

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DEL USO DE DOS BIOCIDAS EN EL
ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES FOLIARES DE CAFÉ (*Coffea
dewevrei*)**

GABRIELA GHERALDINE AYALA MIRANDA

LA PAZ - BOLIVIA

2020

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“EVALUACIÓN DEL USO DE DOS BIOCIDAS EN EL ESTABLECIMIENTO DE
EXPLANTES FOLIARES DE CAFÉ (*Coffea dewevrei*)”**

*Tesis de grado presentado como
requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agrónomo*

GABRIELA GHERALDINE AYALA MIRANDA

ASESORES:

Ing. Ph. D. Yakov Arteaga García

Ing. Ph. D. Wellington Marota Barbosa

Ing. M. Sc. Maria Gessi Teixeira

REVISORES:

Ing. Casto Maldonado Fuentes

Ing. Carlos Choque Tarqui

Ing. Celso Ticona Quispe

APROBADA

PRESIDENTE TRIBUNAL EXAMINADOR

DEDICATORIA

A Dios por ser el sustento, esperanza y refugio de mi vida.

Con mucho amor a mis padres, Ramiro y Lorena, por su amor y apoyo incondicional que me brindaron durante cada etapa de mi vida y por enseñarme a siempre soñar en grande.

A mis hermanos, Brenda, Asiel e Iriel, con mucho cariño, por su apoyo y amor para seguir adelante en cada momento difícil que tuve.

Sin ustedes no lo habría logrado.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento y gratitud:

A Dios por haberme permitido estudiar y culminar mi carrera con éxito, y por haberme regalado la oportunidad de vivir experiencias tan enriquecedoras a lo largo de mi carrera universitaria.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme brindado tantas oportunidades y formado académica y profesionalmente a través de todos los docentes que compartieron su conocimiento y enseñanzas conmigo.

Un especial agradecimiento a mis asesores: Ph. D. Yakov Arteaga, Ph. D. Wellington Marota Barbosa y M. Sc. Maria Gessi Teixeira, por la valiosa orientación, paciencia, apoyo, confianza y amistad que me brindaron para la culminación de este trabajo.

A la Universidad brasilera IFSULDEMINAS por haberme abierto las puertas para mi intercambio académico, a cada uno de sus coordinadores, profesores, personal, compañeros y amigos que durante mi estadía me acogieron como una familia.

Al Ph. D. René Chipana por la oportunidad del intercambio a Brasil que gestionó durante su cargo como Director de Carrera y por todo su apoyo para llevar a cabo con éxito esta valiosa y enriquecedora experiencia.

Al Tribunal de Revisores: Ing. Casto Maldonado Fuentes, Ing. Carlos Choque Tarqui e Ing. Celso Ticona Quispe, por las observaciones, sugerencias y correcciones para elaborar el presente documento.

A toda mi familia, por todo el valioso apoyo incondicional que de una u otra manera, fue dedicado hacia mí.

A mis amigos de la facultad, a Arantza por su apoyo para realizar la parte práctica de este trabajo, a Marcela, Ximena, Laura, Claudia, Ibeth, Alicia, Mauricio, Paul, Weimar, Anderson, Manuel, Franklin y Franz, gracias por la amistad y momentos inolvidables compartidos durante la carrera.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Origen e Importancia del Café.....	4
3.1.1. Origen del Café.....	4
3.1.2. Importancia del Café.....	5
3.2. El Café en el Mundo.....	5
3.3. El Café en Bolivia.....	6
3.4. Generalidades del género <i>Coffea</i>	8
3.5. Café Excelsa (<i>Coffea dewevrei</i>)	8
3.6. Importancia de la multiplicación del Café.....	9
3.7. La callogénesis.....	12
3.8. Tipos de Callos.....	13
3.9. La Contaminación Microbiana en el cultivo de tejidos.....	14
3.9.1. Efecto de la Contaminación microbiana en el Cultivo in vitro.....	16
3.9.2. Contaminación por hongos.....	17
3.9.3. Contaminación por bacterias.....	18
3.10. Biocidas empleados.....	18
3.10.1. Plant Preservative Mixture™ (PPM)	18
3.10.2. Antibiotic Antimycotic Solution Sigma® (AAS).....	20
3.11. La oxidación en el cultivo de tejidos.....	20

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. LOCALIZACIÓN.....	23
4.1.1. Ubicación geográfica.....	23
4.1.2. Características de la zona de estudio.....	24
4.2. MATERIALES.....	25
4.2.1. Material vegetal de estudio.....	25
4.2.2. Material de laboratorio.....	25
4.2.2.1. Biocidas.....	25
4.2.2.2. Reactivos.....	25
4.2.2.3. Equipos y materiales de vidrio.....	26
4.2.3. Material de campo.....	26
4.2.4. Material de gabinete.....	27
4.3. METODOLOGÍA.....	27
4.3.1. PRIMER EXPERIMENTO.....	27
Fase 1. Preparación del material experimental.....	27
Fase 2. Colección y desinfección del material biológico.....	28
Fase 3. Elaboración del Medio de Cultivo.....	28
Fase 4. Preparación e Introducción de los explantes.....	29
Fase 5. Registro de datos.....	30
Fase de Recultivo	30
4.3.2. SEGUNDO EXPERIMENTO.....	31
Fase 1. Preparación del material experimental.....	31
Fase 2. Colección y desinfección del material biológico.....	31
Fase 3. Elaboración del Medio de Cultivo.....	31
Fase 4. Preparación e Introducción de los explantes.....	31
Fase 5. Registro de datos.....	31
Fase de Recultivo	31
4.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	32
Modelo aditivo lineal.....	32
4.4.1. PRIMER EXPERIMENTO.....	32
4.4.1.1. Croquis experimental.....	33
4.4.2. SEGUNDO EXPERIMENTO.....	34
4.4.2.1. Croquis experimental.....	34
4.5. VARIABLES DE RESPUESTA.....	35
4.5.1. Porcentaje de Contaminación.....	35
4.5.2. Porcentaje de oxidación.....	35

4.5.3. Porcentaje de callogénesis.....	35
4.5.4. Frecuencia callogénica.....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
5.1. PRIMER ENSAYO.....	37
5.1.1. Porcentaje de Contaminación.....	37
5.1.2. Porcentaje de oxidación.....	40
5.1.2.1. Oxidación alta y baja.....	42
5.1.3. Porcentaje de callogénesis.....	43
5.1.4. Frecuencia callogénica.....	44
5.2. SEGUNDO ENSAYO.....	47
5.2.1. Porcentaje de Contaminación.....	47
5.2.2. Porcentaje de oxidación.....	49
5.2.2.1. Oxidación alta y baja.....	50
5.2.3. Porcentaje de callogénesis.....	50
5.2.4. Frecuencia callogénica.....	51
6. CONCLUSIONES.....	53
7. RECOMENDACIONES.....	55
8. BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de Varianza del porcentaje de Contaminación (1º ensayo).....	37
Cuadro 2. Prueba de Duncan Alfa=0,05 del Factor A (Tipo de Hoja) (1º ensayo).....	38
Cuadro 3. Prueba Duncan Alfa=0,05 del Factor B (Dosis de AAS®) (1º ensayo).....	39
Cuadro 4. Análisis de Varianza del porcentaje de Oxidación (1º ensayo).....	40
Cuadro 5. Prueba Duncan Alfa=0,05 del porcentaje de Oxidación (1º ensayo).....	41
Cuadro 6. Análisis de Varianza del porcentaje de Callogénesis (1º ensayo).....	43
Cuadro 7. Prueba Duncan Alfa=0,05 del porcentaje de Callogénesis (1º ensayo).....	43
Cuadro 8. Análisis de Varianza de la Relación del porcentaje de Callo Nodular (1º ensayo).....	45
Cuadro 9. Análisis de Varianza del porcentaje de Callo Mixto (1º ensayo).....	46
Cuadro 10. Análisis de Varianza del porcentaje de Contaminación (2º ensayo).....	47
Cuadro 11. Prueba Duncan Alfa=0,05 del Nivel A (Biocida) (2º ensayo).....	48
Cuadro 12. Prueba Duncan Alfa=0,05 del Nivel B (Dosis) (2º ensayo).....	48
Cuadro 13. Análisis de Varianza del porcentaje de Oxidación (2º ensayo).....	49
Cuadro 14. Análisis de Varianza del porcentaje de Callogénesis (2º ensayo).....	50
Cuadro 15. Análisis de Varianza del porcentaje de Callo Cicatricial (2º ensayo).....	52
Cuadro 16. Análisis de Varianza del porcentaje de Callo Nodular (2º ensayo).....	52
Cuadro 17. Datos de la variable de respuesta Contaminación (1º Ensayo).....	70
Cuadro 18. Datos de la variable de respuesta Oxidación (1º Ensayo).....	71
Cuadro 19. Datos de la variable de respuesta Callogénesis (1º Ensayo).....	72
Cuadro 20. Datos de la variable de respuesta Contaminación (2º Ensayo).....	73
Cuadro 21. Datos de la variable de respuesta Oxidación (2º Ensayo).....	74
Cuadro 22. Datos de la variable de respuesta Callogénesis (2º Ensayo).....	74

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diagrama de temperatura de Machado.....	24
Gráfico 2. Climograma de Machado.....	25
Gráfico 3. Caracterización de la relación del nivel de oxidación en los explantes foliares sometidos a diferentes dosis biocida AAS.....	42
Gráfico 4. Caracterización de la reacción callogénica de explantes foliares sometidos a diferentes dosis del biocida AAS.....	44
Gráfico 5. Caracterización de la relación del nivel de oxidación en los explantes foliares sometidos a diferentes dosis en porcentaje del recomendado técnico (RT) del biocida PPM™.....	50
Gráfico 6. Caracterización de la reacción callogénica de explantes foliares sometidos a diferentes dosis del biocida PPM™.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción callogénica inducida en explantes foliares de genotipos de <i>Coffea</i> (<i>canephora</i> y <i>arabica</i>).....	13
Figura 2. Ubicación de la zona de estudio.....	23
Figura 3. Ubicación del laboratorio y el pie de café.....	23
Figura 4. Reacción callogénica inducida en explantes foliares de <i>Coffea dewevrei</i>	46
Figura 5. Sala de preparación de medios de cultivo del Laboratorio de biotecnología.....	60
Figura 6. Vista externa del Laboratorio.....	60
Figura 7 y 8. Especie de café arbórea del estudio: <i>Coffea dewevrei</i>	60
Figura 9. Muestreo de las hojas adultas cerca de la base del árbol.....	61
Figura 10. Muestreo de las hojas jóvenes cerca de la copa.....	61
Figura 11. Aplicación de los plaguicidas con el EPI (Equipo de Protección Individual).....	61
Figura 12. Preparación de los plaguicidas.....	61
Figura 13. Aplicación de los fungicidas-bactericidas sistémicos a las hojas.....	61
Figura 14. Colección de las hojas marcadas.....	62
Figura 15. Introducción de las hojas a la caja de plastroformo.....	62
Figura 16. Proceso de desinfección padrón.....	62
Figura 17. Movimientos concéntricos con el frasco y los agentes desinfectantes.....	62
Figura 18. Enjuague de las hojas con agua destilada dentro de la cámara de flujo.....	63
Figura 19. Autoclavado de los materiales de laboratorio.....	63
Figura 20. Materiales autoclavados en la Cámara de Flujo.....	63
Figura 21. Preparación del medio de cultivo.....	64
Figura 22. Medio de cultivo autoclavado.....	64
Figura 23. y 24. Corte de la nervadura central y los bordes de la hoja porque se los desecha a la hora de introducir in vitro.....	64
Figura 25. Corte de los explantes a 7x7 mm.....	65

Figura 26. Inoculación de los explantes en el medio de cultivo.....	65
Figura 27 y 28. Disposición de los explantes en la BOD.....	65
Figura 29. BOD o Cámara de Germinación.....	66
Figuras 30 y 31. Toma de datos con ayuda del estereoscopio.....	66
Figuras 32 y 33. Recultivo de los explantes (traspaso de los explantes de una placa Petri a otra).....	67
Figura 34. Reubicación de los explantes.....	67
Figura 35. Sellado de las cajas Petri.....	67
Figura 36 y 37. Explantes contaminados con hongos.....	68
Figura 38. Contaminación fúngica.....	68
Figura 39. Contaminación bacteriana.....	68
Figura 40. Sistema para obtener las fotografías de los explantes (Estereoscopio + programa de computador).....	69
Figura 41. Explante con callos nodulares y mixtos.....	69
Figura 42. Caja Petri con explantes con callos mixtos.....	69
Figura 43. Explantes con alta oxidación.....	69

RESUMEN

En Bolivia el café es un cultivo muy importante, pero que hasta ahora el único método de obtención de plantas es el tradicional, mediante semillas que hacen del café una especie monoclonal, lo que a la larga genera problemas de compatibilidad llegando a reducir los rendimientos, y no se ha incursionado aún en el uso del cultivo de tejidos o técnicas de ingeniería genética para la obtención de clones con mejores ventajas.

La especie *Coffea dewevrei* o café excelsa presenta resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*) y a algunos nemátodos (Fazuoli, 1981), como también al minador de la hoja del café (*Leucoptera coffeella*) (Medina Filho et al., 1977). Existen informaciones de que es resistente a bajas temperaturas (Petek, 2005 e Cramer, 1957), lo que le garantiza ser un óptimo material para el mejoramiento genético del café.

La contaminación es el principal problema que afecta los laboratorios de micropropagación comercial. El elevado grado de contaminación y la localización sistémica de microorganismos son responsables, en algunos casos, del fracaso de la implantación de cultivos in vitro, por lo que se viene estudiando la adición de biocidas en el medio de cultivo para disminuir la contaminación.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto biocida de los productos PPM™ (Plant Preservative Mixture) y AAS® (Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH) en el establecimiento de explantes foliares de café (*Coffea dewevrei*) y su influencia en la formación de callos.

Antes de la introducción in vitro se aplicó fungicidas/bactericidas sistémicos ya que el pie de café se encontraba al aire libre, luego se realizó una desinfección de las hojas en el laboratorio con alcohol al 70 % por dos minutos, para ser tratadas con hipoclorito de sodio al 2,5 % y Tween 20 al 0,04 % por 20 minutos, con el posterior triple enjuague con agua deionizada autoclavada. Primeramente se usó el medio de cultivo MS con 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 5 mg.L⁻¹ de BAP. Se contó con dos experimentos. Los explantes fueron inoculados en placas de Petri con 30 mL de medio, para el primer experimento se tuvo 5 dosis de AAS (0, 5, 10, 15 y 20 ml L⁻¹) para el factor B y el factor A era tipo de hojas (hojas jóvenes y maduras). Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial combinatorio con 2 niveles en el Factor A y 5 en el B contando con 4 repeticiones (placas) y 10 explantes por placa. Para el segundo experimento se tenía el mismo medio

y diseño experimental con la diferencia de que se usó únicamente hojas adultas, se contaba con 5 repeticiones y que al medio se agregó 5 concentraciones de los dos biocidas (0, 50, 100, 150 y 200 % de la recomendación técnica de cada producto) que eran los 5 niveles del factor B y el A contaba con dos niveles (adición de AAS y PPM). En ambos experimentos se evaluó la contaminación, callogénesis, oxidación y frecuencia callogénica.

Para el primer experimento se encontró que las concentraciones de AAS probadas tuvieron un efecto en la contaminación, al igual que el tipo de hoja que se usó. Las concentraciones de AAS combinadas con las hojas maduras no fueron efectivas y presentó un índice muy elevado de contaminación (81 %) pero las hojas jóvenes presentaron índices bajos (11 %). Las concentraciones de AAS combinadas con las hojas jóvenes influyeron en la oxidación de manera negativa y tuvieron un efecto negativo también en la callogénesis, ya que a mayor dosis el porcentaje de callogénesis disminuyó, así mismo los tratamientos con menor dosis tuvieron una formación más alto de callos cicatriciales, nodulares y mixtos, este último tipo de callo tiene una probabilidad de diferenciarse en callo embriogénico, y a la larga en embriones. Para el segundo experimento, donde se usó hojas maduras solamente, se encontró que el tipo de biocida y la dosis de este tienen un efecto en la contaminación, se ve que el más efectivo es el PPM, ya que con el AAS hubo un porcentaje muy elevado de contaminación (89,6 %). Las dosis del PPM usadas no tuvieron un efecto directo sobre la oxidación ni la callogénesis y se observó un surgimiento satisfactorio de callos cicatriciales y nodulares, y se conoce que estos tienden a evolucionar a callo mixto y a su vez en embriogénico, por lo tanto se concluye que el mejor tipo de hoja es la hoja joven por los resultados bajos de contaminación que se obtuvo con su uso y que la adición del biocida PPM™ es más adecuada para la especie en estudio ya que es efectivo en el control de la contaminación, sin afectar la oxidación y callogénesis.

Palabras clave: Café in vitro; Biocida; Contaminación; Callogénesis; *Coffea dewevrei*

SUMMARY

In Bolivia coffee is a very important crop, but so far the only method of obtaining plants is the traditional one, by using seeds that make coffee a monoclonal species, which in the long run generates compatibility problems and even reduces yields, and the use of tissue culture or genetic engineering techniques to obtain clones with better advantages has not yet been introduced.

The species *Coffea dewevrei* or café excelsa presents resistance to rust (*Hemileia vastatrix*) and to some nematodes (Fazuoli, 1981), as well as to the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) (Medina Filho et al., 1977). There is information that it is resistant to low temperatures (Petek, 2005 and Cramer, 1957), which guarantees that it is an optimal material for the genetic improvement of coffee.

Contamination is the main problem that affects commercial micropropagation laboratories. The high degree of contamination and the systemic localization of microorganisms are responsible, in some cases, for the failure of the implantation of in vitro cultures, which is why the addition of biocides in the culture medium is being studied to reduce contamination.

The aim of this work is to evaluate the biocide effect of the products PPM™ (Plant Preservative Mixture) and AAS® (Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH) in the establishment of coffee leaf explants (*Coffea dewevrei*) and their influence on the formation of corns.

Before the in vitro introduction, systemic fungicides/bactericides were applied, since the coffee grounds were outdoors, then the leaves were disinfected in the laboratory with 70 % alcohol for two minutes, to be treated with 2.5 % sodium hypochlorite and 0.04 % Tween 20 for 20 minutes, with the subsequent triple rinse with autoclaved deionized water. Firstly, MS culture medium was used with 10 mg.L-1 of 2.4-D and 5 mg.L-1 of BAP. Two experiments were carried out. Explants were inoculated in Petri dishes with 30 mL of medium, for the first experiment there were 5 doses of AAS (0, 5, 10, 15 and 20 ml L-1) for factor B and factor A was type of leaves (young and mature leaves). A Randomized Complete Design with combinatorial factor arrangement was used with 2 levels in Factor A and 5 in Factor B counting with 4 replicates (plates) and 10 explants per plate. For the second experiment, the same medium and experimental design was used, with the

difference that only adult leaves were used, 5 replicates were counted and 5 concentrations of the two biocides were added to the medium (0, 50, 100, 150 and 200 % of the technical recommendation of each product), which were the 5 levels of factor B and A had two levels (addition of AAS and PPM). In both experiments, contamination, callogenesis, oxidation and callogenic frequency were evaluated.

For the first experiment it was found that the AAS concentrations tested had an effect on contamination, as did the type of leaf used. The AAS concentrations combined with the mature leaves were not effective and presented a very high contamination rate (81 %) but the young leaves presented low rates (11 %). The concentrations of AAS combined with the young leaves influenced the oxidation in a negative way and also had a negative effect on the callogenesis, since the higher the dose, the percentage of callogenesis decreased, likewise the treatments with lower doses had a higher formation of cicatricial, nodular and mixed callus, this last type of callus has a probability of differentiating into embryogenic callus, and in the long run into embryos. For the second experiment, where only mature leaves were used, it was found that the type of biocide and the dose of this have an effect on contamination, it is seen that the most effective is PPM, since with AAS there was a very high percentage of contamination (89.6 %). The doses of PPM used did not have a direct effect on oxidation or callogenesis and a satisfactory emergence of cicatricial and nodular corns was observed, and it is known that these tend to evolve into mixed callus and in turn into embryogenic, therefore it is concluded that the best type of leaf is the young leaf because of the low results of contamination obtained with its use and that the addition of biocide PPM™ is more appropriate for the species under study because it is effective in controlling contamination, without affecting oxidation and callogenesis.

Keywords: In vitro coffee; Biocide; Contamination; Callogenesis; *Coffea dewevrei*

1. INTRODUCCIÓN

La gran demanda de café exige ser afrontada por los países y la ciencia con la utilización de técnicas innovadoras que minimicen el tiempo de producción y genere plantas más resistentes a plagas y a ambientes adversos.

Existen más de 130 especies del género *Coffea*, pero sólo tres son cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* P. y *Coffea liberica* Bull, las cuales presentan limitantes para su mejoramiento genético a través de programas convencionales por su carácter perenne y diferencias de nivel de ploidía e incompatibilidad. Además, existen características de importancia como resistencia a plagas o patógenos, que no se encuentran presentes en el germoplasma disponible. Técnicas de ingeniería genética se han utilizado en otros países para solventar esta barrera y se han generado avances significativos durante las últimas décadas. (Villalta y Gatica, 2019).

En Bolivia el café es un cultivo muy importante, pero que hasta ahora el único método de obtención de plantas es el tradicional, mediante semillas o monoclonal que a la larga genera problemas de compatibilidad llegando a reducir los rendimientos, y no se ha incursionado aún en el uso del cultivo de tejidos para la obtención de clones con grandes ventajas como obtener plantas libres de enfermedades, propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria, además de optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales, entre otros.

La especie *Coffea dewevrei*, también conocida como café excelsa, es una especie de café originaria de África Central, pudiendo llegar a medir de 8 a 10 metros de altura. (Carvalho, 1990).

Además de estas características morfológicas, el café excelsa presenta resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*) y a algunos nemátodos (Fazuoli, 1981), como también al minador de la hoja del café (*Leucoptera coffeella*) (Medina Filho et al., 1977). Existen informaciones de que es resistente a bajas temperaturas (Petek, 2005 y Cramer, 1957), lo que le garantiza ser un óptimo material para el mejoramiento genético del café.

Debido a sus características morfológicas, la variedad de café excelsa puede ser utilizada como cortina rompevientos en cultivos de cafetales, debido al altísimo porte. Otra aplicación comercial de la especie sería la formación de *blends*, si se realiza la adición de hasta 23 % de sus granos en el café arábica no presenta grande influencia en la bebida de café (Carvalho, 2008).

La contaminación es el principal problema que afecta los laboratorios de micropropagación comercial, que fue estimada que si resulta en un promedio mayor de 10 % puede resultar en el completo fracaso del proceso de producción (Cassells, 2001; citado por Scherwinski-Pereira, 2010). Un nivel bajo de contaminación no puede ser obtenido sin la aplicación de prácticas de garantía de calidad y la introducción de estrategias de control de la producción, comunes en otros segmentos industriales (Scherwinski-Pereira, 2010).

El manejo de contaminantes en el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos vegetales depende inicialmente del uso de plantas matrices libres de patógenos y de la combinación de métodos de desinfección y/o cultivo de meristemos para el establecimiento de cultivos libres de patógenos y contaminantes (Cassells, 2000 a; citado en Scherwinski-Pereira, 2010).

La detección de contaminantes bacterianos latentes y la eliminación de la contaminación fúngica y bacteriana de cultivos establecidos *in vitro* permanecen a la espera del desarrollo de mejores estrategias (Scherwinski-Pereira, 2010).

La contaminación es un problema muy importante en el cultivo *in vitro* de plantas, por lo que el presente trabajo pretende probar que esta puede ser controlada por biocidas que poseen una acción antibiótica / antimicótica, sin que estos afecten a la callogénesis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto biocida de los productos PPM™ (Plant Preservative Mixture) y Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH® en el establecimiento de explantes foliares de café (*Coffea dewevrei*) y su influencia en la formación de callos.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el porcentaje de contaminación de los explantes con los tratamientos de PPM™ y Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH® y con el uso de hojas jóvenes y maduras.
- Relacionar el porcentaje de oxidación de los explantes con los tratamientos de PPM™ y Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH® y con el uso de hojas jóvenes y maduras.
- Relacionar la formación de callos de los explantes con los tratamientos de PPM™ y Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH® y con el uso de hojas jóvenes y maduras.
- Evaluar la frecuencia callogénica con respecto a los tratamientos de PPM™ y Antibiotic Antimycotic Solution SIGMA-ALDRICH® y con el uso de hojas jóvenes y maduras.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origen e Importancia del Café

3.1.1. Origen del Café

Existe consenso casi unánime que el café se originó en su forma silvestre conocida como Arábica en el altiplano de Abisinia (actual Etiopia) y circula una serie de leyendas respecto al descubrimiento de su uso como bebida. La más aceptada hace referencia a Kaldi, un pastor de Abisinia quien observó que sus cabras saltaban alrededor muy excitadas y llenas de energía después de haber comido las hojas y frutos de cierto arbusto. Kaldi llevó frutos y ramas de ese arbusto al Abad de un monasterio quien habría descubierto la bebida del café al poner las cerezas al fuego, las que al tostarse produjeron un exquisito aroma.

El café se hizo popular alrededor del siglo XIII como bebida estimulante, posiblemente a raíz de la prohibición islámica de las bebidas alcohólicas. Ya en el siglo XV, los musulmanes introdujeron el café en Persia, Egipto y Turquía, donde la primera cafetería, Kiva Han, abrió en 1475 en Constantinopla. Posteriormente el café llegó a Europa en el siglo XVII gracias a los mercaderes venecianos, donde rápidamente se transformó en una bebida favorita y circuló en los distintos países (Italia, 1645; Inglaterra, 1650; Francia, 1660). La primera cafetería en Londres se abrió en 1652 y en Paris en 1672. En el siglo XVIII, los grandes cultivos se desplazan a Ceilán e Indonesia como también América del Sur, donde la primera plantación se estableció en Brasil en 1727 (Gotteland y De Pablo, 2007).

La primera descripción de una planta de café fue hecha en 1592 por Prospero Alpini y, un siglo después, Antoine de Jussieu (1713) la denominó *Jasminum arabicum* (la consideró un jazmín). Fue Linneo (1737) quien la clasificó en un nuevo género, el género *Coffea*, con una sola especie conocida: *C. arabica*. Hoy, se reconocen 103 especies, sin embargo, sólo dos son responsables del 99 % del comercio mundial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Arias, 2013).

3.1.2. Importancia del Café

El café es una bebida muy apetecida por sus características organolépticas, convirtiéndola en una de las más consumidas en el mundo. Contiene una inmensa variedad de compuestos químicos responsables de su calidad sensorial y de sus efectos fisiológicos, como por ejemplo la cafeína, que es un estimulante reconocido del sistema nervioso central y que incide en el estado de alerta del individuo (Gotteland y De Pablo, 2007).

No es posible no exagerar la importancia del café en la economía mundial. El café es uno de los productos primarios más valiosos, segundo en valor durante muchos años, superado únicamente por el petróleo como fuente de divisas para los países en desarrollo. El cultivo, procesamiento, comercio, transporte y comercialización del café proporciona empleo a millones de personas en todo el mundo. El café tiene una importancia crucial para la economía y la política de muchos países en desarrollo. Para muchos de los países en desarrollo del mundo, las exportaciones de café representan una parte sustancial de sus ingresos en divisas, en algunos casos más del 80 %. El café es un producto básico que se comercia en los principales mercados de materias primas y de futuros, muy en especial en Londres y en Nueva York (International Coffee Organization).

3.2. El Café en el Mundo

Según Gotteland y de Pablo (2007) el café es indudablemente uno de los productos vegetales más importantes del comercio internacional global y en la actualidad se produce café en distintas regiones, siendo Brasil el mayor país productor y exportador.

Según el Informe del Mercado del Café emitido en noviembre del 2019 por la Organización Internacional del Café, se calcula que la producción mundial del año cafetero 2018/19 (año cafetero es el período de un año comprendido entre el 1 de octubre y el 30 de septiembre del año siguiente) fue de 169 millones de sacos (60 kg. c/u), un 5.4 % más voluminosa que la de 2017/18. La producción de Robusta aumentó un 11 % en 2018/19 y fue de 70,67 millones de sacos (41,82 %). La de Arábica aumentó un 1,7 % y fue de 98,33 millones de sacos (58,18). El café Arábica produce un café fino y

aromático, mientras que el Robusta, que tiene menor precio, produce una bebida rica en cafeína, fuerte y más ácida y es usualmente usada para la fabricación de café soluble o instantáneo. Se calcula también que la producción mundial del año cafetero 2019/20 descenderá un 0,9 % y será de 167,4 millones de sacos.

Los principales productores mundiales de café en el 2018 fueron: en primer lugar, Brasil con 61,7 millones de sacos de 60 kg. (36,7 % con un alza del 17 % respecto a la gestión pasada), seguido de Vietnam con 29,5 millones (17,6 %), Colombia con 13,6 millones (8,1 % con un alza del 2,7 %), Indonesia con 10,2 millones (6,1 %) y Etiopía ocupa la quinta posición con 7,5 millones (4,5 % con un alza del 0,6 %). En términos comerciales, durante el período 2004/2005 se alcanzó un nivel global de exportaciones de US\$ 8.900 millones. En los países productores este cultivo tiene un alto impacto económico y social pues en su mayoría involucra a pequeños agricultores y a una numerosa mano de obra.

El consumo mundial en 2018/19 creció un 1,7 %, a 165,35 millones de sacos, y se espera que en 2019/20 aumente un 1,5 % y sea de 167,9 millones de sacos.

El consumo per cápita de café es variable en el mundo. Según los últimos datos de la Gotteland y de Pablo (2007), los países nórdicos de Europa tienen el mayor consumo aparente expresado en kg/año/persona de café verde: Finlandia (11,8), Noruega (9,5) y Dinamarca (9,1). El mayor productor, Brasil, muestra un consumo per cápita de 4,4 kg/año, Estados Unidos, 4,1 kg/año, Colombia 1,0 kg/año, Argentina 1,0 kg/año y Chile 0,6 kg/año, esta última cifra representa un consumo aparente diario de 1,64 gramos por persona.

3.3. El Café en Bolivia

Según Sagárnaga (2017) el café marca el proceso de evolución de la sociedad humana. Es, después del agua, la segunda bebida más consumida en el planeta, a diario se beben más de 2.250 millones de tazas de café. Ello ha implicado que, siglo tras siglo, su preparación busque el sabor perfecto. Constituye una ciencia y un arte, cuyo actual boom mundial ya llegó a Bolivia. Hay dos tipos de café, el comercial, o de commodity, y el de especialidad. El segundo se determina con base en las características, tanto de cuidado

en el cultivo como de las intrínsecas botánicas de plantas y suelos. Bolivia produce desde aproximadamente el año 2000 café de especialidad que mayormente se exportaba. Ya desde hace unos siete años empezó un boom interno, donde se comienza a apreciar, poco a poco, el grano boliviano. El eje del negocio empezó a ser el sabor. Y tras ese primer paso, hoy en Bolivia ya se consume café de especialidad, aunque en todavía contados, pero notables “coffee shops”. Son sitios donde el preparado de esta bebida, nacida hace siglos en Etiopía, requiere puntilloso detalle y sacrificada investigación, es decir, arte y ciencia.

Empieza en los yungas: La cadena del café más fino empieza generalmente en el trópico paceño, aunque ya se cultivan destacados granos en Santa Cruz y Cochabamba. En los Yungas de La Paz se produce la especie conocida como “arábica”, cuyas variedades le han dado fama internacional. De hecho, por ejemplo, en 2011, el grano de Takesi fue considerado uno de los diez mejores del mundo en el concurso Cafés del Año, organizado por la Specialty Coffee Association of America. En aquel certamen participaron 300 tipos de café de todo el planeta. Existe una virtud y a la vez adversidad del café boliviano es que, a diferencia de muchos de sus competidores, es cosechado a mano.

Para los productores, a una serie habitual de delicados cuidados agronómicos en los últimos años se ha sumado otra de adversidades sociales y económicas. “La producción de coca nos ha afectado muchísimo, éramos 40 productores, ahora quedamos 12”, cita Poulet, “hubo quienes hasta arrancaron sus plantas para luego sembrar coca”. A esa competencia interna se sumó la externa, donde los productos vietnamita, centroamericano o brasileño coparon mercados y bajaron los precios.

El productor añade que en este negocio el 50 por ciento de los costos constituye la mano de obra y que el boom cocalero subió marcadamente ese gasto. “En Centroamérica el jornal está, al cambio, en 40 bolivianos, aquí cobran el triple, y mientras acá se cosecha un promedio de 10 quintales por hectárea, los centroamericanos cosechan 40”, compara.

Según datos oficiales, entre 2012 y 2016, los volúmenes de exportación del café boliviano cayeron de 60.000 a 30.000 sacos. En términos monetarios, el descenso fue de 20 a 12 millones de dólares. Mientras en 2012 se registraban 23 mil familias productoras, hoy se

contabilizan alrededor de 15.000 (Sagárnaga, 2017).

3.4. Generalidades del género *Coffea*

Según la Organización Internacional del Café, el café pertenece a la familia de las rubiáceas (Rubiaceae), grupo que engloba unos 500 géneros y más de 6.000 especies, la mayoría árboles y arbustos tropicales.

Dentro del género *Coffea* hay más de 100 especies, todas ellas autóctonas de África tropical y de algunas islas de Océano Índico, como Madagascar. Todas son leñosas, pero comprenden desde arbustos hasta árboles de 5 a 10 metros de altura. Sus hojas son elípticas, acabadas en punta y aparecen por pares. Presentan peciolos cortos y pequeñas estípulas, y en el envés pueden aparecer unas pequeñas cavidades que albergan pequeños artrópodos, conocidas como domitia. Las hojas pueden ser también de distintos colores: verde lima, verde oscuro, bronce o con matices purpúreos. Los frutos son tipo drupa, con epicarpio carnoso y doble semilla. Las flores aparecen en inflorescencias.

Las dos especies más importantes desde el punto de vista económico son *Coffea arabica* L. (café arábica) y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta). Otra especie también conocida pero cultivada en menor escala es *Coffea liberica* (café libérica). *Coffea excelsa* y *Coffea dewevrei* también se producen comercialmente, pero recientemente se han identificado como variedades de *C. liberica*, *C. arabica* supone más del 60 % de la producción mundial, frente a *C. canephora* que abarca prácticamente el resto. *C. liberica* supone menos del 1 % (ICO citado por Jimenez, 2014).

3.5. Café excelsa (*Coffea dewevrei*)

La clasificación taxonómica del cafeto según Cronquist (1985), mencionado por Mazorca (1998) es la siguiente, Reino: vegetal; Sub reino: Embryophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Sub Clase: Asteridae; Orden: Rubiales; Familia: Rubiaceae; Género: *Coffea*; Especie: *Coffea dewevrei* L. y Nombre común: Café excelsa.

La especie *Coffea dewevrei*, también conocida como café excelsa, es una especie de

café originaria de África Central, que puede llegar a medir de 8 a 10 metros de altura.

Las hojas son grandes, en promedio de 26 cm de longitud por 13 cm de ancho, y coriáceas. Florecen abundantemente en varias épocas del año y las flores están agrupadas en inflorescencias densas, cuatro a cinco inflorescencias por axila foliar y de una a cinco flores por inflorescencia. Son más grandes de que las de *Coffea arabica*, presentándose con cinco a seis lóbulos en la corola y son auto incompatibles.

La maduración de los frutos es lenta, aproximadamente de un año; los frutos son ovoides (16 x 14 mm), con pedúnculos cortos, con disco grande, saliente y rojo. El mesocarpio tiene poco líquido y, el endocarpio, bastante sólido. Las semillas, en promedio con 9,2 mm de longitud por 6,3 mm de ancho, son en general afiladas en una de las extremidades y presentan película plateada adherente y endospermo amarillado. El número total de flores producidas es grande; la producción anual es elevada y el promedio de semillas del tipo moca es aproximadamente de 21 % (Carvalho, 1990).

Además de estas características morfológicas, el café excelsa presenta resistencia a la roya (*Hemileia vastatrix*) y a algunos nematoides (Fazuoli, 1981), y al minador de la hoja del café (*Leucoptera coffeella*) (Medina Filho et al., 1977). Existen informaciones de que es resistente a bajas temperaturas (Petek, 2005 y Cramer, 1957), lo que le garantiza óptimo material para el mejoramiento genético de café.

Debido a sus características morfológicas, el café excelsa puede ser utilizado como rompe-viento en cultivos cafetaleros, debido al altísimo porte. Otra aplicación comercial de la especie sería la formación de *blends*, se puede realizar la adición de hasta 23 % de sus granos al café arábico, no presenta grande influencia en la bebida del café (Carvalho, 2008).

3.6. Importancia de la multiplicación del Café

Hoy, se reconocen 103 especies, sin embargo, sólo dos son responsables del 99 % del comercio mundial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Arias, 2013).

Ante la sustentabilidad de la caficultura, hay una necesidad constante de generar nuevas

variedades con elevada producción, resistencia a enfermedades, tolerancia a plagas y adaptadas a diferentes condiciones de cultivo (Söndahl et al., 1985 citado por Marota, 2003).

Debido a las diferencias de ploidía entre las especies de café, estas se encuentran aisladas genéticamente y por tanto los programas tradicionales de fitomejoramiento no son factibles de utilizar, se necesitan hasta 24 años de cruces continuas para obtener una variedad nueva, lo anterior ha ocasionado que se recurra al cultivo de tejidos como alternativa (Sondahl y Lauritis 1992; Ascanio y Arcia 1994; Hamon et al. 2000; Etienne et al. 2002).

Las diferentes ploidías en el género *Coffea* obstaculizan la introducción de características agronómicas de las especies diploides hacia las tetraploides y por esto, es tan importante el uso de técnicas que puedan romper estas barreras entre especies y que sirvan para complementar los programas tradicionales de mejoramiento genético y, a la vez la base genética disponible. El mejoramiento del café y la obtención de un nuevo cultivar con base en las metodologías tradicionales, es un proceso que requiere alrededor de treinta años (Melese, 2016) y esfuerzos, ya que comprende varios pasos como la selección de las especies o variedades a utilizar, su consiguiente hibridación y evaluación de la progenie resultante, en algunos casos retrocruces, y cruces interespecíficos (Villalta y Gatica, 2019).

Uno de los sucesos más espectaculares en la historia del cultivo de tejidos de plantas, no sólo por su valor científico, sino por el potencial de aplicación ha sido el descubrimiento de la embriogénesis somática en células cultivadas in vitro (Reinert 1958; Stewart et al. 1958 citado por González, 2003). Este descubrimiento permitió demostrar la totipotencia de las células de plantas superiores y su capacidad para formar plantas completas (Reinert et al. 1977 citado por González, 2003).

La micropropagación vegetativa de plantas origina individuos idénticos a la planta madre. Es una técnica que está siendo cada vez más adoptada en el ámbito mundial, principalmente por su mayor efectividad (Haine, 1992). La propagación vegetal es la indicada para la multiplicación del material genético de alta productividad resistente a

enfermedades garantizando uniformidad en las poblaciones y manteniendo la ganancia genética obtenida en la selección (Davide, Faria y Botelho, 1995). Por eso el uso de técnicas de propagación vegetativa *in vitro* en café es una alternativa viable para la rápida multiplicación, de nuevas plantas, nuevos clones, híbridos, variantes somaclonales o plantas transgénicas, con características deseables y representadas por un número pequeño de especies (Söndahl, et al., 1985 citado por Marota, 2003).

Los métodos de cultivo de tejidos permiten la producción de plantas relativamente uniforme en grande escala, en menor periodo de tiempo en relación con los métodos convencionales. Usando el cultivo de tejidos para la propagación de café, existen tres diferentes métodos que pueden ser usado: microestacas, embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta (Söndahl et al., 1985 citado por Marota, 2003).

La embriogénesis somática ha demostrado ser el mejor método de propagación a gran escala. Se trata de un proceso característico de las plantas vasculares, por el cual células de tejidos somáticos se desenvuelven hasta la formación completa de una planta, a través de una serie de estancias embrionarias semejantes a aquellas observadas en la formación de embriones cigóticos (Williams y Maheswaran, 1986; Rodríguez et al., 2000).

El embrión somático es una estructura bipolar independiente desarrollada partir de: inducción y activación de células totipotentes, formación de células y grupos de células embriogénicas, diferenciación bipolar, y el desenvolvimiento de embrión según los estadios embrionarios característicos, maduración y germinación de manera similar a aquella que ocurre con el embrión cigótico (Tisserat, 1985). Este proceso se presenta de forma directa sobre la superficie de los tejidos organizados (hojas, caules, etc.) y de forma indirecta a través de una etapa intermediaria de formación de callos o suspensión celular (Rodríguez et al., 2000).

El medio básico utilizado en diversos cultivos es llamado "MS", en referencia a sus autores, Murashige y Skoog (1962). Un medio de cultivo debe contener macro y microelementos, agua, aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento, pudiendo ser líquido o solido a través de la adición del agar. También son utilizados carbohidratos como sacarosa, proporcionando un crecimiento vigoroso y saludable (Thorpe y Patel,

2012). En cultivo de tejidos, la adición de hormonas en los medios de cultivo es de suma importancia, pues reproduce lo que ocurre naturalmente en la planta, combinaciones de esas sustancias propician un mejor crecimiento y desenvolvimiento del explante (Junqueira y Carneiro 2000).

3.7. La callogénesis

El proceso de embriogénesis se presenta de forma indirecta a través de una etapa intermediaria de formación de callos o suspensión celular (Rodríguez et al., 2000).

Según González (2003) dentro del protocolo de regeneración por embriogénesis somática en *Coffea spp.* existen diferentes etapas o fases por la que pasa el proceso. Cada fase está regulada por diversos factores que se conjugan e interactúan para que el proceso se desarrolle. En la fase inicial o de inducción se debe formar un callo compuesto por células con alta capacidad regenerativa y por ser la fuente inicial de biomasa se debe buscar una población celular que posea alta tasa multiplicativa, sin perder las características fisiológicas y bioquímicas que le permiten regenerar.

Para la inducción de la formación de callos de *Coffea canephora* a partir de explantes foliares se emplean, generalmente, 2,4-D y kinetina como reguladores del crecimiento. Estos compuestos son factores que controlan y regulan el proceso de formación de callo con potencial embriogénico.

La embriogénesis somática en café, así como en otros cultivos, depende del estado fisiológico del explante (Staritsky, 1970 citado por Marota, 2003) del tipo de hoja, del tiempo de subcultivo (Michaux-Ferriere et al., 1987 citado por Marota, 2003), del estado fisiológico de las plantas, de las condiciones del ambiente y del genotipo.

El primer estudio histológico de la embriogénesis somática en callo de *Coffea arabica* utilizando explantes foliares describió que la proliferación de los callos es originada de las células del mesófilo lagunoso, y que callos embriogénicos de alta y baja frecuencia se originan de rutas alternativas de desarrollo (Söndahl et al., 1979a citado por Marota, 2003).

La embriogénesis de baja frecuencia (embriogénesis directa) ocurre a partir de la

diferenciación de algunas células localizadas en los bordes del explante. La embriogénesis de alta frecuencia se origina a partir de la redeterminación de células diferenciadas, de la proliferación de callos y de la inducción de células embriogénicas determinadas, dependiente de la acción de reguladores de crecimiento para retomar la actividad mitótica y para la determinación del estado embriogénico (Marota, 2003).

3.8. Tipos de callos

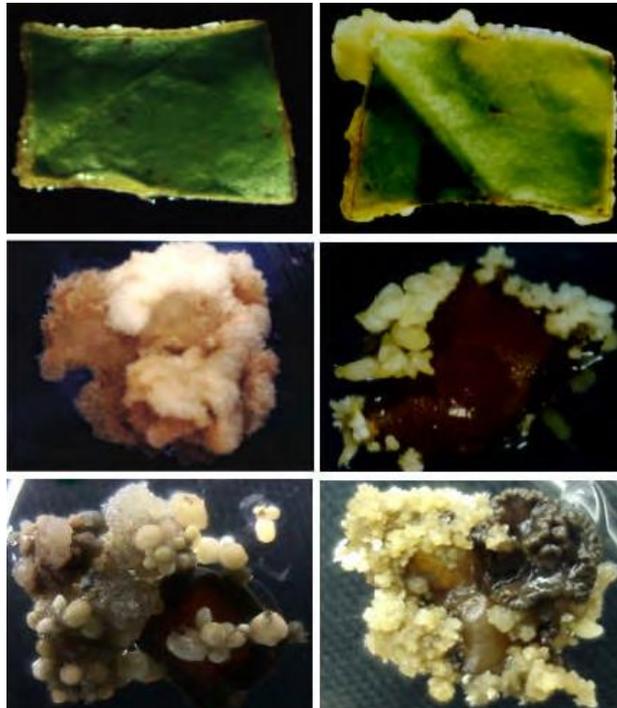


Figura 1. Reacción callogénica inducida en explantes foliares de genotipos de *Coffea (canephora y arabica)*: A, **callo cicatricial** a los 28 días de cultivo en el genotipo Catimor UFV 395-141; B, **callo nodular** a los 45 días de cultivo en el genotipo Catimor UFV 395-141; C, **callo mixto** a los 156 días de cultivo en el genotipo Catimor UFV 395-141; D, **embriogénesis directa** a los 56 días en la variedad Apoatã; E, **callo embriogénico** a los 56 días en el genotipo Catimor UFV 395-141; F, **callo friable embriogénico** a los 112 días en la variedad Apoatã. (Marota, 2003).

Según los resultados obtenidos en la tesis de doctorado de Marota (2003), la reacción callogénica inducida en explantes foliares de los genotipos de *Coffea (canephora y arabica)* resultó en la formación de callos cicatriciales, callos nodulares, callos mixtos, callos embriogénicos y callos friables embriogénicos, conforme a la Figura 1, el callo cicatricial (Figura 1A) es aquel que ocurre en los primeros días de inducción, después de la reacción en las extremidades de los explantes, donde fue hecho o corte en el tejido foliar. Este tipo de reacción es denominado callo de cicatrización por Michaux-Ferriere et al.

(1987), siendo que sobre esta formación se desenvuelven otros callos. A lo largo del tiempo de cultivo, callos con formaciones globulares compactas desenvuelven, generalmente en las proximidades de la región donde ocurría una nervura lateral, siendo denominados calos nodulares (Figura 1B). Callos mixtos son aquellos en los cuales ocurrieron formaciones amorfas de células alargadas, de coloración blanquecina, sobreponiéndose a los callos compactos (Figura 1C). En general, el surgimiento de este tipo de callo es relativamente rápido, en medios conteniendo como regulador de crecimiento citoquininas y auxinas, principalmente el 2,4-D, que cuando es comparado con callos inducidos con citoquininas solamente (Nakamura et al., 1992). Cuando ocurría la formación de embriones directamente de los explantes cultivados en cajas Petri, el callo fue denominado callo embriogénico (Figura 1D e 1E). Callos friables embriogénicos son aquellos formados por agregados de células, midiendo cerca de 1 mm de diámetro, que se sueltan de los tejidos foliares, presentando coloración amarillo-crema (Figura 1F). La presencia de embriones en este tipo de callo también fue verificada. Este tipo de callo posibilita el establecimiento de cultivos líquidos a partir de los agregados celulares, y posterior diferenciación en embriones somáticos. En este sistema de cultivo de cultivos líquidos, Zamarripa et al. (1991) obtuvieron 400.000 embriones g⁻¹ de materia fresca de agregados celulares en *Coffea canephora*.

3.9. La Contaminación Microbiana en el cultivo de tejidos

Según Scherwinski-Pereira (2010) los términos contaminación microbiana en el cultivo de tejidos, contaminación en el cultivo *in vitro*, o simplemente contaminación, son reiteradamente utilizados en los trabajos de micropropagación de plantas para designar, en laboratorio la presencia de microorganismos en células, tejidos y órganos o una colección de plantas. Independientemente del tipo de asociación que los diferentes grupos de microorganismos puedan estar involucrados, es un procedimiento rutinario descartar las muestras que presenten alguna colonia visible al ojo y que pueda causar algún tipo de amenaza al cultivo. Este procedimiento parte del principio de que, en general, los microorganismos en las plantas en fase de micropropagación son responsables de la patogenicidad, adoptándose de esa forma el principio de la erradicación parcial o total del cultivo como medida de control, de esta forma que la

contaminación puede ser definida como el acto de que algo se infecte, presuponiendo la ocurrencia de una enfermedad contagiosa, causada por un agente biológico. Sin embargo, como ya se sabe, la gran mayoría de los microorganismos contaminantes en el cultivo de tejidos de plantas no promueven la muerte de los materiales establecidos in vitro directamente por causar enfermedades en las plantas, pero sí, generalmente por la competencia que se genera con las plantas in vitro por los nutrientes del medio de cultivo y porque excretan sustancias generalmente tóxicas a los explantes en el medio de cultivo.

De hecho, el estado normal de las plantas es el de coexistir con una amplia gama de microorganismos simbiotes o no simbiotes, presentes en los diversos órganos de las plantas, como hojas o raíces, cuyos efectos o finalidades son objeto de profundas investigaciones en áreas como la microbiología. Para tener idea de la complejidad del tema, se estima que aproximadamente 90 % de las especies vegetales presentan algún tipo de asociación simbiótica con microorganismo como los rizobios (asociación de bacterias con plantas leguminosas), micorrizas (asociación de hongos con plantas), rizobacterias (bacterias promotoras de crecimiento de plantas - RPCPs) y las diazotróficas (bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico), de tal modo que muchos beneficios recíprocos fueron desarrollados, como mayor crecimiento, reproducción y resistencia a estreses bióticos y abióticos para las plantas, así como un lugar de refugio, nutrición y diseminación para el lado de los microorganismos (Scherwinski-Pereira, 2010).

La contaminación es el principal problema que afecta los laboratorios de micropropagación comercial, que fue estimada de representar en promedio el 10 %, pero pudiendo resultar en el completo fracaso del proceso de producción (Cassells, 2001). Pérdidas por contaminación de hasta 2 % por subcultivos son usualmente admitidas como el nivel máximo para garantizar el éxito de la producción. Ese nivel no puede ser obtenido sin la aplicación de prácticas de garantía de calidad y la introducción de estrategias de control de la producción, comunes en otros segmentos industriales (Scherwinski-Pereira, 2010).

El manejo de contaminantes en el cultivo in vitro de células, tejidos o órganos vegetales depende inicialmente del uso de plantas matriz libres de patógenos y de la combinación

de métodos de desinfección y/o cultivo de meristemos para el establecimiento de cultivos libres de patógenos y contaminantes (Cassells, 2000 a).

Aunque el entendimiento sobre la identidad, fuentes y epidemiología de los diferentes contaminantes microbianos han avanzado considerablemente en los últimos años, la detección de contaminantes bacterianos latentes y la eliminación de la contaminación fúngica y bacteriana de cultivos establecidos *in vitro* permanecen a la espera del desarrollo de mejores estrategias. Una vez seguidos los procedimientos básicos padrones de desinfección, la contaminación frecuente se origina de la introducción en cultivos de explantes contaminados con microorganismos endofíticos o resistentes al proceso de desinfección (Scherwinski-Pereira, 2010).

3.9.1. Efecto de la Contaminación microbiana en el Cultivo in vitro

El elevado grado de contaminación y la localización sistémica de microorganismos son responsables, en algunos casos, por el fracaso de la implantación de cultivos in vitro. La contaminación perjudica incluso el desarrollo de experimentos en función del reducido número de explantes obtenidos (Pasqual, 2001a).

Según Scherwinski-Pereira (2010) los microorganismos compiten con los explantes por el espacio, carbohidratos (fuente de energía), nutrientes y otros compuestos, pudiendo también liberar en el medio de cultivo sustancias tóxicas perjudiciales al desarrollo del material *in vitro*. Algunos hongos y levaduras reducen el pH del medio (< 3) donde ocurre la fermentación de los carbohidratos, produciendo sustancias fitotóxicas y liberando compuestos como etanol y ácido láctico.

La asepsia de explantes y esterilización del medio de cultivo, vidriera y ambiente de inoculación son condiciones imprescindibles en trabajos de cultivo vegetales. Cualquier microorganismo que entre en contacto con el medio tendrá condiciones de desarrollarse y, como consecuencia, inviabilizará el cultivo.

Hay relatos de la presencia de microorganismos endofíticos en tejidos vegetales en un gran número de especies de plantas. Hongos, levaduras y bacterias han sido aislados con mayor frecuencia y su presencia puede ser identificada al principio del cultivo. Sin

embargo, mayores problemas están relacionados con contaminaciones bacterianas, especialmente aquellas que permanecen latentes *in vitro*, es decir, no presentan un desarrollo visible en el medio, ni síntomas en los tejidos en los primeros subcultivos.

Las contaminaciones pueden ocurrir:

1. Durante el establecimiento del cultivo, probablemente causadas por ineficientes desinfecciones superficiales del explante.
2. Después del establecimiento *in vitro*, causadas por microorganismos endógenos o microorganismos que fueron introducidos durante la inoculación y/o subcultivos.
3. Después de un largo periodo de almacenamiento post-esterilización.

Contaminantes pueden ser introducidos con el explante, durante las manipulaciones en el laboratorio y/o por vectores (Scherwinski-Pereira, 2010).

3.9.2. Contaminación por hongos

Según Scherwinski-Pereira (2010) Los hongos son definidos como organismos aclorofilados, eucarióticos, que generalmente se reproducen sexualmente y asexualmente por esporas, y cuyas estructuras somáticas, ramificadas, normalmente filamentosas, son circuncidadas por pared celular. Son organismos heterotróficos que necesitan de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, como por ejemplo la glucosa. Contaminaciones fúngicas son fácilmente visualizadas en virtud de la intensa fructificación de los hongos *in vitro*.

Son los patógenos de plantas más comunes y habitantes saprófitos del suelo. Muchos géneros de hongos están asociados con las plantas, pero especialmente éstos encontrados como contaminantes en cultivo de tejidos incluyen especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Candida*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Chyptococcus*, *Fusarium*, *Microsporium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Rhizopus*, *Rhodotorula* entre otros.

El cultivo *in vitro* de explantes pequeños usados para iniciar los cultivos podrá resultar infestaciones fúngicas generalmente resultan en la muerte del explante, pero algunas veces la protección del cultivo puede ser obtenida y el crecimiento del material cultivado puede continuar (Scherwinski-Pereira, 2010).

3.9.3. Contaminación por bacterias

Según Sherwinski-Pereira (2010) las bacterias constituyen el más común y problemático tipo de contaminación por microorganismos en el cultivo de tejidos, porque éstas pueden ser sistémicas y su detección, muchas veces, es difícil. Numerosos géneros están asociados con el desarrollo de las plantas *in vivo*, los géneros destacados a continuación son encontrados frecuentemente en cultivo de células *in vitro* causando serios problemas: *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Oerskovia*, *Propionobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, y *Xanthomonas*.

Aunque algunos géneros de bacterias puedan ser patogénicos, muchos son encontrados en el suelo como saprofitas, o en las plantas como flora epífita. Sin embargo, pueden interferir en el crecimiento *in vitro* y conducir el cultivo de plantas a la muerte. Para detectar con precisión la contaminación superficial remanente, o contaminación endógena por bacterias, es necesario cultivar explantes en uno o más medios de cultivo que permita un rápido desarrollo de microorganismos.

Cultivos contaminados por bacterias presentan el medio con aspecto turbio. Brotes de algunas plantas desarrollan manchas marrones en sus hojas o en la base, donde después de ser analizadas en el microscopio, son encontradas contaminaciones bacterianas.

Algunas bacterias no se multiplican o se multiplican lentamente en un medio de cultivo, por lo tanto, no forman colonias visibles. Contaminaciones bacterianas en el medio de cultivo son más visibles por medio de la ligera inclinación de los recipientes (Scherwinski-Pereira, 2010).

3.10. Biocidas empleados

3.10.1. PLANT PRESERVATIVE MIXTURE (PPM™)

PPM™ (Preservative Plant Mixture) es un conservante / biocida de amplio espectro de acción, es termoestable que, en función de la dosis, evita o reduce eficazmente la contaminación microbiana en el cultivo de tejidos vegetales. Puede ser usado para

reducir la contaminación de bacterias y hongos en cultivo de tejidos de plantas, y en altas concentraciones para reducir contaminaciones endógenas.

En dosis óptimas, PPM™ no perjudica la germinación de semillas in vitro, la proliferación de callos o la regeneración de callos.

A pesar del uso más estricto de técnicas estériles y condiciones asépticas, la contaminación de las células vegetales y los cultivos de tejidos vegetales sigue siendo un problema persistente.

PPM™ previene la germinación de esporas de bacterias y hongos. Debido a que es estable al calor, se puede esterilizar en autoclave con medios.

PPM™ puede usarse como un ingrediente estándar en medios de cultivo de tejidos vegetales. El PPM es menos costoso que los antibióticos y puede prevenir la contaminación por hongos simultáneamente.

PPM es biocida y bioestático. Además de inhibir la contaminación por contacto con el aire, el agua y el ser humano, también se puede usar para reducir la contaminación endógena.

El principal científico involucrado en el desarrollo de la aplicación del PPM™ es el Dr. Assaf Guri. El Dr. Assaf Guri posee títulos en genética, genética aplicada y mejora vegetal de la Universidad Hebrea de Jerusalén y la Universidad Estatal de Michigan en los Estados Unidos. Antes de unirse a Plant Cell Technology, Inc., Assaf trabajó con el Centro de Investigación Agrícola Volcani en Israel, la Universidad Estatal de Michigan en East Lansing, Michigan y DNAP en Nueva Jersey.

El PPM™ (Plant Preservative Mixture) es compuesto por 5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone y 2-methyl-3(2H)-isothiazolone. Actúa como biocida y fue desarrollado para el uso en el cultivo de tejidos de plantas. Este producto actúa como bactericida y fungicida cuando es adicionado al medio de cultivo (Miyazaki et al., 2010).

Recientemente existen varios estudios comprobando la eficacia del compuesto en la organogénesis adventicia en melón, petunia, y tabaco (Compton y Koch, 2000), en

crisantemo, abedul europeo y rododendro (George y Tripepi, 2001), en *Petunia* híbrida (Miyazaki et al., 2010), en bambú gigante neotropical (Jiménez et al., 2006) y en la regeneración de brotes prolíficos de frutilla (Haddadi, 2010).

3.10.2. ANTIBIOTIC ANTIMYCOTIC SOLUTION® SIGMA (AAS)

El producto Antibiotic Antimycotic Solution® de la empresa Sigma-Aldrich, es usado para el cultivo de células y tejidos como un suplemento en diferentes tipos de medios de cultivo celulares.

Acciones bioquímicas/fisiológicas, modo de acción: La penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. La estreptomicina inhibe la síntesis de proteínas procarióticas al prevenir la transición del complejo de iniciación al ribosoma de prolongación de la cadena y causa *miscoding* (un error en el código genético). La anfotericina B interfiere con la permeabilidad de la membrana fúngica al formar canales en las membranas y hacer que se filtren pequeñas moléculas.

Espectro antimicrobiano: Bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, hongos y levaduras. Solubilizado en una solución reguladora de citrato patentada. Formulado para contener 10,000 unidades/ml de penicilina G, 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 25 mg/ml de anfotericina B. Recomendado para su uso en aplicaciones de cultivo celular a 10 ml/L. Se debe usar Filtrado estéril.

Otros productos usados como antibióticos en el cultivo de tejidos de plantas para la prevención de la contaminación son a base de penicilina, estreptomicina e anfotericina. Algunos trabajos reportan el uso de estos antibióticos en el cultivo de papa (Gilbert, Shohet y Caligari, 1991), en crisantemo y tabaco (Da silva et al., 2003), en la embriogénesis somática de *Huperzia selago* (Szypuła et al., 2005), y en el cultivo de raíces y brotes de *Arnebia densiflora* (Çölgeçen, Koca y Toker, 2011).

3.11. La oxidación en el cultivo de tejidos

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido). En sustratos orgánicos, la oxidación y reducción involucra la participación de átomos de carbono

enlazados en forma covalente a otros átomos (Karp 1998, citado por Azofeifa, 2009).

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados in vitro, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot et al. 1996, Bray et al. 2000).

En el caso particular del cultivo de tejidos in vitro, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George 1993, Tabiyeh et al. 2006, Van Staden et al. 2006, Abdelwahd et al. 2008).

El establecimiento in vitro de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado in vitro (George 1996, Laukkanen et al. 2000, Murkute y Shanti-Patil 2003, Tang y Newton 2004). El desarrollo de este problema está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Este fenómeno se produce por el desbalance entre las reacciones pro-oxidación (excesiva formación de ROS y, o RNS o de naturaleza enzimática) y los mecanismos antioxidantes para detoxificar (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Novoa et al. 2001, Turrens 2003).

No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir (George 1996, Ogita 2005).

La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de

compuestos fenólicos, (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos) ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados (Tabiyeh et al. 2006).

Además, se puede deber a la oxidación de proteínas, a que fenoles se unan con proteínas mediante puentes de hidrógeno (Harms et al. 1983), a la acción de enzimas peroxidasas, las cuales pueden catalizar su oxidación en presencia de peróxido. Este y otros radicales libres son liberados o generados durante el proceso de escisión, limpieza, desinfección y cultivo del explante (George 1996, Uddin y Titov 2007). La presencia de algunas sustancias fenólicas dañinas puede tener un efecto autocatalítico en su síntesis.

El daño que resulta de la producción de exudados es usualmente más severo durante los estados iniciales de cultivo. El problema tiende a cesar cuando el explante inicia su crecimiento (Azofeifa, 2009).

Aparte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, van Staden et al. 2006). La implementación de subcultivos (transferencias) frecuentes a un medio de cultivo fresco en poco tiempo se torna imperativo si el medio de cultivo donde se encuentra el explante muestra indicios de oscurecimiento (Azofeifa, 2009).

Se sabe que el oscurecimiento del medio de cultivo ocurre en función de la acumulación de compuestos fenólicos producidos por el metabolismo secundario de las células. La oxidación de estos compuestos produce sustancias tóxicas, como quinonas, que pueden ser responsables por la pérdida de capacidad embriogénica de las células (Söndahl y Sharp, 1977; Garcia y Menendez, 1987) citado por Marota (2003).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LOCALIZACIÓN

4.1.1. Ubicación geográfica

La ciudad de Machado se halla geográficamente ubicada a Latitud: -21.661, Longitud: -45.925 con coordenadas 21° 39' 40" Sur, 45° 55' 30" Oeste.

El Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado se encuentra ubicado en la ciudad de Machado, un municipio que está en el Estado de Minas Gerais encontrado en el Sudeste de Brasil.

La figura 2 presenta la ubicación de la zona donde se realizó el estudio, muestra el estado de Minas Gerais en Brasil y la ciudad de Machado en el mapa de Minas Gerais.



Figura 2. Ubicación de la zona de estudio

La figura 3 presenta la localización de entes importantes para el estudio.



Figura 3. Ubicación del laboratorio y el pie de café

4.1.2. Características de la zona de estudio

Clima

De acuerdo con el sitio web Climate-Data.org Machado tiene un clima Tropical de altitud. Este clima se clasifica como Cwa según la clasificación de Köppen y Geiger. La temperatura media anual en Machado es de 20.6 °C. La precipitación media anual de 1508 mm. Presenta una humedad relativa de 74 %. Este municipio se encuentra a una altitud de 809 msnm.

Como nos muestra el diagrama de temperatura de Machado, las temperaturas máximas y mínimas, con un promedio de 23.4° C, enero es el mes más cálido. En el mes más frío del año es de 16.7 °C en el medio de junio.

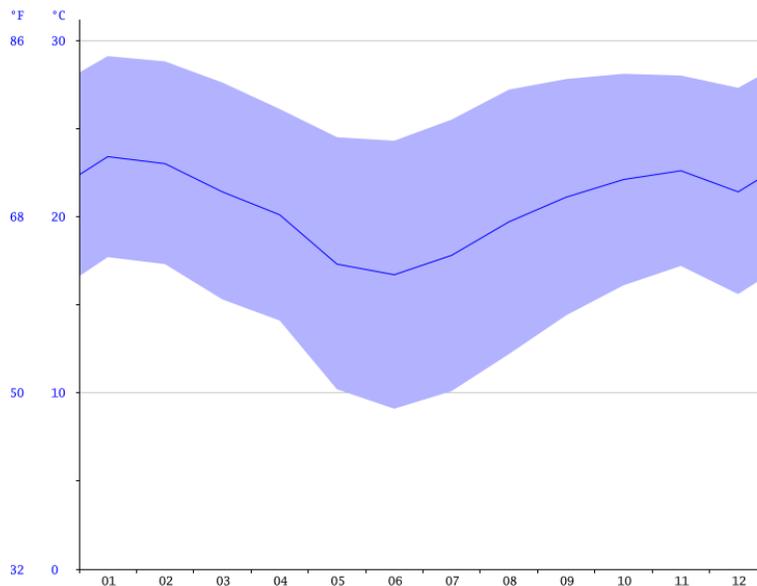


Gráfico 1. Diagrama de temperatura de Machado

El climograma de Machado presenta que el mes más seco es julio. Hay 27 mm de precipitación en julio. 280 mm, mientras que la caída media en diciembre. El mes en el que tiene las mayores precipitaciones del año.

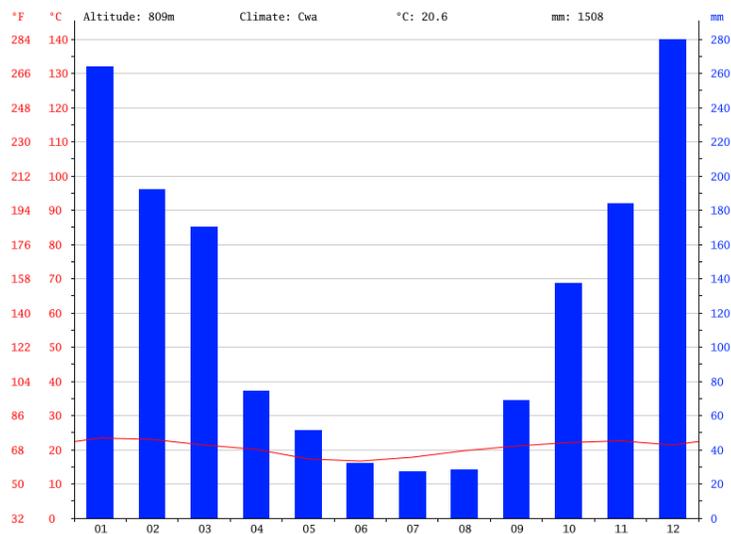


Gráfico 2. Climograma de Machado

4.2. MATERIALES

4.2.1. Material vegetal de estudio

El material vegetal empleado en el presente estudio fue colectado de un pie de Café Excelsa (*Coffea dewevrei*), se recolectó hojas (tanto hojas jóvenes como maduras) para los explantes foliares del cultivo in vitro.

4.2.2. Material de laboratorio

4.2.2.1 Biocidas

- Plant Preservative Mixture (PPM™)
- Antlbiotic Antimycotic Solution (AAS) SIGMA-ALDRICH®

4.2.2.2 Reactivos

- Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog)
- 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)
- BAP (6-benzilamino-purina o benzyl adenina)
- Sacarosa
- Phytigel
- Tween 20
- Alcohol 70 % y 96 %

- Hidróxido de sodio 1 N
- Ácido clorhídrico 0,05 N

4.2.2.3 Equipos y materiales de vidrio

- Medidor de pH
- Microondas
- Agitador magnético
- Balanza Analítica
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- B.O.D.
- Micropipetas
- Matraces de Erlenmeyer
- Vasos de precipitado
- Probetas
- Bastón de vidrio
- Embudo de vidrio
- Placa de Petri
- Pinzas
- Lámina de bisturí
- Cabo de bisturí
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Filtro esterilizador con 0,22 μm

4.2.3. Material de campo

- EPI (Equipo de Protección Individual)
- Kasumin®: Fungicida/Bactericida, antibiótico sistémico.
- Tiofanato metílico: fungicida sistémico.
- Pulverizador
- Escalera
- Tijera
- Caja de plastoformo
- Papel toalla

4.2.4. Material de gabinete

- Cámara fotográfica
- Estereoscopio normal
- Estereoscopio triocular con cámara integrada
- Computadora
- Material de escritorio (hojas de papel, bolígrafos, USB, etc)

4.3. Metodología

El proyecto de investigación para la presente tesis fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado, localizado en el estado de Minas Gerais de Brasil, se trabajó con un espécimen de *Coffea dewevrei* con el fin de obtener explantes foliares e inducirlos a la callogénesis embriogénica somática.

En el trabajo se desarrollaron dos ensayos:

4.3.1. PRIMER ENSAYO

Fase 1. Preparación del material experimental

Primeramente, se procedió con el muestreo de las hojas adecuadas para el experimento, se marcó las hojas de la parte inferior del pie de café, intentando buscar las hojas más grandes y saludables que en su mayoría eran adultas las cuales serían útiles para el nivel 1 del factor A: HOJAS ADULTAS (completamente desarrolladas).

De igual manera se buscó las hojas más jóvenes del ejemplar de café, las cuales se encontraban más cercanas a la copa de la planta, eran muy escasas, por lo que se marcó a todas las hojas jóvenes que existían en el árbol, estas hojas eran las más pequeñas de la planta y además presentaban una coloración que tiende más a marrón, se empleó estas hojas para el nivel 2 del Factor B: HOJAS JÓVENES.

Debido a que el ejemplar de *Coffea dewevrei* se encuentra al aire libre se tiene una gran probabilidad de un intenso ataque de patógenos como hongos, bacterias, ácaros e insectos hacia la planta madre, por lo tanto, tuvieron que ser realizadas pulverizaciones

una semana antes de empezar el experimento, en días alternados, con los siguientes químicos fungicidas:

- Kasumin®: Fungicida/Bactericida, antibiótico sistémico, usado con una concentración de 300 mL/100 L de agua.
- Tiofanato metílico (Cercobin 700 WP): fungicida sistémico, usado con una concentración de 250 g.p.c./100 L de agua.

Fase 2. Colección y desinfección del material biológico

Una semana después de la aplicación de los plaguicidas, se recolectaron las hojas marcadas para el trabajo en el inicio de la mañana, se las cortó del peciolo de la hoja con la ayuda de una tijera de tal manera que no se las pueda dañar, luego fueron colocadas en papel toalla humedecido, y conducidas al laboratorio en una caja de plastroformo previamente desinfectada.

Después de ese período las hojas fueron lavadas con agua común para luego ser llevadas a la cámara de flujo laminar y a ser sometidas a la desinfección padrón, la cual, se realizó introduciendo las hojas en un frasco con una cantidad de alcohol etílico al 70 % de modo que cubra todas las hojas meciendo con un movimiento concéntrico (envolvente) el frasco ligeramente por dos minutos.

Posteriormente las hojas fueron tratadas con hipoclorito de sodio al 2,5 % conteniendo Tween 20 0,04 % (3 gotas/100 ml) para abrir la cutícula de la planta y el desinfectante tenga una acción más penetrante, se introdujo esta solución en el frasco de las hojas ya enjuagadas y se lo meció por 20 minutos. En seguida, fueron lavadas tres veces con agua deionizada autoclavada. Todo este proceso se lo realizó dentro de la Cámara Flujo Laminar, la cual está programada con 15.8 mm H₂O de presión, con el blower encendido.

Fase 3. Elaboración del Medio de Cultivo

Antes de la elaboración del Medio de Cultivo se procedió a autoclavar todos los materiales de laboratorio requeridos para este proceso y someterlos a la luz ultravioleta en la Cámara de Flujo, esto para evitar cualquier tipo de contaminación.

Para el primer experimento se realizó el medio cultivo MS (Mursahige y Skoog) el cual contiene sales, vitamina B5, se le agregó 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel, y se ajustó a un pH 5,7.

Como reguladores de crecimiento se utilizó, para una primera instancia, 5 mg L⁻¹ BAP y 10 mg L⁻¹ de 2-4 D (2,4-diclorofenoxiacético), esto para inducir a la formación de callos - callogénesis), como uno de los factores de estudio se adicionó 5 concentraciones del producto biocida AAS®: 0, 5, 10, 15 y 20 ml L⁻¹.

Posteriormente se autoclavó el medio para evitar posibles contaminaciones y luego se adicionó el biocida Antibiotic Antimycotic Solution® (AAS) de la empresa SIGMA-ALDRICH que contiene una mezcla de penicilina, estreptomina y anfotericina.

Debido a que el AAS® es un biocida a base de bacterias y hongos, no se pudo realizar el autoclavado de este con el medio de cultivo, ya que mataría a los microorganismos que actúan con el efecto biocida, por lo que se realizó el microfiltrado del mismo antes de vaciar lo en las Cajas de Petri, con el medio.

Al finalizar el proceso de hacer el medio de cultivo se guardó las Cajas Petri con el medio de cultivo en una gaveta oscura hasta que se introdujeron los explantes.

Fase 4. Preparación e Introducción de los explantes

De las hojas previamente lavadas y desinfectadas se cortaron explantes cuadrados, con ayuda del bisturí, a un tamaño de aproximadamente 7x7 mm, excluyendo la nervadura central y los bordes de las hojas, y estos fueron inoculados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo (Söndahl et al., 1985 citado por Marota, 2003).

Los explantes fueron cultivados en placas de Petri estériles de polietileno cristal (90x15 mm de diámetro) conteniendo de 25 a 30 ml de medio de cultivo. Cada placa contenía diez explantes. Las placas Petri se las sellaban con una o más capas de nylon adecuado para laboratorio para evitar que cualquier tipo de microorganismo proveniente del ambiente pueda ingresar al medio de cultivo y contaminar a los explantes.

Los cultivos fueron incubados en obscuridad total a 25 °C en una Cámara de Germinación

tipo B.O.D. (Biochemical Oxigen Demand) en los medios primarios por 30 días, y posteriormente recultivados en medios secundarios (medio de recultivo especificado en la fase de Recultivo) conforme a cada protocolo y constantemente fueron revisados para evitar pérdida de material por causa de contaminación.

Fase 5. Registro de datos

Se registró los datos una vez a la semana, se contaba con 4 variables de respuesta, las primeras 3 variables (contaminación, oxidación y callogénesis) se tomaron desde las primeras semanas, especialmente la contaminación ya que se vio explantes contaminados desde la segunda semana de los experimentos (individualmente cada uno), en cuanto a la cuarta variable (frecuencia callogénica) se tomó a partir del segundo mes de cada ensayo.

Fase de Recultivo

El recultivo se lo realizó después de los 30 días con un cambio en el medio de cultivo, se mantuvo los mismos componentes del medio primario, con la diferencia de usar 1 mg L^{-1} de 2,4-D, lo cual impulsa a la embriogénesis de los callos ya formados; de este modo es que los explantes fueron traspuestos a este nuevo medio.

Debido a que existe contaminación (incluso con la presencia de los biocidas en el medio de cultivo) especialmente por bacterias y hongos, por ejemplo, si hablamos de hongos, la propagación de los hongos por los micelios y las esporas invade y contamina rápidamente hay una gran posibilidad que cuando aparezca hongos en un explante se contamine a la caja Petri, por lo que diariamente se hacía un control de la contaminación y si se detectaba la presencia de un hongo en un explante se salvaba los demás explantes, transfiriendo los no contaminados a una nueva caja Petri ya con el medio, se lo inoculaba con los debidos cuidados para no contaminar los explantes limpios, de ésta misma manera se realizaba al observar la presencia de una bacteria en algún explante.

Este recultivo se realiza también con el fin de optimizar el proceso y no tener alteraciones en la composición de los fitorreguladores o la pérdida de nutrientes del medio.

4.3.1. SEGUNDO EXPERIMENTO

Para el segundo experimento se realizó el mismo procedimiento del primer experimento respecto a la **Fase 1** (Preparación del material experimental) y **Fase 2** (Colección y desinfección del material biológico) con la diferencia de que se utilizó solamente hojas adultas.

Fase 3. Elaboración del Medio de Cultivo

Para el segundo experimento se realizó también el medio cultivo MS (Mursahige y Skoog) con la misma concentración de vitaminas y reguladores de crecimiento mencionados para el primer experimento con la variación que se usó 5 concentraciones de los dos biocidas **PPM™** y **AAS®**: 0, 50, 100, 150 y 200 % de la recomendación técnica de cada producto.

La distribución de los porcentajes se realizó de la siguiente manera:

Para el Nivel A_1 (dosis de **PPM™**) se consideró que según bibliografía se recomienda una dosis de 2 ml L^{-1} de **PPM™** por lo que para los niveles de B se usaron $A_1B_0(0 \%) = 0 \text{ ml L}^{-1}$, $A_1B_1(50 \%) = 1 \text{ ml L}^{-1}$, $A_1B_2(100 \%) = 2 \text{ ml L}^{-1}$, $A_1B_3(150 \%) = 3 \text{ ml L}^{-1}$, $A_1B_4(200 \%) = 4 \text{ ml L}^{-1}$.

De la misma manera para **AAS®** (Nivel A_2) según bibliografía se recomienda usar 10 ml L^{-1} , por lo tanto los niveles para el Factor B que se usaron fueron $A_2B_0(0 \%) = 0 \text{ ml L}^{-1}$, $A_2B_1(50 \%) = 5 \text{ ml L}^{-1}$, $A_2B_2(100 \%) = 10 \text{ ml L}^{-1}$, $A_2B_3(150 \%) = 15 \text{ ml L}^{-1}$, $A_2B_4(200 \%) = 20 \text{ ml L}^{-1}$.

De igual manera, se autoclavó el medio para evitar posibles contaminaciones, sólo que cuando se adicionó al medio destinado para el Factor A (**PPM™** como biocida) si se pudo autoclavar pero con el **AAS®** no fue así (al igual que el primer ensayo).

Para la **Fase 4** (Preparación e Introducción de los explantes) se realizó el mismo procedimiento que en el primer experimento, con la diferencia que se trabajó exclusivamente con hojas adultas. Respecto al Registro de datos (**Fase 5**) se colectó datos también una vez a la semana y se realizó también el Recultivo en los medios secundarios a los 30 días y según la contaminación.

4.4. Metodología experimental

Modelo aditivo lineal

Diseño Completamente Aleatorio con Arreglo Factorial Combinatorio

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \alpha_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Valor de la variable de respuesta evaluada en una unidad experimental que recibió el i – ésimo nivel de A y el j -ésimo nivel de B

μ = Media general

α_i = Efecto fijo del i -ésimo nivel de A

β_j = Efecto fijo del j -ésimo nivel de B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto fijo de la interacción del i -ésimo nivel de A con el j -ésimo nivel de B

α_{ij} = Efecto aleatorio de residuales o error experimental NIID $\sim(0, \sigma_e^2)$

Diseño Completamente Aleatorio

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Una observación cualquiera (j -ésima unidad experimental que recibe la i -ésima formulación)

μ = Media general

τ_i = Efecto fijo de la i -ésima dosis de biocida

ϵ_{ij} = Efecto aleatorio de residuales o error experimental NIID $\sim(0, \sigma_e^2)$

4.4.1. PRIMER EXPERIMENTO

El primer ensayo se evaluó bajo un Diseño Completamente Aleatorio con Arreglo Factorial Combinatorio, considerando 2 factores de estudio, donde el primer factor de estudio (Factor A) es el tipo de hoja a usar y el segundo las dosis del producto Antibiotic Antimycotic Solution, contando con 2 niveles en el factor A, 5 niveles en el factor B y con 4 repeticiones, por lo que se tuvo 40 unidades experimentales, cada unidad experimental

fue una placa de Petri con 10 explantes. Los niveles del factor B son las dosis de Antibiotic Antimycotic Solution® y se detallan a continuación:

4.4.1.1 Croquis experimental

FACTOR A

A1= hoja joven
A2= hoja madura

FACTOR B

B0= 0 ml L⁻¹
B1= 5 ml L⁻¹
B2= 10 ml L⁻¹
B3= 15 ml L⁻¹
B4= 20 ml L⁻¹

A1B1	A2B4	A2B4	A2B0	A1B3
A2B3	A2B2	A1B0	A1B4	A2B1
A2B1	A1B1	A1B4	A2B2	A1B2
A1B0	A1B2	A1B3	A2B3	A1B0
A1B4	A1B3	A1B1	A2B4	A2B3
A2B2	A1B1	A2B1	A2B3	A2B4
A1B3	A2B0	A1B4	A1B0	A1B2
A2B1	A1B2	A2B0	A2B2	A2B0

Cada unidad experimental representaba una placa de Petri y estaban acomodadas en una BOD en condiciones de obscuridad y a una temperatura de 25 °C.

El segundo nivel del factor A (Hoja Madura) presentó una contaminación de los explantes bastante alta, lo que se tradujo en una pérdida alta de unidades experimentales en este nivel A2, de esa manera es que únicamente para la variable de respuesta de porcentaje de Contaminación se pudo analizar como un DCA con Arreglo Factorial Combinatorio y se usó el croquis presentado anteriormente, pero las variables porcentaje de oxidación, porcentaje de callogénesis y frecuencia callogénica se las evaluó bajo un Diseño Completamente al Azar simple usando las mismas muestras únicamente del nivel A1, por lo que se muestra, a continuación, el croquis que se usó para el DCA considerando que sólo se usó **Hojas Jóvenes** (antes A1) y se mantuvo las **5 dosis de AAS®** y la cantidad de repeticiones (4).

T0= 0 ml L⁻¹
T1= 5 ml L⁻¹
T2= 10 ml L⁻¹
T3= 15 ml L⁻¹
T4= 20 ml L⁻¹

T1	T2	T3	T5	T3
T4	T1	T1	T2	T5
T4	T5	T3	T5	T4
T5	T1	T4	T2	T3

Al igual que la primera etapa cada unidad experimental representaba una placa de Petri

y estaban en una BOD en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 25 °C.

4.4.2. SEGUNDO EXPERIMENTO

El segundo ensayo se evaluó bajo un Diseño Completamente Aleatorio con arreglo bifactorial, en el cual el primer factor de estudio (Factor A) es el BIOCIDA empleado y el segundo las dosis en porcentaje del recomendado técnico de cada producto Plant Preservative Mixture (PPM™) y Antibiotic Antimycotic Solution® (AAS), donde se contó con 2 niveles en el factor A y 5 niveles en el factor B y contó con 5 repeticiones, por lo que se tuvo 50 unidades experimentales, cada unidad experimental fue una placa de Petri con 10 explantes. Los niveles del factor B son los porcentajes de las dosis del Recomendado Técnico (RT) de cada producto (PPM Y AAS) se detallan a continuación:

4.4.2.2. Croquis experimental

FACTOR A

A1= BIOCIDA PPM
A2= BIOCIDA AAS

FACTOR B

B0= 0 %
B1= 50 %
B2= 100 %
B3= 150 %
B4= 200 %

A2B3	A1B0	A2B4	A2B2	A2B0
A1B3	A2B2	A1B0	A1B4	A1B0
A2B1	A1B1	A1B4	A2B2	A2B3
A1B0	A1B2	A1B2	A1B1	A2B0
A2B4	A1B3	A2B3	A1B4	A1B1
A2B2	A1B1	A2B1	A2B3	A2B4
A1B3	A1B3	A1B4	A2B1	A1B2
A1B1	A2B2	A1B2	A1B4	A2B0
A2B1	A1B2	A2B0	A2B0	A1B0
A2B1	A2B4	A1B3	A2B3	A2B4

Al igual que en el primer experimento el segundo nivel del factor A (Biocida AAS®) presentó una contaminación alta, por lo que se analizó las variables porcentaje de oxidación, porcentaje de callogénesis y frecuencia callogénica bajo un Diseño Completamente al Azar simple usando las mismas muestras únicamente del nivel A1 (PPM™), por lo que se presenta, a continuación, el croquis que se usó para el DCA considerando que sólo se usó el **Biocida PPM™** (antes A1) y se mantuvo las **5 dosis** (porcentaje del RT) y la cantidad de repeticiones (5).

T0= 0 %
T1= 50 %
T2= 100 %
T3= 150 %
T4= 200 %

T3	T1	T3	T2	T5
T3	T2	T2	T5	T2
T4	T1	T5	T4	T1
T4	T5	T1	T5	T3
T2	T4	T3	T1	T4

4.5. VARIABLES DE RESPUESTA

Las variables de respuesta consideradas en cada uno de los experimentos del presente estudio fueron:

4.5.1. Porcentaje de contaminación

Este porcentaje se midió por cada caja Petri, la cual representa una repetición, cada semana, sin embargo, para elaborar el Análisis de Varianza se tomó en cuenta los datos tomados al final del experimento. Se procedió a contar cuántos explantes quedaban en la caja Petri luego de proceder con el recultivo, donde se sacaban los explantes contaminados (de hongos o bacterias), este número fue llevado a porcentaje, con la relación de 1 explante igual a 10 % ya que cada caja petri contaba con 10 explantes.

4.5.2. Porcentaje de oxidación de los explantes

El porcentaje de oxidación se midió contando los explantes que presentaban una oxidación considerable por cada caja Petri y se lo convirtió en porcentaje.

Además, se hizo el estudio de la relación entre la Oxidación Alta y Oxidación Baja.

4.5.3. Porcentaje de callogénesis

El porcentaje de callogénesis se mide en cada una de las cajas de Petri, que representa una repetición, se contó el número de explantes donde se observaba callogénesis y se calculó la relación de porcentaje.

4.5.4. Frecuencia callogénica

La frecuencia callogénica es la relación de tipos de callo que presenta cada explante considerando los siguientes tipos de Callos (se muestra los tipos de callo en la Figura 4):

- Sin reacción (sin presencia de callos) SR
- Callo cicatricial CC
- Callo nodular CN

- Callo mixto CM
- Callo embriogénico CE

En el primer experimento se midió a los 30, 60 y 75 días y en el segundo a los 30 y 60 días. La medición se la realizó con ayuda de un estereoscopio observando cada explante y llevándolo a porcentaje según el tipo de callo que presenta.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para el análisis y procesamiento de datos y elaboración de gráficos de la presente tesis se utilizó dos softwares: el programa estadístico Infostat y el programa Excel.

Debido a que los datos usados están en función de porcentaje se usó la “Transformación arcoseno o angular” de datos, ya que se tiene una distribución binomial con varianzas y medias que son independientes, presentando usualmente varianzas que van a los extremos (Ochoa, 2016).

Se emplea la fórmula:

$$\text{Dato transformado} = \sin^{-1}\sqrt{\frac{x}{100}}$$

Los resultados del estudio se presentan a continuación:

5.1. PRIMER ENSAYO

5.1.1. Porcentaje de Contaminación

Para analizar esta variable de respuesta, se mantuvo el diseño de ambos experimentos de un DCA con Arreglo Factorial Combinatorio.

Cuadro 1. Análisis de Varianza del porcentaje de Contaminación (1º ensayo)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Int.
TIPO DE HOJA (A)	28162,11	1	28162,11	190,22	<0,0001	*
NIVELES DE AAS (B)	2277,66	4	569,41	3,85	0,0122	*
A*B	778,91	4	194,73	1,32	0,2868	NS
Error	4441,43	30	148,05			
Total	35660,11	39				
C.V. = 30,03 %						

* = significativo NS = No Significativo

El Análisis de Varianza indica que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) para el factor A (tipo de hoja), por lo que se puede afirmar que cuando se emplea una hoja joven y otra madura para establecer el cultivo in vitro, estadísticamente, el porcentaje de contaminación será diferente.

Para el factor B (Niveles de AAS), se obtuvo una diferencia significativa, por lo que se

puede afirmar que usando diferentes niveles de Antibiotic Antimycotic Solution® (AAS) en el medio de cultivo como biocida se obtendrá diferencias significativas en los porcentajes de contaminación.

Para la interacción entre el Tipo de Hoja y los Niveles de AAS se obtuvo un resultado de no significancia, lo que nos indica que no existe una interacción entre los factores A y B, que cualquier tipo de hoja combinado con cualquier nivel del antibiótico nos dará el mismo comportamiento en cuanto a la contaminación, es decir, que el comportamiento de los niveles del factor A (tipo de hoja) bajo el efecto de los niveles del factor B (dosis de AAS®) son paralelos para la variable de contaminación, se puede aseverar que los niveles de A no afectaron a los niveles de factor B.

En cuanto al Coeficiente de Variabilidad (CV) se puede afirmar que está entre los rangos confiables, por lo que se tuvo un Buen Manejo de Unidades Experimentales.

Cuadro 2. Prueba de Duncan Alfa=0,05 del Factor A (Tipo de Hoja) (1º ensayo)

TIPO DE HOJA	Medias	n	EE	
HOJA MADURA	81	20	2,72	A
HOJA JOVEN	11	20	2,72	B

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

La Prueba Duncan para el Factor A muestra que hay diferencia significativa entre la Hoja Madura y Hoja Joven en cuanto a la contaminación, con este resultado se puede afirmar que con la Hoja Joven se obtiene un menor porcentaje de contaminación, por lo que se recomienda usar las hojas más nuevas para establecer el cultivo de tejidos, especialmente si se trata de especies que no se encuentran en un ambiente controlado.

La principal razón por la cual la Hoja Joven presenta menor porcentaje de contaminación es que estas hojas se encuentran menos tiempo al aire libre, por lo que está menos tiempo expuesta a patógenos contaminantes, y es menos probable de presentar microorganismos endógenos.

En el trabajo de investigación planteado por López *et. al.* (2010) se evaluó la influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café, trabajando con genotipos de *Coffea arabica* y *C. canephora*, donde se usó hojas de 3 diferentes

etapas o edades (Hoja inmadura, hoja joven y hoja madura) pese a que se realizó una rigurosa desinfección del material biológico, después de 30 días se observó que los explantes provenientes de hoja joven y de hoja inmadura de ciertos genotipos presentaron valores de cero a 54 % en los demás genotipos solamente los explantes provenientes de hoja inmadura presentaron menores niveles de contaminación, con valores de 0 a 36 %, con los explantes provenientes de hoja madura se presentaron altos porcentajes de contaminación, desde 90 hasta 100 % en todos los genotipos, lo que argumentan los autores de esta investigación es que se puede atribuir a que las hojas maduras presentan mayor cantidad de unidades formadoras de colonias de microorganismos, además que el crecimiento de su pared celular y la formación de ceras y ligninas epicuticulares es mayor que en hojas jóvenes, lo que dificulta la acción del agente desinfectante en los microorganismos endógenos.

Según Lallana et al. (2006), la escasa capacidad de absorción de sustancias por parte de tejidos maduros se debe a los depósitos de cera de mayor grosor presentes en la cutícula foliar (López et al., 2010).

Esta argumentación nos permite afirmar que es mejor trabajar con hojas jóvenes a la hora de inocular explantes de café.

Cuadro 3. Prueba Duncan Alfa=0,05 del Factor B (Dosis de AAS®) (1º ensayo)

NIVELES DE AAS	Medias	n	E.E.			
15 ml	57,50	8	4,30	A		
0 ml	51,25	8	4,30	A	B	
10 ml	42,50	8	4,30		B	C
20 ml	42,50	8	4,30		B	C
5 ml	36,25	8	4,30			C

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

La Prueba Duncan para el Factor B muestra que existe diferencia estadística significativa entre los diferentes niveles del antibiótico en cuanto a la contaminación, con este resultado se puede afirmar que usando 5 ml del producto antibiótico se obtiene el menor porcentaje de Contaminación, por lo que se recomienda usar esta dosis para establecer los cultivos de la especie de café en estudio.

Se puede observar un resultado parecido en el trabajo de Gilbert, Shohet y Caligari,

(1991), que reportan el uso de los antibióticos penicilina, estreptomina y anfotericina en el cultivo de papa con las siguientes concentraciones 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 ml/L y obteniendo estas medias en los rangos de contaminación 3.5, 1.4, 1.6, 1.2, 1.5, 1.5, 1.0 respectivamente, donde el rango es (0 = no contaminación - 4 = severa contaminación) de plantas micropropagadas después de 14 días en medio de cultivo con antibiótico. Se puede observar que usando productos como el AAS (antibióticos a base de bacterias) independientemente si se adiciona una dosis baja o alta de antibiótico, se obtuvo una contaminación evidente.

5.1.2. Porcentaje de oxidación

Como se indicó anteriormente, este Diseño seguirá, para el proceso de datos y la interpretación, un Diseño Completamente al Azar, considerando solamente las hojas jóvenes y las 5 dosis de AAS™.

Cuadro 4. Análisis de Varianza del porcentaje de Oxidación (1º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS	920,52	4	230,13	4,96	0,0095	*
Error	695,62	15	46,37			
Total	1616,14	19				
CV = 10,47 %						

* = significativo

Según el Análisis de Varianza se evidencia una diferencia significativa ($p < 0,05$) para el porcentaje de oxidación, por lo que se puede afirmar que existe un efecto directo entre las dosis de Antibiotic Antimycotic Solution® y el porcentaje de oxidación, es decir, que cuando usamos diferentes dosis del biocida en el medio cultivo, estadísticamente el porcentaje de oxidación será diferente.

En cuanto al C.V. podemos afirmar que está entre los rangos confiables, por lo que tuvimos un Buen Manejo de Unidades Experimentales.

Cuadro 5. Prueba Duncan Alfa=0,05 del porcentaje de Oxidación (1º ensayo)

DOSIS	Medias	n	E.E.			
5 ml	90,00	4	3,40	A		
20 ml	85,00	4	3,40	A	B	
10 ml	85,00	4	3,40	A	B	
15 ml	77,50	4	3,40		B	C
0 ml	65,00	4	3,40			C

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

Para la prueba Duncan se puede observar diferencia significativa entre las diferentes dosis del AAS® para la oxidación, se ve que usar el T₁ (5 ml del biocida) nos hará obtener el más alto porcentaje de oxidación (90 %), analizando este resultado se puede ver que este tratamiento donde se usó solamente hojas jóvenes no obtuvo ningún indicio de contaminación ya que la media de esta variable fue de 0 %, debido a que no se realizó ningún recultivo (transferencia de los explantes a un nuevo medio de cultivo cuando uno de los explantes presenta contaminación) por lo que se quedó con el mismo medio durante todo el experimento, eso puede ser un factor que influya a que la oxidación sea mayor que las demás dosis altas del antibiótico, porque al traslocar los explantes a un medio limpio todos los exudados que producen la oxidación se quedan en el medio contaminado, así mismo se demuestra que usando el T₀ (0 ml del biocida respectivamente) se obtiene el menor porcentaje de oxidación, por lo que conclusivamente, el biocida tiene un efecto directo sobre la oxidación, ya que se muestra que mientras se incrementa la dosis de este biocida hay un incremento de la oxidación.

En el trabajo de investigación de López *et. al.* (2010) donde se evaluó la influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café en 13 genotipos mejorados de *C. canephora* y *C. arabica*, se evaluó también la oxidación y pese a que usaron una solución antioxidante para sumergir las hojas antes de la introducción de los explantes, se obtuvo que en la mayoría de explantes presentaron valores de oxidación mayores a 50 %, excepto 4 genotipos que tuvieron porcentajes inferiores a 45 % en explantes de hoja inmadura o joven, los explantes provenientes de hoja inmadura de cinco genotipos tuvieron menor nivel de oxidación (2 a 60 %) que el resto de los genotipos, principalmente en los explantes provenientes de hoja madura que tuvieron altos porcentajes de oxidación (60 a 100 %). Se observa que al trabajar con

explantes sin importar la edad de estos, se obtiene una evidente oxidación.

Marota (2003) indica en su tesis de doctorado donde trabajó con la embriogénesis somática en cafés arábica y robusta que, en las primeras semanas de cultivo, varios explantes de su experimento obtuvieron una coloración marrón oscura, como consecuencia de la oxidación de compuestos fenólicos presentes en las células. Esta coloración marrón puede ser atribuida a la presencia de quinonas, un producto de la oxidación de los compuestos fenólicos. Alta concentración de compuestos fenólicos, como los ácidos clorogénicos, cafeico, ferúlico, p-cumárico, trans-cinámico y otros, son característicos del género *Coffea*. Este hecho fue también observado por otros autores como Söndahl y Sharp (1977), García y Menendez (1987) e JUMA (1994), citado por Marota (2003).

5.1.2.1. Oxidación alta y baja

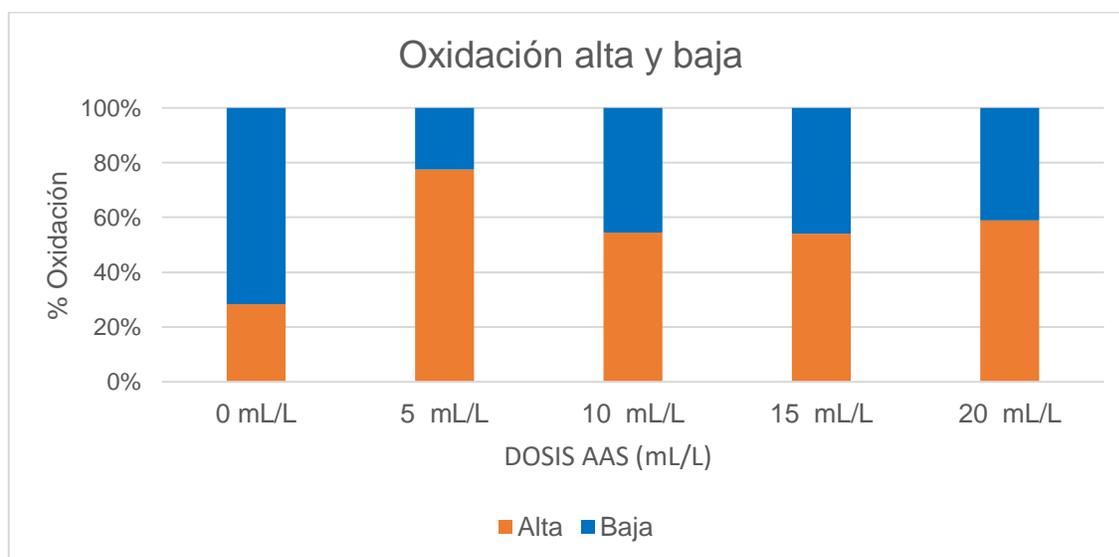


Gráfico 3. Caracterización de la relación del nivel de oxidación en los explantes foliares sometidos a diferentes dosis biocida AAS (■Oxidación alta; ■Oxidación baja).

Ya que el uso del biocida tiene un efecto sobre la oxidación, este gráfico corrobora el resultado y muestra que los tratamientos con dosis de AAS® presentan una proporción de más de la mitad de explantes con oxidación alta siendo el mayor el T5 (5 ml/L AAS®) con 77,5 %, por las razones ya presentadas con anterioridad, no obstante, el T0 mostró la mayor proporción de oxidación baja.

5.1.3. Porcentaje de Callogénesis

Cuadro 6. Análisis de Varianza del porcentaje de Callogénesis (1º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS	5127,13	4	1281,78	5,31	0,0072	*
Error	3618,41	15	241,23			
Total	8745,54	19				

CV = 23,61 %

* = significativo

El Análisis de Varianza indica que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) para el porcentaje de Callogénesis, por lo que se puede afirmar que existe una relación directa entre las dosis de Antibiotic Antimycotic Solution® y el porcentaje de Callogénesis, es decir, que cuando se emplea diferentes dosis del biocida en el medio cultivo, estadísticamente el porcentaje de Callogénesis será diferente.

En cuanto al C.V. se puede afirmar que está entre los rangos confiables, por lo que se tuvo un Buen Manejo de Unidades Experimentales.

Cuadro 7. Prueba Duncan Alfa=0,05 del porcentaje de Callogénesis (1º ensayo)

DOSIS	Medias	n	E.E.			
T0= 0 ml	100,00	4	7,77	A		
T1= 5 ml	92,50	4	7,77	A	B	
T2= 10 ml	67,00	4	7,77		B	C
T3= 20 ml	53,00	4	7,77		B	C
T4= 15 ml	20,50	4	7,77			C

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

Para la prueba Duncan se puede aseverar que usando el T0 y T1 (0 y 5 ml del biocida respectivamente) se obtiene el mayor porcentaje de Callogénesis, y aplicando los tratamientos con las dosis más altas se obtuvo valores menores en cuanto al porcentaje de Callogénesis, entonces, se puede concluir que el uso de este biocida tendrá un efecto negativo en cuanto a la Callogénesis, y se recomienda usar dosis bajas de este biocida (así como el T1 de 5 ml/L medio) para que haya una inducción positiva de la formación de callos.

En el trabajo de investigación de López *et. al.* (2010) se evaluó la callogénesis, y se encontró que después de 30 días, los porcentajes de callogénesis fluctuaron de 9 a 100 %, y diferenciando el tipo de hoja se encontró que en explantes provenientes de hoja

inmadura y joven la formación de callos se obtuvo valores de 36 a 100 %. Así, los explantes de hojas inmaduras y jóvenes fueron los mejores para la inducción de calogénesis, incluso para la formación de callo embriogénico. Sin embargo, concluye, es necesario mejorar el medio de cultivo para aumentar el porcentaje de explantes embriogénicos.

Las diferencias en cuanto a la calogénesis verificadas por otros autores utilizándose condiciones inductoras semejantes, en lo que se refiere al regulador de crecimiento, pueden ser debido a las diferencias en los explantes en función de la posición en la planta en que se retiró los mismos, de la edad fisiológica y de la época del año, como es sugerido por Molina et al. (2002).

5.1.4. Frecuencia calogénica (FC)

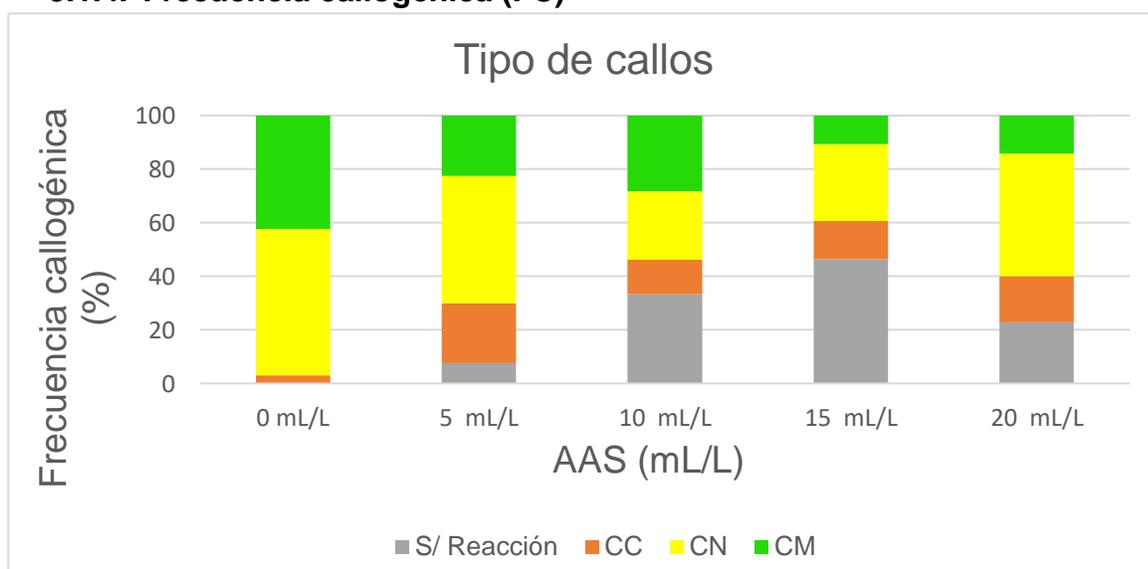


Gráfico 4. Caracterización de la reacción calogénica de explantes foliares sometidos a diferentes dosis del biocida AAS (■ Sin reacción, ■ callo cicatricial, ■ callo nodular, ■ callo mixto).

Se puede observar que aún no existe la presencia de callos embriogénicos ni de callos embriogénicos friables, pero se ve la presencia de callos mixtos que con el transcurso del tiempo evolucionarán a estos dos tipos de callos deseables, se puede observar la mayor presencia de callos mixtos en los tratamientos T0 (0 mL L⁻¹ de AAS) y T2 (10 mL L⁻¹), otra vez se reitera que bajas dosis de AAS® propician a un resultado beneficioso relacionado a la producción de callos, asimismo se observó que el T3 (15 mL L⁻¹) tuvo el menor

resultado en callos mixtos, de igual manera se ve que la mayor proporción de explantes sin reacción se presentaron en los tratamientos T2 y T3 (10 y 15 mL/L) y el T0 sólo presentaba explantes con callos de los tipos nodular y mixto. Se observa también que en su mayoría los explantes presentaron callos nodulares y una cantidad considerable de callos mixtos.

A diferencia del presente ensayo, en el experimento de López *et. al.* los explantes provenientes de hojas jóvenes e inmaduras dieron la más alta formación de callo embriogénico (27 a 73 %) después de los 60 días, para las especies de *C. canephora* y *C. arabica*.

Los explantes con capacidad de formar embriones somáticos expresaron tal capacidad días después que aquéllos que sólo pudieron formar células callosas, porque el callo embriogénico crece más lento que el callo no embriogénico (González et al., 2002), citado por López *et. al.* (2010).

Se evaluó mediante un Análisis de Varianza si las diferentes dosis tienen efecto sobre la formación de los dos tipos de callos más importantes que obtuvimos en este ensayo, que son los Callos Nodulares y los Callos Mixtos. Los resultados se muestran a continuación:

Cuadro 8. Análisis de Varianza de la Relación del Callo Nodular (%) (1º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS	407,71	4	101,93	1,07	0,4068	NS
Error	1432,63	15	95,51			
Total	1840,34	19				

NS = No Significativo

El Análisis de Varianza nos muestra que no existe una diferencia significativa ($p > 0,05$) para la relación de porcentaje de Callo Nodular que observamos en la Frecuencia callogénica, por lo que se puede afirmar que no existe un efecto directo entre las dosis de Antibiotic Antimycotic Solution® y la formación de callos de este tipo, es decir, que cuando se emplea diferentes dosis del biocida en el medio cultivo, estadísticamente el porcentaje de Callo Nodular será el mismo.

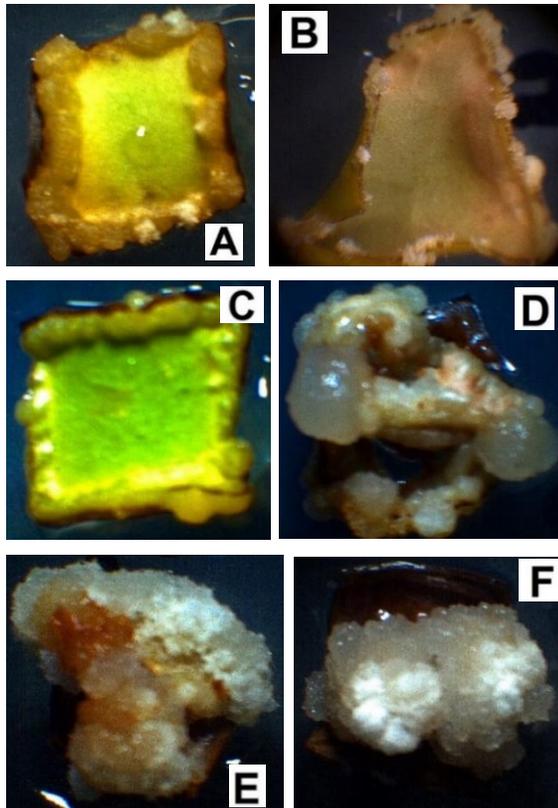
Cuadro 9. Análisis de Varianza del porcentaje de Callo Mixto (1º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS	703,80	4	175,95	0,84	0,5222	NS
Error	3149,99	15	210,00			
Total	3853,79	19				

NS = No Significativo

El Análisis de Varianza nos muestra que no existe una diferencia significativa ($p > 0,05$) para la relación de porcentaje de Callo Mixto, por lo que se puede afirmar que no existe un efecto directo entre las dosis de Antibiotic Antimycotic Solution® y la formación de callos de este tipo, es decir, que cuando se emplea diferentes dosis del biocida en el medio cultivo, estadísticamente el porcentaje de Callo Mixto será el mismo.

En la siguiente imagen, se muestra un modelo de los tipos de callos que se encontró en los dos ensayos:



Fuente: Elaboración propia

Figura 4. Reacción callogénica inducida en explantes foliares de *Coffea dewevrei*: A, callo cicatricial en hoja madura; B, callo cicatricial en hoja joven; C, callo nodular en hoja madura; D, callo nodular en hoja joven; E y F, callo mixto en hoja madura.

5.2. SEGUNDO ENSAYO

5.2.1. Porcentaje de contaminación

Cuadro 10. Análisis de Varianza del porcentaje de Contaminación (2º ensayo)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Int.
BIOCIDA	2609,77	1	2609,77	16,86	0,0002	*
DOSIS (%)	2693,29	4	673,32	4,35	0,0051	*
BIOCIDA*DOSIS	1102,52	4	275,63	1,78	0,1517	NS
Error	6190,73	40	154,77			
Total	12596,32	49				
CV = 18,08 %						

* = significativo NS = No Significativo

El Análisis de Varianza indica que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) para el factor A (Biocida), como se observa en la tabla, existe alta significancia para lo que es el tipo de biocida que se usa para el experimento en cuanto a contaminación, es decir, que hay un efecto directo entre el tipo de antibiótico y la contaminación de los explantes, así es que si se usa diferentes biocidas (AAS® o PPM™) entonces se obtendrá diferentes porcentajes de contaminación.

Para el factor B (Dosis en porcentaje del recomendado técnico), se obtuvo diferencia significativa, por lo que se puede afirmar que, adicionando diferentes dosis de los biocidas en el medio de cultivo, se obtendrá diferencias significativas en los porcentajes de contaminación.

Para la interacción entre el Biocida y las dosis de los mismos se obtuvo un resultado de no significancia, es decir, no existe una interacción entre los factores A y B y el comportamiento de los niveles del factor A (biocida) bajo el efecto de los niveles del factor B (dosis en porcentaje del Recomendado Técnico) son paralelos para la variable de contaminación, se puede aseverar que los niveles de A no afectaron a los niveles de factor B.

En cuanto al C.V. se puede afirmar que está entre los rangos confiables, por lo que se tuvo un Buen Manejo de Unidades Experimentales.

Cuadro 11. Prueba Duncan Alfa=0,05 del Nivel A (Biocida) (2º ensayo)

BIOCIDA	Medias	n	E.E.		
AAS	89,60	25	2,49	A	
PPM	73,60	25	2,49		B

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

Se puede evidenciar una diferencia significativa entre los tipos de biocida a utilizar, se ve que se obtiene un menor porcentaje de contaminación (73,60 %) con el uso del PPM, por lo que se puede recomendar su uso en la introducción in vitro del café *Coffea dewevrei* para controlar la contaminación. Aun así, el porcentaje de contaminación es demasiado alto, la principal razón por la que se tiene este resultado es que se trabajó con hojas muy maduras y, por ende, estas hojas que se encuentran al aire libre fueron expuestas por más tiempo a microorganismos contaminantes, por lo que se puede recomendar usar hojas jóvenes e incluso se ve que es recomendable tener protocolos de desinfección más severos.

Cuadro 12. Prueba Duncan Alfa=0,05 del Nivel B (Dosis) (2º ensayo)

DOSIS (%)	Medias	n	E.E.		
0%	95,00	10	3,93	A	
100%	86,00	10	3,93	A	B
200%	76,00	10	3,93		B
50%	79,00	10	3,93		B
150%	72,00	10	3,93		B

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

Se puede observar que entre el testigo y las demás dosis si existe una diferencia, y a su vez se infiere que entre las diferentes dosis estadísticamente son iguales, y además que los tratamientos con dosis del biocida presentan un porcentaje de contaminación menor, por lo que una vez más se puede recomendar el uso de los biocidas.

A diferencia del presente estudio, en el estudio de Rihan *et. al.* (2012) se estudió el efecto del PPM en el desarrollo de microbrotes de coliflor y se encontró una correlación negativa entre la concentración del PPM en el medio líquido y el número de microbrotes desarrollados, a mayor concentración de PPM, menor número de microbrotes, pero pudieron encontrar que cuando aplicaron la dosis 0,5 mL L⁻¹ de PPM al medio de cultivo fue efectivo al controlar la contaminación y manteniendo la capacidad de generar

microbrotes.

5.2.2. Porcentaje de oxidación

Como se indicó anteriormente, este Diseño seguirá, para el proceso de datos y la interpretación, un Diseño Completamente al Azar, solamente contando con el factor del uso del PPM™ como biocida (Factor A).

Cuadro 13. Análisis de Varianza del porcentaje de Oxidación (2º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS (%)	423,56	4	105,89	0,24	0,9094	NS
Error	8647,56	20	432,38			
Total	9071,12	24				

CV = 29,90 %

NS = No Significativo

Se puede observar que no existe una significancia en el uso de diferentes dosis de PPM para el porcentaje de oxidación, por lo que se puede afirmar que, si se aplica diferentes dosis de PPM™, se obtendrá los mismos resultados de oxidación, no se evidencia efecto del PPM™ en la oxidación.

En cuanto al Coeficiente de Variabilidad (CV) se puede afirmar que está entre los rangos confiables, por lo que se tuvo un Buen Manejo de Unidades Experimentales.

Debido a que en este ensayo se obtuvo valores de oxidación de entre 50 a 100 %, cabe recordar que es una situación normal y a veces, difícil de controlar, ya que como vimos anteriormente en el ensayo de López *et. al.* (2010) pese a que se usó sustancias antioxidantes se vio que en los explantes provenientes de hoja madura se tuvo altos porcentajes de oxidación (60 a 100 %). Se puede corroborar nuevamente que al trabajar con explantes sin importar la edad de estos, se obtiene una evidente oxidación.

5.2.2.1. Oxidación alta y baja

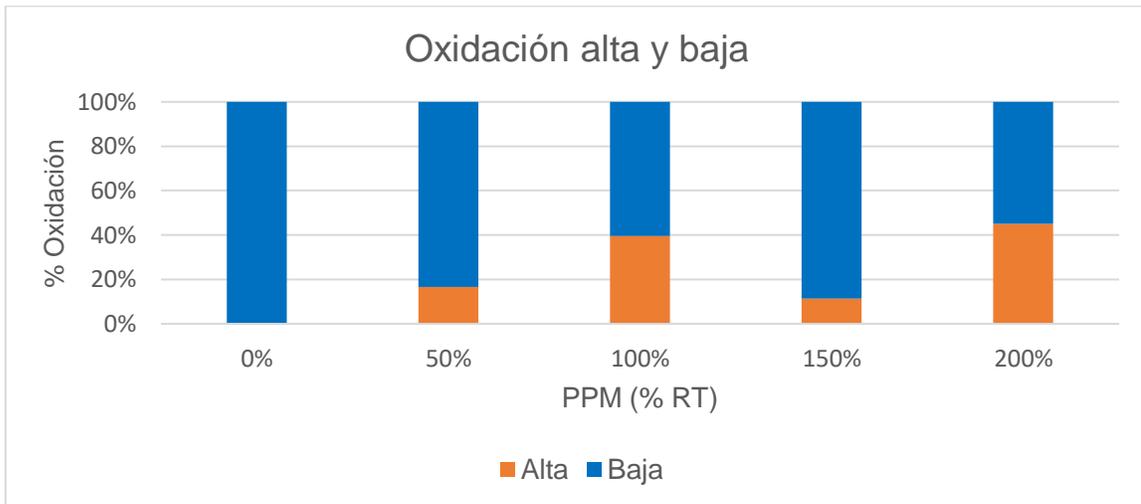


Gráfico 5. Caracterización de la relación del nivel de oxidación en los explantes foliares sometidos a diferentes dosis en porcentaje del recomendado técnico (RT) del biocida PPM™ (Oxidación alta; Oxidación baja).

Considerando el resultado que muestra que el uso del PPM™ no tiene un efecto directo en la oxidación del explante, este gráfico nos puede ayudar a corroborar este resultado ya que se puede observar que los explantes que si presentaban oxidación en su mayoría es una oxidación baja, vemos que los tratamientos T0 (0 % del RT de PPM™), T1 (50 %), y T3 (150 %) presentaron proporciones elevadas de oxidación baja y el tratamiento con mayor dosis de PPM™ T4 (200 %) mostró la mayor proporción de oxidación alta.

5.2.3. Porcentaje de callogénesis

Cuadro 14. Análisis de Varianza del porcentaje de Callogénesis (2º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS (%)	1429,78	4	357,45	1,64	0,2045	NS
Error	4371,49	20	218,57			
Total	5801,27	24				

CV = 18,85 %

NS = No Significativo

Se puede afirmar que el uso del PPM no afecta a la callogénesis, es decir, que si se usa diferentes dosis de PPM en el medio de cultivo el porcentaje de callogénesis no cambiará.

En cuanto al Coeficiente de Variabilidad (CV) se puede afirmar que está entre los rangos confiables, por lo que se tuvo un Buen Manejo de Unidades Experimentales.

El presente trabajo de investigación presentó valores altos en cuanto a calogénesis después de los 60 días, en el ensayo de López *et. al.* (2010) se encontró los explantes provenientes de hoja madura no presentaron capacidad alguna para la formación de callo a los 30 días de la siembra, pero después de 30 días más, a los 60 días si presentó una evidente formación de callos. Al respecto, Jensen *et al.* (1998) indican que los órganos jóvenes tienen mejor respuesta al establecimiento *in vitro* que los obtenidos de materiales adultos, es decir, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*.

5.2.4. Frecuencia callogénica

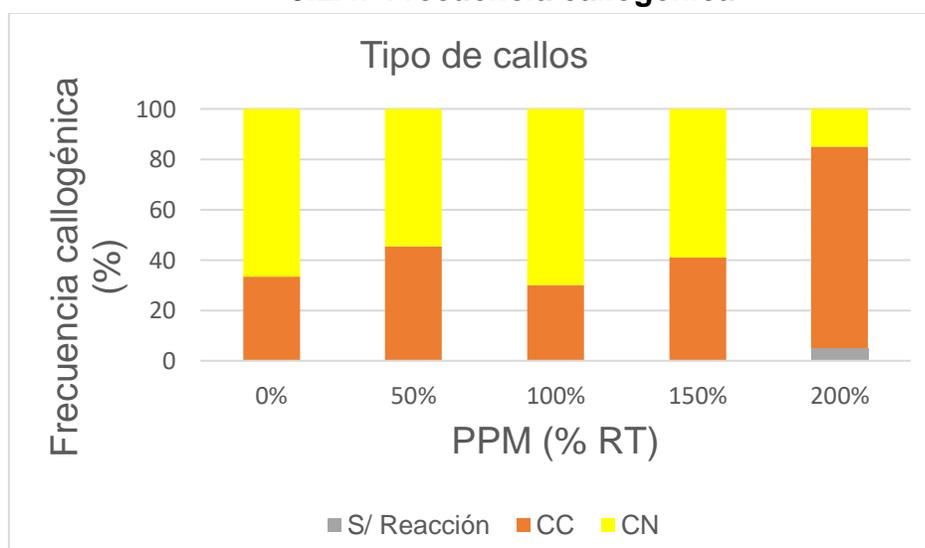


Gráfico 6. Caracterización de la reacción callogénica de explantes foliares sometidos a diferentes dosis del biocida PPM (■ Sin reacción, ■ callo cicatricial, ■ callo nodular).

Se puede observar la notable presencia de callos nodulares, que próximamente se convertirán en callos mixtos y, estos a su vez en callos embriogénicos, se ve que la mayor presencia de callos nodulares en los tratamientos T0 (0 % del RT de PPM) y T2 (100 % del RT), y que el T4 (200 % del RT) presentó el menor resultado en callos nodulares. Asimismo, se tiene una presencia considerable de callos cicatriciales y una cantidad casi nula de explantes que no presentaron reacción, es decir, que no presentan ningún tipo de callo y es en el T4.

Se observa que, en hojas maduras, es más complicado generar los callos más desarrollados, López *et. al.* (2010) en su ensayo lo confirma ya que indica que los

explantes provenientes de hojas jóvenes e inmaduras dieron la más alta formación de callo embriogénico (27 a 73 %) y los explantes provenientes de hojas inmaduras constituyen la mejor alternativa para la formación de callo embriogénico.

Cuadro 15. Análisis de Varianza del porcentaje de Callo Cicatricial (2º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS	3263,10	4	815,78	0,78	0,5531	NS
Error	20998,78	20	1049,94			
Total	24261,88	24				

NS = No Significativo

El Análisis de Varianza nos muestra que no existe una diferencia significativa ($p > 0,05$) para la relación de porcentaje de Callo Cicatricial que observamos en la Frecuencia callogénica, por lo que se puede afirmar que no existe un efecto directo entre las dosis de PPM y la formación de callos de este tipo, es decir, que cuando se emplea diferentes dosis del biocida en el medio cultivo, estadísticamente el porcentaje de Callo Cicatricial será el mismo.

Cuadro 16. Análisis de Varianza del porcentaje de Callo Nodular (2º ensayo)

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Int.
DOSIS	2951,05	4	737,76	0,62	0,6542	NS
Error	23840,58	20	1192,03			
Total	26791,63	24				

NS = No Significativo

El Análisis de Varianza nos muestra que no existe una diferencia significativa ($p > 0,05$) para la relación de porcentaje de Callo Nodular que observamos en la Frecuencia callogénica, por lo que se puede afirmar que no existe un efecto directo entre las dosis de PPM y la formación de callos de este tipo, es decir, que cuando se emplea diferentes dosis del biocida en el medio cultivo, estadísticamente el porcentaje de Callo Nodular será el mismo.

6. CONCLUSIONES

Para el primer experimento se puede concluir:

- Para porcentaje de contaminación se recomienda trabajar con hojas jóvenes debido a que se registró un menor grado de contaminación, ya que estas están menos tiempo expuestas a la infestación por microorganismos, asimismo se obtuvo el menor resultado de contaminación con la dosis 5 ml L⁻¹ del antibiótico AAS®.
- Para el porcentaje de oxidación se infiere que el AAS® tiene un efecto directo en esta variable y se recomienda no usar dosis altas del producto, ya que estas producen una mayor oxidación en el explante, la dosis que nos dio el resultado más bajo para oxidación además del testigo (0 mL/L) es el T3 (15 mL/L de AAS®) y la dosis que presentó el más alto porcentaje de oxidación es el T1 (5 mL/L) debido a que no se realizó el recultivo en esta dosis por la ausencia de contaminación. Esto también se corroboró al observar el gráfico de alta y baja oxidación, los explantes oxidados de este tratamiento (T1) presentaron alrededor de un 80 % de oxidación alta.
- Para el porcentaje de callogénesis se concluye que el AAS® tiene un efecto negativo para la formación de callos, ya que si no se usa el producto se ve un 100 % de callogénesis pero si se emplean las dosis del antibiótico la callogénesis va disminuyendo, para esta variable el mejor resultado está reflejado en el T0 y T1 (5mL/L).
- Para la frecuencia callogénica se obtuvieron cantidades de callos mixtos considerables, que representarían los callos más deseables de los que presentaron los explantes, ya que estos evolucionarán a callos embriogénicos más pronto que los otros tipos, se observó la mayor cantidad de estos callos mixtos en el T0 y T2 (10 ml/L), asimismo se ve que la mayor proporción de explantes sin reacción se presentaron en T2 y T3 (10 y 15 mL/L) y el T0 sólo presentaba

explantes con callos. Se concluyó que el uso del biocida AAS no tiene ningún efecto sobre la formación de callos nodulares ni mixtos.

Para el segundo experimento se concluye:

- Para porcentaje de contaminación, se observó que los dos biocidas usados en el experimento tienen diferentes efectos por lo que se puede recomendar, en base del menor porcentaje de contaminación, que el mejor biocida a utilizar es el PPM™, en cuanto a las dosis se observó que hubo diferencia para contaminación entre usar o no los biocidas y finalmente se puede recomendar el uso del PPM™ con la dosis más baja, ya que estadísticamente la contaminación es la misma en los 4 tratamientos con adición de dosis del antibiótico, y representaría un menor gasto, esta dosis sería el T1 (50 % del recomendado técnico), es decir, 1 mL L⁻¹ para agregar al medio de cultivo.
- Para el porcentaje de oxidación se puede concluir que diferentes dosis de PPM™ no influyen en la oxidación de los explantes, por lo que se puede indicar que este antibiótico no tuvo un efecto negativo hacia la oxidación. Asimismo, en el gráfico de oxidación alta y baja se observa una tendencia marcada de oxidación baja en las dosis más bajas, considerando que el T4 (200 % del RT) tiene la mayor proporción de oxidación alta con 45 %.
- Para el porcentaje de callogénesis, se observa que el uso del PPM™ no tuvo un efecto directo sobre esta variable. Respecto a la frecuencia callogénica se evidenció una notable presencia de callos nodulares, que evolucionarán en callos mixtos y, estos a su vez en callos embriogénicos, la mayor presencia de callos nodulares en los tratamientos T0 (0 % del RT de PPM) y T2 (100 % del RT), y que el T4 (200 % del RT) presentó el menor resultado en callos nodulares. Asimismo, se tuvo una presencia considerable de callos cicatriciales y una cantidad casi nula de explantes que no presentaron ningún tipo de callo y es en el T4. Se concluyó que el uso del biocida PPM no tiene ningún efecto sobre la formación de callos cicatriciales ni nodulares.

7. RECOMENDACIONES

- Probar más protocolos de desinfección para la introducción *in vitro* de esta especie, más severos, especialmente si se pretende usar hojas adultas.
- Probar la introducción *in vitro* con otros antibióticos / biocidas para controlar la contaminación.
- Experimentar con otras dosis de diferentes auxinas y citoquininas y diferentes combinaciones entre ellas.
- Probar la introducción *in vitro* con otros estadios de las hojas jóvenes de esta especie para encontrar el punto de equilibrio entre baja contaminación y mayor producción de callos.
- Usar y probar diferentes soluciones antioxidantes para disminuir el problema de la oxidación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Arias, H. (2013). Estandarización de una metodología para la determinación multiresiduo de plaguicidas en café verde (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Química Industrial).
- Carvalho, A. F., Fazuoli, L. C., Teixeira AA Guerreiro Filho, O. (1990). Aproveitamento do café Excelsa em mistura com o café Arábica. *Bragantia (Brasil)* v. 49 (2) p. 335-343.
- Carvalho, C. D. (2008). Cultivares de café: origem, características e recomendações. *Brasília: Embrapa Café*. 1.
- Cassells, A. C. (2001). Contamination and its impact in tissue culture. Simposio llevado a cabo en el Simposio IV *International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560* (pp. 353-359).
- Cassells, A. C. (2000a) Contamination detection and elimination. In: SPIER, R. E. (Ed.) *Encyclopedia of plant cell biology*. Chichester: Wiley. 577-586.
- Climate-Data.org. (2017). Climate-Data.org. Oedheim, Alemania: AM Online Projects / OpenStreetMap contributors. Recuperado de <https://es.climate-data.org/location/24990/>
- Cramer, P.J. (1957) A review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba, Costa Rica, Inter-American Institute of Agricultural Sciences. 262 p. (Miscellaneous publication, 15)
- Compton, M. E., & Koch, J. M. (2001). Influence of plant preservative mixture (PPM) TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2), 259-261.
- Çölgeçen, H., ÇALIŞKAN, U. K., y TOKER, G. (2011). Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 513-520.
- da Silva, J. A. T., Nhut, D. T., Tanaka, M., & Fukai, S. (2003). The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). *Scientia Horticulturae*, 97(3), 397-410.
- Davide, A. C., Faria, J. M., Botelho, S. A. (1995) Propagação de espécie florestais, Lavras: Universidad Federal de Lavras. 41 p.
- Fazuoli, L. C. (1981). Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M. incognita*. In *Colloque International Sur La Protection Des Cultures Tropicales, Lyon. Resumos*. Fondation Scientifique de Lyon. (p. 57).

George, M. W., & Tripepi, R. R. (2001). Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of Chrysanthemum, European birch, and Rhododendron. *HortScience*, 36(4), 768-769.

Gilbert, J. E., Shohet, S., y Caligari, P. D. S. (1991). The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue cultures. *Annals of applied biology*, 119(1), 113-120.

González-Vega, M. (2003). Estudio del proceso de calogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canephora P.*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), 16-23.

Gotteland, M., & de Pablo, S. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista chilena de nutrición*, 34(2), 105-115.

Haddadi, F., Aziz, M. A., Saleh, G., Rashid, A. A., y Kamaladini, H. (2010). Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific shoot regeneration from in vitro shoot tips using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *HortScience*, 45(3), 453-456.

Haine, R.J. (1992) Mass propagation by cuttings, biotechnologies and the capture of genetic gain. Seminario presentado en el Simposio: Symposium in iufro's centennial year mass production technology for genetically improved fast-growing forest tree especie. 1992, Bordeaux syntheses. Paris. 128-144.

International Coffee Organization. (s.f.). *Historia del café*. Consultado el 28 de octubre de 2018. http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp

Jimenez, E. R. & Pérez-Urria, E. (2014). Café I. REDUCA (Biología), 7(2). Café I (G. *Coffea*). *Reduca Biología*, 7(2), 113-132.

Jiménez -García, V., Castillo, J., Tavares-Eiraldi, M. E., Guevara-Berger, E., & Montiel-Longhi, M. B. (2006). In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. La propagación in vitro del bambú gigante neotropical, *Guadua angustifolia* Kunth, mediante la proliferación de brotes axilares. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 86, 389-395.

Junqueira, L., Carneiro, J., Andrade, C, y Jordão, B. (2000). *Biología celular e molecular* 7º edición. (pp. 26-39). Guanabara-Koogan.

Karp, G. 1998. *Biología celular y molecular*. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. McGraw-Hill Interamericana. México D.F. México. 746 p.

López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivel, A., Aguirre-Medina, J. F., & Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(3), 205-213.

Marota, W. 2003. *Embriogênese somática em cafés arábica e robusta*. Tesis de Doctorado. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, Brasil. 116 p.

Medina Filho, H.P., Carvalho, A.; Monaco, L.C. (1977) Melhoramento do cafeeiro: XXVII. Observações sobre a resistência do cafeeiro ao mineiro. *Bragantia*, Campinas, 36. 131-137.

Miyazaki, J., Tan, B. H., y Errington, S. G. (2010). Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(3), 365-372.

Organización Internacional del Café (Noviembre del 2019). Informe del Mercado del Café. Disponible en: <http://www.ico.org/documents/cy2019-20/cmr-1119-c.pdf>

Pasqual, M. (2001a) Introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA-FAEPE. 97.

Petek, M. R., Sera, T., y Alteia, M. Z. (2005). Selection for frost resistance in *Coffea arabica* progenies carrying *C. liberica* var. *Dewevrei* genes. *Crop Breeding And Applied Technology*, 5 (3), 354.

Rihan, H. Z., Al-Issawi, M., Al-Swedi, F., & Fuller, M. P. (2012). The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial seed produced. *Scientia horticultrae*, 141, 47-52.

Rodríguez, M., Cevallos, A. M., y Montes, S. (2000). PROTEÍNAS EXTRACELULARES MARCADORAS DEL POTENCIAL EMBRIOGÉNICO EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea spp.* *Cultivos Tropicales*, 21(2). 11-15.

Sagárnaga, R. (27 de noviembre de 2017). El café ya es arte y ciencia en Bolivia. *Los Tiempos*. Recuperado de <https://www.lostiempos.com/oh/actualidad/20171127/cafe-ya-es-arte-ciencia-bolivia>

Söndahl; M. R., Nakamura; T. y Sharp w. R. (1985) Propagation of coffee. In: HENKE, R. R., Hughes, K. W., Constantin, M. P., Hollaender, A. *Tissue culture in forestry and agriculture*. New York: Plenum. 215 – 232.

Scherwinski-Pereira, J. E. (2010). *Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas*. Brasilia DF, Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA.

Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

Sridevi, V., & Giridhar, P. (2014). In vitro shoot growth, direct organogenesis and somatic embryogenesis promoted by silver nitrate in *Coffea dewevrei*. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 23(1), 112-118.

Szypuła, W., Pietrosiuk, A., Suchocki, P., Olszowska, O., Furmanowa, M., y Kazimierska, O. (2005). Somatic embryogenesis and in vitro culture of *Huperzia* selago shoots as a potential source of huperzine A. *Plant science*, 168(6), 1443-1452.

Thorpe, T. A., Patel, K. R., y Vasil, I. K. (2012). Clonal propagation: Adventitious buds. *Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1, 49-60.

Tisserat, B. (1985) Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed). *Plant Cell Culture – A Practical Approach*. Oxford: IRL, 79-105.

Villalta-Villalobos, J., & Gatica-Arias, A. (2019). Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 577-599.

Williams, E. G., y Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57(4), 443-462.

ANEXOS



Figura 5. Sala de preparación de medios de cultivo



Figura 6. Vista externa del Laboratorio del Laboratorio de biotecnología



Figura 7 y 8. Especie de café arbórea del estudio: *Coffea dewevrei*, las imágenes muestran la gran altura que este árbol tiene, que en la actualidad mide aproximadamente 10 m.



Figura 9. Muestreo de las hojas adultas cerca de la base del árbol



Figura 10. Muestreo de las hojas jóvenes cerca de la copa



Figura 11. Aplicación de los plaguicidas con el EPI (Equipo de Protección Individual)



Figura 12. Preparación de los plaguicidas



Figura 13. Aplicación de fungicidas-bactericidas sistémicos a las hojas



Figura 14. Colección de las hojas marcadas



Figura 15. Introducción de las hojas a la caja de plastoformo



Figura 16. Proceso de desinfección padrón



Figura 17. Movimientos concéntricos con el frasco y los agentes desinfectantes



Figura 18. Enjuague de las hojas con agua destilada dentro de la cámara de flujo



Figura 19. Autoclavado de los materiales de laboratorio



Figura 20. Materiales autoclavados en la Cámara de Flujo Laminar



Figura 21. Preparación del medio de cultivo

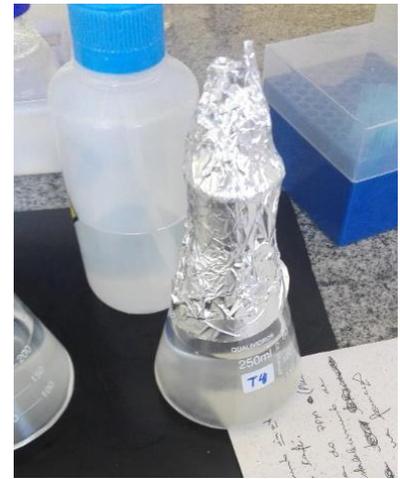


Figura 22. Medio de cultivo autoclavado



Figura 23. y 24. Corte de la nervadura central y los bordes de la hoja porque se los desecha a la hora de introducir *in vitro*



Figura 25. Corte de los explantes a 7x7 mm



Figura 26. Inoculación de los explantes en el medio de cultivo

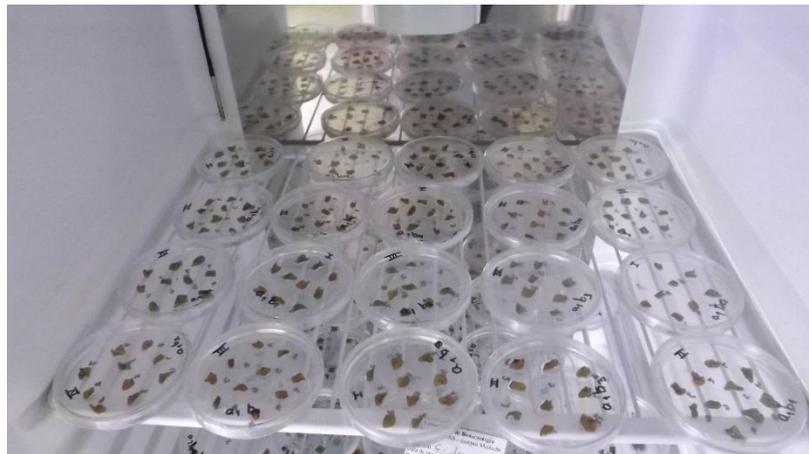


Figura 27 y 28. Disposición de los explantes en la BOD



Figura 29. BOD o Câmara de germinación



Figuras 30 y 31. Toma de datos con ayuda del estereoscopio



Figuras 32 y 33. Recultivo de los explantes (traspaso de los explantes de una placa Petri a otra)



Figura 34. Reubicación de los explantes



Figura 35. Sellado de las cajas Petri

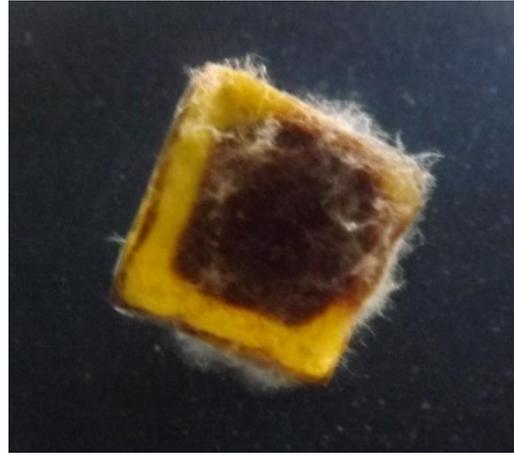
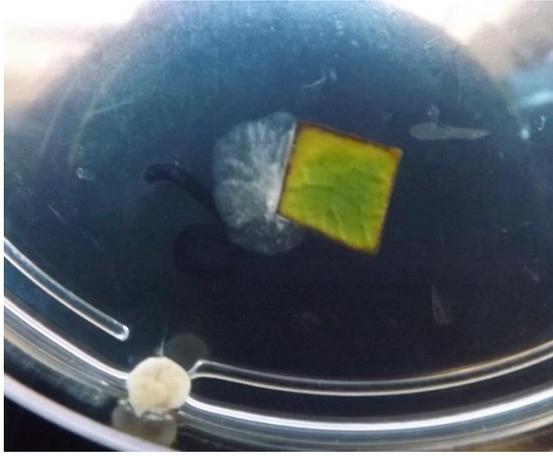


Figura 36 y 37. Explantes contaminados con hongos



Figura 38. Contaminación fúngica



Figura 39. Contaminación bacteriana



Figura 40. Sistema para obtener las fotografías de los explantes (Estereoscopio + programa de computador)

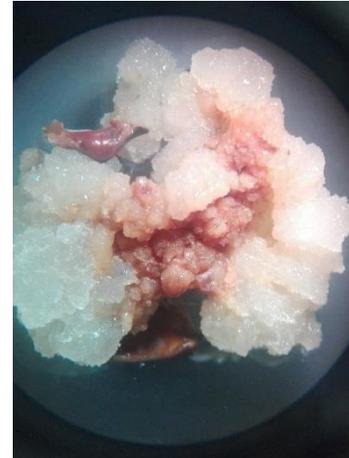


Figura 41. Explante con callos nodulares y mixtos



Figura 42. Caja Petri con explantes con callos mixtos



Figura 43. Explantes con alta oxidación

DATOS DEL EXPERIMENTO

PRIMER ENSAYO

- **PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN**

Cuadro 17. Datos de la variable de respuesta Contaminación (1º Ensayo)

TIPO DE HOJA	NIVELES DE AAS	CONTAMINACIÓN (%)
HOJA JOVEN	0 ml	30
HOJA JOVEN	0 ml	10
HOJA JOVEN	0 ml	40
HOJA JOVEN	0 ml	0
HOJA JOVEN	5 ml	0
HOJA JOVEN	5 ml	0
HOJA JOVEN	5 ml	0
HOJA JOVEN	5 ml	0
HOJA JOVEN	10 ml	10
HOJA JOVEN	10 ml	0
HOJA JOVEN	10 ml	0
HOJA JOVEN	10 ml	0
HOJA JOVEN	15 ml	70
HOJA JOVEN	15 ml	10
HOJA JOVEN	15 ml	20
HOJA JOVEN	15 ml	10
HOJA JOVEN	20 ml	0
HOJA JOVEN	20 ml	0
HOJA JOVEN	20 ml	0
HOJA JOVEN	20 ml	20
HOJA MADURA	0 ml	80
HOJA MADURA	0 ml	80
HOJA MADURA	0 ml	80
HOJA MADURA	0 ml	90
HOJA MADURA	5 ml	50
HOJA MADURA	5 ml	80
HOJA MADURA	5 ml	70
HOJA MADURA	5 ml	90
HOJA MADURA	10 ml	80
HOJA MADURA	10 ml	70
HOJA MADURA	10 ml	80
HOJA MADURA	10 ml	100
HOJA MADURA	15 ml	100

HOJA MADURA	15 ml	90
HOJA MADURA	15 ml	90
HOJA MADURA	15 ml	70
HOJA MADURA	20 ml	90
HOJA MADURA	20 ml	80
HOJA MADURA	20 ml	70
HOJA MADURA	20 ml	80

- **PORCENTAJE DE OXIDACIÓN**

Cuadro 18. Datos de la variable de respuesta Oxidación (1º Ensayo)

DOSIS AAS	OXIDACIÓN (%)
0 ml	70
5 ml	90
10 ml	80
15 ml	70
20 ml	80
0 ml	60
5 ml	90
10 ml	90
15 ml	80
20 ml	90
0 ml	60
5 ml	80
10 ml	90
15 ml	90
20 ml	90
0 ml	70
5 ml	100
10 ml	80
15 ml	70
20 ml	80

- **PORCENTAJE DE CALLOGÉNESIS**

Cuadro 19. Datos de la variable de respuesta Callogénesis (1º Ensayo)

DOSIS AAS	CALLOGÉNESIS (%)
0 ml	100
5 ml	90
10 ml	88,89
15 ml	50
20 ml	100
0 ml	100
5 ml	100
10 ml	80
15 ml	66,67
20 ml	20
0 ml	100
5 ml	80
10 ml	40
15 ml	62,5
20 ml	50
0 ml	100
5 ml	100
10 ml	60
15 ml	33,33
20 ml	85,71

SEGUNDO EXPERIMENTO

- **PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN**

Cuadro 20. Datos de la variable de respuesta Contaminación (2º Ensayo)

BIOCIDA	DOSIS (% RT)	CONTAMINACIÓN (%)
PPM	0 %	100
PPM	0 %	90
PPM	0 %	90
PPM	0 %	100
PPM	0 %	90
PPM	50 %	80
PPM	50 %	70
PPM	50 %	80
PPM	50 %	80
PPM	50 %	80

PPM	100 %	80
PPM	100 %	90
PPM	100 %	60
PPM	100 %	70
PPM	100 %	100
PPM	150 %	50
PPM	150 %	50
PPM	150 %	40
PPM	150 %	50
PPM	150 %	90
PPM	200 %	80
PPM	200 %	40
PPM	200 %	40
PPM	200 %	60
PPM	200 %	80
AAS	0 %	100
AAS	0 %	100
AAS	0 %	80
AAS	0 %	100
AAS	0 %	100
AAS	50 %	60
AAS	50 %	90
AAS	50 %	70
AAS	50 %	80
AAS	50 %	100
AAS	100 %	80
AAS	100 %	100
AAS	100 %	90
AAS	100 %	100
AAS	100 %	90
AAS	150 %	100
AAS	150 %	90
AAS	150 %	100
AAS	150 %	80
AAS	150 %	70
AAS	200 %	100
AAS	200 %	90
AAS	200 %	80
AAS	200 %	90
AAS	200 %	100

- **PORCENTAJE DE OXIDACIÓN**

Cuadro 21. Datos de la variable de respuesta Oxidación (2º Ensayo)

DOSIS PPM (% RT)	OXIDACIÓN (%)
0 %	50
50 %	100
100 %	50
150 %	75
200 %	50
0 %	100
50 %	66,66
100 %	100
150 %	100
200 %	100
0 %	50
50 %	100
100 %	75
150 %	83,33
200 %	100
0 %	100
50 %	50
100 %	66,66
150 %	80
200 %	75
0 %	75
50 %	50
100 %	100
150 %	100
200 %	100

- **PORCENTAJE DE CALLOGÉNESIS**

Cuadro 22. Datos de la variable de respuesta Callogénesis (2º Ensayo)

DOSIS PPM (% RT)	CALLOGÉNESIS (%)
0 %	100
50 %	100
100 %	90
150 %	100
200 %	100
0 %	80
50 %	100

100 %	80
150 %	100
200 %	80
0 %	100
50 %	100
100 %	100
150 %	50
200 %	80
0 %	75
50 %	100
100 %	100
150 %	80
200 %	50
0 %	100
50 %	100
100 %	100
150 %	100
200 %	90