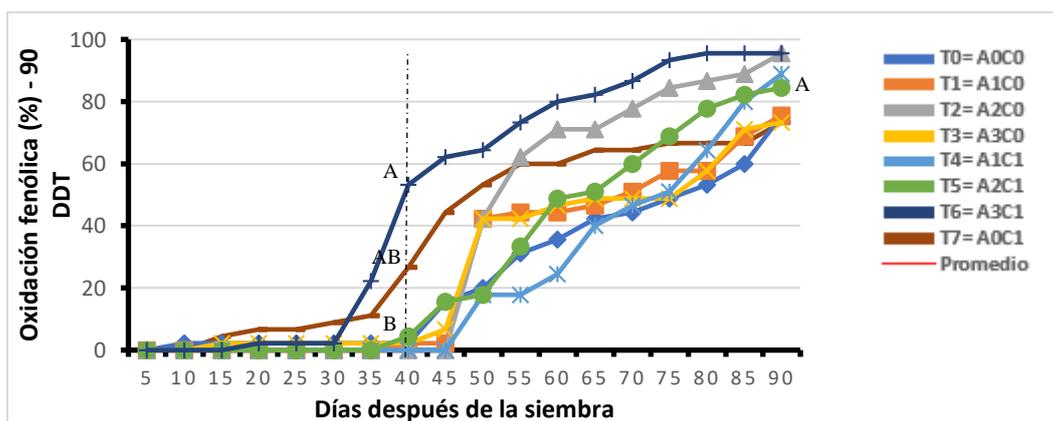


Figura 13. Días a la oxidación fenólica de explantes inoculados de *C. arabica* L.

6.1.9 Porcentaje de sobrevivencia de los explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

Con respecto al porcentaje de sobrevivencia de los explantes inoculados de *C. arabica* L., no hubo interacción entre las hormonas (p-valor = 0.1745); en ese sentido, el tratamiento T4 consiguió una mejor sobrevivencia con 22.2 %, le siguen los tratamientos T0 y T1 con 20 % en ambos casos; por otro lado, los tratamientos que presentaron menor porcentaje de sobrevivencia

fueron el T7 (0.5 mg L⁻¹ KIN) y T3 (3.0 mg L⁻¹ 2,4-D) con 2.2 y 4.4 % respectivamente (Figura 14).

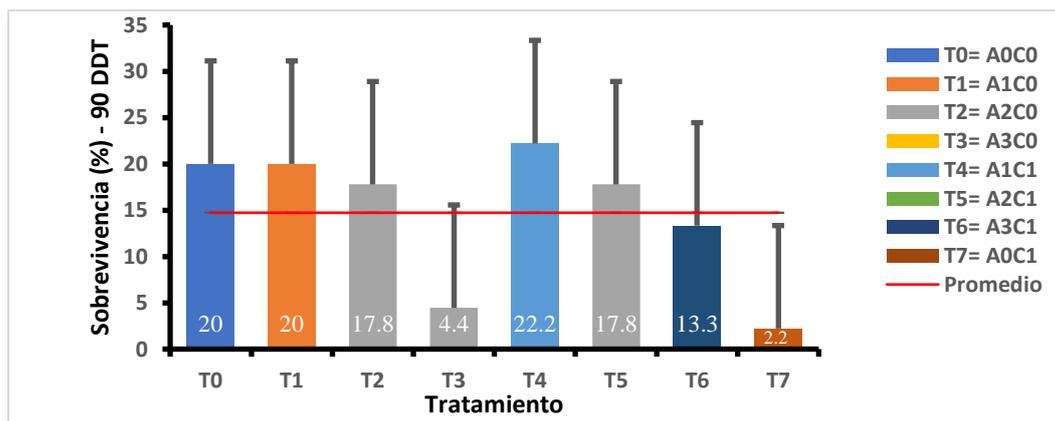


Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia en explantes de *C. arabica* L.

6.1.10 Días a la sobrevivencia de los explantes de *Coffea arabica* L., en total oscuridad

Durante la evaluación, se evidenció que a los 10 DDT la sobrevivencia disminuyó sin diferencias significativas en los tratamientos T1, T2 y T6 y alcanzaron 93.3, 95.6 y 97.8 % respectivamente, a los 35 DDT T7 y T2 alcanzaron 75.6 y 93.3 %, a los 45 DDT T5 y T3 presentaron el 100 % de sobrevivencia, pero a los 50 DDT la sobrevivencia se redujo en todos los tratamientos, a los 50 DDT T5 presentó mayor sobrevivencia, con 82.2 % y con menor sobrevivencia T7 con 33.3 %. Finalmente, a los 90 DDT T4 presentó el mayor valor de sobrevivencia con 22.2 %, seguido por T0 y T1, con 20 % (Figura 15).

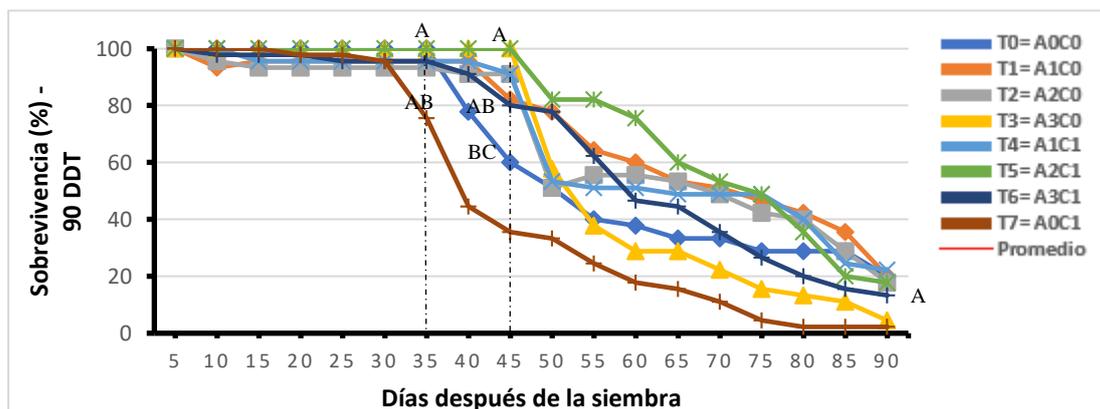


Figura 15. Días a la sobrevivencia de explantes inoculados de *C. arabica* L., medias con letras distintas indican diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$).

6.2 Influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas a partir de callos de *Coffea arabica* L.

Con los resultados obtenidos en el ensayo de inducción de callos de *C. arabica* L., a los 90 días se observó que entre los tratamientos T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7 no existió diferencias significativas en las variables porcentaje de: contaminación, oxidación fenólica y

sobrevivencia; sin embargo, en los parámetros porcentaje de formación de callo presentó diferencias. Se tomó a T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN), para desarrollar el segundo objetivo, ya que mostró el mayor porcentaje de formación de callos. El fotoperíodo utilizado para el segundo objetivo fue 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

6.2.1 Proliferación de estructuras callogénicas en *Coffea arabica* L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo

A los 45 DDT, no presentó interacción entre el fotoperíodo y los reguladores del crecimiento (p-valor = 0.5643); sin embargo, el fotoperíodo presentó diferencias significativas (p-valor = 0.0084); de tal forma, los tratamientos en total oscuridad alcanzaron los mayores porcentajes de proliferación (crecimiento) del callo: 32.3 y 43.3 % para T2 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) y T3 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) respectivamente; mientras que, en fotoperíodo se obtuvo 18 y 23 % para T0 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) y T1 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) respectivamente. El tratamiento T3 presentó callos con mayor tamaño en comparación con los demás tratamientos. Finalmente, los tratamientos no formaron órganos *de novo* y la media general de proliferación fue de 29.2 % (Figura 16).

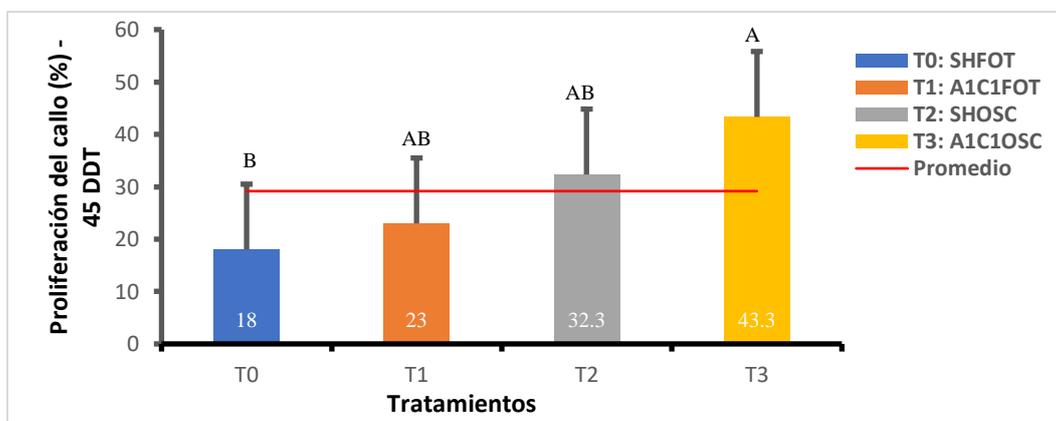


Figura 16. Porcentaje de formación de callo en explantes de *C. arabica* L., medias con letras distintas representa diferencia significativa (p-valor del fotoperíodo = 0.0084).

6.2.2 Días a la proliferación de estructuras callogénicas en *Coffea arabica* L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo

La proliferación de callos inoculados tuvo un crecimiento inicial considerable en todos los tratamientos hasta los 25 DDT (días después del tratamiento), después se observó una ligera estabilización; sin embargo, hasta los 45 DDT los callos presentaron crecimiento a los 20 DDT, existiendo diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a fotoperíodo con los tratamientos de total oscuridad, después de 35 DDT T3 se diferenció del resto de tratamientos, hasta el término de la evaluación (Figura 17).

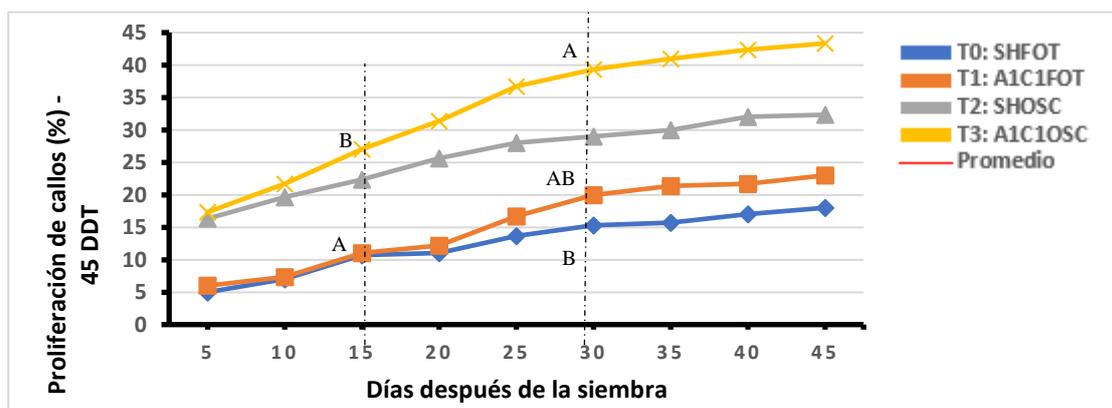


Figura 17. Días a la proliferación de estructuras calogénicas en explantes de *C. arabica* L., letras distintas indican diferencias significativas entre sus medias (p-valor = 0.0084).

6.2.3 Color del callo en explantes de *Coffea arabica* L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo

Durante la evaluación, en condiciones de fotoperíodo se desarrollaron callos color crema y café beige: en los tratamientos T0 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) y T1 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) el color café beige presentó 67 y 27 %, equivalente a 10 y 5 callos; mientras que, el color crema alcanzó 33 y 73 %, equivalente a 4 y 11 callos respectivamente. Los tratamientos en total oscuridad mostraron diferentes coloraciones (Figura 18); de esta forma, T2 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) alcanzó para el color crema, beige y blanco 27, 40 y 33 %, equivalente a 4, 6 y 5 callos respectivamente. Finalmente, T3 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) alcanzó para el color crema, beige y amarillo 80, 13 y 7 %, equivalente a 12, 2 y 1 callo respectivamente (Figura 19).

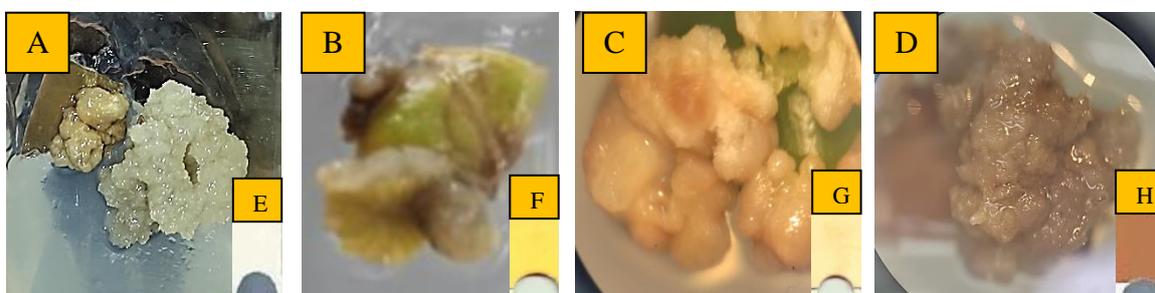


Figura 18. Callos con diferentes colores, **A:** Blanco, **B:** Amarillo, **C:** Crema (amarillo cremoso), **D:** Café beige y **E-H:** Colores según sistema de Munsell.

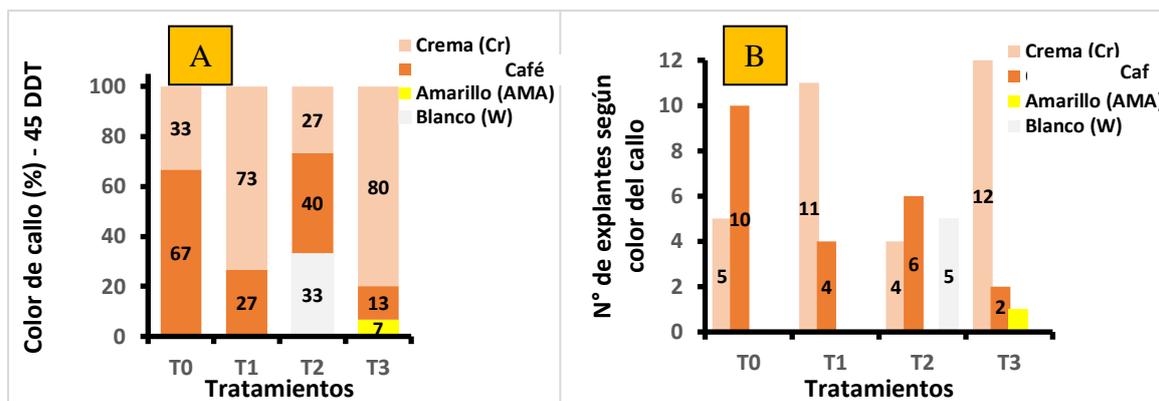


Figura 19. Color de los callos, **A:** Porcentaje de color del callo en explantes de *C. arabica* L., y **B:** Número de explantes según el color del callo en total oscuridad y fotoperíodo.

6.2.4 Friabilidad del callo bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo

En cuanto a friabilidad de callo, los tratamientos sometidos a fotoperíodo alcanzaron el 100 % de friabilidad. Por otra parte, en total oscuridad el tratamiento T2 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) obtuvo 73.3 y 26.7 %; mientras que, T3 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) logró 80 y 20 % de callos friables y no friables, respectivamente. Finalmente, todos los tratamientos no formaron órganos *de novo* y la media general de crecimiento de los callos fue de 29.2 % (Figura 20).

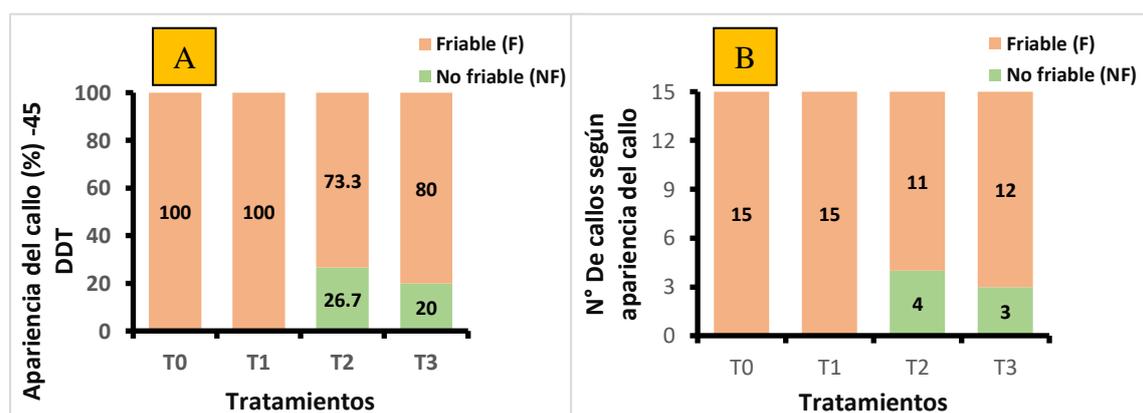


Figura 20. Friabilidad de los callos, **A:** Porcentaje de friabilidad de callo en explantes de *C. arabica* L., y **B:** Número de explantes según friabilidad del callo en total oscuridad y fotoperíodo.

6.2.5 Porcentaje de oxidación fenólica en callos de explantes de *Coffea arabica* L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo

En cuanto al parámetro oxidación fenólica, no hubo diferencias significativas (p-valor = 0.7328) en la interacción de los factores fotoperíodo y reguladores del crecimiento, tampoco hubo influencia de los factores individualmente; de tal forma, bajo condiciones de fotoperíodo se obtuvieron 33.3 y 20 % para los tratamientos T0 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) y T1

(0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) respectivamente; sin embargo, en condiciones de total oscuridad se alcanzaron 20 y 13.3 % para los tratamientos T2 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) y T3 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN), respectivamente, el T3 presentó menor valor de oxidación fenólica. La media general de oxidación fenólica fue de 21.7 % (Figura 21).

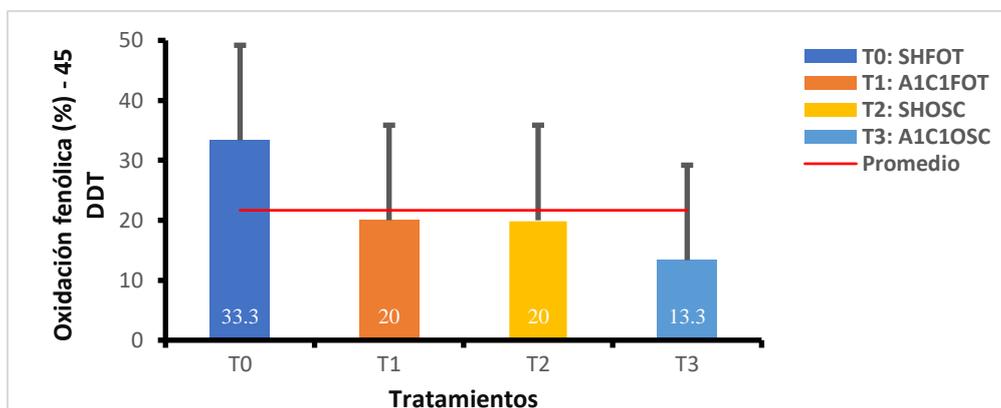


Figura 21. Porcentaje de oxidación fenólica en callos de *C. arabica* L.

6.2.6 Porcentaje de sobrevivencia de callos de *Coffea arabica* L., bajo condiciones de total oscuridad y fotoperíodo

En la variable sobrevivencia no se presentó interacción (p-valor = 0.7328) entre los factores fotoperíodo y reguladores del crecimiento, tampoco hubo diferencias significativas en los factores individualmente; de tal forma, los callos a los 45 DDT tuvo un resultado positivo; sin embargo, T0 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) con 66.7 % presentó menor valor de sobrevivencia; mientras que, el mayor valor se obtuvo en T3 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) con 86.7 % en total oscuridad y con fitohormonas. Finalmente, la media general de sobrevivencia fue de 78.3 % (Figura 22).

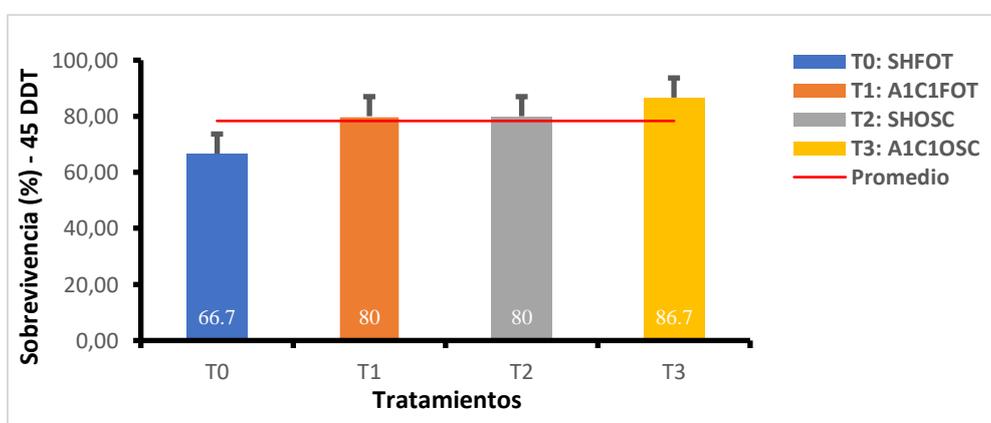


Figura 22. Porcentaje de sobrevivencia en callos de *C. arabica* L.

7 DISCUSIÓN

7.1 Efecto del balance hormonal auxina-citocinina en la formación de estructuras callogénicas en explantes obtenidos de plántulas de invernadero de *Coffea arabica* L.

Las técnicas de cultivo de tejidos permiten la micropropagación clonal de un genotipo de planta determinado en un tiempo relativamente corto y en espacios pequeños; para ello, es necesario medios de cultivo suplementados con: sales minerales, vitaminas, fitohormonas y en ocasiones bioestimulantes (Camarena *et al.*, 2014; Sharry *et al.*, 2015; Levitus *et al.*, 2017; Montes de Godoy, 2019), para la obtención de callos es común el uso de auxinas (2,4-D) de forma individual (Espinosa *et al.*, 2012), dos auxinas (2,4-D y AIB) (López-Gómez *et al.*, 2010) o en combinación con citocininas (Kinetina) (González-Vega *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2020).

En la presente investigación, la formación de callos inició a los 20 y 25 días de evaluación en los tratamientos T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN), respectivamente; en ese sentido, Morales del Cid (2017) en su estudio indica inicio de formación a los 18 días, empleando 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 4.3 mg L⁻¹ de KIN en *C. arabica* variedad Geishas. Los callos iniciaron en los bordes del explante y en las nervaduras secundarias; además, se observó que los explantes comenzaron a arrugarse, separarse del medio de cultivo y tornarse de color verde claro. Según Setiawan *et al.* (2020) en los bordes del explante las células están en contacto directo con el medio de cultivo y según Espinosa *et al.* (2012) en las nervaduras las células son menos diferenciadas; como consecuencia, responden rápidamente al efecto de las fitohormonas; igualmente, mencionan que los explantes se arrugan debido al engrosamiento de las células perivasculares del haz, con un posterior crecimiento en todas las direcciones.

En el presente estudio, los tratamientos suplementados únicamente con 2,4-D no formó estructuras callogénicas, esto es respaldado por Santana (1982), quien señala que la acción independiente del 2,4-D no forma callos en el cultivo del café (*Coffea* sp), resultados similares obtuvieron Rodríguez *et al.* (2014), al observar engrosamiento en los explantes de *Ugni molinae*, pero sin sobrevivencia a los 60 días de evaluación, usando 2,4-D; mientras que, los tratamientos suplementados con 2,4-D y Kinetina si formaron estructuras callogénicas, en ese sentido, T4 y T5 presentaron 15.56 y 8.9 % de formación de callos respectivamente; sin embargo, los resultados obtenidos son bajos en comparación al 80 % de formación que presentan Quiñones *et al.* (2020), usando 2.5 mg L⁻¹ de KIN + 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D en explantes

de hojas jóvenes de café; y, al 73.3 % de formación que presentan Eras *et al.* (2020), al emplear 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ de KIN en explantes de *Cinchona officinalis* L.; además, los resultados obtenidos son parcialmente inferiores a los obtenidos por López-Gómez *et al.* (2010), quienes obtuvieron 38.71 % de formación de callos al utilizar 2.21 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) + 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) en explantes foliares de café. Finalmente, la baja respuesta de formación de callo puede atribuirse a la alta concentración de 2,4-D, según Quiñones *et al.* (2020) a bajas concentraciones de 2,4-D induce mayor cantidad de callo embriogénico y las hojas jóvenes e inmaduras tienen mayor capacidad de respuesta morfogénica.

A los 90 días de la evaluación predominó el color crema en los callos, con 57.1 y 75 % para los tratamientos T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN), respectivamente, resultados que son bajos en relación a los obtenidos por Espinosa *et al.* (2012), ya que presentan el 100 % de callos color crema y friables, al emplear 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ de 2,4-D en explantes foliares de café; mientras que, los resultados son similares a los presentados por Eras *et al.* (2020), quienes alcanzaron 73 % de callos color crema usando 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D en

En relación a la friabilidad del callo, en la presente investigación los datos obtenidos fueron altos, ya que se alcanzó valores de 86 y 100 % de friabilidad en los tratamiento T4 (1.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN) y T5 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ KIN), respectivamente, estos resultados son similares a los que presentan Eras *et al.* (2020), quienes alcanzaron el 100 % de friabilidad en callos de *Cinchona officinalis* L., en los tratamientos combinados con 2,4-D (1, 2 y 3 mg L⁻¹) y KIN (0 y 0.5 mg L⁻¹) en total oscuridad; así mismo, resultados similares presenta Setiawan *et al.* (2020) con 100 % de callos friables en *C. arabica*, empleando 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg L⁻¹ TDZ; en ese sentido, Quiñones *et al.* (2020) mencionan que la hormona 2,4-D estimula el alargamiento celular al agregar plasticidad a la pared celular; de modo que, el agua ingresa a la célula a través de la ósmosis, esto estimula que las células se alarguen; por lo tanto, el callo friable contiene mucha agua y entre sí es relativamente fácil de separar; sin embargo, al utilizar como fitohormonas 2,4-D y Kinetina incrementa la posibilidad de obtener mayor porcentaje de callo compacto.

La contaminación que se presentó en la investigación fue baja, ya que el máximo valor se obtuvo en los tratamientos T0 (testigo) y T2 (2.0 mg L⁻¹ 2,4-D), con 6.7 %. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Quiñones *et al.* (2020), al presentar 10 % de contaminación en explantes foliares de *C. arabica* L., var. Caturra. La contaminación no restringió la formación de callos en esta investigación y la baja contaminación se atribuye a que se usaron

hojas jóvenes; de acuerdo a, López-Gómez *et al.* (2010) esto se debe a que las hojas jóvenes e inmaduras presentan menor cantidad de unidades formadoras de colonias de microorganismos; además, el crecimiento de la pared celular y la formación de ceras y ligninas epicuticulares es menor que en hojas maduras, lo que facilita la acción del agente desinfectante en los microorganismos endógenos.

En cuanto a oxidación fenólica, los datos obtenidos fueron considerablemente altos, ya que se alcanzó valores hasta 95.6 % para los tratamientos T3 (3.0 mg L⁻¹ 2,4-D) y T7 (0.5 mg L⁻¹ KIN), como consecuencia afectó significativamente a la sobrevivencia de los explantes y limitó la formación de callos, estos resultados fueron similares a los obtenidos por Quiñones *et al.* (2020) al presentar el 100 % de oxidación y superiores a los encontrados por López-Gómez *et al.* (2010) quienes presentan hasta 60 % de oxidación en hojas jóvenes e inmaduras; por tanto, el alto porcentaje de oxidación fenólica obtenido en esta investigación se atribuye a que los explantes de hojas jóvenes tienen alto contenido de fenoles y polifenoles, ya que son sustancias reactivas y comunes en el metabolismo del oxígeno (López-Gómez *et al.*, 2010).

7.2 Influencia del fotoperíodo en la proliferación de estructuras callogénicas de *Coffea arabica* L.

En la presente investigación se implementaron 4 tratamientos evaluados durante 45 días, divididos en dos grupos: un grupo bajo fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; y, otro grupo en total oscuridad.

Los tratamientos en fotoperíodo: T0 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) y T1 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) alcanzaron 18 y 23 % de proliferación de las estructuras callogénicas, los resultados obtenidos son significativamente bajos en comparación al 65 % de proliferación de los callos de *Cinchona officinalis* L que presentan Moreno *et al.* (2019), en el tratamiento suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ de BAP empleando el mismo fotoperíodo, durante 90 días de evaluación. Después de 15 días los callos cambiaron paulatinamente del color crema a café beige, ya que la luz incrementó la oxidación fenólica de los callos *in vitro*, debido a que los mismos tuvieron tejido foliar vivo; por tanto, la fenolización de los callos *in vitro* llegó hasta 33.3 %, esto afectó significativamente la supervivencia de los mismos; en ese sentido, Rizzo (2020), indicó que la luz es la principal fuente de energía de las plantas, de ahí la importancia del fotoperíodo; sin embargo, Azofeifa (2009) mencionó que la luz incrementa la biosíntesis de sustancias fenólicas, pues las enzimas involucradas en la biosíntesis y oxidación de fenoles se incrementan con la luz.

Por otra parte, los tratamientos en total oscuridad presentaron mayor proliferación: T3 (0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.25 mg L⁻¹ KIN) y T2 (0.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.0 mg L⁻¹ KIN) alcanzaron

43.3 y 32.3 % respectivamente; estos resultados son bajos comparados con los que presenta Cruz (2019) al alcanzar 96 % de proliferación de callos, en el tratamiento suplementado con 0.25 mg L^{-1} de 2,4-D + 0.5 mg L^{-1} de KIN en *C. arabica* L., var. Obatá; por tanto, los resultados obtenidos de proliferación puede atribuirse a la baja concentración de la citoquinina, esto es corroborado por Quiñones *et al.* (2020) quienes mencionan que las citoquininas (6-bencilaminopurina) incrementan la intensidad de proliferación y estimulan el desarrollo de embriones somáticos.

Además, la baja proliferación de estructuras callogénicas y la nula formación de órganos *de novo* puede deberse a que esta variedad Etiope necesita más tiempo de evaluación u otras hormonas; en este sentido, Morales del Cid (2017) indica que la variedad Bourbon requiere entre 19 semanas para formar órganos *de novo* y que explantes foliares de *C. arabica* L., var. Geisha forman estructuras globulares en concentraciones de 0.01 mg L^{-1} ANA + 0.5 mg L^{-1} KIN, empleando el mismo fotoperíodo.

8 CONCLUSIONES

- En la fase inducción de callos, fue posible estimular respuestas morfogénicas en explantes foliares de *Coffea arabica* L., el medio de cultivo MS (1962) enriquecido únicamente con 2,4-D no formó estructuras callogénicas; mientras que, el medio de cultivo suplementado con 2,4-D (1.0 mg L^{-1} y 2.0 mg L^{-1}) combinadas con KIN (0.5 mg L^{-1}) formó callos de color crema y friables, donde el tratamiento T4 alcanzó el mayor valor de formación con 15.6 %, a pesar de ser un porcentaje bajo se comprobó la importancia del balance hormonal auxina (2,4-D) + citocinina (KIN), para inducir nuevos tejidos. La variable contaminación no presentó problema durante el desarrollo de la investigación; sin embargo, la oxidación fenólica tuvo un efecto negativo y limitó la formación de callos.
- En la fase de proliferación de estructuras callogénicas el fotoperíodo tuvo un efecto negativo, pero presentó el 100 % de friabilidad; sin embargo, los tratamientos en total oscuridad alcanzaron mayor porcentaje de proliferación, con 43.3 % para T3 (0.5 mg L^{-1} 2,4-D + 0.25 mg L^{-1} KIN), los tratamientos no generaron órganos *de novo*, pero se comprobó la influencia de las fitohormonas para estimular el crecimiento del callo. Finalmente, se comprobó que la oxidación fenólica tuvo una influencia directa en los tratamientos sometidos en fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; además, tiene una correlación negativa con la variable sobrevivencia de los callos *in vitro*; en consecuencia, afectó directamente en la formación de estructuras callogénicas y en la proliferación de los callos.

9 RECOMENDACIONES

- Para la fase de inducción de callos de *Coffea arabica* L., se recomienda utilizar diferentes niveles de la auxina (2,4-D) y citocinina (KIN); además, trabajar con mayor cantidad de material vegetal para desarrollar más callos *in vitro* y contar con suficiente material vegetal *in vitro* (explantes), ya que en el presente estudio se tuvo que esperar a la culminación del tiempo de evaluación de los tratamientos para continuar con el establecimiento de los tratamientos restantes.
- De manera paralela, es pertinente contar con un protocolo de desinfección confiable y eficiente, porque es parte fundamental en el desarrollo de la investigación. En este estudio inicialmente se presentó inconvenientes con la variable contaminación.
- Dentro de la fase de proliferación de estructuras callogénicas de *C. arabica* L., es pertinente desarrollar el ensayo a distintos niveles de fotoperíodos tales como: 12/12 o 8/16; es decir, 12 horas luz con 12 horas de oscuridad y 8 horas luz con 16 horas de oscuridad; además, de tomar en cuenta la temperatura de incubación; en este sentido varios autores han realizado estudios similares con temperaturas de incubación entre los 25 a 27 °C.
- Finalmente, es necesario seguir realizando investigaciones en *C. arabica* L., ya que es necesario buscar métodos efectivos que incrementen la producción de plántulas de forma rápida, uniforme y libre de enfermedades que afectan a esta especie, porque es de interés económico para el mundo entero; además, se recomienda trabajar con diferentes hormonas u otras concentraciones de 2,4-D inferiores a las que se emplearon en este ensayo, ya que a medida que se incrementó la concentración de 2,4-D (3.0 mg L⁻¹) combinada con KIN (0.5 mg L⁻¹) el porcentaje de formación fue nulo, este argumento permite recomendar una concentración inferior de 2,4-D.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. E., Ortiz, J. L., Mesén, F., Jiménez, L. D., & Altmann, F. (2018). Café arábica (*Coffea arabica* L.) 39–62. https://doi.org/10.1007/978-3-319-79087-9_3
- Alcántara, J., Acero, J., Alcantara, J., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Astudillo, C. B. (2021). Identificación del comportamiento morfológico de cinco cultivares de café arábigo en la finca Andil de la UNESUM. Jipijapa, Ecuador. Tesis, Universidad Estatal del Sur de Manabí.
- Azofeifa, Á. (2009). Origen y factores desencadenantes. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf
- Balcázar, S. (2016). Fotoperíodo y control de la floración. Departamento de Recursos Naturales., 07(01), 37. http://www.fca-ude.edu.uy/upload/Materiales/Fotoperiodismo_interior-0056-0247.pdf
- Bravo, E. (2014). La biodiversidad en el Ecuador. Salesiana, Universidad Politécnica.
- Camarena, F., Chura, J., & Blas, R. (2014). Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. <https://doi.org/10.1021/pr3003326>
- Casierra-Posada F, Peña-Olmos J. (2015). Modificaciones fotomorfogénicas inducidas por la calidad de la luz en plantas cultivadas. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 39(1);84-92. Doi: 10.18257/raccefyn.276
- Coa, M., Mendez Natera, J., Silva-Acuña, R., & Mundarain, S. (2014). Evaluación de métodos químicos y mecánicos para promover la germinación de semillas y producción de fosforitos en café (*Coffea arabica*) var. Catuaí rojo. *Idesia*, 32(1), 43–53. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000100006>
- Córdova, A., Cobos, M., Imán, S., & Castro, J. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh “Camu Camu.” *Scientia Agropecuaria*, 5, 25–34. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>
- Cruz, J. (2019). Efecto de fitohormonas en la callogénesis *in vitro* de café-variedad Obatá. 1–22.
- Cruz, M., & Irigoyen, J. (2005). Guía técnica de semilleros y viveros. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?Id=1CYOAQAIAAJ&pg=PR2&dq=propagacion+sexual&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=propagacion%20sexual&f=false.
- Deo, P.; Harding, R.; Taylor, M.; Tyagi, A.; Becker, D. (2009). Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 99: 61–71.
- Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I., & Gonzales, M. Del P. (2005). Café para cardiólogos. 11(ISSN 0120-5633), 9.
- Encalada, M., Soto, F., & Morales, D. (2016). Crecimiento de posturas de cafeto (*Coffea arabica* L.) con cuatro niveles de sombra en dos condiciones edafoclimáticas de Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 37(2), 72–78. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4335.7681>
- Engelmann, F., Dulloo, M., Astorga, C., Dussert, S., & Anthony, F. (2007). Conserving coffee.

- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., & Guartanza, J. (2020). Inducción *in vitro* de estructuras calogénicas en *Cinchona officinalis* L. *Bosques Latitud Cero*, 10(1), 14–28.
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Masapanta, L., & Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. 35(4), 407–415.
- Figueroa, E., Pérez, F. Z., & Godínez, L. (2015). La producción y el consumo del café (P. García-Miranda, Martha (ed.)).
- George, E. (2008). Background. Part of plant propagation by tissue culture. Springer. *Plant Tissue Culture Procedure*, 3rd editio, 501.
- Godoy, L., E, H., Valera, E., & A, T. (2006). Calogénesis y regeneración *in vitro* de arroz (*Oryza sativa* L.) Con los bioestimulantes cubanos Biostan y Liplant. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 31–36. [Http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v36n1/v36n1a06.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v36n1/v36n1a06.pdf)
- González-Vega, M., Hernández-Espinosa, M., & Hernández-Rodríguez, A. (2010). Influencia de la edad del callo en la inducción de suspensiones celulares de cafeto. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1021–7444), 299–306.
- González, M., Rosales, P., Castilla, Y., Lacerra, J., & Ferrer, M. (2015). Efecto de la germinación y el desarrollo de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* L.). Effect of Bioenraiz® as stimulant of coffee plants (*Coffea arabica* L.) germination and the development. 36(1), 73–79.
- Hernández-Amasifuen, Angel David, Argüelles Curaca, Alexis, Cortez Lázaro, Anthony Apolinario, & Díaz Pillasca, Hermila Belba. (2021). Inducción *in vitro* de callos a partir de explantes foliares en rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *La Granja. Revista de Ciencias de la Vida*, 34(2), 131-140. [Https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.09](https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.09)
- Levitus, G., Echenique, V., Clara, R., Hopp, E., & Mroginski, L. (2017). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. In *argenbio* (2nd ed., Issue 60). [Https://doi.org/10.17129/botsci.1521](https://doi.org/10.17129/botsci.1521)
- Liu, C.P: Yang, L and Shen, H.L. (2015). Proteomic Analysis of Immature *Fraxinus mandshurica* Cotyledon Tissues during Somatic Embryogenesis: Effects of Explant Browning on Somatic Embryogenesis. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 13692-13713.
- López-Gómez, P., Iracheta-Juan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivel, A., Aguirre-Medina, J. F., Carmen, M., & Adriana, O. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. 33(3), 205–213.
- López, F., Escamilla, E., Zamarripa, A., & Cruz, J. G. (2016). Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) En Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(3), 297–304. [Http://www.scielo.org.mx/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000300297&Ing=es&nrm=iso&tIng=](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000300297&Ing=es&nrm=iso&tIng=)
- Medina, C., García, I., Caro, M., & Aristizábal, F. A. (2007). Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Ciencia Química-Farmacéutica*, 36(1), 70–80. [Http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v36n1/v36n1a06.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v36n1/v36n1a06.pdf)
- Montes de Godoy, M. (2019). Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (*Coffea arabica*) resistente a roya (*Hemileia vastatrix*). *Cultivos Tropicales*, 40(2),

- Morales del Cid, R. (2017). Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.) -variedades Sarchimor y Geisha- a partir de meristemos axilares y láminas foliares. 1–23. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6113/1/CPA-2017-072.pdf>
- Moreno, J., Pérez, C., Moreno, I., & Moreno, J. (2019). Effect of culture medium on morphogenic processes *in vitro* in *Cinchona officinalis* L. FCA UNCUYO, 51(1), 55–68. [Http://www.scielo.org.ar/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1853-86652019000100005&lang=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1853-86652019000100005&lang=es)
- Munsell A. H. (1912). A pigment color system and notation. The American Journal of Psychology. University of Illinois Press. 23 (2): 236-244.
- Nápoles-Vinent, S., Milanés-Riquene, S., Hernández-Forte, I., Morales-Mena, B., & Nápoles-Garcías, M. C. (2022). Rhizobia increases the germination of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* seeds. Second evidence in Cuba. Agronomy Mesoamerican, 33(1), 13. <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45719>
- Pérez, L., Rodríguez, N., Vargas, O., & Melgarejo, L. (2014). Germinación y dormancia de semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica (Issue July, pp. 63–113).
- Pérez, M., & Martínez-Laborde, J. (1994). Introducción a la fisiología vegetal.
- Pincay, R. (2017). Establecimiento de nuevas plantaciones de café y la perspectiva de desarrollo económico en la parroquia la unión. Tesis, Ecuador: Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador
- Ponce, L., Orellana, K., Acuña, I., Alfonso, J., & Fuentes, T. (2018). Estudios del desarrollo social: Cuba y América Latina. Número 1, 307–325.
- Pozo, M. (2014). Análisis de los factores que inciden en la producción de café en el Ecuador 2000-2011.
- Santistevan, M., Julca, A., Borjas, R., & Tuesta, O. (2014). Caracterización de fincas cafetaleras en la localidad de Jipijapa (Manabí, Ecuador). Ecología Aplicada, 187-192.
- Quiñones, M., Yafac, N., Garavito-Salini, R., & Principe, L. (2020). Desdiferenciación celular *in vitro* de *Coffea arabica* L. “café” var. Caturra a partir de explantes foliares. Scientia, XXII, 141–148.
- Ramos, R., Wondyifraw, T., Martínez, F., Gonzalez, M., Endale, G., Alemayehu, T., & Zerihun, A. (2009). Plant regeneration through somatic embryogenesis in three ethiopian *Coffea arabica* Lin . Hybrids. Bioecnología Vegetal, 9(1), 19–26. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/303/277>
- Razdan, M. (2003). Introduction to plant tissue culture. Science Publishers. Inc. USA., second edi, 375.
- Rizzo, S. (2020). Efecto de diferentes tipos de luz en el crecimiento de plantas *in vitro*: Revisión de Literatura. Agrícola Panamericana, 25. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/7ad4cd68-8ded-4fa6-a10f-35540b970b07/content>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones

- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111–118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Rojo, E., Pérez, E., & Carril, U. (2014). Café I (G. *Coffea*). *Reduca Biología*, 7(2), 113–132.
- Romero, J., & Camilo, J. (2019). Manual de producción sostenible de café. [Http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.4335.7681](http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.4335.7681)
- Ron, S. R. (2020). Regiones naturales del Ecuador. BIOWEB. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en <<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/RegionesNaturales>> Consulta: 31 de enero 2019.
- Ryavalad, S., Malabasari, T. A., Shantappa, T., Uppar, D. S., Biradar, B. D., & Mantur, S. M. (2019). Micropropagation studies in papaya (*Carica papaya* L.) Cv. 'Surya.' *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(4), 2362–2367. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.804.275>
- Sánchez, L., & Alvarenga, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Revista Tecnología En Marcha*, 28(1), 105–120. [Http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lang=pt](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0379-39822015000100105&lang=pt)
- Santana, N. (1982). Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 4 (3): 35-40.
- Sastry, S., Mandal, B., Hammond, J., Scott, S. ., & Brinddon, S. . (2019). *Encyclopedia of plant viruses and viroids*. Springer, Nueva Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3912-3_231
- Setiawan, R. B., Rahmah, M., Trisnia, H., Chaniago, I., Syukriani, L., Yunita, R., & Jamsari, J. (2020). Embryogenic callus induction of coffee [*Coffea arabica* L.] On several plant growth regulator concentration and incubation temperature. *IOP Science*, 497, 1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/497/1/012012>
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* (primera). [Http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738](http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738)
- Suárez, I. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. In F. E. U. de Córdoba (Ed.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Vanegas, S., Orellana, D., & Pérez, P. (2018). La realidad ecuatoriana en la producción de café. 2(2), 72–91. [https://doi.org/10.26820/recimundo/2.\(2\).2018.72-91](https://doi.org/10.26820/recimundo/2.(2).2018.72-91)
- Villavicencio, E., González, A., & Carranza, M. (2012). Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) y recurso fitogenético del desierto Chihuahuense. *Rev. Mex. Cien*, 3, 84–102.
- World Coffee Research, (WCR). (2018). El Futuro de la diversidad genética. 12 de noviembre de 2018. <https://worldcoffeeresearch.org/news/future-genetic-diversity/>

11 ANEXOS

Anexo 1. Hoja de campo para la toma de datos del ensayo de inducción de callos para los parámetros: contaminación, oxidación fenólica y sobrevivencia de explantes de *Coffea arabica* L.

ENSAYO INDUCCIÓN DE CALLOS																						
Fecha de inoculación:																						
Fecha de inicio de evaluación:																						
Variables a Evaluar: Contaminación (C); Oxidación fenólica (O) y Sobrevivencia (S).																						
DÍAS DE EVALUACIÓN																						
Trat.	5			10			15			20			25			n...			90			Obser.
	c	o	s	c	o	s	c	o	s	c	o	s	c	o	s	c	o	s	c	o	s	
TnR1Te1																						
TnR1Te2																						
TnR1Te3																						
TnR1Te4																						
TnR1Te5																						
TnR1Te...																						
TnR1Te15																						
TnR2Te1																						
TnR2Te2																						
TnR2Te3																						
TnR2Te4																						
TnR2Te5																						
TnR2Te...																						
TnR2Te15																						
TnR3Te1																						
TnR3Te2																						
TnR3Te3																						
TnR3Te4																						
TnR3Te5																						
TnR3Te...																						
TnR3Te15																						
Fecha																						

Anexo 2. Hoja de campo para la toma de datos del ensayo de inducción de callos para los parámetros: formación de callo de *C. arabica* L.

ENSAYO DE INDUCCIÓN DE CALLOS																													
Fecha de siembra:																													
Fecha inicio toma datos:																													
TRAT.	REP.	N° Tubos	% FORMACIÓN CALLO									COLOR DEL CALLO								APARIENCIA CALLO									
			10	15	20	25	30	5	0	5		0	5	0	5	0	5	0	5		0	5	0	5	0	5	0	5	
n	1	e1																											
		e2																											
		e3																											
		e4																											
		e5																											
	2	e1																											
		e2																											
		e3																											
		e4																											
		e5																											
	3	e1																											
		e2																											
		e3																											
		e4																											
		e5																											
FORMACIÓN DE CALLO:												COLOR:								APARIENCIA:									
0= 0.0 % Sin formación												 CR= Crema								F= Friable									
1= 50.0 %: regular (formado callo 1 explante)												 C= Café beige								NF= No Friable									
2= 100.0 %: muy bueno (formado callo 2 explantes).												 AMA=Amarillo																	

Anexo 3. Datos recolectados del ensayo en el primer objetivo.

TRAT.	REP.	CONTAMINACIÓN (%)	OXIDACIÓN FENÓLICA (%)	SOBREVIVENCIA (%)	PROLIFERACIÓN CALLOS (%)
T0	1	6.67	66.67	26.67	0
T0	2	13.33	80.00	6.67	0
T0	3	0	73.33	26.67	0
T1	1	13.33	66.67	20.00	0
T1	2	0	93.33	6.67	0
T1	3	0	66.67	33.33	0
T2	1	6.67	60.00	33.33	0
T2	2	13.33	73.33	13.33	0
T2	3	0	93.33	6.67	0
T3	1	0	93.33	6.67	0
T3	2	0	73.33	0.00	0
T3	3	0	93.33	6.67	0
T4	1	6.67	60.00	33.33	13.33
T4	2	6.67	80.00	13.33	13.33
T4	3	0	80.00	20.00	20
T5	1	0	86.67	13.33	13.33
T5	2	0	93.33	26.67	0
T5	3	0	86.67	13.33	13.33
T6	1	0	100.00	0	0
T6	2	6.67	73.33	20.00	0
T6	3	6.67	80.00	20.00	0
T7	1	0	100.00	0	0
T7	2	6.67	93.33	0.00	0
T7	3	0	93.33	6.67	0

Leyenda: **TRAT:** Tratamientos y **REP:** Repeticiones.

Anexo 4. Datos recolectados del ensayo en el segundo objetivo.

TRAT.	REP.	CONTAMINACIÓN (%)	OXIDACIÓN FENÓLICA (%)	SOBREVIVENCIA (%)	PROLIFERACIÓN CALLOS (%)
T0	1	0	40	60	20
T0	2	0	40	60	17
T0	3	0	20	80	17
T1	1	0	20	80	24
T1	2	0	40	60	12
T1	3	0	0	100	33
T2	1	0	20	80	32
T2	2	0	0	100	43
T2	3	0	40	60	22
T3	1	0	0	100	34
T3	2	0	20	80	51
T3	3	0	20	80	45

Leyenda: TRAT: Tratamientos y REP: Repeticiones.

Anexo 5. Porcentaje de las variables de color y friabilidad de los callos del primer objetivo.

90 DDT

TRAT.	COLOR CALLOS (%)				FRIABILIDAD (%)		
	C	AMA	CR	TOTAL	F	NF	TOTAL
T0	0	0	0	0	0	0	0
T1	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0
T4	28.57	14.29	57.14	100	85.71	14.29	100
T5	25	0	75	100	100	0	100
T6	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	0

Leyenda: DDT: Días después de los tratamientos, TRAT: Tratamientos, C: Café beige, Cr: Crema, AMA: Amarillo, F: Friable y NF: No Friable.

Anexo 6. Porcentaje de las variables de color y friabilidad de los callos del segundo objetivo.

45 DDT

TRAT	COLOR DE CALLOS (%)				FRIABILIDAD (%)			
	C	BL	AMA	CR	TOTAL	F	NF	TOTAL
T0	66.67	0	0	33.33	100	100	0	100
T1	26.67	0	0	73.33	100	100	0	100
T2	40.00	33.33	0	26.67	100	73.33	26.67	100
T3	13.33	0	6.67	80	100	80	20	100

Leyenda: DDT: Días después de los tratamientos. TRAT: Tratamientos, C: Café beige, BL: Blanco, Cr: Crema, AMA: Amarillo, F: Friable y NF: No Friable.

Anexo 7. Resultados obtenidos para el parámetro porcentaje formación de callos en explantes de *C. arabica* L., durante 90 días de evaluación.

ANÁLISIS DE VARIANZA NO PARAMÉTRICO DE KRUSKALL WALLIS							
VARIABLE	TRATAMIENTO	N	MEDIAS	D.E.	PROMEDIO RANGO	H	P
% FORMACIÓN CALLO	T0	3	0	0	10 A	9.65	0.007
	T1	3	0	0	10 A		
	T2	3	0	0	10 A		
	T3	3	0	0	10 A		
	T4	3	15.53	3.87	22.33 B		
	T5	3	8.89	7.68	17.67 AB		
	T6	3	0	0	10 A		
	T7	3	0	0	10 A		
TEST BONFERRONI							
VARIABLE	N	COEFICIENTE DE VARIACIÓN					
% FORMACIÓN CALLO	24	99.59					
FUENTE DE VARIACIÓN	SC	GL	CM	F	P-VALOR		
MODELO	738.89	7	105.56	11.40	<0.0001		
TRATAMIENTO	738.89	7	105.56	11.40	<0.0001		
ERROR	148.15	16	9.26				
TOTAL	887.04	23					
TRATAMIENTOS	MEDIAS	N	E.E.	RANGO			
T6	0	3	1.76	A			
T3	0	3	1.76	A			
T2	0	3	1.76	A			
T1	0	3	1.76	A			
T0	0	3	1.76	A			
T7	0	3	1.76	A			
T5	8.89	3	1.76	AB			
T4	15.56	3	1.76	B			
Medias con una letra distintas son significativamente diferentes (p < 0.05)							

Anexo 8. Certificación de traducción del resumen del trabajo de titulación

Certificación de traducción del idioma Inglés

Lic. Marcos David Castillo

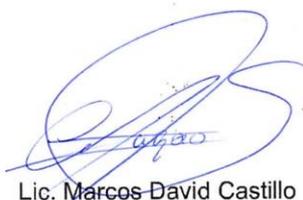
Licenciado en Educación mención Inglés

CERTIFICO:

Que he realizado la traducción de español a inglés del resumen derivados de tesis denominado: **“Efecto del fotoperiodo en la inducción de estructuras callogénicas en explantes de *Coffea arabica* L., a partir de plántulas de invernadero, a nivel de laboratorio”**, de autoría del Sr. **Olger Vinicio Cueva Jiménez**, con cédula Nro. **1105795775**, egresado de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional de Loja, el mismo que se encuentra bajo la dirección del Ing. Víctor Hugo Eras, previo a la obtención de título de Ingeniero agrónomo.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado hacer uso del presente en lo que creyere conveniente

Loja, 23 de junio 2022.



Lic. Marcos David Castillo
Licenciado en Educación mención Inglés