

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

TRABAJO DE GRADUACIÓN
ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CAFÉ (*Coffea arabica*) VARIEDAD
CUSCATLECO POR MEDIO DE MICROESQUEJES

PRESENTADO POR:

NOÉ RAÚL MARTÍNEZ DE PAZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DOCENTES DIRECTORES:

MSc. RICARDO FIGUEROA CERNA

LIC. KARLA MARÍA QUINTANILLA MORENO

MARZO DEL 2014

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CAFÉ (*Coffea arabica*) VARIEDAD
CUSCATLECO POR MEDIO DE MICRO ESQUEJES

PRESENTADO POR:
NOÉ RAÚL MARTÍNEZ DE PAZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADO:
LIC. OSCAR ARMANDO GUERRA ASCENCIO

FIRMA: _____

DOCENTES DIRECTORES:
MSc. RICARDO FIGUEROA CERNA

FIRMA: _____

LIC. KARLA MARÍA QUINTANILLA MORENO

FIRMA _____

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTROAMÉRICA

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

VICE-RECTOR ACADÉMICO:

MAESTRA ANA MARÍA GLOWER DE ALVARADO

VICE-RECTOR ADMINISTRATIVO:

MAESTRO ÓSCAR NOÉ NAVARRETE

SECRETARIO GENERAL:

Dra. ANA LETICIA ZAVALETA DE AMAYA

FISCAL GENERAL

LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTROAMÉRICA

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR, FACULTAD
MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE.

DECANO:

LIC. RAÚL ERNESTO AZCUNAGA LÓPEZ

VICE-DECANO:

ING. WILLIAM VIRGILIO ZAMORA GIRÓN

SECRETARIO:

LIC. VÍCTOR HUGO MERINO QUEZADA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA:

LIC. OSCAR ARMANDO GUERRA ASCENCIO

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTROAMÉRICA

AGRADECIMIENTOS

A Dios todo poderoso por haberme brindado la capacidad y oportunidad de estudiar y de haberme dado unos excelentes padres quienes me han apoyado a lo largo de toda mi vida

Al Ingeniero Carlos Arévalo jefe del laboratorio de biotecnología y demás autoridades de CENTA, por haberme permitido realizar esta investigación en las instalaciones del laboratorio de biotecnología.

A la señora Carmen y Mima por su valiosa colaboración en el laboratorio ya que en muchos momentos fueron quienes me guiaron y al señor Silvestre Mijango por su colaboración en el área de vivero y palabras de apoyo

Al Licenciado Ricardo Figueroa y Licenciada Karla Quintanilla por su ayuda a lo largo de la investigación y de la revisión de este documento

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1	Introducción del café en El Salvador	2
2.2	Origen y taxonomía del café	2
2.3	Morfología del cafeto	3
2.3.1	Sistema radicular.....	3
2.3.2	Tallo	3
2.3.3	Fruto.....	4
2.4	Beneficios ecológicos que genera el café.....	4
2.5	Importancia socioeconómica del Café para El Salvador.....	5
2.6	Variedades de café de importancia comercial en El Salvador	6
2.6.1	Variedad Tekisic.....	6
2.6.2	Variedad Pacas.....	6
2.6.3	Variedad Pacamara.....	7
2.6.4	Variedad Catisic	7
2.6.5	Variedad Catuai rojo.....	8
2.6.6	Variedad Cuscatleco	8
2.7	Enfermedades del cafeto	9
2.8	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	12
2.8.1	Propagación <i>in vitro</i>	12
2.8.2	El explante	13
2.8.3	Desinfección superficial del explante	14
2.8.4	Oxidación fenólica	15
2.8.5	Reguladores de crecimiento.....	16
2.8.6	Medios de Cultivo.....	17
2.8.7	Factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos.....	19
2.8.8	Organogénesis.....	20
2.8.9	Microesquejes	20

3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	23
3.1	Ubicación y descripción el área de estudio.....	23
3.2	Fase de campo.....	23
3.3	Fase de laboratorio.....	23
3.3.1	Preparación de medios de cultivo.....	23
3.3.2	Preparación del material vegetativo.....	25
3.3.3	Desinfección superficial del explante y control de Oxidación.....	26
3.3.4	Inducción a brotación.....	26
3.3.5	Condiciones físicas de crecimiento.....	27
3.4	Parámetros que se midieron en la desinfección superficial y control de oxidación fenólica.....	28
3.5	Variables evaluadas en la fase de inducción a brotación.....	28
3.6	Diseño experimental.....	28
3.7	Análisis estadístico de los datos.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Etapa de desinfección y control de oxidación fenólica.....	29
4.1.1	Porcentaje de sobrevivencia.....	29
4.1.2	Porcentaje de contaminación.....	29
4.1.3	Oxidación fenólica.....	31
4.2	Inducción a brotación.....	32
4.2.1	Días a brotación.....	32
4.2.2	Porcentaje de brotes por explante.....	33
4.2.3	Porcentaje de explantes con brotes.....	36
5	DISCUSIÓN.....	39
5.1	Desinfección y control de oxidación fenólica.....	39
5.2	Inducción a brotación.....	41
6	CONCLUSIONES.....	43
7	RECOMENDACIONES.....	44
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	Página.
1. Procedimiento para preparar medios de cultivo, CENTA 2013.....	25
2. Supervivencia de explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco a siete días de sembrado, CENTA 2013	29
3. Contaminación en explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco, CENTA 2013... ..	30
4. Porcentaje de contaminación en explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco a tres semanas de cultivo con relación al tipo de explante.....	30
5. Oxidación fenólica en un explante de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco a los 3 días de cultivo, CENTA 2013	31
6. Porcentaje de oxidación en los explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco a tres semanas de cultivo.....	32
7. Brotación de un explante de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco a los 12 días de cultivo en el tratamiento (T1), CENTA 2013.....	33
8. Porcentajes promedios de brotación <i>in vitro</i> de explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).....	34
9. Porcentajes promedios de brotación <i>in vitro</i> para el nudo apical a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).....	35

10. Porcentajes promedios de brotación *in vitro* del segundo nudo 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).....35
11. Porcentaje promedio de brotes formados en cada uno de los explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco, a 10 semanas de siembra con relación al tipo de explante.....36
12. porcentaje de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco con brotes a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).....37
13. porcentaje de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco con brotes a 10 semanas de siembra con relación al tipo de explante.....38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro.	Página.
1 Composición del medio formulado con las sales de Murashige y skoog (1962), CENTA 2013.....	23
2. Tratamientos que se aplicaron en la fase de inducción a brotación, CENTA 2013.....	27
3. días a brotación de explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad Cuscatleco sometidos a diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP), a 10 semanas de cultivo, CENTA 2013.....	32
4. Análisis de varianza para porcentaje de brotación <i>in vitro</i> de los explantes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco, 10 semanas después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP), CENTA 2013.....	33
5. Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes de café (<i>Coffea arabica</i>) variedad cuscatleco, 10 semanas después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP), CENTA 2013.....	36

RESUMEN

El café (*Coffea arabica*) es un cultivo importante en El Salvador que se ve amenazado por la aparición de ciertas enfermedades además de otros factores, por lo que es necesario contar con variedades resistentes o tolerantes a estas, así como también contar con una técnica de propagación efectiva que permita altas tasas de multiplicación y precios bajos. La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Alvares Córdova” CENTA de marzo a noviembre del 2013 y consistió en la evaluación de diferentes concentraciones de la citoquinina Benzilaminopurina para la inducción a brotación en microesquejes de café variedad cuscatleco.

Las microesquejes de café (*Coffea arabica*) variedad Cuscatleco fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 10% y 8%, obteniéndose un mayor porcentaje de contaminación a causa de hongos que de bacterias conformando un 55% de contaminación, además los explantes pasaron por un enjuague de 10 minutos en una solución de ácido cítrico para controlar la oxidación fenólica, luego se inició la inducción a brotación en los explantes para lo que se utilizaron los dos primeros nudos de un tallo ortotropico y tres concentraciones diferentes de Benzilaminopurina para medir los efectos de la hormona sobre la brotación en los explantes. Al cabo de 10 semanas de cultivo el medio suplementado con 3 mg/l de Benzilaminopurina para el segundo nudo (T5) fue el que obtuvo mejores resultados en las variables evaluadas, a pesar de no haberse encontrado diferencia estadística significativa entre los tratamientos, se recomienda utilizar este tratamiento (T5) en la micropropagación *in vitro* de café variedad cuscatleco.

1. INTRODUCCIÓN.

El café (*Coffea arabica*), es un producto tradicional de las regiones tropicales entre las que destaca América Latina pues Brasil, Colombia y México se encuentran entre los principales productores (Berthouly, 1989), en El Salvador el café es una fuente directa e indirecta de generación de empleos y uno de los principales rubros económicos, recientemente la caficultura nacional se ha vuelto seriamente afectada debido al apareamiento de plagas y enfermedades como la roya del cafeto lo cual ha incrementado los costos fitosanitarios al incrementar el uso de agroquímicos, lo que crea la necesidad de buscar variedades resistentes a esta enfermedad a medida de mantener un margen de costo beneficio y una alta producción.

La multiplicación vegetativa es un proceso que produce genotipos específicos, además esta es el único procedimiento que permite reproducir en gran escala los genotipos sobresalientes y cuya fijación por vía sexual no puede considerarse por diversas razones (Berthouly, 1989). En el cultivo del café esta técnica permite la rápida propagación vegetativa del material genéticamente estable y escaso para la producción masiva de plantas con características iguales. También es ventajosa por la disminución del área necesaria para el establecimiento de vivero y en la reducción de costos de producción al tratarse de plantas resistentes y tolerantes a factores ambientales y biológicos (Landaverde, *et. al.*, 2002).

En esta investigación se buscó la micropropagación de café variedad Cuscatleco a través de microesquejes evaluando diferentes concentraciones de Benzilaminopurina en dos explantes diferentes con el fin de inducir la generación de brotes. El periodo en que se llevó a cabo la investigación fue de mayo a noviembre de 2013.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Introducción del café en El Salvador

Algunos historiadores señalan que el periodo de introducción del café a El Salvador fue entre los años 1779 y 1796, otros sugieren que entre los años 1800 y 1815, Se cree que los señores Cirilo Guerra y Francisco Martínez de Santa Ana, encontraron las primeras plantas del cafeto en los terrenos de dos campesinos de Ahuachapán, quienes habían obtenido las semillas de la Hacienda del Soyote, propiedad de los señores Álvarez de Asturias, en Jutiapa. De allí el cultivo se extendió al resto de la república, esto sucedió debido a que el Estado promovió esta nueva actividad productiva, mediante la reducción de impuestos, donación de plantas y la promoción de la propiedad privada de los terrenos. Durante el período del Capitán Gerardo Barrios se decretó la donación de todo terreno baldío en las cercanías de Santa Tecla a las personas que dedicaran dos tercios de su extensión al cultivo del café (PROCAFE¹, 2007).

2.2 Origen y taxonomía del café

PROCAFE (2007), menciona que el cafeto tiene su origen en las regiones montañosas de Etiopía y se dice que el nombre arábica viene de que los primeros pueblos en cultivarla, comercializarla y utilizarla como bebida fueron los Árabes, y su cultivo comercialmente se expande en el continente americano, Puerto Rico, África Central y Occidental y Asia. Es importante mencionar, que del cafeto dos especies son las más importantes de este género: especie *arabica* y *canephora* de las que se derivan muchas variedades, las cuales unas tienen importancia comercial, otras de investigación. En El Salvador cinco variedades son las de mayor importancia las cuales poseen características propias y otras similares pero con origen diferente, es decir variedades mutantes y variedades creadas por hibridación lo que las hace diferenciarse en porte alto, intermedio y bajo, de follaje denso, fruto normal, grande y muy grande, color rojo y amarillo, en algunos casos. Destacando en todas, su

¹ Fundación Salvadoreña para la investigación del café

apreciable calidad de bebida de acuerdo a la aclimatación climática y altitud en la que se cultive.

Clasificación taxonómica del cafeto según PROCAFE (2007).

Reino: Vegetal

División: Espermatophitas

Clase: Dicotiledonea

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Género: *Coffea*

Especie: *arabica*



2.3 Morfología del cafeto

2.3.1 Sistema radicular

Está compuesto por la raíz principal que puede alcanzar 50 cm o más de profundidad, de la cual se originan las raíces secundarias que ejercen la función de anclaje y las raíces terciarias de las que emergen las raicillas, que sirven a la planta para la absorción de agua y nutrientes (PROCAFE, 2007).

2.3.2 Tallo

El arbusto de café está compuesto generalmente de un solo tallo o eje central. El tallo exhibe dos tipos de crecimiento. Uno que hace crecer al arbusto verticalmente y otro en forma horizontal o lateral. El crecimiento vertical u ortotrópico es originado por una zona de crecimiento activo o plúmula en el ápice de la planta que va alargando a ésta durante toda su vida, formando el tallo central, nudos y entrenudos (PROCAFE, 2007).

En los primeros 9 a 11 nudos de una planta joven sólo brotan hojas. De ahí en adelante esta comienza a emitir ramas laterales. Estas ramas de crecimiento lateral o plagiotrópico se originan de unas yemas que se forman en las axilas superiores de las hojas. En cada axila se forman dos o más yemas unas sobre las otras. De las yemas superiores se desarrollan las ramas laterales que crecen horizontalmente. La yema inferior a menudo llamada accesoria, da origen a nuevos brotes ortotrópicos. Usualmente esta yema no se desarrolla a menos que el tallo principal sea decapitado, podado o agobiado

2.3.3 Fruto

Es una drupa ovalada como una cereza, compuesta por epicarpo o epidermis (pulpa), mesocarpo, (miel y mucilago), endocarpo (pergamino), espermodermo (película plateada) y endospermo (grano o semilla) (PROCAFE, 2007).

2.4 Beneficios ecológicos que genera el café

Desde el punto de vista ecológico y de la biodiversidad, es de vital importancia porque contribuye con el mantenimiento de suelos y ha sustituido el bosque original por un sistema arbóreo adecuado, constituido por cafetales, arboles de sombra, cortinas rompe vientos, por lo que se le considera en la clasificación de Holdridge como “Bosque Húmedo Subtropical”. En el Salvador los cafetales cubren aproximadamente el 8% del territorio y está presente en las tres zonas del país a partir de los 500 *msnm* hasta los 1,600 metros de altura (PROCAFE, 2004).

Los cafetales albergan gran parte de la biodiversidad salvadoreña, formada por especies animales y vegetales, cuya presencia hace que el ecosistema se mantenga en equilibrio. El bosque cafetalero es un sistema complejo, capaz de generar Oxígeno, almacenar agua, generar nuevos suelos y preservar la diversidad de vida (PROCAFE, 2004).

El bosque tropical cafetalero tiene importancia hidrológica además de ser fuente de energía, generar servicios ambientales y conservar la biodiversidad. Protege los suelos contra la erosión, resguarda las principales vertientes de las cuencas hidrográficas y permite la infiltración de agua a los mantos acuíferos. El bosque cafetalero provee el 44% de la demanda total de leña de las poblaciones rurales. Además, una hectárea de café bajo sombra puede mantener una reserva de 200 toneladas de carbono y la tasa neta de fijación de bióxido de carbono es de 126 kg diarios (PROCAFE, 2004).

2.5 Importancia socioeconómica del Café para El Salvador

La caficultura salvadoreña tuvo un fuerte impacto negativo desde el año 2000, cuando a nivel internacional comenzó una grave crisis de bajos precios del grano, una situación que en el caso de El Salvador empujó a muchos productores a la quiebra, a los que enfrentaron la situación con mayor eficiencia, los escasos ingresos obtenidos por las exportaciones apenas les permitían atender sus fincas (Arévalo y Méndez, 2011).

En el año 2007, el café representó el 1.5% del Producto Interno Bruto (PIB) y el 12% del PIB Agropecuario. Las exportaciones de café representaron en el 2008 un 6.7% del total de exportaciones del país, aun cuando la diversificación de exportaciones y la disminución en la productividad del parque cafetalero han minado el desempeño de las primeras. La actividad cafetalera promedio entre los años 1995 y 2007 representaron un 8.3% de las exportaciones totales de El Salvador (CSC² 2009, citado por Arévalo y Méndez, 2011).

Según Arévalo y Méndez (2011), en cuanto al empleo, el café bajo condiciones normales aporta 160,000 empleos directos y cerca de 500,000 empleos indirectos; inyecta recursos en el área rural dinamizando el comercio y aliviando la pobreza rural. A causa de la baja rentabilidad del café se han

² Consejo Salvadoreño del café

incrementado los niveles de desempleo, lo que produce un efecto negativo en los ingresos de los productores y de los trabajadores de la cadena del café.

2.6 Variedades de café de importancia comercial en El Salvador

PROCAFE (2007), manifiesta que las variedades comerciales del cafeto que se cultivan en El Salvador son: Bourbon, Tekisic (Bourbon mejorado), Pacas, Pacamara, Catisic, entre otros, siendo el Bourbon y el Pacas los que tienen el 81.1% del área cafetalera.

Con la llegada de la roya en El Salvador, se hizo más imperativo y urgente introducir y disponer de nuevos materiales genéticos que ampliaran la base genética de las variedades existentes; además que presentaran mejor producción, adaptabilidad y resistencia a enfermedades como la roya (PROCAFE, 1997).

2.6.1 Variedad Tekisic.

Esta variedad se obtuvo en el país como producto de selecciones genéticas en plantas Bourbon “tradicional” lográndose obtener al final, plantas con buenas cualidades de producción, adaptabilidad, conformación de la planta y calidad del producto. Además es de porte alto, laterales con entrenudos largos, buen crecimiento de ramas y formación de laterales secundarios. La altura recomendada para el cultivo de esta variedad es entre 800 a 1500 *msnm* porque en estas condiciones se obtiene mejor producto en calidad y cantidad. Los valores de producción oscilan entre 16 a 60 quintales oro por manzana, como ventaja presenta una reducida bienalidad. Sin embargo las principales desventajas son: Menos tolerancia al viento, sol y sequía, además mayor susceptibilidad a la roya del cafeto (PROCAFE, 1997).

2.6.2 Variedad Pacas

PROCAFE (2007), sostiene que se originó de una mutación natural del Bourbon, se descubrió en el año 1949 en la finca San Rafael, cantón Palo Campana, departamento de Santa Ana; la planta llamo la atención de los

caficultores por su aspecto morfológico compacto, se le asignó el nombre, variedad Pacas, en honor al apellido de la familia en cuya propiedad se identificó.

Entre las características de la variedad están: Porte pequeño, laterales aceptablemente largos, entrenudos cortos y hojas de color verde oscuro, favoreciendo su cultivo a distanciamientos cortos, siendo la densidad de plantas por manzana mayor. La productividad de esta variedad es entre 24 a más de 70 quintales oro por manzana, estas producciones están relacionadas a distanciamientos, altitudes, fertilización, y otros (PROCAFE, 1997).

2.6.3 Variedad Pacamara

PROCAFE (2007), manifiesta que es un híbrido artificial proveniente del cruzamiento entre la variedad Pacas con Maragogipe rojo; efectuado en El Salvador en el año 1958 y liberado como variedad en la década de los ochenta.

La variedad se desarrolla mejor en condiciones de media a estricta altura, con rangos en altitud de siembra de 900 a 1,500 *msnm*, estimándose que sus cualidades mejoran al cultivarse arriba de los 1,000 *msnm*. En observaciones de campo se ha notado que Pacamara tolera favorablemente problemas de sequía y viento (PROCAFE, 1997).

2.6.4 Variedad Catisic

PROCAFE (2007), manifiesta que esta variedad es un híbrido de del Caturra rojo con el híbrido de Timor. El producto de este cruce se le conoce como Catimor y fue introducido en El Salvador en 1978. Once líneas de catimor fueron sometidas a continua selección, evaluación y pruebas de adaptabilidad, productividad, calidad de bebida y resistencia a la roya del cafeto, como producto de este trabajo se obtuvo la variedad Catisic que se liberó en los años ochenta.

Presenta resistente a la roya del cafeto, reduce los costos de producción por no aplicar fungicidas, altamente productivo, producción precoz en relación a otras variedades, fruto grande de color rojo y muy buena calidad de bebida. Por producción precoz, requiere de un programa de fertilización intensiva, Requiere de regulación adecuada de sombra (PROCAFE, 2007).

2.6.5 Variedad Catuai rojo

PROCAFE (2007), sostiene que esta variedad fue creada en Brasil en 1949 y es resultado de la hibridación intervarietal de los progenitores caturra amarillo por Mundo Novo. Fue introducida a El Salvador en 1978 y se liberó en 1985.

Tanto en El Salvador como en otros países caficultores, Catuai Rojo muestra muy buenos promedios de producción, lo cual está muy relacionado a la fertilización, distanciamientos de siembra, tipo de suelo, sombreado del cafetal. Sobre catación lo catalogan con acidez, cuerpo y sabor aceptable. (PROCAFE, 1997).

2.6.6 Variedad Cuscatleco

PROCAFE (2007), manifiesta que es un híbrido proveniente del cruce de la variedad Villa sarchi por el híbrido de Timor, se introdujo a El Salvador en 1992 y se liberó en febrero del 2007.

La variedad Cuscatleco tiene las siguientes características: sistema radicular fuerte y profundo con resistencia a nematodos, estructura compacta bien desarrollada de forma cónica, con entrenudos cortos en el eje principal, porte intermedio bandolas largas (más de 80 cm de largo) y el diámetro de grosor del tallo, hasta los 40 cm. El follaje es denso con hojas grandes y corrugadas de color verde intenso, brotes de color verde claro, con alto vigor híbrido, precocidad y resistencia a la roya del cafeto, sin embargo, es ligeramente susceptible a las enfermedades Cercospora (*Cercospora coffeicola*) y Ojo de Gallo (*Mycena citricolor*) (Quijano, 2007).

La maduración del fruto es intermedia y uniforme, es de color rojo, resistente a la caída por el efecto de la lluvia y su tamaño es grande de forma alargada. El porcentaje de grano vano es menos de seis. Es de producción precoz y la maduración del fruto está en función a la altitud donde se cultiva (30 semanas en promedio a partir de la floración) (Quijano, 2007).

Según PROCAFE (2007), esta variedad presenta un porte intermedio, bandolas largas y entrenudos cortos, follaje denso y muy vigoroso, fruto grande de color rojo, resistente a la roya del cafeto y a nematodos, productividad entre 2,070 a 2,300 Kg por hectárea, responde muy bien al manejo de tejidos mediante recepas, se adapta desde los 600 a 1,200 *msnm*, bajo sombra regulada. Tiene crecimiento lento y maduración tardía en altitudes mayores a 1,200 *msnm*.

2.7 Enfermedades del cafeto

Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*)

De acuerdo a Gali (s.a), la roya del café es la enfermedad más importante de ese cultivo en todo el mundo. Se descubrió inicialmente en la vecindad del Lago Victoria, en el este de África, en 1861.

La Roya es un hongo fitoparásito obligado del cafeto. Pertenece a la subdivisión de los Basidiomicetos, del orden Uredinales, familia Pucciniaceae. Existen 32 razas de Roya (*Hemileia vastatrix*) que atacan a especies del género *Coffea* especialmente, a las plantas de la especie *arabica* y también a otras del mismo género, pero con diferentes grados de virulencia (Gali, s.a). En el hongo *Hemileia vastatrix* ocurren variantes genéticas que pueden atacar a unas variedades de café, pero a otras no. Estas variantes se denominan razas fisiológicas. La raza II es la más frecuente en casi todos los países cafeteros del mundo (CENICAFE³, 2011).

³ Centro Nacional de Investigaciones de Café, Colombia.

Los límites de temperatura óptimos para su desarrollo se enmarcan entre los 21 y 25° C. Dentro de estos parámetros, la germinación de las esporas tiene lugar entre las 3 y 4 horas posteriores de su liberación. Por debajo de 16° C y por encima de los 27° C las esporas no germinan (Galís, s.a).

Desarrollo de la epidemia de la roya.

Se conoce como epidemia a aquella aparición de una enfermedad que se esparce rápidamente y con alta frecuencia entre los individuos de una población o área, al mismo tiempo. Una epidemia avanza progresivamente, con tres fases claramente diferenciables (CENICAFE, 2011).

Fase lenta.

CENICAFE (2011), manifiesta que la epidemia inicia con la infección de unas pocas hojas, en las que no se observan síntomas sino hasta después de haber transcurrido el período de incubación. Durante esta fase las infecciones solo se aprecian en menos de 10 de cada 100 hojas en el árbol.

Fase rápida o explosiva.

CENICAFE (2011), sostiene que si las condiciones lo permiten, como resultado de la primera fase ya existe una gran cantidad de inóculo dispersándose dentro del árbol y entre los árboles del lote. Durante un período de 2 a 3 semanas la enfermedad puede llegar a estar presente en 30 ó más hojas de cada 100 hojas del árbol.

Fase terminal o máxima.

CENICAFE (2011), argumenta que finalmente, las hojas atacadas severamente van cayendo del árbol, y el número de hojas sanas es muy reducido como para continuar con la alta tasa de infección y reproducción, por lo que la enfermedad llega a su máximo por agotamiento del hospedero y la epidemia termina.

ANACAFE⁴ (1998), manifiesta que los síntomas de esta enfermedad se presentan como manchas verde pálido a verde amarillo en el haz de las hojas, en el envés son manchas anaranjadas, las hojas severamente atacadas se desprenden del árbol por lo cual se ve afectado en su producción, bajo condiciones favorables para su desarrollo, la enfermedad puede llegar a provocar defoliación total y muerte del cafeto.

En las condiciones de El Salvador, el hongo subsiste durante la época seca en lesiones necróticas en hojas vivas y en hojas secas producidas en la infección del año anterior. Las primeras lluvias reactivan el hongo formando el inoculo primario. La fase de crecimiento acelerado del hongo se presenta desde julio a octubre, la de máxima infección desde noviembre hasta enero, la decadencia de los niveles de infección es desde febrero hasta abril (PROCAFE, 2007).

Antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*)

ANACAFE (1998), argumenta que la enfermedad es conocida como muerte descendente, porque la infección se inicia en la parte terminal de las ramas y avanza hacia el eje (tallo) central. Puede causar daños a la flor, bandolas y hojas, los síntomas en las hojas se presentan como manchas concéntricas, que van desde los bordes hacia la parte central. En frutos, como puntos negros sobre la pulpa.

Los factores que predisponen al cafeto al ataque del patógeno son: periodos prolongados de lluvia, exposición directa a la luz solar y suelos con desequilibrios nutricionales.

Mancha de hierro

ANACAFE (1998), sostiene que en su fase inicial se presentan manchas circulares de 3 a 10 mm de diámetro, con tres colores concéntricos bien

⁴ Asociación Nacional del café, Guatemala.

definidos; una mancha circular cenicienta oscura, en el centro, con diminutos puntos negros, luego un amarillo café-rojizo y en toda la orilla un halo amarillo.

Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)

Según ANACAFE (1998), esta enfermedad se caracteriza por la presencia de numerosas manchas en las hojas, más o menos circulares, de 5 a 15 mm de diámetro y de color gris ceniciento. En brotes tiernos y frutos tienden a ser avaladas, bajo condiciones óptimas el hongo desarrolla sobre las manchas unos hilitos amarillos en forma de diminutos alfileres erguidos y doblados que corresponden a los cuerpos fructíferos del hongo.

2.8 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Es un conjunto de técnicas con las que se ejerce un control relativo sobre procesos morfogénicos, fisiológicos que se llevan a cabo en los tejidos en estudio, en donde se cultiva un explante con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de nutrientes y reguladores de crecimiento tiene la capacidad de regenerar no solo tejidos y órganos sino también plantas completas (Esquivel y Escalant 1994, citado por. López 2013), La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una secuencia de sucesos compuesta principalmente de tres etapas: Etapa I, el establecimiento aséptico del cultivo primario; Etapa II, Multiplicación de brotes; Etapa III, enraizamiento y preparación del inóculo para su trasplante a suelo (Roca y Mroginski, 1991: Villalobos y Thorpe, 1991).

2.8.1 Propagación *in vitro*

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que en general, varias células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad se denomina totipotencialidad celular. El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante, como por

ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (Dublin,1993).

Las técnicas de propagación *in vitro* se basan en el concepto de totipotencia celular, enunciado desde 1902 por Haberlandt: La célula como unidad morfológica y fisiológica del ser viviente, es capaz de autonomía, ya que posee toda la información genética necesaria para generar una nueva planta, siempre y cuando se le suministren las condiciones necesarias para su desarrollo (Etienne, *et. al.* citados por Landaverde, *et. al.*, 2002).

Las diferentes posibilidades que ofrece el cultivo *in vitro* son: La obtención de haploides, obtención de plantas libres de virus, e hibridación somática. Además la multiplicación vegetativa es el único procedimiento para reproducir a gran escala los genotipos sobresalientes, cuya fijación por vía sexual no pueden considerarse por diversas razones, como la incompatibilidad y la depuración genética prolongada (Berthouly, 1989).

El primer trabajo en cultivo de tejido en café fue realizado por Starisky en 1970, quién obtuvo callosidades de ápice de ramas ortótropas de *C. canephora*, *C. arabica* y *C. liberica*. Con esta obtuvo además, embriones somáticos y plantas. Las técnicas más desarrolladas en café son: Propagación por microesquejes y embriogénesis somática (Berthouly, 1989).

2.8.2 El explante

Es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo, la elección de un explante constituye el paso para el establecimiento de los cultivos, puede ser un fragmento de cualquier parte de la planta, (Roca y Mroginski, citados por López 2013) al ser un método de clonación la planta madre debe reunir ciertas características como: tamaño, edad fisiológica y planta donante, además la elección de un explante apropiado es el primer paso para el establecimiento de un cultivo y a la vez está

determinado por el objetivo perseguido y de la especie vegetal en estudio (Castillo, citado por Quintanilla, 2003).

2.8.3 Desinfección superficial del explante

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por microorganismos que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando el tejido o el órgano es cultivado *in vitro* el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células. Los que trabajan con tejidos adultos de plantas que crecen en el campo, señalan que el porcentaje de contaminación es alto, haciéndose necesaria la estricta desinfección superficial (Landaverde, *et. al.*, 2002).

Para la desinfección del material vegetativo, se utiliza comúnmente Hipoclorito de Calcio (del 6 –12 %) o Hipoclorito de Sodio (del 2- 5%) (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

También se recomienda la adición de un detergente (2 a 4 gotas de tween – 20) para romper la tensión superficial y permitir que el explante este en mejor contacto con el químico. No se puede generalizar sobre el tipo de desinfectante o la concentración de este a utilizar debido a que cada especie y tipo de explante, es un caso particular lo que resalta la importancia de experimentar con diferentes métodos utilizando un número reducido de explantes (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

La concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación de determinado explante es la más adecuada, si es más diluida que esta, no se eliminarán los microorganismos y si es más concentrada se dañará el explante. Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes nuevos sean más limpios que los viejos, materiales que crecen en el invernadero son más limpios que los que se encuentran en el campo, y entre más pequeño sea el explante a introducir al cultivo *in vitro* menor será la contaminación a eliminar. Otra recomendación que se ha

formulado es el uso de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

Otro método de desinfección para el material vegetativo es el planteado por Dublin (1993), la desinfección de los tallos se hace mediante lavado con agua corriente seguido de un paso rápido (2 minutos) por alcohol a 70° y de la inmersión (30 minutos al vacío) en una solución de hipoclorito de calcio (10 g/litro). Después de tres enjuagues en agua estéril, los tallos se cortan en explantes que se colocan en un medio de organización de las yemas ortótropas en tallos ortótropos.

Por lo general para esterilizar los medios de cultivo se hace en autoclave a una presión de 115 Lb y 121 °C de temperatura por 20 minutos. La cristalería debe lavarse con detergentes que sean fáciles de remover con agua, se recomienda que para cristalería que haya estado en contacto con altas concentraciones de hormonas u otros agentes se enjuaguen con etanol 70% antes de lavarlos con detergente, y por ultimo un lavado con agua estéril (Abdelnour, *et. al.*,1994). Para los instrumentos metálicos como pinzas, bisturíes etc. la técnica comúnmente utilizada para esterilización es el flameo, los instrumentos se sumergen en alcohol 90% y se flamean, para esterilizar otros instrumentos como cajas de petri o papel se utiliza el autoclave.

2.8.4 Oxidación fenólica

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 serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996, citado por Azofeifa, 2009).

En términos generales, un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso al fenómeno, de esta forma evitan las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski 2008, citado por Azofeifa, 2009), Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, tales como capturadores o desactivadores de iones; reaccionando con intermediarios en el equilibrio redox o en la catálisis del transporte de electrones. Agentes reductores con bajo potencial redox en solución, previenen el oscurecimiento de tejidos, ya que evitan la oxidación de fenoles y ayudan a una rápida remoción de las quinonas formadas. (George, 1996; Shao, *et. al.*, citado por Azofeifa, 2009).

Empleo de sustancias antioxidantes.

Éstas se utilizan en tres momentos principales: a) en forma de aspersión o en inmersión del explante recién aislado de la planta donadora y hasta el inicio del proceso de desinfección, b) luego del proceso de desinfección o c) agregado al medio de cultivo. Los antioxidantes más empleados, para el cultivo de células vegetales *in vitro*, son el ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) y la cisteína (CIS), ya sea solos o en mezcla. La oxidación de explantes, en varias especies vegetales, disminuye o se evita si éstos, luego de su establecimiento *in vitro*, son puestos a crecer en una condición de oscuridad por algunas semanas. Posteriormente, los explantes se transfieren a un ambiente con luz normal, o en ciertas ocasiones, a una condición de baja luminosidad (George 1996, citado por Azofeifa, 2009).

2.8.5 Reguladores de crecimiento

Son compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades fomentan, inhibe o modifican el desarrollo de las plantas, y se dividen en dos grandes grupos: reguladores naturales y sintéticos, los primeros

se encuentran presentes en las plantas mientras que los sintéticos son compuestos artificiales obtenidos por síntesis química (CATIE⁵, 1987).

El crecimiento normal de la planta está determinado de forma armónica por reguladores que funcionan como hormonas, los principales grupos de reguladores son: Auxinas, Giberelinas, Citoquininas, Etileno e inhibidores de crecimiento, sus concentraciones varían de acuerdo al estado de desarrollo de la planta (Coto, 2007).

Citoquininas

Las citoquininas se sintetizan en la planta generalmente en las semillas, frutos y sobre todo en las raíces, no presentan desplazamiento es decir no se desplazan del sitio de síntesis. Dentro de las citoquininas naturales se tienen la Zeatina y la 2 isopentil- adeniana (2IP) y el benzilaminopurina (BAP), y en las sintéticas las más comunes son la Kinetina y el Benziladenina (BA) (CATIE, 1987).

Estas han recibido mucha atención que se consideran estimuladoras de la división celular, inducen la organogénesis estimulan el rompimiento de la latencia de las yemas axilares, el ácido Bencilaminopurina (BAP) es un compuesto sintético muy activo y es el más utilizado debido a su disponibilidad y a un costo razonable (Roca y Mrogonski, citados por Quintanilla, 2003).

2.8.6 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas, que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos los cuales proporcionan al cultivo *in vitro* una dieta balanceada de nutrientes y hormonas, para mantener su viabilidad, estimular su diferenciación y regular su crecimiento (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

⁵ Centro agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica.

Desde 1940 se han desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre los requerimientos nutricionales de los tejidos de las plantas en medios estrictamente definidos. La mayoría de tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simple (CIAT, 1993, citado por Landaverde, *et. al.*, 2002).

Existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan en el cultivo de tejidos vegetales; estas fórmulas generalmente recibieron su nombre de investigadores como por ejemplo: Las sales minerales de Murashige, *et. al.*, (1962) BMS, las sales minerales de White BW, las sales de Shenk y Hildebrant (1972) BSH, Heller CH, Erickson (ER), Lins - maierkoop (LS), BS de Gambor etc (CIAT 1993, citado por Landaverde, *et. al.*, 2002).

Los constituyentes de un medio de cultivo vegetal pueden clasificarse en sales inorgánicas (minerales), compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y materiales inertes (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

Para el cultivo de tejidos se hace necesario la aplicación de sales inorgánicas al medio de cantidades importantes de macronutrientes como sales de Nitrógeno, Potasio, Calcio, Fósforo, Magnesio y Azufre y micronutrientes como sales de Hierro, Magnesio, Zinc, Boro, Cobre, Molibdeno, Iodo y Cobalto (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

En los compuestos orgánicos se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos otros compuestos que se han descrito como beneficiosos para el cultivo de tejidos (Abdelnour, *et. al.*, 1994).

El principal carbohidrato utilizado en los medios de cultivo es la sacarosa como fuente de carbono, ya que las plantas fabrican su fuente de energía a partir de la fotosíntesis, en condiciones de laboratorio debido a la baja

intensidad lumínica las plantas no producen suficientes azúcares, por lo que es necesario la adición de altas cantidades de sacarosa a los medios de cultivo.

Las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y citoquininas. Estas intervienen en la elongación y división celular y en la germinación de la semilla. Entre las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentran el Ácido Indolacético (AIA), Ácido Naftalenacético (ANA), 2,4-D, Picloram. Entre las citoquininas se encuentran: Benzilaminopurina (BA), la Kinetina y Zeatina (Aldelnour, *et. al.*, 1994).

Otros componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo son: agua de coco, glicina, sustancias antioxidantes como ácido ascórbico y la adición de carbono activado al medio de cultivo ha demostrado ser útil en varios cultivos posiblemente al absorber metabólicos tóxicos para los explantes (Roca y Mroginsky, 1991).

Otros de los factores que intervienen en el cultivo de tejidos son el pH del medio, la temperatura, humedad, luz y el intercambio gaseoso (Aldenour, *et. al.*, 1994). Es suficiente decir que una especie en particular puede reaccionar favorablemente a un conjunto de condiciones, mientras que en otros pueden no hacerlo; por consiguiente la tarea de decidir las condiciones de cultivo adecuadas pueden requerir en algunos casos, una decisión por el método de ensayo y error (CIAT 1993, citado por Landaverde, *et. al.*, 2002).

2.8.7 Factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos

Según Esquivel y Escalant, citados por López (2013), los factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos con mayor impacto son:

La luz, en condiciones *in vitro*, la intensidad y cantidad de luz es muy baja en comparación con condiciones naturales por lo que se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda, el espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros.

El pH, la acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y diferente para cada tipo de planta, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de cada especie, sin embargo el pH adecuado para las plantas generalmente oscila entre 4.5 a 7.0

La humedad, en condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es cercana al 100%, por lo que la planta *in vitro* no desarrolla un adecuado sistema de regulación hídrica.

2.8.8 Organogénesis

Es el proceso que comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de explantes o callos (Lizt y Jarret, 1991).

Organogénesis directa: consiste en la generación de plantas sin raíces directamente del explante, las células del tejido se diferencian primero para luego dar origen a tejidos y órganos.

Organogénesis indirecta: consiste cuando el explante genera una masa indiferenciada de células llamada callo, a partir del cual se forman partes diferenciadas como brotes o raíces.

2.8.9 Microesquejes

Según Dublin (1993), los primeros cultivos fueron hechos por Custers (1980), partiendo de fragmentos de tallos ortótropos y plagiótropos de *C. arábica* provistos de yemas, y tomados de cafetos jóvenes de 1 a 2 años obtenidos de semillas. El establecimiento de estos microesquejes *in vitro* fue relativamente difícil. Por otra parte, el autor comprobó que los tallos obtenidos de yemas plagiótropos y desarrollados *in vitro* presentaban un porte vertical, comparable al de aquéllos obtenidos de yemas ortótropos, bajo las mismas condiciones.

La propagación *in vitro* mediante microesquejes, consiste en obtener a partir de un nudo portador de yemas preexistentes, una microplanta cuyos nudos pueden ser utilizados como estacas *in vitro* y así sucesivamente un gran número de individuos. Dicha metodología incluye los siguientes pasos: Cultivo de segmentos de tallos ortotrópicos y obtención *in vitro* de nuevos tallos ortotrópicos, multiplicación clonal *in vitro*, enraizamiento y aclimatación (Berthouly, 1989).

Berthouly (1989), manifiesta que el explante con sus yemas axilares ortotrópicos preexistentes se toma de un tallo ortotrópico joven clorofílico. Generalmente se utilizan los tres primeros nudos. El explante comprende un nudo (sin hojas) prolongado por un fragmento de entrenudo de 2 a 3 cm de longitud (Dublin, 1993).

Según Dublin (1993), la primera etapa, donde se obtienen las ramas ortótropas en condiciones *in vitro*, es sumamente delicada. En efecto, durante el paso de las condiciones *in vivo* a las condiciones *in vitro*, se afrontan los problemas de contaminación (bacterias, hongos) y de oxidación fenólica, que son más acentuados en las regiones tropicales y aún más cuando los explantes se toman directamente del campo.

Los tallos ortótropos, obtenidos de yemas preexistentes o neoformadas, se cortan en microesquejes que constan de un par de hojas y un entrenudo; éstos se subcultivan en el medio fresco caulógeno que sólo favorece su desarrollo como tallo. Si las condiciones del medio de cultivo, la temperatura, y la luz son adecuadas, cada microesquejes puede producir un tallo nuevo con cuatro a seis pares de hojas al final de las ocho semanas de cultivo. Este tallo podrá cortarse en igual número de microesquejes, mientras que el microesqueje originario, colocado otra vez en medio fresco, producirá nuevos tallos que se cortarán, y así sucesivamente. Este proceso de corte y subcultivo periódico *in vitro* de los microesquejes crea verdaderas cepas de producción de microesquejes

vigorrosos con la misma apariencia de los que se producen *in vivo* en el vivero (Dublin, 1993).

Según Dublin (1993), los esquejes *in vitro* que han alcanzado un desarrollo suficiente (de 5 a 6 pares de hojas) pueden establecerse muy fácilmente. La rizogénesis puede lograrse ya sea por subcultivo de los microesquejes en un medio sólido con una leve concentración de los elementos minerales (MS diluido a la mitad, suplementado con 2 mg/litro de AIB), o por inmersión de la base de los microesquejes durante 24 horas en una solución de AIB (50 mg/litro) y transfiriendo luego éstos al medio anterior sin auxina.

La principal ventaja de los microesquejes está garantizado por una propagación totalmente conforme de la planta madre, lo cual ha sido confirmado ampliamente por los experimentos en el campo. La alta contaminación por bacterias y hongos es uno de los problemas más importantes junto a la oxidación fenólica, es muy frecuente en este tipo de material. Estas dos etapas de la metodología son las más difíciles de superar. Una vez establecido el cultivo se constituye un banco de germoplasma *in vitro* a partir del cual pueden iniciar la multiplicación masiva del material (Berthouly, 1989).

El uso de la biotecnología para la propagación de variedades de café tiene ventajas económicas en plantas cuya reproducción por semilla no es fiable, como el caso de los híbridos, a diferencia de las técnicas convencionales como las estacas, a través de microesquejes es posible obtener cantidades comerciales de plantas de café.

3. DISEÑO METODOLÓGICO.

3.1 Ubicación y descripción el área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), ubicado en kilómetro 33 ½ de la carretera panamericana en el municipio de Ciudad Arce, la Libertad, a una altura de 450 *msnm*, con latitud norte de 13°5 y a una longitud Oeste de 89°26, El Salvador (Quintanilla, 2003).

3.2 Fase de campo

El material vegetativo que se utilizó en esta investigación se tomó de plantas de café de 10 meses de edad procedentes de un vivero al aire libre en el municipio de Refugio departamento de Ahuachapán y se trasladó las plantas en bolsa a las instalaciones del invernadero del laboratorio de biotecnología de CENTA.

3.3 Fase de laboratorio

3.3.1 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo se utilizaron soluciones madres que conforman el medio de cultivo formulado con las sales de Murashige y skoog (1962), compuesto por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas suplementado con reguladores de crecimiento y azúcar como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición del medio formulado con las sales de Murashige y skoog (1962) CENTA 2013

N.	Componentes	Concentración	g/l	Cantidad requerida para un litro de medio
I	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	100X	165	10 ml/l
II	Nitrato de potasio (KNO ₃)	100X	190	10 ml/l
III	Cloruro de calcio (CaCL ₂)	100X	44	10 ml/l

N.	Componentes	Concentración	g/l	Cantidad requerida para un litro de medio
IV	Sulfato de magnesio	100X	37	10 ml/l
V	Fosfato de potasio (KPO ₄)	100X	17	10 ml/l
VI	Hierro(FeSO ₄)	100X	2.18	10 ml/l
VII	Microelementos		Mg/l	10 ml/
	H ₃ BO ₃	100X	620	
	MnSO ₄ H ₂ O	100X	1560	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	100X	860	
	KI	100X	83	
	NaMoO ₄ 2H ₂ O	100X	25	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	100X	2.5	
	CoCl ₂ 6H ₂ O	100X	2.5	
VIII	Vitaminas		Mg/l	10 ml/
	Glicina	100X	200	
	Acido nicotínico	100X	50	
	Piridoxina	100X	50	
	Mioinositol	100X	10	
	Tiamina	100X	10	
IX	Sacarosa			30 g/l
X	Fitigel			2.5 g/l
XI	Ridomil			50 mg/l
XII	Estreptomocina			125 mg/l

Luego se ajustó el pH= 5.7 seguidamente se adicionaron 2.5 gramos por litro de fitagel como agente gelificante. Los medios de cultivo se llevaron al punto de ebullición para disolver el fitagel, después se dispense en frascos de vidrio de un litro y se esterilizo junto a pinzas y papel en la autoclave a una presión de 115 libras/pul² y una temperatura de 120°C durante 20 minutos. En cámara de flujo laminar se procedió a agregar 50 mg de Ridomil y 125 mg de Estreptomocina por litro, finalmente se dispense en frascos gerber (Fig.1).

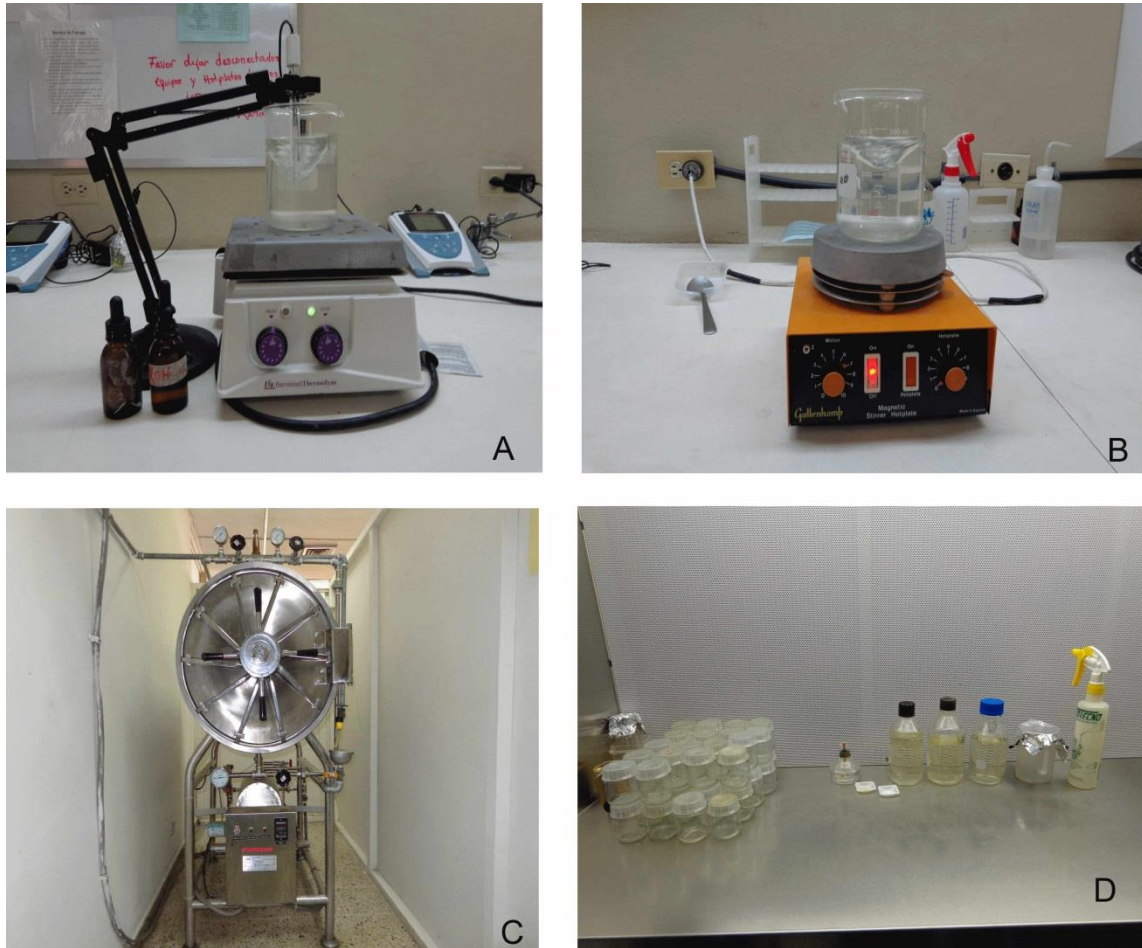


Fig.1. Procedimiento para preparar medios de cultivo: **A)** ajuste del pH a 5.7 **B)** ebullición de los medios de cultivo **C)** esterilización de los medios de cultivo **D)** agregación de Ridomil y Estreptomicina y dispersión del medio a frascos gerber, CENTA 2013.

3.3.2 Preparación del material vegetativo

Las plantas se trasladaron al invernadero del laboratorio, luego con el uso de un bisturí se cortó el primer y segundo nudo del tallo ortotrópico de la planta, se trasladaron al laboratorio donde se les cortaron las hojas a los explantes y se segmentaron en los respectivos nudos con una longitud aproximada de dos centímetros.

3.3.3 Desinfección superficial del explante y control de Oxidación

Para la introducción de material al laboratorio que proviene de campo se realizó un proceso de desinfección de los explantes (primer y segundo nudo), el cual se hizo mediante un lavado con jabón líquido y agua corriente, luego tal como recomienda Landaverde, *et. al.*, (2002), los explantes se dejaron reposando en agua destilada por unos minutos, y se sometieron a un agente desinfectante el cual fue la Inmersión en Hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos y luego en una segunda solución de Hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.

Además de la aplicación del agente desinfectante se realizaron tres enjuagues con agua destilada para remover residuos de estos. Luego de acuerdo a Quintanilla (2013), Com. Pers.⁶ Luego se dejaron en reposo en una solución que contenía 125 mg/litro estreptomicina como antibiótico y 50 mg/litro de Ridomil fungicida sistemático durante 10 minutos. Estas mismas concentraciones se mantuvieron presentes en los medios de cultivo.

Después de la desinfección se pasaron por una solución de ácido cítrico como agente antioxidante para reducir la oxidación fenólica, los explantes se remojaron en una solución de ácido cítrico a una concentración de 150 mg/litro, ya que según Dublin (1993) y Berthouly (1991), para el establecimiento *in vitro* de café es necesario un antioxidante para controlar los efectos de oxidación fenólica. Estos explantes pasaron previamente por la fase de desinfección. Luego los explantes fueron colocados en un medio simple de las sales de Murashige y Skoog (1962), por un periodo de cuatro semanas, dejándolos en oscuridad durante una semana para reducir la oxidación fenólica.

3.3.4 Inducción a brotación

Después de la desinfección superficial de los explantes y control de oxidación fenólica, se tomaron nuevos explantes provenientes de las plantas del

⁶ Quintanilla, Karla; Lic. en Biología y técnico del laboratorio de biotecnología, CENTA

vivero, las cuales pasaron por la etapa de desinfección y control de oxidación fenólica y que continuaron con la inducción a brotación en donde se utilizaron dos explantes, los cuales fueron el primer y segundo nudo de un tallo ortótropo posteriormente fueron colocados en el Medio de cultivo con las sales de Murashige y Skoog (1962) durante 10 semanas, modificando la concentración de la citocinina Benzilaminopurina (cuadro 2), en el medio nutritivo para conocer el efecto de esta en la inducción a brotación, durante la primer semana de cultivo los explantes estuvieron en oscuridad para reducir la oxidación fenólica. Luego pasaron a fotoperiodos de 16 horas luz y 8 de oscuridad a temperatura 25-27 °C. se realizaron tomas de datos una vez por semana (Anexo 1).

Cuadro 2. Tratamientos que se aplicaron en la fase de inducción a brotación , CENTA 2013

Tratamientos para el primer nudo	Descripción
T1	Primer nudo +1 mg de BAP
T2	Primer nudo +3 mg de BAP
T3	Primer nudo +5 mg de BAP
Tratamientos para el segundo nudo	Descripción
T4	Segundo nudo +1 mg de BAP
T5	Segundo nudo +3 mg de BAP
T6	Segundo nudo +5 mg de BAP

3.3.5 Condiciones físicas de crecimiento

Durante todo el proceso el material vegetativo se mantuvo en la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, la temperatura de la cámara de crecimiento fue de 25 +/- 2 °C.

3.4 Parámetros que se midieron en la desinfección superficial y control de oxidación fenólica

- Porcentaje de sobrevivencia
- Porcentaje de contaminación
- Porcentaje de oxidación

3.5 Variables evaluadas en la fase de inducción a brotación

- Días a brotación
- Porcentaje de brotes por explante
- Porcentaje de explantes con brotes

3.6 Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar con un factorial de 3x2 en el cual 60 frascos pertenecientes a los seis tratamientos con sus 10 repeticiones cada uno, cada tratamiento consistió de una unidad experimental, la unidad experimental fue un frasco con un explante.

3.7 Análisis estadístico de los datos

En la desinfección y control de oxidación fenólica de los explantes se utilizó una descripción porcentual, mientras que en la etapa de inducción a brotación los datos se analizaron principalmente con un análisis de varianza al 0.05 con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1 Etapa de desinfección y control de oxidación fenólica

4.1.1 Porcentaje de sobrevivencia

Durante esta etapa se midió por tres semanas la sobrevivencia del tejido a la contaminación obteniéndose un 45% (Fig.2), mientras que para la oxidación fenólica se obtuvo un 93.34% de sobrevivencia. La concentración de Hipoclorito de Calcio utilizada fue tolerada por el explante de café.



Fig. 2. Sobrevivencia de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a siete días de sembrado, CENTA 2013.

4.1.2 Porcentaje de contaminación

La contaminación por microorganismos se determinó a tres semanas de cultivo, la presencia de hongos fue superior que de bacterias. Las bacterias formaron una capa blanca alrededor del explante y el micelio por hongos fue de coloración blanca en el explante (Fig.3).

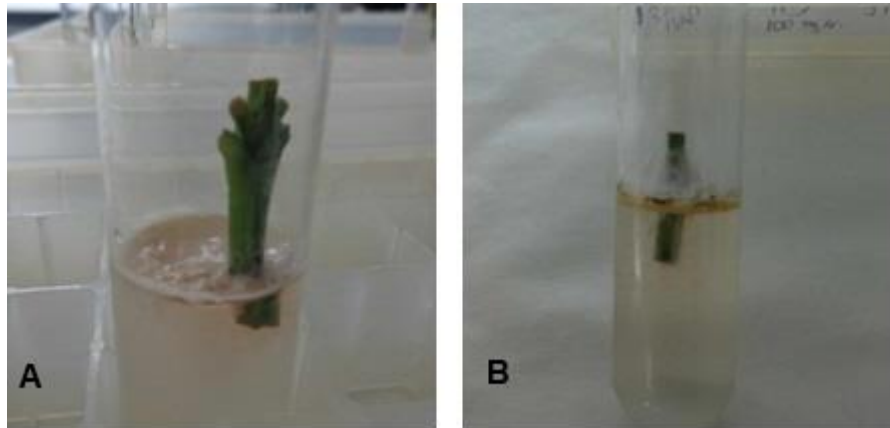


Fig. 3. Contaminación en explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco, **A)** Contaminación por bacteria en explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a los siete días de cultivo, **B)** Contaminación por hongo en un explante de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a siete días de cultivo, CENTA 2013.

La contaminación fue mayor en el segundo nudo con un porcentaje de 55.7% causado por hongos y un 14.7% por bacterias mientras que en el primer nudo se observó un 22.3% de contaminación por hongos y solamente un 7.3% a causa de bacterias (Fig.4).

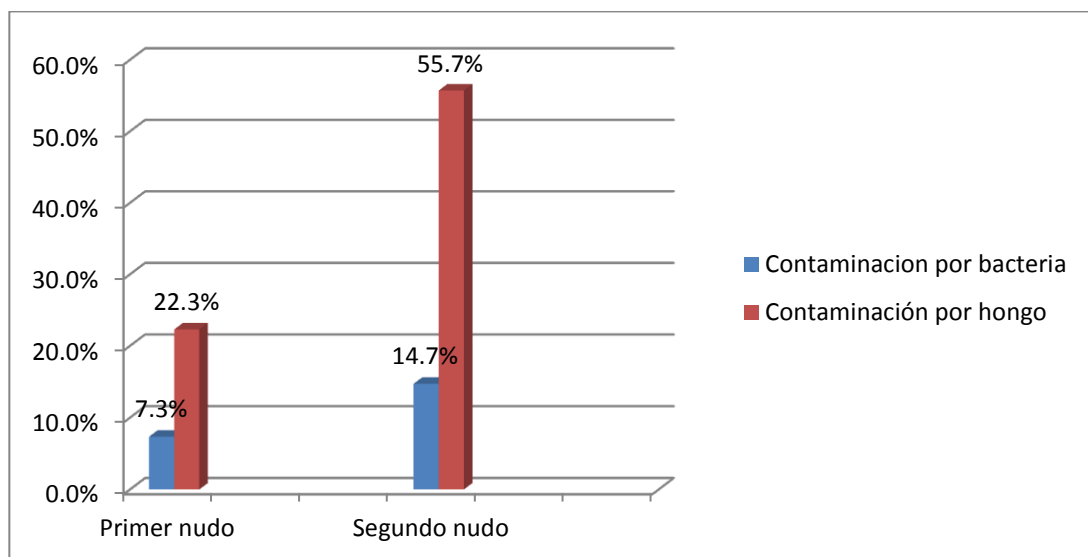


Fig. 4. Porcentaje de contaminación en explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a tres semanas de cultivo con relación al tipo de explante.

El porcentaje total de contaminación en los explantes al final de tres semanas fue de 55%, de este un 33.33% pertenece al segundo nudo y un 21.66% al primero.

4.1.3 Oxidación fenólica

La oxidación fenólica en los explantes se observó a partir del segundo día hasta el tercer día de cultivo, los explantes presentaron una coloración café al igual que el medio de cultivo (Fig.5).



Fig. 5. Oxidación fenólica en un explante de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a los 3 días de cultivo, CENTA 2013.

La oxidación fenólica fue un aspecto de poca incidencia en los explantes, el porcentaje más alto se obtuvo en el segundo nudo con un 5% seguido del primer nudo con un 1.66% de oxidación. (Fig. 6).

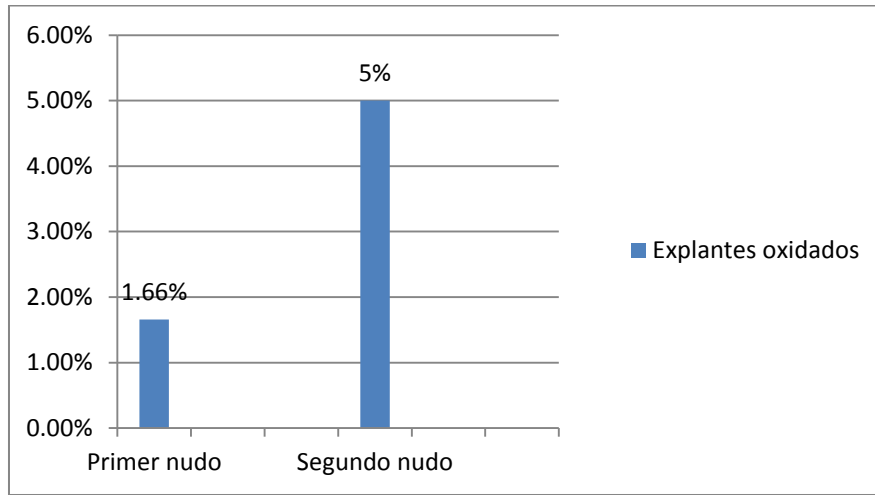


Fig. 6. Porcentaje de oxidación en los explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a tres semanas de cultivo.

4.2 Inducción a brotación

4.2.1 Días a brotación

A los 12 días la mayoría de los tratamientos (cuadro 2), iniciaron la formación de brotes, a diferencia del tratamiento T2 (primer nudo + 3 mg/l de BAP) que inicio la brotación a los 15 días siendo el tratamiento que más tiempo tardo en producir brotes, el cuadro 3 y Fig.7 muestran el comportamiento de los tratamientos con respecto a la formación de brotes.

Cuadro 3. Días a brotación de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad Cuscatleco sometidos a diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP), a 10 semanas de cultivo, CENTA 2013.

Tratamiento	Descripción	DB
T1	Primer nudo +1 mg de BAP	12
T2	Primer nudo +3 mg de BAP	15
T3	Primer nudo +5 mg de BAP	12
T4	Segundo nudo +1 mg de BAP	12
T5	Segundo nudo +3 mg de BAP	12
T6	Segundo nudo +5 mg de BAP	12



Fig. 7. brotación de un explante de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a los 12 días de cultivo en el tratamiento (T1), CENTA 2013.

4.2.2 Porcentaje de brotes por explante

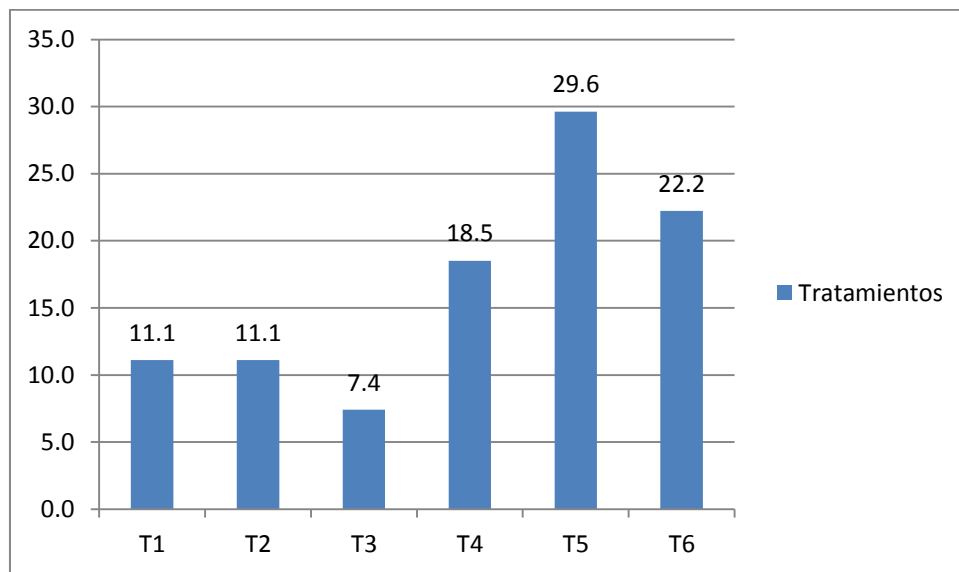
El análisis de varianza realizado tomando como fuente de variación los tratamientos y el porcentaje de brotación no detecto diferencia estadística significativa (cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para porcentaje de brotación *in vitro* de los explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco, 10 semanas después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP), CENTA 2013.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>variaciones</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tratamiento	2.55	5	0.51	0.6216	0,6838	2.3860
Error	44.3	54	0.820370			
Total	46.85	59				

El tratamiento que mejor respondió a la inducción a brotación fue el T5 (segundo nudo + 3mg/l de BAP) con un 29.6 % de brotación al cabo de 10 semanas de cultivo, seguido por los tratamientos T6 (segundo nudo + 5 mg/l BAP) y T4 (segundo nudo + 1 mg/l BAP) con 22.2% y 18.5% respectivamente, los tratamientos T1(primer nudo + 1mg/l BAP) y T2 (primer nudo + 3 mg/l BAP)

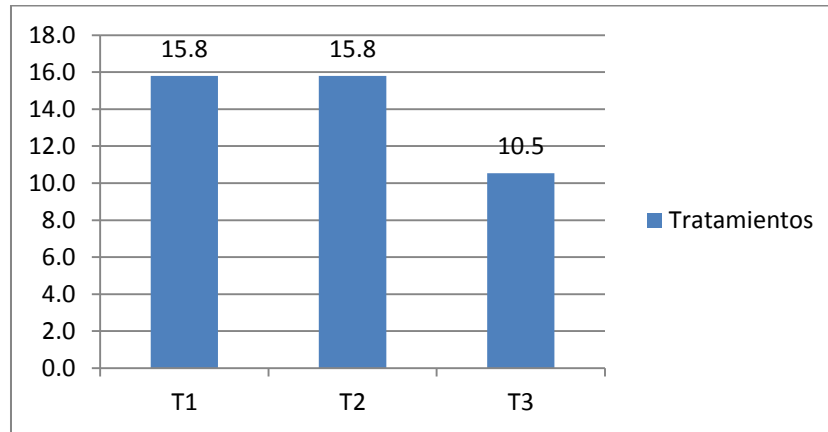
obtuvieron el mismo porcentaje de brotación (11.1%) y finalmente el tratamiento que obtuvo menor porcentaje de brotación fue el tratamiento T3 (primer nudo +5 mg/l BAP) con un 7.4 % de brotación (Fig.8).



T= Tratamiento, T1=primer nudo+1 mg/l de BAP; T2=primer nudo + 3 mg/l de BAP; T3=primer nudo + 5 mg/l de BAP; T4=segundo nudo + 1 mg/l de BAP; T5=segundo nudo + 3 mg/l de BAP; T6=segundo nudo + 5 m mg/l de BAP

Fig. 8. Porcentajes promedios de brotación *in vitro* de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP)

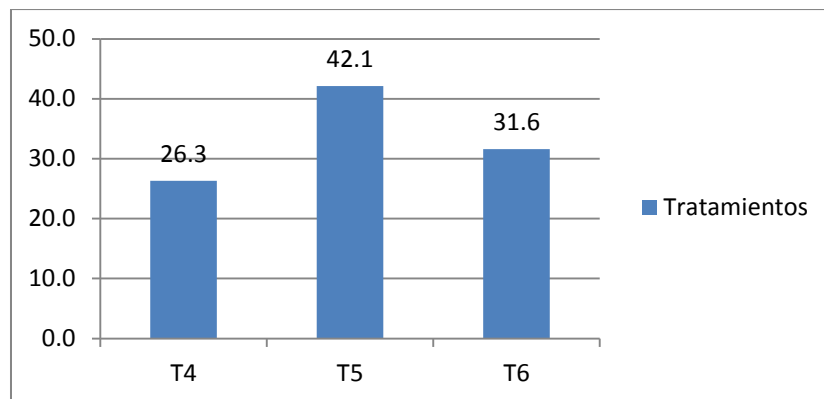
Para el nudo apical, se identificó que el T1 (primer nudo +1 mg/l BAP) y T2 (primer nudo + 3 mg/l BAP) obtuvieron el mismo porcentaje de brotes por explante con un 15.8% mientras que el tratamiento T3 (primer nudo + 5 mg/l BAP) obtuvo solamente un 10.5 % de brotes por explante (Fig.9).



T= Tratamiento, T1=primer nudo+1 mg/l de BAP; T2=primer nudo + 3 mg/l de BAP; T3=primer nudo + 5 mg/l de Benzilaminopurina (BAP).

Fig. 9. Porcentajes promedios de brotación *in vitro* para el nudo apical a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).

Para el nudo secundario se determinó el mayor porcentaje de brotes por explantes se obtuvo en el tratamiento T5 (segundo nudo + 3 mg/l BAP) con un 42.1%, seguido de los tratamientos T6 (segundo nudo + 5 mg/l BAP) con un 31.6%, y el T4 (segundo nudo + 1 mg/l BAP) con un 26.3% (Fig. 10).



T= Tratamiento, T4=segundo nudo + 1 mg/l de BAP; T5=segundo nudo + 3 mg/l de BAP; T6=segundo nudo + 5 mg/l de BAP.

Fig. 10. Porcentajes promedios de brotación *in vitro* del segundo nudo a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).

El nudo secundario obtuvo el mayor porcentaje de brotación al finalizar las 10 semanas de cultivo obteniendo un 70.4 % de brotación mientras que el nudo apical o primer nudo obtuvo solamente un 29.6% de brotación (Fig.11).

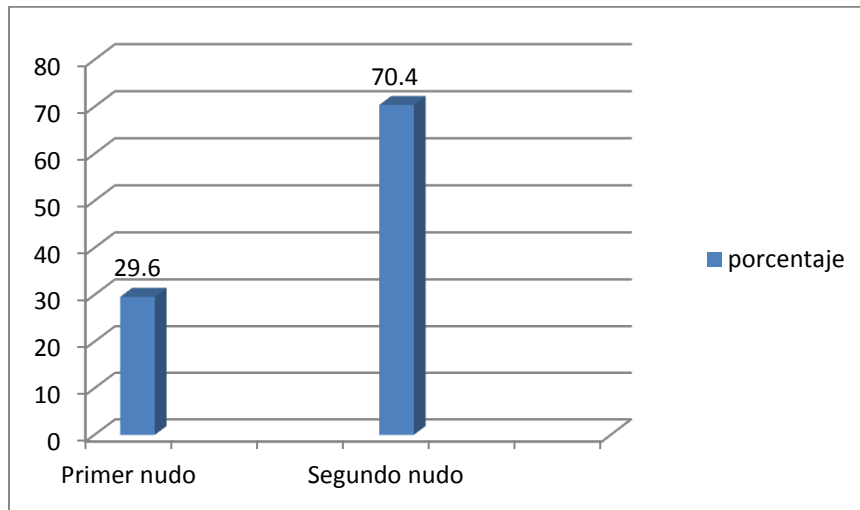


Fig. 11. porcentaje promedio de brotes formados para cada uno de los explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco, a 10 semanas de siembra con relación al tipo de explante.

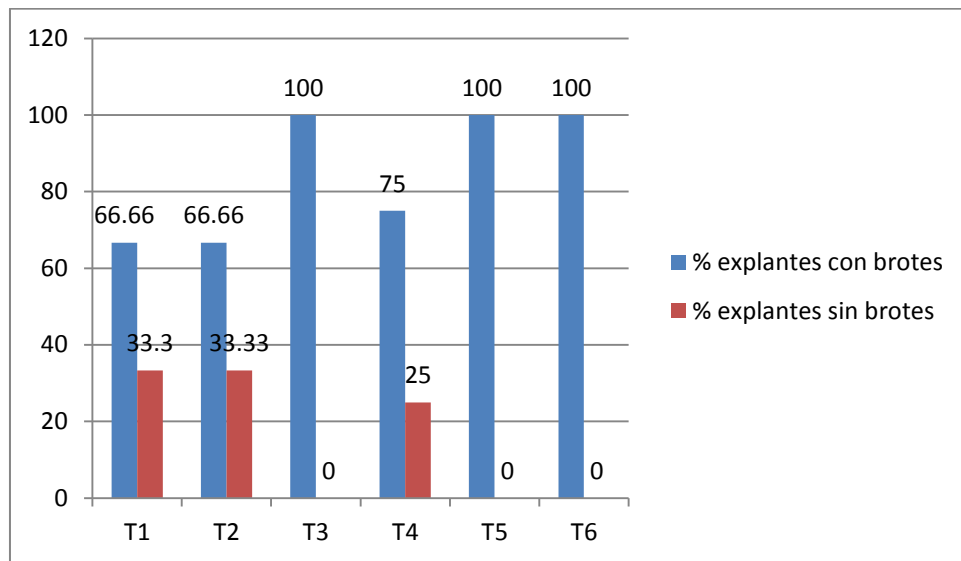
4.2.3 Porcentaje de explantes con brotes

El análisis de la varianza indicó que no existe estadísticamente diferencia significativa entre las fuentes de variación (tratamientos y el porcentaje de explantes con brotes) (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco, 10 semanas después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de Benzilaminopurina (BAP), CENTA 2013.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
variaciones	SC	GL	CM	F	P	Valor crítico para F
Tratamientos	143,48333	5	28,696666	0,084350	0,9944126	2,386069862
Error	18371,1	54	340,205556			
Total	18514,5833	59				

Para la variable porcentaje de explantes con brotes se determinó que los tratamientos T3 (primer nudo + 5 mg/l BAP), T5 (segundo nudo + 3 mg/l BAP) y T6 (segundo nudo + 5 mg/l BAP) obtuvieron un 100% de brotación, en el tratamiento T4 (segundo nudo + 1mg/l BAP) se obtuvo un 75 % de brotación mientras que los menores porcentajes de brotación se obtuvieron en los tratamientos T1 (primer nudo + 1 mg/l BAP) y T2 (primer nudo + 3 mg/l BAP) con un 66% respectivamente (Fig.12).



T= Tratamiento, T1=primer nudo+1 mg/l de BAP; T2=primer nudo + 3 mg/l de BAP; T3=primer nudo + 5 mg/l de BAP; T4=segundo nudo + 1 mg/l de BAP; T5=segundo nudo + 3 mg/l de BAP; T6=segundo nudo + 5 m mg/l de BAP.

Fig. 12. porcentaje de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco con brotes a 10 semanas de la siembra en medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones de Benzilaminopurina (BAP).

El porcentaje de explantes que al cabo de 10 semanas de cultivo produjeron brotes fue de 82.3% y solo el 17,7% de los explantes no generaron brotes, los explantes que mejores resultados brindaron pertenecen a los tratamientos (T3), (T5) y (T6).

El segundo nudo presento un mayor porcentaje de brotación con un 89% con respecto al primer nudo que solo alcanzó un 75% de explantes con brotes (Fig.13).

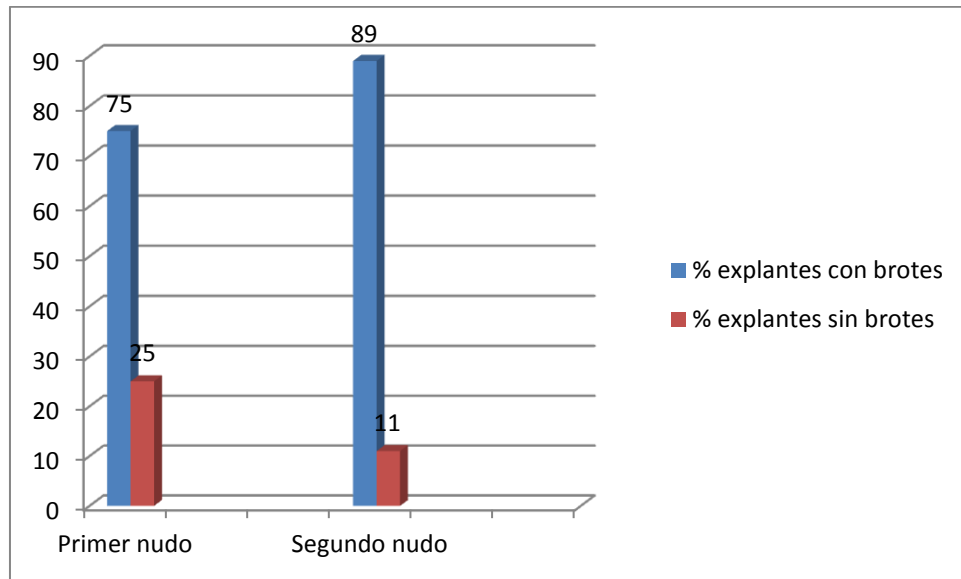


Fig. 13. Porcentaje de explantes de café (*Coffea arabica*) variedad cuscatleco con brotes a 10 semanas de siembra con relación al tipo de explante.

5 DISCUSIÓN.

5.1 Desinfección y control de oxidación fenólica

El porcentaje de sobrevivencia a lo largo de tres semanas de cultivo fue de 45%; con un 62.96% para el primer nudo y un 37.04% para el segundo, resultados similares obtuvo Etienne (1999), citado por Landaverde, *et. al.*, (2002), al obtener entre un 30% y un 70% de contaminación utilizando hipoclorito de calcio al 10%, por otra parte Orellana (1997), obtuvo un 38% de sobrevivencia en microestacas de caoba con una doble desinfección con hipoclorito de calcio (10% y al 8%), mientras que Paz (2000), confirmo que se obtienen altos porcentajes de sobrevivencia a la contaminación con concentraciones de hipoclorito de calcio mayores al 15%, pero también manifiesta que provocan la necrosis y clorosis en el material vegetativo.

Los autores anteriormente mencionados obtuvieron resultados favorables ante la sobrevivencia en los explantes, utilizando hipoclorito de calcio en concentraciones similares a las utilizadas en esta investigación esto posiblemente puede deberse al origen de los explantes que utilizaron, posiblemente estos se encontraban en condiciones contraladas de humedad, luz y otros factores que pudieron haber incidido en la poca presencia de microorganismos contaminantes, mientras que los explantes utilizados en esta investigación provenían de un vivero en condiciones no controladas y al aire libre lo que probablemente favoreció para una mayor presencia de hongos y bacterias, de acuerdo a Giladi, *et. al.*, (1979), citado por Landaverde, *et. al.*, (2002). Descubrieron que se presenta mayor contaminación cuando se utilizan como fuente de explante ramas de árboles que crecen en el campo, que de plantas jóvenes que crecen en invernadero.

Por otra parte Bonga y von Adarkas (1992) , citado por Orellana (1997), manifiestan que el grado de contaminación también está determinado por condiciones climáticas, es más difícil obtener explantes limpios de plantas del trópico húmedo que de regiones más frías, de igual forma Pérez 1998, citado

por Paz (2000), sostiene la existencia de microorganismos que en el campo no son patógenos, pero en el laboratorio se convierten en una fuente principal de contaminación (vitropatógenos), los cuales compiten con la plantas por nutrientes del medio causándoles daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos (fenoles o quinonas).

Debido a la procedencia del material donante utilizado en esta investigación y para disminuir la aparición de microorganismos contaminantes se agregó 50 mg/l de Ridomil y 125 mg/l de Estreptomina al medio de cultivo ya que según Bonga y von Adarkas (1992), citado por Orellana (1997), en muchos casos las bacterias y hongos pueden permanecer latentes dentro de las plantas debido a su capacidad para formar esporas ante esta situación se hace necesario la adición de fungicidas o antibióticos al medio de cultivo.

Del 55% de contaminación obtenido en esta etapa un 78% de contaminación fue por hongos y un 22% (Fig. 4), lo posiblemente se deba a que el material vegetativo fue tomado a inicio de la época lluviosa lo que pudo haber aumentado significativamente la presencia de hongos en las plantas donantes afectando directamente el desarrollo *in vitro* de los explantes, además se observó un mayor porcentaje de contaminación en el segundo nudo con respecto al primero, esto posiblemente se deba a que según Dublin (1993), los cafetos poseen unas estructuras en la base foliar conocidas como estipulas, que mantiene a las bacterias y hongos fuera del alcance del agente desinfectante y que estas no se encuentran presentes en los nudos primarios o apicales de los cafetos, lo que posiblemente aumento el porcentaje de contaminación en el segundo nudo.

El porcentaje global de oxidación fenólica fue 6.66% perteneciendo un 5% al segundo nudo y el 1.66 al primero, este se obtuvo en los primeros tres días de cultivo lo que concuerdo con lo descrito por Berthouly (1991), manifiesta que

la oxidación fenólica en el género *Coffea* varia en relación a la especie y el lugar de procedencia del material vegetativo, la aparición de fenoles en el medio de cultivo puede tardar entre 2 o 3 días de sembrados los explante, y puede producir la muerte del explante.

5.2 Inducción a brotación

El cuadro 3 muestra que todos los tratamientos respondieron favorablemente a la inducción a brotación hecho que según Rodríguez, *et. al.*, (1999), citado por López (2013), se debe a que la presencia de Citoquininas favorece el rompimiento de la latencia de las yemas axilares. Unos tratamientos demoraron más que otros tal fue el caso del tratamiento T2 (primer nudo y 3 mg/l de BAP) que fue el que más tiempo demoró en la generación de brotes mientras que el resto de tratamientos brindaron resultados favorables a los 12 días de cultivo siendo este el menor tiempo en que los explantes generaron brotes, resultados similares obtuvo Sondahl, *et. al.*, (1993), que sostiene que el desarrollo de segmentos nodales de café es visible a tres semanas de cultivo, de igual forma obtuvieron Ocampo y Núñez (2007) resultados en el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de guayaba en medios suplementados con la hormona BAP, al obtener brotes adventicios después de 15 días de cultivo.

A pesar que no se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos (cuadro 4) ya que los porcentajes de brotación fueron relativamente bajos, al final de las 10 semanas de cultivo se determinó que para el primer nudo los tratamientos T1 (primer nudo +1 mg/l de BAP) y T2 (primer nudo +3 mg/l de BAP) brindaron los mayores porcentajes de brotación, mientras que el segundo nudo expresó el mayor porcentaje de brotación en el tratamiento T5 (segundo nudo + 3 mg/l de BAP), que coincide con lo descrito por Hurtado y Merino (1987), quienes manifiestan que en ápices caulinares la concentración endógena de Citoquininas es baja, debido a que estas se sintetizan principalmente en las raíces por lo que la adición exógena de las

mismas en los medios de cultivo es esencial para inducir el proceso de división celular y desarrollo de brotes.

Para la variable porcentaje de explantes con brotes se obtuvo que todos los tratamientos generaron brotes, lo que concuerda con lo descrito por Dublin (1993), que sostiene que para el cultivo de microestacas de café las concentraciones óptimas de BAP oscilan de 1 a 5 mg/l, siendo los tratamientos (T3), (T5) y (T6) los que alcanzaron un 100% de explantes con brotes, aunque no se encontró diferencia estadística significativa en los tratamientos (cuadro 5). El segundo nudo mostro un porcentaje mayor de explantes con brotes en relación a la misma variable para el primer nudo, los mejores resultados para ambos nudos (primero y segundo), se obtuvieron en los medios de cultivo suplementados con 5 mg/l BAP lo que concuerda con lo mencionado por Sondahl, *et. al.*, (1993), quienes sostienen que niveles altos de Citoquininas inducen un mayor desarrollo de yemas en los explantes de café.

6 CONCLUSIONES.

1. La doble desinfección con hipoclorito de calcio (10% y 8%) durante 20 y 10 minutos respectivamente obtuvo un alto porcentaje de contaminación al final de tres semanas de cultivo.
2. El segundo nudo mostro un mayor porcentaje de contaminación, esta fue mayor a causa de hongos que por bacterias en ambos explantes.
3. El tiempo a brotación (días) en los explantes de café no mostraron variaciones considerables en los tratamientos.
4. La oxidación fenólica se controló con el uso de ácido cítrico mediante un enjuague a los explantes.
5. El tratamiento T5 (segundo nudo + 3 mg/l de BAP) obtuvo el mayor porcentaje de brotación y mayor porcentaje de explantes con brotes al final de 10 semanas de cultivo.
6. En todos los tratamientos el porcentaje de brotación fue bajo, no sobrepasando el 29.6%

7 RECOMENDACIONES.

1. Realizar un tratamiento preventivo a las plantas donadoras con fungicida y antibiótico o ser provenientes de invernaderos donde apliquen tratamientos fitosanitarios para mejorar la efectividad del agente desinfectante y reducir la contaminación por microorganismos patógenos.
2. Realizar un enjuague a los explantes con una solución de ácido cítrico para controlar la oxidación fenólica.
3. Experimentar con diferentes tipos y concentraciones de fungida para reducir la contaminación a causa de hongos.
4. Utilizar el segundo nudo en un medio de cultivo suplementado con 3 mg/l de Benzilaminopurina (T5) Para obtener el mayor porcentaje de brotación y de explantes con brotes en explantes de café variedad Cuscatleco.
5. Desarrollar a las fases siguientes: multiplicación *in vitro*, enraizamiento y aclimatización para lograr el establecimiento en campo de plantas de café variedad Cuscatleco producidas mediante microesquejes.
6. Experimentar con otro tipo de medio de cultivo utilizando el T5 (segundo nudo en un medio de cultivo suplementado con 3 mg/l de Benzilaminopurina) con el propósito de elevar el porcentaje de brotación en los explantes.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abdelnour. A. Vicent. Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. P. 38.
- ANACAFE, 1998.(Asociación Nacional del Café). Manual de Caficultura. Guatemala.
- Arévalo, M. Méndez, D. 2011. Análisis multitemporal de las zonas cafetaleras de El Salvador y su impacto en el desarrollo socioeconómico. Tesis Ing. Agr. San Salvador. Universidad de El Salvador P.165.
- Azofeifa A, 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana. P. 24. Versión electrónica, (http://www.mag.go.cr/revmeso/v20n01_153.pdf) consultado el 15 de marzo de 2013.
- Berthouly, M. 1989. Micropropagación del café. Seminario sobre biotecnología en la agricultura cafetalera. Xalapa, México del 12 al 15 de abril de 1989.compiladores Roussos R; Gutiérrez, M. Memorias. P. 228.
- Berthouly, M. 1991. Informe final del proyecto desarrollo y reproducción de variedades con resistencia a la roya del cafeto: Cultivo de tejidos, San José, Costa Rica P. 90.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) 1987, II curso de cultivo de tejidos, Turrialba, Costa Rica.

- CENICAFE (Centro Nacional de Investigaciones de Café) 2011, La raya del cafeto en Colombia, Boletín técnico 36, Caldas, Colombia. P. 53.
- Coto, G. 2007, Conceptos introductorios a la fitopatología, primera edición, San José, Costa Rica. P. 295.
- Dublin P.1993. Multiplicación vegetativa de Café, Avena y Cacao. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia. P. 578-595.
- Gali B, M. S.a. Roya del Cafeto, director técnico de cultivos y suelos s.a. México. P. 5 versión electrónica, (<http://www.forumdelcafe.com/pdf/La%20Roya%20del%20Cafeto.pdf>), consultado el 20 de febrero de 2013.
- Hurtado D, Merino ME (1987), Cultivo de tejidos vegetales, Trillas, México. P. 232 .
- Landaverde. V; López A; Vásquez, T. 2002. Estudio de Inducción a Callo Embriogénico en Variedades Comerciales de Café (*Coffea arabica*) de El Salvador. Tesis Ing. Agr. San Salvador. Universidad de El Salvador. P. 97.
- Litz E, Jarret L. 1991.Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia P. 144- 157.
- López M, 2013. Establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo *in vitro* de *Agave letonae* (HENEQUÉN) a partir de yemas axilares, tesis de licenciatura en biología. Universidad de El Salvador.

- Orellana M. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla*. King). Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica, Centro Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). P. 82.
- Paz, A. 2000. Inducción de Embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* partir de explantes foliares. Tesis para optar a Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Lic. Zamorano Honduras. P. 52.
- PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café 1997. Boletín Estadístico de la caficultura Salvadoreña. Nueva San Salvador, La Libertad. P. 20.
- PROCAFE 2004 (Fundación Salvadoreña para Investigación del Café) Manejo de Cafetales y Arboles de Sombra, Santa Tecla PROCAFE. P. 42.
- PROCAFE 2007 (Fundación Salvadoreña para Investigación del Café) - Manual del Caficultor Salvadoreño, San Salvador. PROCAFE. P. 106.
- Quijano. J. 2007, Artículo Técnico Variedad Cuscatleco, PROCAFE, Santa Tecla, El Salvador. P. 6.
- Quintanilla K. 2003. Micropropagación *in vitro* de loroco (*fernaldia pandurata woodson*) a partir de meristemos apicales del brote, san salvador, tesis de licenciatura en biología, Universidad de El Salvador.
- Ocampo F, Núñez V. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales (versión electrónica) P. 22-27.
- Roca W. y Mroginski L.1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. P. 20-35.

- Sondahl R, T. Nakamura, W. R. Sharp.1993. Propagación *in vitro* de café. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. P. 622-632.
- Villalobos A, Thorpe A, 1991. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. P. 128-131.

ANEXOS

Anexo 1: Cuadro de toma de datos

Evaluación para brotación de explantes de <i>Café Coffea arabica</i> , variedad <i>Cuscatleco</i>							
Fecha de evaluación		Concentración de BAP					
Tipo de explante		No. de evaluación		Fecha de siembra			
No. de repetición	Explantes contaminados	Hongo/Bacteria	Explantes oxidados	Días a formación de brotes	Brotes por explante	No. de nudos por brote	Explantes con brotes
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							