

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**



**ESTUDIO DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO EN
VARIETADES COMERCIALES DE CAFÉ (*Coffea arabica*) DE EL
SALVADOR**

POR:

**VILMA LIZET LANDAVERDE PARADA
ALBA SUGHEY LÓPEZ ORTÍZ
TERESA DEL CARMEN VÁSQUEZ FLORES**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2002.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

RECTORA:

Dra. MARIA ISABEL RODRÍGUEZ.

SECRETARIO GENERAL.

Lic. LIDIA MARGARITA MUÑOZ.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS.

DECANO

Ing. Agr. M Sc. FRANCISCO LARA ASCENCIO.

SECRETARIO.

Ing. Agr. JORGE ALBERTO ULLOA ERROA.

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

Ing. Agr. JOSÉ RICARDO VILANOVA ARCE.

ASESOR.

Ing. Agr. M Sc. MARIO ANTONIO ORELLANA NUÑEZ

JURADO.

Ing. Agr. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA.

Lic. M Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA.

Ing. Agr. ROBERTO CALDERÓN GRANADOS.

RESUMEN

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agronómicas de La Universidad de El Salvador, de Febrero de 2001 a Septiembre de 2001. La cual consistió en evaluar métodos de desinfección del material vegetativo y medios de cultivo para la inducción a embriogénesis somática.

Las hojas de caféto (*Coffea sp*) de las variedades Catuaí Rojo, Pacamara, Tekisic, Catisic y Pacas procedentes del jardín de variedades de PROCAFE, ubicado en la ciudad de Santa Tecla en el Departamento de La Libertad; se desinfectaron, con dos soluciones de Hipoclorito de Calcio al 10 % y 8 %, variando los tiempos de inmersión en cada una de ellas: 20 y 10 minutos (D1), 15 y 8 minutos (D2), 10 y 5 minutos (D3) respectivamente. Los niveles más bajos de contaminación se obtuvieron con el método D1. Este método de desinfección se utilizó para iniciar la etapa de inducción, donde se evaluaron 3 medios de cultivo, modificando la concentración de la hormona 2Isopentyl adenina (2IP) en el medio de inducción (T1B) para conocer el efecto sobre los explantes foliares de las variedades antes mencionadas. Al transferir este material al medio de expresión de callo embriogénico (T2B) los explantes provenientes del medio de inducción con 4 mg de 2IP presentaron mayor respuesta embriogénica en las variables evaluadas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por habernos permitido culminar nuestros estudios.

A los docentes de la facultad de Ciencias Agronómicas por haber contribuido a nuestra formación como profesionales.

A los Ingenieros Mario Orellana y Celina Merino por el aporte de sus conocimientos para la realización de esta investigación.

A todo el personal administrativo de la Facultad de Ciencias Agronómicas por su valiosa colaboración.

Al personal de PROCAFE por su contribución al desarrollo de este trabajo.

Al Licenciado Oscar Orlando Flores y al Ingeniero Agrónomo Carlos Enrique Ruano por su desinteresada ayuda en la reproducción de este documento.

A los miembros del jurado examinador por su tiempo y acertadas observaciones a este documento.

A todos nuestros compañeros y amigos por compartir momentos agradables.

Además expresar nuestros sinceros agradecimientos a las personas que de una u otra forma contribuyeron en este trabajo.

Alba Sugely López Ortiz
Teresa del Carmen Vásquez Flores
Vilma Lizet Landaverde Parada

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la vida y las fuerzas para poder llegar a culminar una etapa de mi vida.

A MIS PADRES

José Gonzalo López y Rosa Margarita de López por todos sus sacrificios y amor infinitas gracias.

A MIS HERMANOS

Tania y Vladimir por todo su apoyo y cariño.

A MIS ABUELOS

Jesús de Benavides y Silvio Benavides por todo su apoyo durante toda mi vida.

A TODA MI FAMILIA Y AMIGOS

Por ser parte importante en este logro.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS

Por todo lo que hemos compartido.

ALBA SUGEY LÓPEZ ORTIZ.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO

Por haberme dado conocimiento fuerza y salud para alcanzar una de las metas de mi vida.

A MIS PADRES

Carlos Alberto Vásquez por su apoyo, y especialmente a mi madre Antonia Bety Flores por su amor y cariño sin la cual no hubiese sido posible la finalización de mis estudios.

A MIS HERMANOS

Oscar Orlando Flores y Juan Carlos Vásquez Flores por su apoyo y colaboración para este trabajo.

A MIS CUÑADAS

Elsy de Vásquez, y Carmen de Flores por su apoyo.

A MIS SOBRINITOS

Karina, Fernando, Sofía, Juan Carlos y Alison por compartir todas sus risas y alegrías.

A MIS ABUELITAS, TIAS, TIOS, PRIMOS Y PRIMAS Y DEMAS FAMILIA

Que en algún momento me incentivaron para seguir adelante.

A MIS COMPAÑERAS DE TESIS

Vilma y Alba por creer en mi y ayudarme en este logro, gracias por su amistad.

A LA FAMILIA GÁMEZ ALAS

Por abrir las puertas de su hogar y brindarme su amistad.

Y A TODOS MIS AMIGOS Y AMIGAS

Que son parte importante de este logro.

TERESA DEL CARMEN VÁSQUEZ FLORES.

DEDICATORIA

“El verdadero triunfador es aquel que no limita sus esfuerzos para lograr sus objetivos” Z. L.

A JEHOVÁ Y JESUCRISTO:

Por permitirme seguir siendo parte de su creación y compartir este logro con las personas que amo.

A MIS PADRES:

Vilma Parada infinitas gracias por su constante sacrificio, dedicación y consejos; Cristóbal Landaverde por su esfuerzo.

A MI ABUELA:

Angela Landaverde por despertar en mi la vocación a esta carrera.

A MIS HERMAN@S:

Rhina, Yeny, Judith, Yasmin, Laura y Juan; por el apoyo que siempre me brindaron.

A MIS SOBRIN@S:

Alexandra, Fátima, Teresa, Daniela, Jonathan, Kevin, Emily y los que faltan por venir; por darme alegría.

A Marinita Rodríguez por sus consejos e incondicional afecto.

A Javier Alexander por ser parte importante en mi vida.

A TOD@S AQUELL@S:

Que me consideran su amiga, que me hicieron partícipes de sus tristezas y alegrías, que me han mostrado su afecto, que saben que son correspondidos y que sus nombres estarían de más en esta página; porque la amistad no se expresa por escrito, sino con hechos en cada oportunidad.

A TOD@S:

L@s docentes de la Facultad de Ciencias Agronómicas que me instruyeron y formaron académicamente.

AL PERSONAL ADMINISTRATIVO:

De esta Facultad que contribuyó a la culminación de este proyecto.

VILMA LIZET LANDAVERDE PARADA.

INDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION DE LITERATURA.	3
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CAFÉ	3
2.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	3
2.1.2. CLASIFICACION TAXONÓMICA	5
2.2.VARIEDADES DE CAFÉ CULTIVADAS COMERCIALMENTE EN EL SALVADOR	12
2.3. REPRODUCCCIÓN DEL CAFÉ	17
2.3.1.REPRODUCCIÓN POR VÍA SEXUAL	18
2.3.2. REPRODUCCIÓN POR VÍA ASEXUAL	18
2.4. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL EN CAFÉ	23
2.4.1. PROPAGACIÓN IN VITRO.....	25
2.4.1.1. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN	26
2.4.1.2. MEDIOS DE CULTIVOS	29
2.4.1.3. PROPAGACION POR MICROESTACAS	32
2.4.1.4. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	33
2.4.2. INGENIERÍA GENÉTICA.....	39
2.4.2.1. MARCADORES MOLECULARES	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO	43
3.2. MATERIAL VEGETATIVO	43
3.3. CONDICIONES FÍSICAS DE CRECIMIENTO	43
3.3.1. ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	44
3.3.1.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN	44
3.3.1.2. ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO	45
3.4. DISEÑO ESTADÍSTICO	46
3.5. VARIABLES EVALUADAS	47
3.5.1. VARIABLES EVALUADAS EN LA ETAPA DE DESINFECCIÓN	47
3.5.1.2. VARIABLES EVALUADAS EN LA ETAPA DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN	50
4.1.1. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DEL TEJIDO	50
4.1.2. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN	50
4.2. ETAPA DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO	56

4.2.1. FASE DE INDUCCIÓN A CALLO INDIFERENCIADO	56
4.2.1.1. DÍAS A INDUCCIÓN A CALLO INDIFERENCIADO (DICI)	56
4.2.1.2. PORCENTAJE DE EXPLANTES CON CALLO INDIFERENCIADO. 57	
(%ECI)	57
4.2.2. FASE DE EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO.	61
4.2.2.1.. DÍAS A EXPRESIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO (DECE)	61
4.2.2.2. PORCENTAJE DE EXPLANTES CON CALLO EMBRIOGÉNICO... 62	
(%ECE)	62
4.2.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL CALLO	64
EMBRIOGÉNICO	64
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES	69
7. BIBLIOGRAFÍA	71
APÉNDICES	77

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Efectos de tres métodos de desinfección sobre los explantes foliares de cinco variedades comerciales de café (<i>Coffea arabica</i>) para el inicio de embriogénesis somática.....	51
Figura 2. Efectos de los medios de cultivo con 2IP en la formación de callo indiferenciado en los explantes foliares de cinco variedades comerciales de café (<i>Coffea arabica</i>).....	58
Figura 3. Efecto residual del 2IP en los días de expresión de callo embriogénico en los explantes en cinco variedades de café (<i>Coffea arabica</i>).....	62
Figura 4. Efecto residual del 2IP en el porcentaje de explantes con callo embriogénico en cinco variedades de café (<i>Coffea arabica</i>).....	63
Figura 5: proceso de embriogénesis somática en café.....	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
cuadro 1: Métodos de desinfección del material vegetativo.....	44
cuadro 2. Días de inducción a callo diferenciado después de 37 días de cultivados los explantes de las cinco variedades de café (<i>Coffea arabica</i>) en tres medios de inducción.....	57

INDICE DE APÉNDICES

Apéndice	Página
Apéndice 1. Composición química de los medios de inducción y expresión (MS)	77
Apéndice 2. Medios de inducción a callo variando la hormona 2 Isopentyladenina.....	78
Apéndice 3. Tratamientos evaluados en la etapa de desinfección.....	78
Apéndice 4. Tratamientos evaluados en la etapa de inducción y expresión de callo embriogénico en la fase de inducción a callo indiferenciado.	79
Apéndice 5. Análisis de varianza para los resultados de la etapa de desinfección en la variable porcentaje de contaminación.	79
Apéndice 6. Prueba de Duncan para las variedades con los resultados de porcentajes de contaminación (5% de significancia).....	80
Apéndice 7. Prueba de Duncan para la fuente métodos de desinfección del material vegetativo, con los resultados de porcentaje de contaminación (5% de significancia).	80
Apéndice 8. Porcentaje de callo indiferenciado al término de la fase de inducción.....	81
Apéndice 9. Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes que formaron callo indiferenciado (% ECI).	81
Apéndice 10. Prueba de Duncan para variedades en la variable porcentaje de explantes con callo indiferenciado (%ECI).....	82
Apéndice 11. Prueba de Duncan para los medios de cultivo en la variable porcentaje de explantes con callo indiferenciado (%ECI).....	82
Apéndice 12. Resultados de la fase de expresión del callo embriogénico (promedio por tratamiento).	82
Apéndice 13. Análisis de varianza para tratamientos medios de cultivo, con respecto a la variable porcentaje de explantes con callo embriogénico (%ECE).	83

Apéndice 14. Prueba de Duncan en la variable porcentaje de explantes con callo embriogénico (%ECE).	83
Apéndice 15. Prueba de Duncan para los medios de la variable porcentaje de explantes callo embriogénico (%ECE).	83

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del café ha sido uno de los rubros económicos más importantes del país, por su contribución al Producto Interno Bruto, generación de empleo y conservación de la biodiversidad; según PROCAFE (2000) Debido a la influencia negativa de factores ambientales (fenómenos naturales), incidencia de plagas, económicos (fluctuaciones del precio en el mercado internacional; políticas económicas nacionales), sociales (alto crecimiento poblacional y demanda de vivienda y consiguiente reducción de áreas de cultivo, robo de grano), técnicos (mal manejo de plantaciones, edad de plantaciones), fisiológicos (estrechez genética de las variedades comerciales cultivadas y que han sido reproducidas sexualmente). En los últimos 18 años, su contribución al PIB, producción, productividad, volumen de exportación, área cultivada y generación de empleo; han experimentado disminuciones considerables.

Por esta razón se está utilizando la propagación de plantas *in vitro*, que es una técnica de reproducción asexual muy útil para el apoyo al mejoramiento genético de un cultivo. 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 (Van der Vossen, citado por Girón 1998)

En la mayoría de países centroamericanos se ha trabajado con variedades locales y algunos de ellos ya cuentan con un protocolo completo y adecuado para la producción

de plantas vía embriogénesis somática. En El Salvador se ha propagado *in vitro* material vegetal costarricense; surgiendo entonces la inquietud de iniciar el proceso embriogénico con material genético nacional.

Es por ello en esta investigación se buscó un método de desinfección para el material vegetal procedente del campo (hojas de cafeto) de 5 variedades comerciales y posteriormente se evaluaron medios de cultivo para inducir a callo embriogénico segmentos de hojas de los cultivares de café.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CAFÉ.

2.1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.

El cafeto tuvo su origen en África, la especie más extendida en el mundo es la *arabica*, existiendo en estado natural, en las alta mesetas etíopes, en la región del Lago de Tana. Otras especies se observaron en estado silvestre en diferentes lugares de África Tropical; la especie *excelsa* en Costa del Marfil, Camerún y Guinea Francesa. El *Coffea liberica* en Sierra Leona, Liberia y Costa de Marfil (Coste 1954).

León (1987) menciona que este cultivo se propagó en la Edad Media de Etiopía a Arabia, los árabes del Yemen utilizaban las cubiertas secas de los frutos de cafeto desde el siglo XV, para preparar una infusión denominada “Kisher” (Coste 1954). El Cafeto se introduce a la India en el siglo XVII en ese mismo siglo fue llevado desde Java del Yemen hasta el Jardín Botánico de Ámsterdam (León 1987).

De Ámsterdam se envió un plantón joven de café a Francia; mientras que los holandeses propagaban el cafeto en sus posesiones asiáticas. El Jardín de Plantas de París envió ejemplares hasta sus posesiones francesas en las Antillas (Dijkman y Welhburg 1986).

Anthony citado por Albarrán (1999) menciona que el cafeto fue introducido en Brasil en el año 1727; cafetos procedentes de Arabia fueron llevados a Jamaica en 1730; entre 1770 a 1790 el cultivo se extendió a Cuba, Puerto Rico, Santo Domingo, México y Colombia. En Centro América, se estima que el período de introducción fue entre 1779 a 1796. Posiblemente el café fue llevado de Cuba a Costa Rica por Francisco Javier Navarro en 1796. Aunque los mexicanos sostienen que fueron los primeros en sembrarlo en fincas de las cercanías de Córdoba, en época anterior a la señalada. En Guatemala se dice que el cultivo del café se inició en 1835, traído de Moka, por padres de la compañía de Jesús; cultivándolos en la casa de estudios de Antigua Guatemala y en Belice se inició su cultivo en 1837, procedente de Jamaica.

En El Salvador algunas fuentes sostienen que el posible período de introducción fue en 1800 a 1815, un siglo después de haber ingresado su cultivo a América; se argumenta que los primeros en haber conocido las plantas de café fueron los señores Cirilo Guerra y Francisco Martínez en 1837 ó 1838 en Santa Ana, producto de semillas de plantas de café que habitaban en los huertos de dos indios de Ahuachapán que estos últimos habían obtenido en la Hacienda Soyote, propiedad de los señores Álvarez de Asturias en el Departamento de Jutiapa en Guatemala. Posteriormente de Ahuachapán lo trasladaron a Santa Ana; extendiéndose al resto de la República (Chacón, citado por Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

En 1820 en un pliego de instrucciones entregado al doctor José María Álvarez (Diputado de la Corte de España por la Provincia de Cuscatlán, antiguo nombre de El Salvador) por parte del Ayuntamiento de San Salvador, en el cual se hace constar que

la Provincia produce entre otros granos y rubros, café. En el periódico La Gaceta del 4 de Enero de 1850, atribuye que el primero que cultivó y enseñó a cultivar café en El Salvador, fue el brasileño Antonio Coehlo, en 1840; con el tiempo el café desplazó gradualmente el añil y se convirtió en el pilar de la economía nacional (Choussy 1934; Asociación Cafetalera en El Salvador 2000).

2.1.2. CLASIFICACION TAXONÓMICA

El cafeto se clasifica taxonomicamente de la siguiente manera

Reino: Vegetal

División: Antofita

Clase: Dicotiledoneal

Subclase: Simpétala

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Genero: *Coffea*

Sección: Eucoffea

Sub-sección: Eritrocoffea

Especies: *arabica*, *canephora*, *liberica*, *excelsa* (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

2.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Raíz: El sistema radical de los cafetos está constituido por una raíz cónica y pivotante, que alcanza de 50 cm a 60 cm de profundidad. De la raíz principal se derivan dos tipos de raíces de segundo orden: Las raíces de sostén o axiales, las cuales son profundas, y las raíces laterales, en donde crecen las raicillas encargadas del intercambio de nutrientes con el suelo; comprendiendo estas últimas el 80 % del sistema radical a una profundidad de 0.30 m y un radio de 2.5 m alrededor del tronco de la planta (León 1987, PROCAFE 1997).

Tallo y porte: Las plantas del género *Coffea*, poseen una característica poco común, el dimorfismo, y se refiere a los dos tipos de crecimiento de sus ejes o ramas. El crecimiento vertical u ortotrópico y el lateral o plagiotrópico que deriva del primero. En El Salvador, a las ramas laterales secundarias se les llama “bandolas” y a las terciarias “criolinas” o “palmillas” (PROCAFE 1997).

En las ramas plagiotrópicas se forman las inflorescencias, por lo general, sólo una vez. Las ramas floríferas de los arbustos de *Coffea canephora*, no suelen ramificarse y en su mayoría producen tallos basales; caso contrario a los *Coffea arabica*. El porte de las variedades de *arabica* fluctúa entre los 1.0 m y los 5.0 m; en cambio, las de *C. canephora* alcanzan hasta los 12 m (León 1987).

Hojas: Crecen en las ramas plagiotrópicas en un mismo plano y en posición opuesta, rodeadas por un par de estipulas agudas; el pecíolo es plano por arriba y convexo por debajo. La lámina es fuerte y delgada, la cara superior es verde oscuro brillante y la inferior verde clara y opaca (León 1987).

Las hojas de la especie *arabica* son de forma oval, acuminadas, cortas y agudas en su base; en ocasiones onduladas; su tamaño varía de 12 cm a 15 cm de largo con 6 cm de ancho. En cambio las hojas de los cafetos *canephora* son de apariencia corrugada u ondulante, de forma oblonga-elíptica, cortas, acuminadas, redondeadas y acuñadas en su base; poseen de 15 cm a 30 cm de largo y de 5 cm a 15 cm de ancho; la nervadura central es plana por arriba y prominente por debajo; las nervaduras laterales son de 8 a 13 pares; el pecíolo es fuerte con 0.8 cm a 2 cm de largo (Dijkman y Welhburg 1986).

Flores: Las flores emergen de las axilas superiores cerca de las hojas, en las ramas plagiotrópicas. En cada axila se forman de 1 a 5 inflorescencias, colocadas en línea recta entre las ramas y las hojas, las inflorescencias son ramillas comprimidas con nudos y entrenudos. La flor tiene de base un receptáculo carnoso ancho en el ápice, que termina en su parte externa con el cáliz e internamente en un disco. El cáliz esta compuesto por 5 dientes finos e irregulares, simulando un reborde verde y continuo; el disco, es una estructura, en forma de anillo, situado entre la corola y el pistilo, el cual funciona como un nectario y aparece luego en el ápice del fruto maduro, observándose como un reborde circular como una depresión al centro la

que corresponde al estilo. La corola es tubular en su base y se abre en 5 pétalos que se despliegan hacia afuera, quedando al final en posición alterna con los pétalos. Las anteras se abren en dos suturas longitudinales. El ovario anterior posee dos óvulos anátropos. El pistilo es blanco, delgado y cilíndrico, que sale del centro del disco; se abren en dos ramas estigmatizadas, al final de la antesis y luego se doblan al marchitarse (León 1987, PROCAFE 1997).

En los ejes laterales de la especie arábica, se desarrolla en flor normal, por lo general un primordio apical en eje central de 1 a 3 flores; formándose de 3 a 7 cimas por axila y de 4 a 18 flores por cima y en la especie *canephora* de 3 a 5 cimas por axila y de 8 a 48 flores por cima, siendo las flores ligeramente más grandes que las de *Coffea arabica* y poseen frecuentemente 6 pétalos en lugar de 5, que es el número normal para el género *Coffea*. Las flores de *C. arabica* son fragantes de color blanco o beige, subsésiles; la corola tiene 5 lóbulos ovales y obtusos, las anteras son mas cortas que los lóbulos-corola. Los de *C. canephora* son de color blanco algunas veces con tonos rosa; sésiles con o sin brácteas, la corola posee de 5 a 7 lóbulos, con estambres y estilos largos (Dijkman y Welhburg 1986, León 1987).

BIOLOGÍA FLORAL

El desarrollo floral se divide en tres fases fisiológicas:

A) Iniciación floral: Consiste en la formación de una rama o una inflorescencia y puede determinarse hasta que la yema ha alcanzado cierto grado de desarrollo, si

se forma una flor ocurren una serie de divisiones celulares que producirán 3 o 4 inflorescencias con 3 o 4 yemas florales. Esta fase está determinada por el fotoperíodo, la temperatura, la disponibilidad de agua, y el balance nutricional (CENICAFE 1988).

CENICAFE (1988) e ISIC (1987) argumentan que el café se comporta como una planta de día corto, manifestándose la iniciación floral en días con 13 ó 14 horas luz. Las condiciones de temperatura que la estimulan son de 23 °C a 26 °C por el día y de 20 °C a 23 °C por la noche, mayores o menores temperaturas la inhiben. Una relación Carbono / Nitrógeno alta favorece a la iniciación floral. Esta fase tiene una duración aproximada de 1 mes.

B) Período de latencia: Las flores diferenciadas crecen durante 2 meses, y dejan de crecer por 1 o 4 meses por condiciones intrínsecas de la planta; una lluvia después de un período de deficiencia de agua en el suelo o una caída repentina de temperatura, puede romper esta latencia (CENICAFE 1988).

C) Antesis: Posterior a la ruptura de la latencia, la yema floral se expande rápidamente y abre en un término de 10 a 15 días. El tiempo que transcurre desde la diferenciación floral hasta la antesis o floración es de 4 a 5 meses (CENICAFE 1988).

Las flores del cafeto se abren generalmente por la mañana y permanecen así todo el día, en el segundo día se inicia el marchitamiento y después del tercero se desprende la corola y los estambres, conservando el estilo. Al abrirse las flores, las anteras han liberado el polen y alcanzado al óvulo, posteriormente se completará la fertilización en 4 o 6 días (PROCAFE 1997).

Fruto: Por un mes aproximadamente, los óvulos fecundados permanecen en latencia e inician un rápido crecimiento, completándose este proceso de 80 a 100 días después de la fertilización y 4 meses más tarde inicia la maduración que tarda entre 40 a 60 días (León 1987).

Los frutos o “cerezos” del cafeto provienen de las flores que emergen de las axilas de las hojas en las ramas laterales. Después de la fecundación se desprende la corola del ovario y el fruto queda adherido al pedúnculo. En su primera fase, las drupas tienen forma globular; pero el ápice es aplanado. El grano tiene un desarrollo lento, tiene una duración de 5 a 6 meses; tornándose entonces el pericarpio de color amarillo o anaranjado y luego rojo, indicando que el fruto alcanza su máximo desarrollo y que debe cosecharse (Molina 1967).

El fruto está formado por el pericarpio y este a su vez está integrado por 3 capas, la más externa es el epicarpio constituido por una sola capa de células finas y numerosos estomas; le sigue el mesocarpio compuesto de parénquima rico en azúcares, taninos, y sustancias colorantes. La tercera capa es el endocarpio y esta

formado por varios estratos de células de paredes gruesas, muy alargadas y amarillas que le dan un aspecto coráceo al “pergamino” (León 1987).

Dijkman y Welhburg (1986) manifiestan que los frutos de *C. arabica* son de forma oblonga – elíptica de 1.5 cm de largo y los de *C. canephora* son más elipsoidales de 0.8 cm a 1.6 cm de largo.

Semilla: La semilla es un cuerpo plano convexo (en su cara interna es plano y en la externa convexo) esta formado por endospermo coráceo color amarillo verdoso; tiene un capa externa más oscura y densa llamada endospermo duro y otra central más clara que es el endospermo suave. Las células del endospermo contienen aceite, almidón, azúcares y alcaloides; al tostar la semilla se forman cuerpos aromáticos y al molerlas se liberan dándole el color y sabor característico al café. El embrión se encuentra en la parte basal de la semilla y es muy reducido, esta integrado por el hipocotilo y dos cotiledones superpuesto, mide 2 mm a 5 mm de largo. El contenido de cafeína de las semillas de los cultivares de *C. arabica* varía de 0.5 a 2 % de materia seca, proporcionándole una bebida ácida. Las semillas de los *C. canephora*, son semejantes a las de la anterior, de menor calidad y tamaño, miden de 7 a 13 mm de largo, su contenido de cafeína es de 2 a 3 % de materia seca, proporcionándole una bebida fuerte sin aroma y frecuentemente amarga (León 1987, Merino 1998).

2.2.VARIEDADES DE CAFÉ CULTIVADAS COMERCIALMENTE EN EL SALVADOR.

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 1995). Como respuestas a estas necesidades se crearon las siguientes variedades:

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 (PROCAFE 1997) 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 café (PROCAFE 1997).

Las características del grano oro son: buen peso, tamaño grande y color ligero; calidad de la taza, moderadas cualidades de aroma y acidez (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

PACAS

Es una variedad considerada como local porque se originó en plantaciones de Bourbon tradicional, en el departamento de Santa Ana, considerándose adaptada a nuestras condiciones de suelo como ambientales (PROCAFE 1997).

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 altitud recomendada para la siembra de esta variedad es entre 500 a 1000 msnm (bajío o media altura). Los promedios de producción varían de 24 a más de 70 quintales oro por manzana, estas producciones están relacionadas a distanciamientos, altitudes, fertilización, y otros (PROCAFE 1997).

El sistema radicular fuerte; tolerancia al viento, sol y sequía, son ventajas de esta variedad y entre sus desventajas están: Susceptibilidad a la roya, y otros problemas fitosanitarios (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

Respecto a valores de catación, la acidez y cuerpo oscilan de reducido a bueno con un buen sabor. El tamaño del grano es pequeño o normal, con porcentajes de

granos normales del 79% (PROCAFE 1997). Las características del grano oro son: Buen peso, tamaño grande, y color ligero (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

CATISIC

Es una variedad híbrida introducida al país, evaluada y liberada por el ISIC, siguiendo PROCAFE con su producción para cultivarla en el país. Esta variedad resultó del cruzamiento entre las variedades Caturra Rojo y el Híbrido de Timor. Realmente es un Catimor, y por los trabajos realizados en el país, se consideró denominarla como variedad Catisic (Cat de Catimor más las siglas de ISIC) (PROCAFE 1997).

Es una planta de tamaño promedio bajo y coloración del brote terminal verde, forma cónica, laterales y entrenudos similares al Pacas. La altitud apropiada para la siembra de Catisic es de 600 a 1000 msnm. La principal ventaja de esta es la tolerancia a ataques por roya, la cual favorece la disminución en costos de producción, al no ser necesaria la aplicación de agroquímicos (fungicidas) para combatirlas; proporciona una productividad promedio que oscila en 18 y 50 quintales oro por manzana (PROCAFE 1997). Los resultados de catación lo ubican como aceptable en cuanto acidez, cuerpo y sabor. El tamaño de grano es también favorable con más del 70% sobre zaranda # 17 (PROCAFE 1997).

Las características del grano oro son: Grande, buen peso con un color ligero; la calidad de la taza con moderadas cualidades de aroma y acidez (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

CATUAI ROJO

Es un Híbrido obtenido en Brasil al hacer un cruzamiento entre las variedades Caturra Amarillo y Mundo Novo. Fue introducido al país por el ISIC. La planta es de tamaño intermedio, un poco más alta que la variedad Pacas. Sus laterales son largos con entrenudos cortos y tendencia a formar “crinolinias”. En general es una variedad con vigorosa conformación agronómica. Con relación a la altitud se recomienda las altitudes de siembra de 600 a 1000 msnm (PROCAFE 1997).

Tanto en El Salvador como en otros países caficultores, Catuaí 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. Igualmente el tamaño del grano es de 70 % sobre zaranda # 17 (PROCAFE 1997).

Las características del grano oro son: Tamaño grande, buen peso y color ligero; la calidad de la taza con aroma y acidez moderada (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

PACAMARA

Es un híbrido obtenido en El Salvador, el cual resultó del cruzamiento entre las variedades Pacas y Maragogipe Rojo, con el objetivo de producción, tamaño de grano y calidad de bebida. La planta se considera de porte alto, entrenudos de longitud intermedia, hojas encarrugadas, color verde oscuro y de mayor tamaño que la variedad Pacas. El fruto presenta un notable tamaño, siendo en la actualidad la variedad comercial cultivada en el país que produce granos de mayor dimensión. También destaca por su apropiada calidad en la taza, se cataloga con cuerpo y acidez apropiada, aún cultivada en condiciones de media altura. Las cosechas promedias oscilan de 18 hasta 85 quintales oro por manzana (PROCAFE 1997).

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.

Las principales desventajas de esta variedad son: Susceptibilidad a la roya del café; necesidad de fertilizaciones apropiadas; tendencia a maduración tardía, y variaciones con respecto al tamaño y conformación de la planta, producción, tamaño de frutos y calidad de bebida.

Las características del grano oro son: Textura muy compacta, pesado, buen color, ranura cerrada; calidad de la taza excelentes cualidades y aroma persistente (Asociación Cafetalera de El Salvador 2000).

2.3. REPRODUCCIÓN DEL CAFÉ

En las especies vegetales, la reproducción es la separación de una célula o grupos de células del progenitor y su desarrollo en un nuevo individuo. Existen dos tipos de reproducción o propagación en plantas, la sexual (generativa o por semillas) y la asexual (vegetativa o clonado) (Greulach y Edison 1970; Pierick 1990).

Cerón (1987) menciona que en África y América, el mejoramiento de los cafetos ha estado orientado a la creación de variabilidad, por medio de la síntesis de híbridos inter específicos de *C. arabica* con *C. canephora* o *C. arabica* con *C. liberica*; la estabilización de sus descendencias a través de la reproducción por semillas tarda cerca de treinta años.

Según Cerón (1987) y Merino (1998) la multiplicación vegetativa es un elemento clave en las estrategias de selección del café. Al igual que numerosas especies leñosas, es utilizada en la conservación de plantas o clones de interés.

2.3.1. REPRODUCCIÓN POR VÍA SEXUAL

Las variedades de *C. arabica* son propagadas por semillas, después de haber realizado un proceso de selección genealógica (Menas, citado por Girón 1998).

La semilla es útil para mantener la especie, proceso que inicia con la germinación por medio del embrión; brotando primero lo que será la raíz, para continuar lo que formará el tallo y el follaje (Cerón 1987).

Merino (1998) menciona que la viabilidad de las semillas de café es muy corta y su poder germinativo dura de 4 a 30 meses.

La reproducción sexual se practica con éxito en la mayoría de las variedades comerciales de *Coffea arabica*, la propagación vegetativa es poco utilizada (Van der Vossen y Valyaro, citados por Girón 1998).

2.3.2. REPRODUCCIÓN POR VÍA ASEXUAL

La propagación vegetativa de las plantas envolverá su reproducción a partir de una porción de ellas, ya sea raíz, tallo u hoja (Cerón 1987). Realizándose con el propósito de conservar y/o mantener ciertas características deseables a los individuos resultantes (ISIC 1972).

Las prácticas más comunes de propagación vegetativa son el injerto y la estaca. La reproducción de la estaca hortícola es una práctica muy desarrollada para la multiplicación masiva de plantas por su mayor productividad (Capot, citado por Girón 1998).

Los métodos de reproducción asexual toman importancia en la selección de individuos heterocigotos con características deseables, permitiendo reproducirlos en forma rápida y conservando su identidad genética (Van der Vossen, citado por Girón 1998).

MEJORAMIENTO GENÉTICO Y SELECCIÓN

La mayoría de géneros de la familia Rubiaceae, posee un genoma básico de 11 cromosomas; en el caso del género *Coffea*, todas sus especies son diploides ($2n = 22$ cromosomas) y de polinización cruzada, excepto la especie *arabica* que es tetraploide ($2n = 4x = 44$) y autopolinizada, lo cual constituye una barrera para el mejoramiento debido a la posibilidad de utilizar toda la variación morfológica y metabólica que este posee (Charrier y Berthaud, citados por Albarrán 1999).

Berthouly (1997) manifiesta que la metodología de mejoramiento de *C. arabica* es generalmente aplicada a especies autógamas y tiene por base la obtención de descendencias puras por selección genealógica, después de la recombinación de caracteres aportados por los padres.

Según Coste, citado por Berthouly (1997) las plantaciones de *C. arabica* en América Central, sur y sureste de Asia; se originaron a partir de número reducido de plantas y debido a su carácter autógamo tiene una base genética limitada. La aparición de más de 40 mutantes en plantaciones de Brasil, contribuyó a la creación de nuevas variedades de interés práctico para el mejoramiento de la especie (Carvalho, citado por Berthouly 1997).

Tradicionalmente la metodología, para seleccionar *C. arabica*, fue la hibridación, luego la selección genealógica y la selección por retrocruzas (Bettancourt y Rodríguez 1988, citados por Berthouly 1997).

Van der Vossen, citado por Berthouly (1997) manifestó que las variedades obtenidas con el procedimiento mencionado, son suficientemente homogéneas para permitir una multiplicación por semilla, instalándose así todas las plantaciones.

Berthouly (1997) menciona que en 1978 Vishueshwara descubrió junto con Srin vason, la heterosis en cafetos *arabica* y que Charrier en 1985 explotó esta característica para crear variedades híbridas F1, en la misma especie, logrando modificar radicalmente la selección clásica.

La hibridación interespecífica, fue utilizada en café, para transferir ciertos caracteres a variedades regionales. En 1927, se iniciaron trabajos de mejoramiento y selección con el híbrido de Timor, (que resultó del cruce de *C. arabica* con *C. canephora*) y posee variabilidad de individuos diploides desarrollando cultivares

triploides con el objetivo de incrementar la probabilidad de recombinación en la meiosis, ya que resultan generalmente en híbridos estériles; la solución para ello es la inducción a los individuos triploides a una duplicación cromosómica para obtener híbridos hexaploides fértiles (Anthony, citado por Albarrán 1999).

PROPAGACIÓN POR INJERTO

La técnica de injerto consiste en implantar una especie o variedad sobre otro individuo de distintos caracteres, el cual, actuando de soporte o sostén, proporcionará los elementos nutritivos necesarios, y de una manera asociada formarán un solo individuo (Juscafresa 1974).

La siembra de la variedad de *Coffea canephora* o *Coffea liberica* que servirá como patrón debe sembrarse de 10 a 15 días antes de la variedad comercial que se utilizará como injerto, se le debe colocar una ramada de 15 a 20 cm (PROCAFE 1995).

La etapa ideal para realizar la práctica de injertación, es aproximadamente de 55 a 60 días después de la fecha de siembra de la semilla de la variedad que servirá como injerto, llamada comúnmente "patacón o soldadito". La semilla de la variedad utilizada como patrón tendrá alrededor de 70 a 75 días, cuando las plantitas tienen las condiciones deseadas, se extraen y se seleccionan las mejores las que tengan raíces abundantes. Los patrones se lavan para eliminar la arena adherida a las raíces.

Para prevenir la presencia de hongos, los patrones se sumergen en una solución de Rizolex (PROCAFE 1995).

PROCAFE (1995) como primer paso menciona que se hace un corte al patrón, y al injerto o yema, después se hace la unión de las partes, y se siembran las plantas injertadas y cuarenta días después de efectuado el injerto se desamarran cuidadosamente y se retira el plástico utilizado.

La importancia de la técnica de injerto en café es conservar características fenotípicas de las variedades comerciales (Pacas, Tekisic, Catisic, Catuai Rojo, y Pacamara) así como producción, tamaño de fruto y calidad de bebida para reducir el uso de nematicidas, disminuyendo costos de producción en los siguientes años, y protección del medio ambiente (flora, fauna y mantos acuíferos) y a la salud humana por la reducción en el uso de nematicidas (PROCAFE 1995).

PROPAGACIÓN POR ESTACAS

La propagación por estacas es una técnica clásica en razón de un dimorfismo de ápices vegetativos del café (ortotrópico o vertical y plagiotrópico u horizontal) (Merino 1998).

Esta técnica es actualmente más utilizada en *Coffea canephora*. La multiplicación vegetativa por estacas, no puede ser realizada más que a partir de

fragmentos de tallo ortotrópico; es decir tallos de crecimiento vertical (IICA PROMECAFE 1997).

La técnica consiste en preparar los esquejes a partir de entrenudos de chupones ortotrópos. El tallo se corta a los 4 -5 cm por debajo de cada nudo y por encima de la base de los pecíolos. Estos segmentos comprenden de un nudo y 2 hojas cortadas por la mitad o en la tercera parte de su largo, luego se seccionan longitudinalmente para obtener 2 esquejes que lleva cada uno una hoja, después del tratamiento de la base con un producto auxínico, el sustrato de arraigo puede ser arena, aserrín, cascarilla de arroz, el porcentaje de enraizamiento es de un 80 % (IICA PROMECAFE 1997).

2.4. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL EN CAFÉ

La biotecnología es la aplicación de organismos vivos para desarrollar nuevos productos o mejorar los ya existentes. Los métodos biotecnológicos actuales, que permiten la transferencia de un gen de un organismo, a otro mediante la ingeniería genética, también incluyen los mismos procesos básicos; cruzamiento, o fermentación que se han utilizado durante siglos para aumentar la productividad de los cultivos, mejorar el suministro de alimentos y desarrollar mejores productos (Monsanto s. f.).

En el área agronómica estas técnicas son aplicadas al mejoramiento de variedades. Por siglos, los productores han trabajado para desarrollar nuevos cultivos que les provocan mejores rendimientos y alimentos de mejor calidad. La biotecnología vegetal ofrece una vía de mejoramiento adicional, contribuyendo a una agricultura sostenible a través de la conservación de los recursos del suelo y la disminución en el uso de insumos (Monsanto s.f.).

Los propulsores de la biotecnología argumentan que esta tiene el potencial de lograr incrementar en la seguridad alimentaria, reducir la presión sobre la tierra, lograr incrementos de producción sostenibles en tierras marginales o en medios ambientes inhospitalarios, y la reducción en el uso de agua y agroquímicos en la agricultura (Monsanto s. f.).

Para el café desde hace treinta años, se han realizado esfuerzos de investigación muy importantes en la mayoría de los campos de la biotecnología, es así como un mapa genético de *Coffea canephora* ha sido publicado y están a punto de ser obtenidas plantas genéticamente transformadas, para resistencia al minador de las hojas (Leroy, citado por Etienne *et al.* 1999).

La herramienta biotecnológica es utilizada en el café con tres fines: Recortar el ciclo de selección para el *Coffea arabica* gracias a la micropropagación de los híbridos (F1, F2, retrocruzamientos). Multiplicar rápidamente los genotipos de *Coffea canephora* en las regiones de mediana altitud donde la multiplicación por

esquejes, presentan problemas para acelerar la instalación de jardines clonales, transformar genéticamente plantas para la obtención de resistencia a insectos, y plantas sin cafeína (Etienne *et al.* 1999).

2.4.1. PROPAGACIÓN IN VITRO

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.* 1999).

La propagación *in vitro* consiste, en cultivar fragmentos de una planta, bajo condiciones de esterilidad, en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Abdelnour *et al.* 1994, Etienne *et al.* 1999).

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 (Berthouly 1989). Luego en 1975, Herman y Hass inducen por primera vez, la neoformación de embriones somáticos a partir de secciones de hoja en *C. arabica* (Girón 1998). En 1977 Sondhal y Sharp reportaron embriogénesis somática de alta y baja frecuencia en *C. Arabica*, a partir de explantes de diferentes órganos de las plantas (hojas, tallos, pecíolos, frutos inmaduros, etc.) usando el medio de Murashige y Skoog con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas (Etienne *et al.* 1999).

Las técnicas más desarrolladas en café son: Propagación por microestacas y embriogénesis somática.

2.4.1.1. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN

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. Evidencias indican que se dan diferentes respuestas entre especies, tipo de órgano o tejido y aún dentro de una

rama, ya que los ápices son más fácilmente dañados por los desinfectantes que las yemas axilares. Diversos productos químicos pueden emplearse para la desinfección, pero deben usarse preferentemente aquellos que sean fácilmente removidos, para no provocar daños al tejido (Villegas, citado por FAO 1990).

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).

Las sales de Calcio son menos tóxicas, sin embargo, el Hipoclorito de Calcio reacciona con el CO₂ de la atmósfera, por lo tanto es químicamente inestable (Villegas, citado por FAO 1990).

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 (Abdelnour *et al.* 1994).

Es difícil obtener una desinfección superficial que no dañe el tejido. En realidad cuando el explante es muy sensible como los brotes apicales. Se recomienda mejor no usar desinfectante (Villegas, citado por FAO 1990).

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, sin embargo, el tamaño debe ser tal que facilite el establecimiento del tejido. Otra recomendación que se ha formulado es el uso de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección. Por ejemplo, 100mg de ácido ascórbico y 150 mg de ácido cítrico en un litro de agua destilada. Esta solución de antioxidantes se esteriliza y en ella se sumergen los explantes antes de iniciar el proceso de reducción de su tamaño para iniciar el cultivo (Abdelnour *et al.* 1994).

INFECCIONES INTERNAS

Las infecciones internas, que pueden constituir un problema importante son causadas por microorganismos que se encuentran en el interior de la planta, y no pueden ser eliminados por esterilización externa, hay dos formas de combatir este

problema: Cultivando meristemos (ya que los microorganismos no se encuentran presentes en ellos) o la adición de antibióticos al medio de cultivo. La adición de antibióticos generalmente conduce a fenómenos fitotóxicos, se necesitan concentraciones tan altas de antibióticos que inhiben también el crecimiento y desarrollo de la planta superior. La utilización de antibióticos puede también conducir a la selección de microorganismos resistentes (Pierik 1990).

2.4.1.2. MEDIOS DE CULTIVOS

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).

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).

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, Perea y Navarro 1998).

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).

SALES INORGANICAS

Para el cultivo de tejidos se hace necesario la aplicación 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 y Cobalto (López citado por FAO 1990).

COMPUESTOS ORGANICOS

En esta categoría 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).

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).

PREPARACIONES NATURALES COMPLEJAS

Una gran variedad de sustancias de composición indefinida ha sido utilizada para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellos se menciona: Extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada y jugo de naranja y tomate (Aldelnour *et al.* 1994).

MATERIALES INERTES

Dentro de estos se encuentran los agentes gelatinizadores, de los cuales también depende la efectividad de un cultivo (CIAT 1993). Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos (López citado por FAO 1990). Este debe su valor en los sistemas de cultivos a dos propiedades: Se derrite al calentarlo, pero a temperatura ambiente se enfría formando un gel semisólido y en esencia biológicamente inerte (Hartman 1997).

Otros compuestos se han empleado para sustituir el agar, sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es el "Gelrite" (López citado por FAO 1990).

La preferencia de uno u otro agente de solidificación depende de la especie de la planta o de las condiciones de cultivo (Torres *et al.* 1998).

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).

2.4.1.3. PROPAGACION POR MICROESTACAS

La propagación *in vitro* mediante microestacas, 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).

Esta técnica fue desarrollada por Dublín y Custer (1980) cuyo principio tiene como base la del esqueje hortícola pero, realizado *in vitro* cuyo objetivo es favorecer la caulogenesis (Berthouly 1989).

La principal ventaja de las microestacas esta garantizado por una propagación totalmente conforme de la planta madre, lo cual ha sido confirmado ampliamente por los experimentos en el campo (Berthouly 1989).

La alta contaminación por bacterias y hongos es uno de los problemas más importantes. También la oxidación fenólica, es muy frecuente en este tipo de material. Estas dos etapas de la metodología son las más difíciles de superar (Berthouly 1989). Una vez establecido el cultivo se constituye un banco de germoplasma *in vitro* a partir del cual pueden iniciar la multiplicación masiva de material (Berthouly 1989).

2.4.1.4. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática, es el proceso de desarrollo que produce un embrión a partir de una o de un grupo de células somáticas no cigóticas (Arcilla y Orozco, citado por Merino 1998).

Estos embriones son parecidos a los embriones cigóticos presentes en la semilla pero provienen de células somáticas es decir de células no implicadas en el proceso sexual (Etienne *et al.* 1999).

Un embrión somático es una estructura bipolar que se desarrolla rápida y simultáneamente, por un lado un meristemo de tallo y por el otro un meristemo de raíz (Arcilla y Orozco citado por Merino 1998).

En café, la embriogénesis somática puede ser obtenida a partir de partes de las plantas como tallos, hojas, óvulos, anteras, y protoplastos: Estos resultados demuestran la aptitud del café a la regeneración por embriogénesis somática: Sin embargo depende igualmente de la especie y del genotipo (Etienne *et al.* 1999).

TIPOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Embriogénesis Somática Directa o de Baja Frecuencia (LSFE) Se realiza en una sola fase por cultivo en un medio único y permite solamente la obtención rápida de embriones somáticos en cantidades limitadas (Etienne *et al.* 1999). Se caracteriza por la aparición de embriones aislados bien constituidos (de 1 a 10 por explante), observados después de 13 a 15 semanas en el medio de inducción (Berthouly 1989).

Embriogénesis Somática Indirecta o de Alta Frecuencia (HSFE) Los primeros trabajos en embriogénesis somática indirecta fueron realizados por Sondhal y Sharp en 1977 (Berthouly 1989).

Con este tipo de embriogénesis se produce un callo secundario denominado callo embriogénico de alta frecuencia, ya que permite obtener una alta cantidad de embriones somáticos (Girón 1998). Se desarrolla en dos fases por cultivo de la pieza vegetal en un primer medio para iniciar una proliferación de callos y luego en un segundo para desarrollar células embriogénicas en embriones (Berthouly 1989).

Los embriones somáticos completamente diferenciados pueden pasar por un medio de regeneración donde se desarrollarán las raíces y los tallos, hasta la formación de plántulas de 4 a 5 pares de hojas aptas para ser transferidas a condiciones *in vivo* (Berthouly 1989). Los embriones aparecen más tardíamente que en el caso de la embriogénesis somática directa, ocurriendo a las 16 o 20 semanas. En los cultivos de tipo HSFE, la cantidad de embriones varía de 100 embriones por explante (Berthouly 1989).

ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA

El número y nombres de las fases que posee la embriogénesis somática indirecta pueden variar según los autores que hagan referencia a ella y se detalla a continuación:

a) Inducción o caulogenesis o inducción del potencial embriogénico de las células de los explantes. En esta etapa se da una transición de células somáticas ($2n$ cromosomas) en células embriogénicas capaces de producir embriones somáticos,

es la más importante y más difícil, a esta transición se le llama desdiferenciación. La inducción es una etapa difícil debido a que se desconocen los factores genéticos o fisiológicos responsables de ella y también, el encontrar condiciones de cultivo favorables a todos los genotipos; en ocasiones dentro de una misma especie, sus diferentes variedades pueden tener distintas reacciones (Berthouly 1989).

Según Ammirato, citado por Girón (1998) todos los tejidos tienen la capacidad de formar callos *in vitro*; pero pocos explantes producen callos embriogénicos, comúnmente se han utilizado explantes de cotiledones, hipocótilos y embriones de plántulas, además ápices caulinares, tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras. Sin embargo, Kester y Davies (1990) sostienen que debe de hacerse un análisis sistemático del potencial embriogénico de las diferentes fuentes de explantes de una planta. CIAT (1993) manifestaron que la respuesta embriogénica del callo depende también del genotipo de la planta, representando una de las mayores dificultades para el establecimiento del proceso de embriogénesis somática, aplicable a todos los genotipos y que sea reproducible.

La fase de caulogénesis se desarrolla en la oscuridad por 4 semanas, debido a que la luz es factor de diferenciación que se opone a la formación de células juveniles; en un medio nutritivo con reguladores de crecimiento, una o dos auxinas (2,4-D, AIB) sola o en combinación, y una citoquinina (BAP o 2IP) (Dublín, citado por Berthouly 1989).

b) Proliferación del callo embriogénico en suspensiones celulares u obtención de cepas embriogénicas. Esta etapa se inicia con la selección y multiplicación de los callos (células indiferenciadas) en un medio líquido con el fin de obtener cepas embriogénicas (Smith y Street, citados por Merino 1998). Ammirato citado por Berthouly (1989) manifiesta que la multiplicación de células embriogénicas en suspensión permite una propagación de plantas a gran escala y Etienne, citado por Girón (1998) argumenta que la fase de proliferación en suspensión embriogénica aumenta fuertemente las potencialidades del proceso de embriogénesis somática y permite homogenizar el desarrollo del material vegetal, obteniéndose un crecimiento sincronizado de embriones y plantas regeneradas.

Desde 1993, Florín *et al.* puso en marcha un protocolo de crioconservación de los callos embriogénicos dentro de nitrógeno líquido, para preservar el potencial embriogénico de las cepas (Merino 1998).

c) Expresión embriogénica y desarrollo de los embriones somáticos

En esta fase las células embriogénicas o predeterminadas de las masas pro embriogénicas evolucionan y se convierten en embriones somáticos viables; los embriones se manifiestan al inicio en estado globular luego en estado de corazón y finalmente en estado de torpedo (Halperin y Welherell, citados por Girón 1998). Esta transformación ocurre en dos o tres meses (Ducos *et al.* citados por Merino 1998).

Kester y Davies (1990) argumentan que las masas proembrionicas son transferidas a un medio basal con auxinas, alto en Amoníaco y Nitrógeno, los embriones somáticos surgen de células solas o de grupos o de masas de células, desarrollándose con polaridad y siguiendo un diseño de un embrión cigótico normal.

d) Maduración de embriones somáticos o conversión de embriones en plántulas sobre medio semisólido. Etienne y otros, citados por Girón (1998) manifestaron que la maduración es un período de transición entre las fases de desarrollo y germinación del embrión, participando grupos de genes distintos; dándose además una acumulación de reservas protéicas, glucidos, y lípidos realizándose una desecación. Las relaciones hídricas entre el embrión y su ambiente juegan un papel regulador determinante en el desarrollo del embrión y especial en la maduración (Adams y Rinne, citados por Girón 1998).

El término conversión se define como la producción de una planta como un fenotipo normal a partir de embriones somáticos y que son semejantes a aquellas plantas nacidas de semillas. La fase de conversión está constituida por dos etapas; la primera es la de pregerminación (1 a 2 meses) corresponde al desarrollo del embrión en estado de torpedo hasta el estado cotiledonal avanzado (los embriones poseen dos hojas cotiledonales de color verde y bien abiertas). Luego son transferidos a un segundo medio de cultivo también semisólido y continuar su desarrollo en plántulas, siendo esta la segunda etapa llamada germinación que tiene una duración de 4 a 6 meses (Redenbaugh *et al.* citado por Merino 1998).

Lelu y otros, citados por Girón (1998) y Kester y Davies (1990) coinciden en que adicionar ácido abscísico (ABA) al medio de cultivo, promueve un desarrollo uniforme y normal de los embriones; también la concentración de sacarosa, el tipo de concentración de carbohidratos y el nitrato de amonio conducen la eficiencia en los pasos de maduración y la calidad de los embriones somáticos.

2.4.2. INGENIERÍA GENÉTICA

La ingeniería genética vegetal, permite la manipulación del material hereditario con el fin de transferir uno o pocos genes de una especie vegetal a otra. De esta manera se introducen caracteres nuevos, codificados por los mismos, en la especie receptora; dando como resultado, la producción de plantas transgénicas o plantas transformadas portadoras de un gen ajeno. Esta constituye una metodología extremadamente prometedora, pues permite la introducción de genes de interés en germoplasmas de elite sin modificar el genotipo ya existente, el cual retendrá todas sus propiedades originales (Martínez s.f.).

El fundamento básico de la manipulación genética de las plantas requiere al menos tres etapas: La identificación y aislamiento de genes que controlen procesos importantes en el crecimiento y productividad de las plantas, la transferencia de estos genes de interés desde un organismo a otro, y la expresión de los genes de interés en las células hospedadoras (Martínez s.f.).

El objetivo fundamental de la ingeniería genética es obtener un fragmento puro de ADN en grandes cantidades. Esto se consigue introduciendo un fragmento de ADN eucariótico en un microorganismo que se reproduzca mucho en poco tiempo. También la ingeniería genética combina *in vitro* material genético de seres procarióticos y eucarióticos creando nuevas formas de vida que propaga en huéspedes temporales (Izquierdo 1993).

Una de las mayores dificultades con las que se ha enfrentado la ingeniería genética vegetal radica en que algunos caracteres que pueden considerarse de interés como los del vigor, la capacidad de crecimiento o la biomasa, tienen una base genética compleja, es decir, de conjuntos poligénicos. Esta característica los hacen muy difíciles de manipular, ya que la metodología de transformación permite la transferencia e integración de unos o pocos caracteres probablemente están controlados y dependen de muchos genes, (generalmente no más de dos) (Martínez s.f.).

En la actualidad se están desarrollando varios proyectos en especies de árboles forestales en particular dirigidos a la modificación de la biosíntesis de la lignina. La transformación de una nueva especie con genes extraños actualmente disponibles, que inducen resistencia a insectos o herbicidas dependerá de la capacidad de plantas completas a partir de células transformadas (Haines, citado por Orellana en 1997).

2.4.2.1. MARCADORES MOLECULARES

La biología molecular y sus rápidos avances en los últimos años ha proveído de las herramientas necesarias al mejoramiento genético de las plantas. Algunas de estas técnicas, como es el caso de los marcadores moleculares, son útiles en la caracterización del germoplasma y la identificación de las características importantes (CIAT 1993).

El uso de los marcadores moleculares en general tienen una gran relevancia en las actividades agroindustriales, para la obtención y caracterización genética de nuevas variedades vegetales, en el control sanitario, calidad de la cadena alimentaria en la detección de los patógenos. Un caso particular es la detección de organismos modificados genéticamente (transgénicos) mediante marcadores en los alimentos (Bueno *et al.* 2001).

Los marcadores se pueden clasificar en morfológicos y marcadores moleculares genéticos. Estos engloban todos los siguientes: Isoenzimáticos o bioquímicos y los marcadores de ADN dentro de los cuales los más importantes son los RFLPS, basados en los fragmentos de restricción, RAPDS (amplificadores al azar de ADN polimórfico), los microsatélites y los AFLPS (amplificación de fragmentos de ADN polimórficos) (Bueno *et al.* 2001).

Los marcadores morfológicos que determinan las características externas y son el primer paso en la identificación, fueron los primeros utilizados en la década de los 60 (Bueno *et al.* 2001). Estos sirven para: Determinar la variabilidad genética en los bancos de germoplasma, desarrollar mapas de ligamento genético e identificar genes específicos con el fin de rastrear su flujo en los programas de mejoramiento (CIAT 1993).

En el caso de los marcadores moleculares genéticos se iniciaron con el uso de isoenzimas y de otros tipos de proteínas. Las isoenzimas son marcadores bioquímicos con alto poder resolutivo para la detección de diferencias genéticas (Bueno *et al.* 2001) ya que permite distinguir genotipos homocigóticos de los heterocigóticos; en otras palabras permite igualar el fenotipo de un individuo con su respectivo genotipo (CIAT 1993).

Los marcadores de ADN los RFLPS fueron los primeros que se utilizaron, en genética humana, más tarde estudiaron su detección y utilización en plantas (CIAT 1993).

La utilización de los marcadores genéticos de ADN han servido para: Construir mapas genéticos de ADN han contribuido en investigaciones de mucha importancia como, la construcción del mapa molecular usando marcadores RFLP y PCR RAPD en *Coffea arabica* (Paillar *et al.* 1996). El uso de marcadores RAPD ha permitido encontrar diversidad genética entre variedades silvestres y cultivadas de *Coffea arabica*, análisis de autoincompatibilidad en *Coffea canephora* usando RFLP (Lashermes *et al.* 1996) entre otros.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, ubicada al Nor - Oeste de la ciudad de San Salvador a 13°43'13" Latitud Norte, 89°12'14" Longitud Oeste y una elevación de 710 msnm.

3.2. MATERIAL VEGETATIVO

Del jardín de Variedades de la Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café (PROCAFE) ubicado en la ciudad de Santa Tecla, Departamento de La Libertad (Fig.5 A) se utilizaron hojas sanas y jóvenes del tercer nudo de las ramas ortótropas (Fig. 5 B) de las variedades de café (*Coffea arabica*): Pacas, Tekisic, Catuai Rojo, Catisic, y Pacamara.

3.3. CONDICIONES FÍSICAS DE CRECIMIENTO

El material vegetal utilizado en la etapa de desinfección, y la inducción de callo embriogénico se cultivó en un cuarto de crecimiento en oscuridad por un mes. Luego ese mismo material se transfirió a la etapa de expresión del callo embriogénico en donde estuvo bajo un fotoperíodo de 8 horas con luz difusa, y 16

horas en oscuridad, proporcionándole una intensidad lumínica de 67 Lux, una humedad relativa en el día 61.66 %, y una temperatura promedio durante el día de 20.62° C.

3.3.1. ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se llevó a cabo en dos etapas, la primera consistió en la búsqueda de un método apropiado de desinfección superficial del material vegetativo. La segunda etapa constó de 2 fases: La inducción a callo indiferenciado y la expresión del callo embriogénico.

3.3.1.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN

Métodos de desinfección:

Las hojas de cada una de las variedades comerciales de café, se lavaron con jabón líquido y agua potable, luego se dejaron reposando en agua destilada por unos minutos, y se sometieron a los tres métodos de desinfección.

cuadro 1: Métodos de desinfección del material vegetativo.

Métodos	Descripción
D ₁	Inmersión en Hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos y luego en Hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
D ₂	Inmersión en Hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos y luego al 8% por 8 minutos
D ₃	Inmersión en Hipoclorito de calcio al 10% por 10 minutos y luego al 8% por 5 minutos. (*)

NOTA: En todos los métodos se hicieron 3 enjuagues con agua destilada estéril después de cada inmersión en las soluciones de Hipoclorito de Calcio

Para definir el mejor método de desinfección en esta etapa bajo condiciones asépticas, a las hojas se les eliminó la nervadura central, los extremos y porciones basales y apicales, seccionándolas en explantes de aproximadamente 1 cm² (Fig.5 C), que fueron colocados en un medio simple de Murashige y Skoog (Apéndice 1) dejándolos en oscuridad durante un mes. Al cabo de una semana se inició la toma de datos, en los 15 tratamientos, evaluando por 2 semanas la sobrevivencia del tejido a los métodos de desinfección y por 4 semanas el porcentaje de contaminación de los explantes.

3.3.1.2. ETAPA DE INDUCCIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO

Después de finalizada la etapa de desinfección y seleccionado el mejor método, se procedió a aplicarlo en las hojas de las 5 variedades de café, los explantes extraídos de 1 cm² fueron colocados en el Medio de Inducción (T1B) propuesto por el CIRAD (Apéndice 1) durante un mes en oscuridad; modificando la concentración de la citocinina 2 Isopentyladenina en el medio nutritivo (Apéndice 2) para conocer el efecto de esta en la inducción a callo embriogénico.

Posteriormente el mismo material vegetal fue transferido a un medio de expresión (T2B) propuesto por el CIRAD (Apéndice 1) y permaneció en condiciones de luz indirecta por 12 semanas, para conocer el potencial embriogénico de las 5 variedades en estudio, por medio de la observación y clasificación de las

características morfológicas del callo como el color y el tipo; así también el tiempo en días necesarios para la expresión de los callos embriogénicos y el porcentaje de explantes con estos callos.

3.4. DISEÑO ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño Completamente al Azar, con un arreglo factorial para conocer la interacción entre las variedades con los métodos de desinfección y los medios de cultivo. Se evaluaron 15 tratamientos para cada una de las etapas de esta investigación (Apéndice 3 y 4) con 4 repeticiones; cada repetición formada por 5 frascos, cada uno de los frascos con 4 explantes.

3.4.1. El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable aleatoria de respuesta

u = Media experimental

T_i = Efecto del tratamiento

E_{ij} = Error experimental

Los resultados se analizaron con el programa GLM de SAS “Statistical Analysis System” y consistió principalmente en un análisis de varianza, y la comparación de medias con la prueba de Duncan.

En la etapa de desinfección se analizaron las variables: Porcentaje de contaminación y porcentaje de sobrevivencia del tejido por medio de un análisis de varianza para las fuentes de variación; variedades, medios de cultivo, y la interacción de ambas fuentes. Además se realizaron pruebas de Duncan a las fuentes de variación; variedades y métodos de desinfección para conocer en cual de ellos se obtendrían los mejores resultados.

Los mismos análisis y pruebas estadísticas se realizaron para las variables porcentajes de explantes con callo indiferenciado y porcentaje de explantes con callo embriogénico, con el fin de determinar cual medio fue más efectivo en cuanto a la formación de callo indiferenciado y callo embriogénico en los genotipos de café en estudio. A las variables color y tipo de los callos no fue necesario hacerles un análisis estadístico, pues son de tipo cualitativo y no cuantitativo.

3.5. VARIABLES EVALUADAS

3.5.1. VARIABLES EVALUADAS EN LA ETAPA DE DESINFECCIÓN

A) Porcentaje de sobrevivencia del tejido a los medios de desinfección.

Durante las dos primeras semanas de cultivo se evaluó la sobrevivencia del tejido, relacionando el número de explantes sobrevivientes dentro de la unidad experimental (constituida por cinco frascos con cuatro explantes c/u) con el total de explantes, multiplicado por 100.

B) Porcentaje de contaminación.

Este valor fue obtenido según el número de frascos dentro de la unidad experimental que presentaban contaminación, en el explante o en el medio, al final de cuatro semanas de cultivo, con relación al total de frascos multiplicado por 100.

3.5.1.2. VARIABLES EVALUADAS EN LA ETAPA DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO

I. Fase de inducción a callo indiferenciado

a) Días de inducción de callo indiferenciado (DICI)

Se contabilizó el tiempo en días a partir de la inoculación o siembra del material vegetativo en el medio de inducción, hasta la aparición de callos indiferenciados en los explantes durante 37 días.

b) Porcentaje de explantes con callo indiferenciado (% ECI) en el medio inicial (T1B = M1) y sus modificaciones (M2 y M3). Esta variable fue medida relacionando el número de explantes que llegaron a formar callo indiferenciado dentro de la unidad experimental, con el total de explantes multiplicado por 100 al final de 37 días de cultivo en el medio.

II. Fase de expresión del callo embriogénico

a) Aspectos morfológicos de los callos embriogénicos

-Tipo de callo: Durante 12 semanas se clasificaron los callos de cada explante de acuerdo a la textura observada (friable, semifriable).

-Color de los callos: Por su coloración los callos se clasificaron como color café y crema; evaluándose durante 12 semanas.

b) Días a expresión del callo embriogénico (DECE): Durante 12 semanas, se cuantificó, los días en que los callos indiferenciados formaron callos embriogénicos en los explantes.

c) Porcentaje de explantes con callo embriogénico (% ECE): Para esta variable se relacionó el número de explantes dentro de la unidad experimental que produjeron callo embriogénico al final de 17 semanas de cultivo en los medios T1B y T2B, con el total de explantes multiplicado por 100.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN

4.1.1. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DEL TEJIDO

Durante esta fase se evaluó por 15 días la sobrevivencia del tejido a los diferentes métodos de desinfección de los cinco genotipos en estudio obteniéndose un 100% de sobrevivencia en todos ellos; manifestándose después de este período efectos normales de oxidación. Las concentraciones de Hipoclorito de Calcio utilizadas fueron toleradas por el tejido de las cinco variedades de café; sin embargo Paz (2000) trabajando con explantes foliares de variedades hondureñas de *Coffea arabica* comprobó que usando concentraciones mayores del 20% se obtienen muy bajos niveles de contaminación pero provoca necrosis al material vegetativo.

4.1.2. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

La eficiencia de los métodos de desinfección fue determinada por el porcentaje de contaminación del material experimental, siendo el mejor el que menor índice de contaminación obtuvo en las cinco variedades en estudio. Como se observa en la figura 1, con el primer método de desinfección (D1) se observaron los más bajos niveles de contaminación.

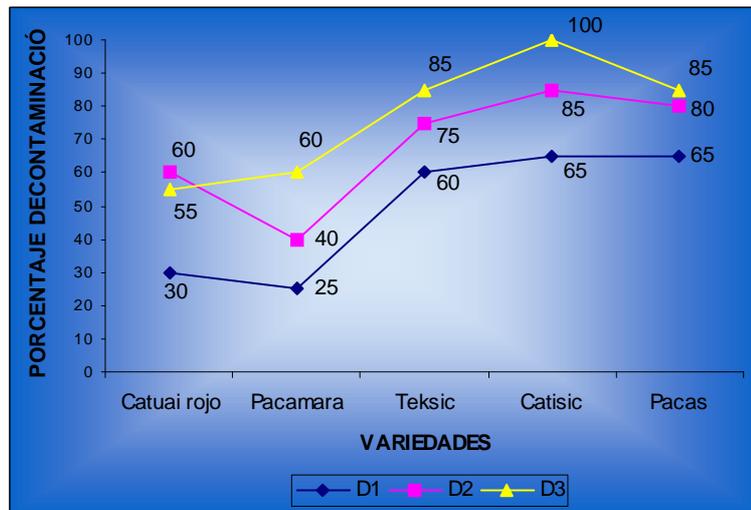


Figura 1. Efectos de tres métodos de desinfección sobre los explantes foliares de cinco variedades comerciales de café (*Coffea arabica*) para el inicio de embriogénesis somática.

El análisis de varianza realizado, demuestra que la diferencia entre los métodos de desinfección es altamente significativa con respecto a los porcentajes de contaminación. Entre las variedades en estudio, también existen diferencias y en la interacción de los métodos de desinfección con las variedades, la diferencia no fue significativa (Apéndice 5).

La prueba de Duncan (Apéndice 6) realizada a los métodos de desinfección mostró que las variedades Catisic, Pacas y Tekisic poseen promedios de contaminación similares estadísticamente; pero diferentes a las variedades Catuai Rojo y Pacamara, no existiendo diferencias significativas entre estas. La variedad Pacamara fue la que mejor respondió a los métodos de desinfección ya que en esta

obtuvo el menor porcentaje de contaminación que fue de 41.66%, la variedad Catuaí Rojo con 48.33%, Tekisic 73.33%, Pacas con 76% y Catisic con 83.33% de contaminación (Apéndice 6) García y Méndez (1987) lograron la formación de plantas a través de embriogénesis somática indirecta en explantes foliares de café "Catimor" utilizando para su desinfección Hipoclorito de Calcio comercial al 10 % diluido al 20 % (2 % de ingrediente activo).

En cuanto a la efectividad entre métodos de desinfección el primer método (D1) fue estadísticamente diferente y superior (49 % de contaminación) al método D2 y D3 y estos entre sí fueron similares estadísticamente con un 68 % y 77 % respectivamente (Apéndice 7). Los niveles de contaminación obtenidos con D1 son similares a los reportados por Etienne *et al.* (1999) en explantes de híbridos F1 de *Coffea arabica* los cuales fueron del 30 % al 70 %.

Los métodos de desinfección varían muy poco entre especies vegetales por ejemplo Berrios *et al.* (1996), micropropagaron 2 variedades de piña (*Ananas comosus L. Merr*) desinfectando las yemas con alcohol al 70 % e Hipoclorito de Sodio comercial al 15 %, manifestándose 30 % de contaminación.

Según Villegas citado por FAO (1990) el porcentaje de contaminación es alto cuando se utiliza tejidos de plantas que crecen en el campo. Los resultados observados en esta investigación podrían ser reflejo de lo expresado anteriormente, debido que el jardín de variedades del cual se obtuvieron los explantes foliares esta

en condiciones de campo. Este tipo de plantas que están expuestas a microorganismos internos y externos son de difícil erradicación, por tal razón las plantas leñosas no son fácilmente establecidas *in vitro*. Además los cafetos poseen unas estructuras cerca de la nervadura central conocidas como domacios, que son poros profundos donde se acumulan microorganismos contaminantes, CIAT citado por Paz (2000). De igual forma Pérez, 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).

En este caso los tipos de contaminación que se presentaron en el material experimental fue fungosa en un 96 % y bacteriana en un 4 %. Por su aspecto macroscópico se determinó que la mayoría de contaminación por hongos fue causada posiblemente por *Penicillium* y en menor cantidad por *Fusarium* y *Rhizoctonia*, encontrados normalmente en el ambiente.

Bonga y Van aderkas, citados por Orellana (1997); manifestaron que el grado de contaminación está determinado por las condiciones climáticas de la región, siendo más difícil la obtención de explantes limpios de plantas del trópico húmedo, que de regiones frías o secas. El material utilizado en esta investigación se recolectó en la época seca, caracterizada por tener las siguientes condiciones: Temperatura de

20.7 °C y una humedad relativa del 73 %. Además el lugar en que crecen las plantas cultivadas *in vitro* influye en dichos niveles, como lo manifestó Villegas citado por FAO (1990) que yemas de durazno crecidas en el campo son difíciles de desinfectar, particularmente en verano. Por su parte Giladi *et al.* (1979), descubrieron que se presenta mayor contaminación cuando se utilizan como fuente de explante ramas de árboles viejos que crecen en el campo, que de plantas jóvenes que crecen en invernadero (Villegas citado por FAO 1990).

En esta investigación se utilizaron explantes foliares de cafetos de los cinco genotipos provenientes de un jardín de variedades situado en el campo, las edades de estos oscilan entre los 9 y 30 años de cultivados; los más bajos niveles de contaminación se manifestaron en la variedad Pacamara que es la plantación más reciente (9 años), confirmando lo antes mencionado.

Además la edad de los explantes es un factor crítico en las especies maderables, la micropropagación es relativamente más fácil cuando se emplean tejidos juveniles, y progresivamente más difícil cuando son adolescentes o maduros (CIAT 1993).

La contaminación también está determinada por la cantidad de tejido. Cuando se trabaja con menor cantidad de éste en condiciones asépticas, menor es la cantidad de microorganismos contaminantes superficiales (Bonga, citada por Torres 1998). Es por ello que se cultivaron explantes foliares de 1 cm², ya que con esta cantidad de tejido el CIAT (1993) y Paz (2000) obtuvieron resultados aceptables.

En cuanto a la oxidación del material experimental utilizado en nuestra investigación inmediatamente después de cortados los explantes, estos se oxidaron en sus extremos; pero esta oxidación fue más notoria a partir de la tercera semana no existiendo una variedad que oxidará más que otra. Al igual que otras especies tropicales, el café contiene altas cantidades de fenoles, el color café que frecuentemente presentan los tejidos bajo cultivo es debido a la formación de quinonas producidas por la oxidación de fenoles (Villegas, citado por FAO 1990).

Las características botánicas de cada especie es otro aspecto que influye en los niveles de contaminación, Fisher y Tsai citado por Villegas (1990) en investigaciones en cocotero, encontraron que la pubescencia del tejido representó un problema para los desinfectantes utilizados. De igual forma la cerosidad que poseen las hojas de cafeto, podría ser una limitante en la acción del producto de desinfección superficial, debido a que los resultados en la etapa de desinfección indican que la variedad Pacamara obtuvo los más bajos niveles de contaminación con los tres métodos de desinfección, ya que al tacto, y en observaciones que se realizaron al microscopio mostró una capa cerosa más delgada que las otras variedades; probablemente esto facilitó la introducción del Hipoclorito de Calcio en los tejidos volviéndolo más eficiente en cuanto a la eliminación de patógenos superficiales.

4.2. ETAPA DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO

4.2.1. FASE DE INDUCCIÓN A CALLO INDIFERENCIADO

Después de la etapa de desinfección y de haber seleccionado el mejor método de desinfección (D3) se evaluaron por 37 días las variedades de café; Catuaí Rojo (V1), Pacamara (V2), Tekisic (V3), Catisic (V4), Pacas (V5); con medios de cultivo de inducción a callo indiferenciado (T1B), al que se le varió la concentración de la hormona 2IP (Apéndice 2) Dicho cambio se realizó con el fin de medir el efecto de esa hormona en cuanto a la formación de callo indiferenciado en los explantes de las variedades antes mencionadas, por medio de las siguientes variables: Días a inducción a callo indiferenciado (DICI) y porcentaje de explantes con callo indiferenciado (% ECI)

4.2.1.1. DÍAS A INDUCCIÓN A CALLO INDIFERENCIADO (DICI)

A los 19 días los explantes de la variedad Tekisic (V3) en el medio de cultivo con 3 mg de 2IP (tratamiento V3M2), iniciaron la formación de callo indiferenciado, siendo el tratamiento que menos tiempo tardó en formarlos. La variedad Catuaí Rojo con los tres medios de cultivo, demostró ser la más tardía e inferior en responder a la formación de callo respecto a las demás variedades y medios ya que, al finalizar la etapa de evaluación (37 días) los explantes aún no los habían expresado. El cuadro 1 muestra el comportamiento de los tratamientos con

respecto al tiempo de formación de los callos indiferenciados (ver además Fig.5 D y 5 E).

cuadro 2. Días de inducción a callo diferenciado después de 37 días de cultivados los explantes de las cinco variedades de café (*Coffea arabica*) en tres medios de inducción.

Tratamientos	Descripción	DICI
V ₁ M ₁	Variedad Catuaí Rojo en el medio de cultivo con 2 mg 2IP	✓
V ₁ M ₂	Variedad Catuaí Rojo en el medio de cultivo con 3 mg 2IP	✓
V ₁ M ₃	Variedad Catuaí Rojo en el medio de cultivo con 4 mg 2IP	✓
V ₂ M ₁	Variedad Pacamara en el medio de cultivo con 2 mg 2IP	21
V ₂ M ₂	Variedad Pacamara en el medio de cultivo con 3 mg 2IP	20
V ₂ M ₃	Variedad Pacamara en el medio de cultivo con 4 mg 2IP	21
V ₃ M ₁	Variedad Tekisic en el medio de cultivo con 2 mg 2IP	20
V ₃ M ₂	Variedad Tekisic en el medio de cultivo con 3 mg 2IP	19
V ₃ M ₃	Variedad Tekisic en el medio de cultivo con 4 mg 2IP	20
V ₄ M ₁	Variedad Catisic en el medio de cultivo con 2 mg 2IP	21
V ₄ M ₂	Variedad Catisic en el medio de cultivo con 3 mg 2IP	X
V ₄ M ₃	Variedad Catisic en el medio de cultivo con 4 mg 2IP	21
V ₅ M ₁	Variedad Pacas en el medio de cultivo con 2 mg 2IP	20
V ₅ M ₂	Variedad Pacas en el medio de cultivo con 3 mg 2IP	20
V ₅ M ₃	Variedad Pacas en el medio de cultivo con 4 mg 2IP	20

DICI= Días de inducción a callo indiferenciado, X= Tratamiento eliminado por contaminación.

✓ = No hubo formación de callo indiferenciado.

4.2.1.2. PORCENTAJE DE EXPLANTES CON CALLO INDIFERENCIADO

(%ECI)

Como muestra la figura 2, el medio de inducción M3 (4 mg de 2IP) usado en la variedad Catisic dio como resultado el mayor número de explantes con callo indiferenciado (77.5 %). La variedad Pacamara fue la que presentó el menor valor (8.75 %) en el medio M2 (3 mg de 2IP) (Apéndice 8).

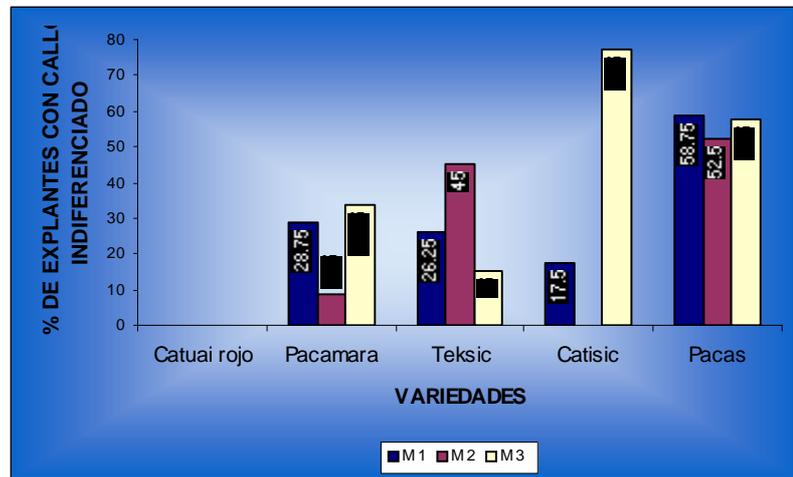


Figura 2. Efectos de los medios de cultivo con 2IP en la formación de callo indiferenciado en los explantes foliares de cinco variedades comerciales de café (*Coffea arabica*).

El análisis estadístico para esta variable mostró que las fuentes de variación; medio de cultivo y variedades son altamente significativas y la interacción entre medios y variedades no es significativa (Apéndice 9). La prueba de Duncan realizada a las variedades señaló que Tekisic, Pacas, y Catisic son estadísticamente iguales entre ellas y superiores a la Pacamara y Catuai Rojo siendo esta última diferente e inferior a la variedad Pacamara (Apéndice 10). Para los medios, la prueba de Duncan determinó que no existe diferencia estadística en los medios conteniendo 2 mg, 3 mg, y 4 mg de 2IP (Apéndice 11).

Dublín citado por Berthouly (1986) expresan que el proceso de embriogénesis somática en el género *Coffea* se inicia con la fase de Caulogénesis

que se desarrolla en la oscuridad por cuatro semanas en un medio con reguladores de crecimiento, auxinas (2,4-D y AIB) solas o en combinaciones y una citocinina (BAP o 2IP). En esta investigación se logró la formación de callo indiferenciado (Fig. 5A) en dichas condiciones en promedio de 19 a 21 días en cuatro de las variedades cultivadas. El tiempo de formación de callos indiferenciados en los explantes de las variedades con los diferentes medios en estudio fue bastante similar probablemente por lo expresado por CIAT (1993). en cuanto a la función de la citocininas y auxinas en el medio primario con respecto a la sincronización y determinación de las células embriogénicas maternas. Además Thorpe; citado por Tiset *et al.* (1993,) comprobaron que en los explantes, ciertas células están preacondicionadas para eventos morfogenéticos que llevan a la embriogénesis somática en presencia de reguladores de crecimiento. También Hartman y Kester (1997) citados por Paz (2000) manifestaron que las auxinas y citocininas regulan el crecimiento y desarrollo de los explantes, a lo que se llama control hormonal el cual se realiza por la clase de hormona, la concentración y la secuencia con que se proporciona.

El tiempo de formación de callo indiferenciado obtenido en esta investigación usando la auxina (2,4-D) y citocinina (2IP) no es muy diferente a los resultados de otros estudios. Por medio de embriogénesis somática indirecta Santos *et al.* (1994), obtuvieron callos indiferenciados en explantes de hojas de *Nerium oleander* usando

un medio MS con 2,4-D y BAP después de 14 días de cultivo, usando un medio de composición similar. Carimi *et al.* (1994) indujeron embriogénesis somática en estilos de *Citrus limon* en el cual obtuvieron callos indiferenciados de 2 semanas de cultivo.

Button *et al.* Evans y otros, citado por Lozoya (1990) mencionan que es posible obtener callo indiferenciado después de tres semanas de cultivo de óvulos inmaduros en cítricos en un medio MS, conteniendo Cinetina, AIB y agar.

El porcentaje de explantes que llegaron a formar callo indiferenciado en las variedades cultivadas de café en los tres tipos de medios, fueron diferentes. Estos resultados pudieran ser atribuidos a que existe un control natural en los genotipos, que los hace responder de una forma distinta a diversas citocininas y auxinas lo que fue confirmado por Hartman y Kester (1997).

Merino (1998) usando explantes foliares provenientes de microestacas de los híbridos Etiopía 29 y Kaffa - 2, cultivados en medio sin citocininas y en presencia de una sola auxina no llegaron a formar callos en la etapa de inducción, por el contrario en la misma investigación usando un medio de inducción, un alto porcentaje de los explantes (91 %) llegaron a formar callo indiferenciado, teniendo en cuenta que éste medio es un Murashige and Skoog al 50 %, suplementado con 1 mg de AIB, 0.5 mg de 2,4-D y 2 mg de 2IP.

4.2.2. FASE DE EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO.

Los explantes de las variedades provenientes de los medios de inducción (T1B) con diferentes concentraciones de 2IP después de 37 días de cultivo, se transfirieron a un medio de expresión (Apéndice 1) en el cual pasaron 84 días más.

4.2.2.1.. DÍAS A EXPRESIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO (DECE)

La figura 3 muestra que a los 7 días de transferidos los explantes en el medio T2B; las variedades Pacamara (en el medio M2 y el M3), la Tekisic (con el medio M1 y el M2), la Catisic (con el medio M1 y el M3), la Pacas (con el M1 el M2 y M3), fueron las que más rápido respondieron a la expresión de callo embriogénico (Fig. 5 F).

En la variedad Pacas los tres medios expresaron la embriogénesis somática a los 7 días, mientras que en la variedad Catuaí Rojo únicamente el M2 expresó dicha respuesta hasta los 42 días. En general todos los medios expresaron la embriogénesis somática en corto tiempo (Apéndice 12).

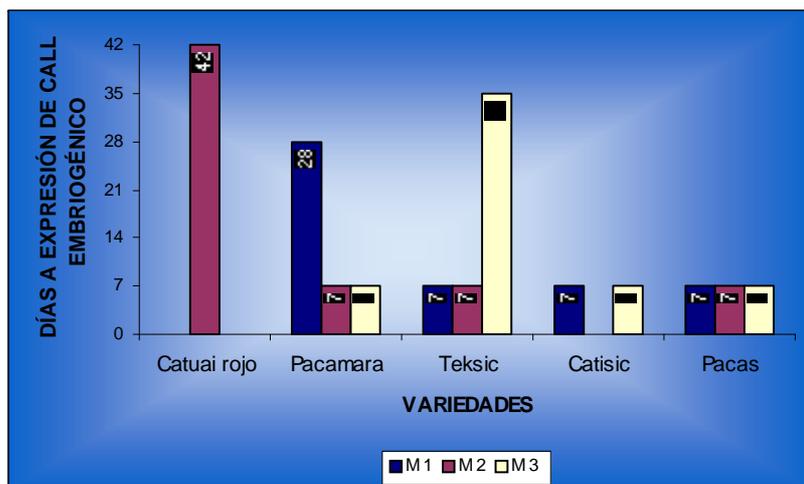


Figura 3. Efecto residual del 2IP en los días de expresión de callo embriogénico en los explantes en cinco variedades de café (*Coffea arabica*).

4.2.2.2. PORCENTAJE DE EXPLANTES CON CALLO EMBRIOGÉNICO (%ECE)

En la figura 4 se observa que los explantes de la variedad Catisic (V4) provenientes del medio de inducción M3 cultivados en el medio T2B al término de 84 días de cultivo en éste, expresó el mayor porcentaje de explantes con callo embriogénico (65%), la variedad Catuaí Rojo no respondió a dicha expresión. En la misma figura se puede observar las diferentes respuestas de las variedades en estudio con respecto al porcentaje de expresión de callo embriogénico (Apéndice 12).

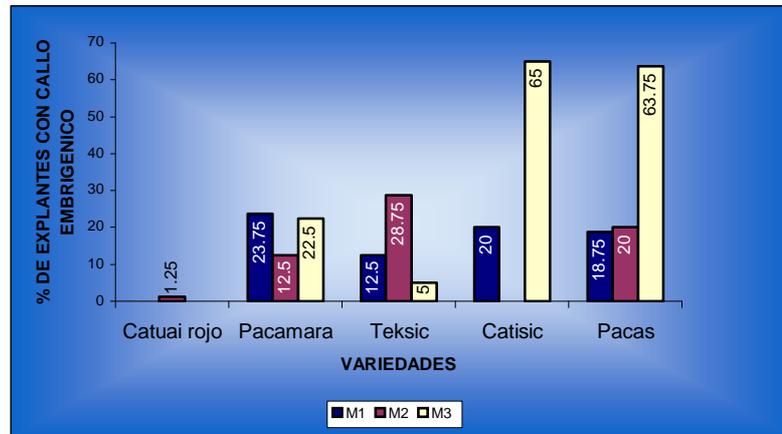


Figura 4. Efecto residual del 2IP en el porcentaje de explantes con callo embriogénico en cinco variedades de café (*Coffea arabica*).

El análisis de varianza para la variable % ECE, manifestó que existen diferencias altamente significativas en las fuentes de variación: Tratamiento, medios, variedades y la interacción entre medios y variedades (Apéndice 13). Debido a ello fue necesario realizar pruebas de Duncan para las fuentes medios de cultivos y variedades y conocer el comportamiento estadístico de ambas, con respecto a la formación de callo embriogénico.

La prueba de Duncan demostró que las variedades Catisic y Pacas son estadísticamente superiores e iguales entre sí, y diferentes a las variedades Pacamara, Tekisic y Catuaí Rojo. Las variedades Pacamara y Tekisic son estadísticamente similares y superiores a la Catuaí Rojo (Apéndice 14).

Con la prueba de Duncan se determinó que el medio de cultivo con 4 mg de 2IP (M3) fue superior a los medios con 3 mg (M2) y 2 mg (M1), siendo estos dos últimos iguales estadísticamente (Apéndice 15).

El porcentaje de explantes que formaron callo embriogénico (0-65 %) y el tiempo que tardaron en aparecer (7-42 días) difirió en las variedades en estudio; confirmando lo expresado por Zamarripa citado por Merino (1998) sobre la existencia de una fuerte interacción entre el genotipo seleccionado y el medio de cultivo, lo que se traduce en los diferentes grados de respuesta en la formación de callo embriogénico en los explantes de café y otras especies vegetales. Además Flink *et al.* Citados por Litz y Jarret (1993) mencionan que puede haber una variación considerable en la respuesta embriogénica de ciertos explantes pertenecientes a la misma especie vegetal.

4.2.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL CALLO EMBRIOGÉNICO

Todos los callos con expresión embriogénica presentaron coloración blanco crema con características friables.

La fase de diferenciación se desarrolla a luz indirecta en un medio con una sola citocinina (BAP) o en asociación con una auxina como el 2,4-D (Berthouly 1987) Sondhal citado por Merino (1998) afirmó que es necesario la presencia tanto

de citocininas como de auxinas para la proliferación de callo embriogénico. Esto se confirma con los resultados de color y tipo de callos obtenidos en esta investigación.

Kuan (1990) mencionó que las citocininas además de promover la división celular influyen en la diferenciación de los tejidos; en esta investigación los explantes provenientes de los medios de inducción a los 7 días de transferidos en el medio de expresión T2B, se inició el crecimiento de masas celulares de color blanco crema de aspecto friable sobre los callos indiferenciados de color café y aspecto friable y semifriables, en algunos explantes de la mayoría de las variedades cultivadas, considerándose como una manifestación de los primeros callos embriogénicos. El aspecto de estos callos fue similar, a los obtenidos por Sondhal y Sharp (1979) en explantes foliares de cafetos por embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF); al igual García y Méndez (1987) en explantes foliares de cafeto Catimor obtuvieron callos friables de color blanco en un medio suplementado con 2IP e IBA. También Merino (1998) utilizando explantes de hoja de los cafetos híbridos Etiopía 29 y Kaffa – 2 logro la formación de callos embriogénicos blancos y friables.

Carimi *et al.* (1994) trabajando con estilos de limón obtuvieron de 36.6 % a 46.2 % de callos friables blanco cremoso en un medio suplementado con BA (Benzilaminopurina). Después Kim *et al.* (1993) cultivando anteras de *Catharanthus roseus* por 2 a 3 meses, obtuvieron callos blancos y friables en un 50 % en un medio basal con NAA y Kinetina después de cuatro semanas.



Figura 5: Proceso de embriogénesis somática en variedades comerciales de café (*Coffea arabica*). A. Jardín de variedades de Café. B) Hojas del tercer nudo. C) Explante foliar. D y E) Formación de callo indiferenciado. F) Callo embriogénico. G) Inicio de la Embriogénesis Somática. H , I) Embriones Somáticos en fase globular. J) Embrión en fase de Torpedo. K) Embrión Cotiledonal. L) Germinación de Embriones somáticos.

5. CONCLUSIONES

- El método más eficiente para la desinfección de explantes foliares de variedades de café provenientes del campo fue el de mayor tiempo de inmersión del tejido vegetal, 20 y 10 minutos en concentraciones de 10 % y 8 % de solución de hipoclorito de calcio, respectivamente lográndose con éste los más bajos niveles de contaminación.
- De los métodos de desinfección evaluados, ninguno de ellos afectó negativamente el tejido y no provocó muerte inmediata de éste en las cinco variedades de café, indicando que las cantidades de Hipoclorito de Calcio en todos los tiempos de inmersión fueron toleradas por los mismos.
- Los explantes de la variedad Tekisis en el medio de inducción con 3mg de 2IP formaron callo indiferenciado a los 9 días, no obstante fue la variedad Catisic en el medio de inducción con 4 mg de 2IP la que mayor número de explantes con callo indiferenciado produjo.
- Al igual que otras investigaciones en los explantes foliares de los genotipos de café evaluados en esta investigación se formaron callos color café de tipos friables y semifriables (callo indiferenciado) que no lograron diferenciarse en la etapa de expresión embriogénica.

- En la mayoría de tratamientos, excepto los de la variedad Catuaí Rojo, se expresó la embriogénesis somática a los 7 días.

- En los explantes foliares de las cinco variedades que formaron callo de color blanco crema y tipo friable se desarrollaron posteriormente embriones somáticos; por lo tanto se confirmó los resultados de otros investigadores que los callos con dichas características son embriogénicos.

6. RECOMENDACIONES

- Para dar inicio al proceso de embriogénesis somática con material proveniente del campo se recomienda su desinfección con soluciones de Hipoclorito de Calcio al 10 % y 8 % por un tiempo de 20 y 10 minutos de inmersión, respectivamente realizando tres enjuagues con agua destilada estéril después de cada inmersión.
- Para obtener el mayor porcentaje de explantes con callo embriogénico se recomienda la utilización del medio de cultivo con 4 mg de 2IP en la fase de inducción en las variedades comerciales Catisic y Pacas.
- Es conveniente hacer subcultivos (repiques) constantemente del material vegetal cultivado *in vitro* para conservar su potencial embriogénico en la fase de expresión hasta que se manifieste dicho potencial.
- Se recomienda investigar las fases de suspensión celular, desarrollo, maduración y germinación de embriones somáticos provenientes de variedades comerciales de café.
- Seleccionar plantas élites de café de genotipos de alto interés comercial, con características agronómicas deseables, para continuar con la investigación de embriogénesis somática.

- Es necesario proponer y realizar investigaciones utilizando estos cultivares de café hasta la fase de aclimatación en campo de plantas obtenidas por esta técnica, las cuales han sido seleccionadas por sus características agronómicas.

- Se recomienda mejorar las condiciones físicas, ambientales, y de manejo del laboratorio de cultivo de tejidos de esta facultad para disminuir los niveles de contaminación e incrementar la calidad y cantidad de plantas propagadas en éste.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour. A. Vicent. Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. Pc. 38.
- Albarrán, J. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en biorreactores simplificados. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Centro Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Pc 12 – 13.
- ASOCIACIÓN CAFETALERA DE EL SALVADOR. 2000. Monografía del café, dos siglos de historia en la caficultura salvadoreña. San Salvador, El Salvador. Imprenta Criterio 136 p.
- 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.
- Bueno, MA; Manzanera, JA; Grau, JM; Sánchez, N; Gómez A. 2001. Propagación in vitro de *Populus tremula* l. y *Populus alba* l. INIA Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y alimentaría. Madrid, España. Imprenta Kadmos. pc 27 – 51.
- Carimi, F.; De Pasquele, F.; Grulio Crescimanno, F. 1994. Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*). Plant cell, tissue and organ culture 37: pc 209- 211

- CENICAFE (Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Comité departamental de cafeteros de caídos. División Técnica, Centro Nacional de Investigación del Café. 1988. Tecnología del cultivo del café. 2 ed. Pc 88 – 90.
- Cerón, F. 1987. Uso de reguladores de crecimiento vegetal de la inducción in vivo de yemas axilares latentes de *Coffea arabica*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. Centro Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) pc 5 – 9.
- CIAT (Centro Internacional de Agronomía Tropical) 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Eds W R Roca; L. A. Mroginski. Cali, Colombia. 970 p.
- Coste, R. 1954. Cafetos y cafés en el Mundo (Tomo 1). Barcelona, España, Talleres de I. G. Seix y Borrall Hnos. pc 17 – 20.
- Choussy, F. 1934. El café, historia. Vol. II. El Salvador pc 136 – 142.
- Dijkman, M.J.; Wehlborg. 1986. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. 7ª. Ed. México. Editorial Limusa, V. 2, Pc. 877 – 886.
- Etienne, H.; Etienne, D.; Vásquez, N.; Berthouly, M. 1999. Aportes de las biotecnologías al mejoramiento genético del café; el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. Desafíos de la Caficultura Centroamericana, Capítulo 13. Publicación CIRAD/PROMECAFE IICA (Ed). San José, Costa Rica.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 1990. fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales: Método aséptico.
- García de E.; Méndez, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares de cafeto “Catimor”. Universidad Central de Venezuela. Café cacao te, Vol. 31. pc 15 – 22.
- Greulach, V.A.; Edison, A. J. 1970. Las plantas introducción a la botánica moderna. México. Editorial Limusa – Wiley pc 495 – 517.
- Girón, I. E. 1998. Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Centro Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 92 P.
- Hartman, H.T.; Kester, D.E. 1997. Propagación de plantas principios y prácticas. Traducido por Antonio Mario Ambrosio. 5ª. Reimpresión D.F. México. Compañía Editorial Continental, pc. 596 – 599, 757 p.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura PROMECAFE. 1997. Simposio Latinoamericano de Caficultura. San José, Costa Rica. Editorama,. pc. 25 – 49, 520 p.
- ISIC (Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café). 1987. Fisiología del cafeto. Nueva San Salvador, El Salvador, Offset ISIC Depto. Comunicaciones. Pc. 40 – 46, 175 p..
- Izquierdo, M. 1993. Ingeniería Genética. Madrid, España, Ediciones Pirámide, S.A. pc. 99, 221 p.
-

- Juscafresca, B. 1974. El injerto y la hibridación en los árboles, arbustos y plantas ornamentales. Barcelona, España. Serrahima y Urpí, S. A. pc 15 – 16, 127 p.
- Kester.; Davies. 1990. Plant Hormones Physiology Biochemistry and molecular Biology and editor. 2° ed. pc. 37-42
- Kim, S. W.; Song, N. H.; Jung, K. H.; Kwak, S. S.; Liu, J. R. 1994. High frequency plant regeneration from anther derived cell suspension cultures via somatic embryogenesis in *catharanthus roseus*. Plant cell reports 13: pc 319 – 322.
- Kuan, O. 1990. Introducción a la técnica de cultivo de tejido. Institución Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica. 86 p.
- Lashermes, P.; Cros, J.; Combes, C., Trouslot, P.; Hamon, S.; Charrier, A. 1995. Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the hybrids *Coffea* L. theor appl genet 93: pc 626 – 632.
- Lashermes, P.; Conturon, E.; Moreau, N.; Paillard, M.; Louarn, J. 1996. Inheritance and genetic mapping of self. Incompatibility in *coffea canephora*, pierre – theor appl genet 93: pc 458 – 462.
- Lashermes, P.; Trouslot, P; Anthony, F; Combes, M.; Charrier, A.; 1996. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87: pc 59-64.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos Tropicales. IICA(Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) San José Costa Rica. pc 194-203.
-

- Litz R. E.; Jarret, R. L. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos embriogénesis somática y organogénesis. In Roca, W.M.; Mroginski, L.A. eds. Cultivos de tejidos en la agricultura . Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia. pp. 144- 172
- López.; 1990. Medios de cultivo. In FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).Via delle terme di caracalla. Roma, Italia. pc 15- 19.
- Lozoya, H- 1990. Embriogénesis somática. In FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)Via delle terme di caracalla. Roma, Italia.
- Martínez, C; s.f. Algunas tendencias de la Ingeniería Genética en la Biotecnología Forestal pc 4-6.
- Merino, C. 1998. Informe sobre el aprendizaje de la Biotecnologías aplicadas al café. Reporte de capacitación. Centro de Investigación de NESTLE tours Francia 28 p.
- Molina, J. 1967. Formación, desarrollo y maduración de los frutos del café. Tegucigalpa, Honduras. Pc. 33-34.
- 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). pc 82.
- Paillard, M; Lashermes, P; Petiard, V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor Appl Genet* 93:pc 41-47.

- Paz, A. 2000. Inducción de Embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. Tesis para optar a Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Lic. Zamorano Honduras. pc.14-19. 35 p.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. por Luis Ayerbe Mateosagasta. 3°ed. Madrid, España. Artes Gráficas Palermo, Ediciones mundiprensa. pc 90-95.
- PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la investigación del Café. 1995. La práctica del injerto en el cultivo del cafeto. Nueva San Salvador. La Libertad pc. 3-15.
- PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café 1997. Boletín Estadístico de la caficultura Salvadoreña. Nueva San Salvador, La Libertad. pc 1-20.
- PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café 1998. Boletín Estadístico de la caficultura Salvadoreña. Nueva San Salvador, La Libertad. pc 5-14.
- Santos, I; Guimaraes, I, Salema, R. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Nerium oleander*. Plant Cell, Tissue and organ culture 37: pc 83-86.
- Torres, AC; Caldas, LS; Buso, JA. 1998. Cultura de tecidos e transformacao genética de plantas. Embrapa – sp1. Embrapa – CNPH: Brasilia. 864p
- Villegas , A. 1990. Métodos asépticos. In FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Villa delle terme di caracalla. Roma, Italia. pc. 21-22.

APÉNDICES

Apéndice 1. Composición química de los medios de inducción y expresión (MS)

Composición	Inducción T ₁ B (CIRAD)	Expresión T ₂ B (CIRAD)
Macronutrientes/2*	25	25
Micronutrientes/2*	25	2.5
Fe EDTA/2*	2.5	2.5
Tiamina HCl	1	20
Myo Inositol	100	200
Ac. Nicotínico	1	
Pyridoxina	1	
Glicina	1	
L. Cysteina		20
Extracto de malta	400	800
Hidrocaseina	100	200
Sulfato de Adenina	0	60
2, 4D	0.5	1
AIB	1	
2IP	Diferentes concentraciones de materiales y métodos	
BAP	0	4
SACAROSA**	30	30
Gelrite**	4	4

* ml/L

** g/L

Las demás medidas están dadas en mg/L

Apéndice 2. Medios de inducción a callo variando la hormona 2 Isopentyladenina.

Medios de cultivos	Descripción
M ₁	Medio de cultivo de inducción T ₁ B
M ₂	Medio de cultivo de inducción T ₁ B + 1 mg 2IP
M ₃	Medio de cultivo de inducción T ₁ B + 2 mg 2IP

Apéndice 3. Tratamientos evaluados en la etapa de desinfección.

Métodos	Descripción
T ₁	Variedad Tekisic = 20 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₂	Variedad Tekisic = 15 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 8 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₃	Variedad Tekisic = 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 5 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₄	Variedad Catisic = 20 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₅	Variedad Catisic = 15 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 8 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₆	Variedad Catisic = 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 5 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₇	Variedad Catuaí = 20 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₈	Variedad Catuaí = 15 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 8 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₉	Variedad Catuaí = 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 5 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₁₀	Variedad Pacas = 20 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₁₁	Variedad Pacas = 15 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 8 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₁₂	Variedad Pacas = 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 5 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₁₃	Variedad Pacamara = 20 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₁₄	Variedad Pacamara = 15 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 8 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.
T ₁₅	Variedad Pacamara = 10 minutos con Hipoclorito de Calcio al 10% + 5 minutos con Hipoclorito de Calcio al 8%.

Apéndice 4. Tratamientos evaluados en la etapa de inducción y expresión de callo embriogénico en la fase de inducción a callo indiferenciado.

Tratamientos	Descripción
V ₁ M ₁	Catuaí Rojo en el medio de cultivo con 2 mg 2IP
V ₁ M ₂	Catuaí Rojo en el medio de cultivo con 3 mg 2IP
V ₁ M ₃	Catuaí Rojo en el medio de cultivo con 4 mg 2IP
V ₂ M ₁	Pacamara en el medio de cultivo con 2 mg 2IP
V ₂ M ₂	Pacamara en el medio de cultivo con 3 mg 2IP
V ₂ M ₃	Pacamara en el medio de cultivo con 4 mg 2IP
V ₃ M ₁	Tekisic en el medio de cultivo con 2 mg 2IP
V ₃ M ₂	Tekisic en el medio de cultivo con 3 mg 2IP
V ₃ M ₃	Tekisic en el medio de cultivo con 4 mg 2IP
V ₄ M ₁	Catisic en el medio de cultivo con 2 mg 2IP
V ₄ M ₂	Catisic en el medio de cultivo con 3 mg 2IP
V ₄ M ₃	Catisic en el medio de cultivo con 4 mg 2IP
V ₅ M ₁	Pacas en el medio de cultivo con 2 mg 2IP
V ₅ M ₂	Pacas en el medio de cultivo con 3 mg 2IP
V ₅ M ₃	Pacas en el medio de cultivo con 4 mg 2IP

Apéndice 5. Análisis de varianza para los resultados de la etapa de desinfección en la variable porcentaje de contaminación.

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrado	Cuadrado Medio	F. Calculada	Pr. > F
Tratamiento	14	26493.33333	1820.95238	4.02	0.0002
Método	2	8173.33333	4086.66667	9.01	0.0005
Variedad	4	16360.00000	4090.00000	9.02	0.0001
Método * Variedad	8	960.00000	120.00000	0.26	0.9741
Error experimental	45	20400.000	453.33333	-	-
Total	59	45893.3333	-	-	-

G.L. = Grados de Libertad.

Apéndice 6. Prueba de Duncan para las variedades con los resultados de porcentajes de contaminación (5% de significancia)

Variedades	Medias de Contaminación	N	Duncan
Catisic	83.333 %	12	A
Pacas	76.667 %	12	A
Tekisic	73.333 %	12	A
Catuaí Rojo	48.333 %	12	B
Pacamara	41.667 %	12	B

Apéndice 7. Prueba de Duncan para la fuente métodos de desinfección del material vegetativo, con los resultados de porcentaje de contaminación (5% de significancia).

Métodos	Medias	Duncan
D3	77.000	A
D2	68.000	A
D1	49.000	B

Apéndice 8. Porcentaje de callo indiferenciado al término de la fase de inducción.

Repetición	Tratamiento	% ECI
1	V ₁ M ₁	0.00
2	V ₁ M ₂	0.00
3	V ₁ M ₃	0.00
4	V ₂ M ₁	28.75
5	V ₂ M ₂	8.75
6	V ₂ M ₃	33.75
7	V ₃ M ₁	26.25
8	V ₃ M ₂	45.00
9	V ₃ M ₃	15.00
10	V ₄ M ₁	17.50
11	V ₄ M ₂	X
12	V ₄ M ₃	77.50
13	V ₅ M ₁	58.75
14	V ₅ M ₂	52.50
15	V ₅ M ₃	57.50

% ECI = Porcentaje de explantes con callo indiferenciado.

X = Tratamiento eliminado por contaminación.

Apéndice 9. Análisis de varianza para la variable porcentaje de explantes que formaron callo indiferenciado (% ECI).

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F. Calculada	Pr. > F
Tratamiento	13	34544.875000	2657.298076	7.71	0.0001
Método	2	1167.425000	583.712500	1.69	0.0001
Variedad	4	29155.058333	7288.764583	21.14	0.0001
Método * Variedad	7	4222.39166	603.198809	1.75	0.1237
Error experimental	42	14483.260000	344.839285	-	-
Total	55	49028.125000	-	-	-

G.L. = Grados de Libertad.

Apéndice 10. Prueba de Duncan para variedades en la variable porcentaje de explantes con callo indiferenciado (%ECI).

Variedades	Medias de % ECI	N	Duncan
Pacas	85.833 %	12	A
Catisic	78.125 %	8	A
Tekisic	60.417 %	12	B
Pacamara	50.417 %	12	B
Catuaí Rojo	21.333 %	12	C

Apéndice 11. Prueba de Duncan para los medios de cultivo en la variable porcentaje de explantes con callo indiferenciado (%ECI).

Medios	Medias de % ECI	N	Duncan
M ₃	64.000	20	A
M ₁	54.550	20	A
M ₂	54.375	16	A

Apéndice 12. Resultados de la fase de expresión del callo embriogénico (promedio por tratamiento).

	Tratamiento	DECE	ECE
1	V ₁ M ₁	0	0.00
2	V ₁ M ₂	80	1.25
3	V ₁ M ₃	0	0.00
4	V ₂ M ₁	66	23.75
5	V ₂ M ₂	45	12.50
6	V ₂ M ₃	45	22.50
7	V ₃ M ₁	45	12.50
8	V ₃ M ₂	45	28.75
9	V ₃ M ₃	73	5.00
10	V ₄ M ₁	45	20.00
11	V ₄ M ₂	X	X
12	V ₄ M ₃	45	65.00
13	V ₅ M ₁	45	18.75
14	V ₅ M ₂	45	20.00
15	V ₅ M ₃	45	63.75

DECE = Días a expresión de callo embriogénico.

% ECE = Porcentaje de explantes con callo embriogénico.

Apéndice 13. Análisis de varianza para tratamientos medios de cultivo, con respecto a la variable porcentaje de explantes con callo embriogénico (%ECE).

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F. Calculada	Pr. > F
Tratamiento	13	2205.23214286	1696.32554945	9.05	0.0001
Medio	2	3283.48214286	1641.74107143	8.76	0.0007
Variedad	4	10692.96875000	2673.24218750	14.27	0.0001
Medio* Variedad	7	8075.78125000	1153.68303571	6.16	0.0001
Error experimental	42	7868.75000000	187.35119048	-	-
Total	55	29920.98214286	-	-	-

G.L. = Grados de Libertad.

Apéndice 14. Prueba de Duncan en la variable porcentaje de explantes con callo embriogénico (%ECE).

Variedades	Media	Duncan
Pacas	42.500 %	A
Catisic	34.167 %	A
Pacamara	19.583 %	B
Tekisic	15.417 %	B
Catuai Rojo	0.417 %	C

Apéndice 15. Prueba de Duncan para los medios de la variable porcentaje de explantes callo embriogénico (%ECE).

Medios	Medias de % EFCI	Duncan
M ₃	31.260	A
M ₂	15.625	B
M ₁	15.000	B