

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



Evaluación de protocolos de desinfección y medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos en café (*Coffea arabica*) variedad Bourbon en El Salvador.

POR:

Moreno Carranza, Luz Esmeralda

Vásquez Osegueda, Elías Antonio

Ciudad Universitaria 1 de diciembre de 2017.

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



Evaluación de protocolos de desinfección y medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos en café (*Coffea arabica*) variedad Bourbon en El Salvador.

POR:

Moreno Carranza, Luz Esmeralda

Vásquez Osegueda, Elías Antonio

Ciudad Universitaria 1 de diciembre de

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



Evaluación de protocolos de desinfección y medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos en café (*Coffea arabica*) variedad Bourbon en El Salvador.

POR:

Moreno Carranza, Luz Esmeralda

Vásquez Osegueda, Elías Antonio

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

Ingeniero(a) Agrónomo

Ciudad Universitaria 1 de diciembre de 2017

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

RECTOR

LIC. M.SC. ROGER ARMANDO ÁRIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

DECANO

ING. AGR. M.SC. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO

ING. AGR. M.SC. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

F. \_\_\_\_\_

Ing. Agr. M.Sc. Fidel Ángel Parada Berríos

DOCENTE DIRECTOR

F. \_\_\_\_\_

Ing. Agr. M.Sc. Mario Antonio Orellana Núñez

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

F. \_\_\_\_\_

Ing. Agr. Mario Alfredo Pérez Ascencio

## RESUMEN

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del Departamento de Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, de febrero a noviembre de 2016, donde se evaluaron cuatro protocolos de desinfección que consisten en reducir los porcentajes de agentes contaminantes como lo son bacterias, hongos y levaduras, y que ya se encuentran establecidos por diferentes Centros de Investigación, con el propósito de determinar el mejor para la introducción de explantes provenientes de hojas de plantas sanas de café (*Coffea arabica*) de 12 años de edad de la variedad “Bourbón” del Jardín de Variedades de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), ubicado en Santa Tecla, La Libertad, El Salvador. La segunda etapa de la investigación consistió en evaluar dos medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos, el primero propuestos por Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo; CIRAD, y el segundo utilizado por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; CATIE; para lo cual se utilizó un Diseño estadístico Completamente al Azar, evaluando cuatro protocolos de desinfección, con cuatro repeticiones de 10 unidades experimentales. Para la etapa de inducción al callo se evaluaron dos medios de cultivo, con cuatro repeticiones de 10 unidades experimentales. El objetivo principal de la investigación fue Identificar una metodología adecuada comparando protocolos de desinfección y medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos en explantes de hoja de café variedad “Bourbón”. Los resultados mostraron que: el tratamiento cuatro que consistió en asperjar los arbustos con Azoxystrobin 50 % en concentraciones de 1g/L durante tres días consecutivos y luego se procede a la desinfección en laboratorio con una solución antioxidante (1mg/L de Azoxystrobin 50 %, 150 mg/L de ácido cítrico, 100 mg/L de ácido ascórbico y sacarosa 30 g/L) preparada y esterilizada previamente un día antes de la inoculación; propuesto por el INIFAP fue el que mejores resultados mostró en comparación a los demás tratamientos. Para la etapa de inducción a embriogénesis somática el tratamiento dos desarrollado por CATIE mostró los mejores resultados con al menos 10 explantes con la formación de embriones somáticos en estado globular.

Este trabajo concluye que el protocolo de desinfección de INIFAP y el protocolo de inducción y formación de embriones somáticos de CATIE serían los indicados de acuerdo a este estudio para la producción de plantas vía embriogénesis somática con explantes de hojas de café variedad “Bourbon”.

**Palabras claves:** Café, embriogénesis somática, inducción, desinfección, protocolos.

## **ABSTRACT**

The research was carried out in the Agricultural Biotechnology laboratory of the Department of Phytotechnics of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of El Salvador, from February to November 2016, where four disinfection protocols were evaluated, which consist of reducing the percentages of contaminating agents such as bacteria, fungi and yeast, and which are already established by different Research Centers, with the purpose of determining the best for the introduction of explants from leaves of healthy coffee plants (*Coffea arabica*) of 12 years of age of the variety "Bourbon" of the Variety Garden of the Salvadoran Foundation for Coffee Research (PROCAFE) , located in Santa Tecla, La Libertad, El Salvador. The second stage of the investigation consisted in evaluating two culture media for the induction of embryogenic calluses, the first proposed by the international cooperation center in agronomic research for development; CIRAD, and the second used by the Tropical Agronomic Research and Training Center; CATIE; for which a randomized statistical design was used, evaluating four disinfection protocols, with four repetitions of 10 experimental units. For the callus induction stage, two culture media were evaluated, with four repetitions of 10 experimental units. For the callus induction stage, two culture media were evaluated, with four repetitions of 10 experimental units. The main objective of the research was to identify an adequate methodology comparing disinfection protocols and culture media for the induction of embryogenic calluses in coffee leaf explants "Bourbon" variety. The results showed that: treatment four consisted of sprinkling the bushes with Azoxystrobin 50% in concentrations of 1g / L for three consecutive days and then proceeded to disinfection in the laboratory with an antioxidant solution (1mg / L of Azoxystrobin 50%, 150 mg / L of citric acid, 100 mg / L of ascorbic acid and sucrose 30 g / L) prepared and sterilized previously one day before inoculation; proposed by the INIFAP was the one that showed the best results compared to the other treatments. For the stage of induction to somatic embryogenesis the treatment two developed by CATIE showed the best results with at least 10 explants with the formation of somatic embryos in globular state.

This work concludes that the disinfection protocol of INIFAP and the protocol of induction and formation of somatic embryos of CATIE would be those indicated according to this study for the production of plants via somatic embryogenesis with explants of leaves of coffee variety "Bourbon"

Key words: Coffee, somatic embryogenesis, induction, disinfection, protocols.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A nuestro docente director, Ing Mario Antonio Orellana Núñez, por su paciencia, tiempo y dedicación durante el desarrollo y ejecución del proyecto de investigación.

A nuestro asesor estadístico, Ing Miguel Paniagua por colaborar en la etapa de procesamiento y análisis de datos estadísticos. Y a la vez a la Ing Jenny encargada del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agronómicas, por su tiempo y ayuda para el desarrollo de actividades relacionadas con la investigación.

A mi compañero de tesis y amigo Elías Antonio Vásquez Osegueda, por formar parte de mi equipo de trabajo y tener su apoyo incondicional durante los años de estudio y el desarrollo de la investigación.

A todos los docentes que a lo largo de mi formación académica impregnaron esfuerzo, tiempo y dedicación en cada una de sus cátedras.

A mis padres, Pablo Moreno y Ana Luz Carranza por su apoyo incondicional durante todos mis años de estudio y por motivarme a siempre continuar.

A mis hermanos, Edgar, Ernesto, Vicente y José, por ser una de mis principales fuentes de motivación, entusiasmo y alegría.

A mis compañeros y amigos por su apoyo y motivación durante el desarrollo de la investigación y todas las personas que a lo largo de mi formación académica, me motivaron y ayudaron en cada uno de las etapas de la carrera.

*Luz Esmeralda Moreno Carranza*

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro asesor de tesis Ing. Agr. Mario Orellana por el aporte de sus conocimientos para la realización de esta investigación.

A mi familia, padres, hermanos, tíos y tías que me apoyaron a seguir con mis estudios.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agronómicas por haber contribuído a mi formación como profesional.

A mi compañera de tesis Esmeralda Moreno por haber compartido en todo momento y su apoyo incondicional en mis estudios y en la investigación.

A todos mis compañeros y amigos por compartir momentos agradables a lo largo de mis estudios.

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

*Elías Antonio Vásquez Osegueda*

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

Por su apoyo incondicional, consejos, amor y motivación; sin ellos no hubiese sido posible la culminación de mi formación académica.

### **A MIS HERMANOS**

Edgar, Ernesto, Vicente y Jose porque son y serán siempre mi motor para seguir siendo una mejor persona además por aportar a mis días sonrisas y motivación.

### **A MI SOBRINO**

Alvaro Ernesto, por venir a formar parte importante de mi familia y por el amor sincero e incondicional para con mi persona.

### **A MI ABUELA**

Por hacerme sentir que siempre puedo mejor como persona y por impregnar en mi valores humanitarios.

### **A CARLOS SAÚL MARTÍNEZ**

Por apoyarme en todo momento y formar parte importante en mi desarrollo profesional.

### **A ELÍAS ANTONIO VÁSQUEZ OSEGUEDA**

Por estar conmigo a lo largo de toda la carrera, por ser mi amigo y por entenderme y tenerme la paciencia necesaria para lograr los objetivos en común.

*Luz Esmeralda Moreno Carranza*

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS TODOPODEROSO**

Por haberme permitido vivir, por darme entendimiento y salud para alcanzar una de mis metas

### **A MI MADRE**

Celia Marisol Osegueda de Vásquez por su apoyo incondicional, por sus consejos, por su amor y cariño sin el cual no hubiese sido posible la finalización de mis estudios.

### **A MIS HERMANOS**

Josué Manuel Vásquez Osegueda y Deysi Marisol Vásquez Osegueda por su apoyo y colaboración para este trabajo.

### **A MI TIA**

María Isabel Orellana por su apoyo y dedicación de tiempo en mis estudios.

### **A MIS ABUELITOS, TIAS, TIOS, PRIMOS Y PRIMAS Y DEMAS FAMILIA**

Que en algún momento me motivaron y aconsejaron para seguir mis estudios.

*Elías Antonio Vásquez Osegueda*

Índice de contenido	Pág.
Resumen .....	iv
Abstract .....	v
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Origen y distribución del café .....	2
2.2. Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	3
2.3. Reproducción del café.....	5
2.3.1. Via sexual.....	6
2.3.2. Via asexual.....	6
2.4. Genética y mejoramiento del café .....	6
2.5. Material genético en la caficultura de El Salvador .....	7
2.6. roya del cafeto.....	9
2.7. Biotecnología aplicada al café .....	11
2.7.1. Marcadores moleculares .....	11
2.7.2. Quantitative Trait Locus (QTL) .....	12
2.7.3. Ingeniería genética (transgénesis) .....	13
2.7.4. Cultivo de tejidos .....	14
2.7.5. Embriogénesis somática .....	15
3. Materiales y métodos .....	28
3.1. Ubicación de la investigación .....	28
3.2. Material vegetativo .....	28
3.3. Etapas de la investigación.....	28
3.3.1. Etapa de desinfección .....	28
3.3.2. Etapa de inducción a callo embriogénico .....	30
3.4. Medios de cultivo.....	32
3.4.1. Medios de inducción a callos embriogénicos .....	32
3.4.2. Medios de expresión de callos embriogénicos .....	32
3.5. Condiciones físicas de crecimiento in vitro.....	33
3.6. Diseño estadístico .....	33
3.7. Diseño matemático.....	34

3.8. Variables evaluadas .....	34
3.8.1. Etapa de desinfección .....	34
3.8.2. Etapa de inducción y expresión de callo embriogénico .....	34
4. Resultados y discusión.....	36
4.1. Etapa de desinfección .....	36
4.2. Etapa de inducción y expresión del callo embriogénico .....	39
4.2.1. Fase de inducción a callo indiferenciado.....	39
4.2.2. Fase de expresión del callo embriogénico .....	41
5. Conclusiones.....	44
6. Recomendaciones.....	45
7. Bibliografía .....	46
8. Anexo .....	50

Índice de cuadros	Pág.
Cuadro 1. Composición de medios de cultivo para la inducción a callo embriogénico en explantes de hojas de café.....	31
Cuadro 2. Composición de medios de cultivo para la expresión de callo embriogénico en explantes de hojas de café variedad Bourbon.....	32
Cuadro 3. Modelos lineales generalizados mixtos para frascos contaminados - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento.....	37
Cuadro 4. Comparación de medios de cultivo para inducción a callos indiferenciados en café variedad Bourbon.....	40
Cuadro 5. Aspectos morfológicos de los callos embriogénicos en café variedad Bourbon, comparación de medios.....	41
Cuadro 6. Comparación de medios de cultivo para la expresión de callos embriogénicos en café variedad Bourbon.....	42

Índice de figuras	Pág.
Figura 1. Días y porcentaje de contaminación en la evaluación de protocolos de desinfección en explantes de hojas de café ( <i>Coffea arabica</i> ) variedad “Bourbon” para la introducción <i>in vitro</i> . UES.CCAA.2016.....	36
Figura 2. Comparación de protocolos de desinfección en hojas de café ( <i>Coffea arabica</i> ) variedad “Bourbon” para la sobrevivencia de explantes <i>in vitro</i> . UES.CCAA.2016.....	39
Figura 3. Proceso de inducción a embriogénesis somática en café ( <i>Coffea arabica</i> L.) variedad “Bourbon” UES.CCAA.2017.....	43

Índice de anexo	Pág
Imagen A- 1. Origen genético del café.	50
Imagen A- 2. Método convencional para la generación de una nueva variedad	50
Imagen A- 3. Proceso de hibridación del café	51
Imagen A- 4. Proceso de formación de la variedad de café Cuscatleco.	51
Tabla A- 1. Composición de Murasahige y Skoog – medio basal	52

## 1. INTRODUCCION

El café (*Coffea arabica*) es una planta que ha formado parte de policultivos tradicionales y de múltiples asociaciones que se ha establecido en diversas plantaciones especializadas, como por ejemplo en sistemas agroforestales con árboles de sombra y múltiples propósitos como madera, frutas, leña, entre otros. El cultivo del café es un rubro de mucha relevancia social, económica y ambiental para El Salvador, superando a otras alternativas agrícolas de producción, ya que contribuye en la sostenibilidad y conservación de suelos altamente vulnerables (León 1987).

En Centro América, el origen de las principales problemáticas de este rubro son factores climáticos, bajos precios internacionales y sobre todo de manejo del cultivo, siendo las plagas y enfermedades, como la broca del fruto del café (*Hypothenemus hampei*) y la roya del café (*Hemileia vastatrix*), las principales causas de la disminución de la producción; además, factores fisiológicos que se han venido degradando al pasar los años debido a la estrechez genética entre las variedades comerciales cultivadas y que se han reproducido sexualmente; razón suficiente, por la cual, en la actualidad se están reproduciendo las plantas in vitro, que es una técnica biotecnológica que genera grandes ventajas para la re-generación de plantaciones de importancia agrícola y comercial (Landaverde Parada et al, 2002).

Pero para lograr la mejora genética es necesario e importante hacer investigaciones sobre embriogénesis somática en café variedad Bourbon, estudiando diferentes metodologías de desinfección del material vegetativo para la introducción de explantes in vitro y buscar un medio de cultivo adecuado para la inducción a callos embriogénicos y así poder afinar los procesos de laboratorio para el cultivo in vitro para lograr tal fin (PROCAFE, sf)

La embriogénesis se refiere a la formación de un embrión somático a partir de células somáticas. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con eje radical-apical y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno. Esta

estructura es capaz de crecer y formar una planta completa. (Abdelnour-Esquivel y Escalante, 1996).

La variedad "Bourbón" es producto de una mutación espontánea del café arábico, presenta porte alto, bandolas largas, entrenudos largos, arquitectura abierta y frutos rojos intensos; se adapta de los 800 a 1,600 msnm, presenta excelente calidad de bebida y es susceptible a roya por que el grado de diversidad genética es bajo, debido principalmente a la biología reproductiva autógena y no posee en su base genética de resistencia a enfermedades y plagas, incluida la roya del café (PROCAFE, 1997).

El objetivo principal de esta investigación fue la identificación de un protocolo de desinfección de hojas de café provenientes de campo abierto para la introducción de material vegetal in vitro, así como la identificación de un medio de cultivo para la inducción a callos embriogénicos en café variedad "Bourbón", debido a que esta variedad es una de las que posee mejores características de producción y organolépticas a nivel nacional pero es altamente susceptible a la roya.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Origen y distribución del café**

El centro más probable de origen del café arábigo lo constituyen las montañas sur occidentales de Etiopía, el altiplano del Sudán y el Norte de Kenia, donde es un componente natural del sotobosque, ubicado de 1,300 a 2,000 metros de altitud (Sondal et al. s.f.).

Los intentos para determinar el origen genético de *C. arabica* se basaron en el análisis del comportamiento meiótico de cariotipo, el emparejamiento de cromosomas en los híbridos con especies diploides y en las plantas dihaploides de *C. arabica*. Estos estudios han revelado una marcada afinidad cromosómica y la ausencia de cromosoma de diferenciación sustancial entre los dos genomas constitutivos de *C. arabica* y la especie diploide de *coffea*. El comportamiento diploide normal de *C. arabica* se piensa que es debido a un sistema genético. La investigación del origen se puede basar en los resultados de los diferentes estudios

de evolución de secuencias de ADN. El origen alotetraploide de *C. arabica* fue estudiado por el análisis de polimorfismo observado por RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimorfica). El trabajo en el genoma del cloroplasto apoya firmemente la idea de que una especie cercana a *C. eugenoides* donaron el genoma materno de *C. arabica* y el Análisis de rDNA mostró que el padre era una especie del grupo *canephoroide* (*C. canephora*, *C. congensis*) (Rodríguez, 2000). (Imagen A-1).

En conclusión, no hay mayor evidencia citogenética sobre su origen, pero lo que se conoce parece indicar que es un alelotetraploide y que como posibles especies parentales se ha mencionado, basándose en su afinidad fenotípica, *C. eugenoides* y *C. congensis*, ambas diploides. Un problema especial en el origen de *C. arabica* es que en su hábitat natural no se encuentran otras especies del genero, de modo que si resultó de un cruce interespecífico y de la duplicación cromosómica subsiguiente, estos debieron ocurrir fuera del área actual de origen, de donde se extendió después hacia las tierras altas de Etiopia. Otra posibilidad es que se derive de especies que ya desaparecieron del área actual de dispersión. Finalmente, no puede descartarse la posibilidad de un origen autopoliploide (León, 1987).

En 1720 se realizó la introducción desde Francia a la isla Martínica. Desde esta isla se distribuyó a México, Brasil, Colombia, Venezuela y Centroamérica. En El Salvador, algunas fuentes sostienen que el posible período de introducción fue entre 1800 a 1815, un siglo después de haber ingresado su cultivo a América.

En la actualidad entre los mayores productores de café están Brasil que históricamente ha sido y es el mayor productor con el 32.6% de la producción mundial, seguido en orden de importancia por Vietnam (19.0%), Colombia (8.8%) e Indonesia (7.5%). Brasil no es solo el primer productor, sino que también es el primer exportador de café del mundo. Le siguen Vietnam, Alemania, Indonesia y Colombia. Cabe destacar la tercera posición de Alemania en el ranking de mayores exportadores del mundo sin ser un país productor supera en exportaciones a grandes productores como Colombia o Indonesia. Alemania es, a su vez, el segundo importador de café a nivel mundial pero exporta más del 55% de ese café como producto procesado. Entre los países importadores, se encuentran la mayoría de los

mercados de consumo tradicional de café, tales como la Unión Europea, los Estados Unidos de América y Japón, representando poco más del 50 por ciento del consumo mundial. (Asociación Cafetalera de El Salvador, 2000).

## **2.2. Clasificación taxonómica y descripción botánica**

El café es una angiosperma que pertenece a la familia de las Rubiaceas, del género *Coffea*, existiendo especies como la *arabica*, *canephora*, *liberica*, *excelsa*. El sistema radical de los cafetos está constituido por una raíz cónica y pivotante, que va de los 50 cm a más 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 éstas 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 (PROCAFE, 1997).

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 “crinolinias” o “palmillas” (CENICAFE, 1988).

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 del *Coffea arabica*. El porte de las variedades de *Arabica* fluctúa entre 1.0 m y 5.0 m; en cambio, las de *C. canephora* alcanzan hasta los 12 m (León, 1987).

La lámina de la hoja mide de 12 a 24 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, variando su forma de elíptica a lanceolada. En la parte inferior, en el ángulo que forman en el nervio central y lateralmente, existen unos agujeros de forma irregular que se abren en cámaras diminutas llamadas “democio”, cuya función no se conoce aún; sin embargo, con frecuencia viven en ellas ácaros muy pequeños (PROCAFE, 1997).

Las flores emergen de las axilas superiores cerca de las hojas, en las ramas plagiotrópicas. En cada axila se forman de uno a cinco inflorescencias, colocadas en línea recta entre las ramas y las hojas, las inflorescencias son ramillas comprimidas con nudos y entrenudos (León, 1987).

- Biología floral

El desarrollo floral se divide en tres fases fisiológicas:

La primera es la iniciación floral que 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 ocurre una serie de divisiones celulares que producirán tres o cuatro inflorescencias con tres o cuatro yemas florales. Esta fase está determinada por el fotoperíodo, la temperatura, la disponibilidad de agua y el balance nutricional (CENICAFE, 1988).

La segunda es que en el período de latencia las flores diferenciadas crecen durante dos meses y dejan de crecer por uno o cuatro 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 (León,1987).

La tercera es la antesis que se da 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 cuatro a cinco meses (CENICAFE, 1988).

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 meses más tarde inicia la maduración que tarda entre 40 a 60 días (León,1987).

La semilla está formada por un endospermo coráceo color amarillo verdoso; tiene una 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, está integrado por el hipocotilo y dos cotiledones superpuestos, mide de 2 mm a 5 mm de largo (PROCAFE, 1997).

### **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) (Pierick, 1990).

#### **2.3.1. Via sexual**

Las variedades de *C. arabica* son propagadas por semillas, después de haber realizado un proceso de selección genealógica. 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. Además, la viabilidad de las semillas de café es muy corta y su poder germinativo dura de cuatro a 30 meses (Cerón, 1987).

#### **2.3.2. Via asexual**

La propagación vegetativa de las plantas inicia su reproducción a partir de una porción de ellas, ya sea raíz, tallo u hoja. Realizándose con el propósito de conservar y 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. 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 (Cerón, 1987).

#### 2.4. Genética y mejoramiento del café

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 (Albarrán, 1999).

La tetraploidía de *C. arabica* frente a la diploidía de las otras especies de café evita el flujo de genes entre arábica y otras especies. Enfoques biotecnológicos pueden ser útiles en la superación de estos retos y para complementar los programas de mejoramiento convencional (Imagen A-2). (Carneiro, 1999).

Para mejorar las características de las variedades cultivadas de *C. arabica* pueden mencionarse tres grupos de plantas como fuentes de genes, estos son: Introducciones o variedades de *C. arabica*, especialmente las de origen etíope, los híbridos interespecíficos naturales, tales como el híbrido Timor (híbrido natural entre las especies *C. canephora* y *C. arabica*) con características predominantes de *C. arabica* y la resistencia a la roya de *C. canephora* y los híbridos interespecíficos artificiales o mejorados en distintos centro experimentales con diversos métodos y objetivos. El grupo más promisorios por los mejoradores de *C. arabica* son las plantas provenientes de la hibridación interespecífica. (CATIE, 2007)

En el mejoramiento genético del cafeto por hibridación entre especies diploides con la especie tetraploide *C. arabica* se han utilizado básicamente dos métodos: la duplicación de la especie diploide y el cruzamiento posterior del tetraploide artificial con la especie *C. arabica* (Imagen A-3). Por este método se han creado el Icatu en el Brasil con propósitos de mejorar el *C. arabica*. se ha desarrollado un programa de mejoramiento genético que ha demandado más de 40 años de trabajo y entre 3 y 4 retrocruzamiento. (Carneiro, 1999).

## **2.5. Material genético en la caficultura de el salvador**

La Variedad Pacas es obtenida por la mutación natural de Bourbón en 1949; presenta follaje abundante de color verde oscuro, porte bajo, entrenudos cortos, muy buena calidad de bebida. Se adapta de 500 a 1000 msnm, la producción es de 24 a 55 qq/mz. Susceptible a Roya (Quijano Landaverde, 2013).

Tekisic que es un Bourbón mejorado, es una variedad que proviene del proceso de selección de la variedad Bourbón tradicional, iniciado en 1949. En 1973 se estableció la siembra de plantas élites en la Estación Experimental del ISIC ubicada en Santa Tecla a 955 msnm. Forma ligeramente cónica, porte alto, con abundantes laterales y entrenudos largos. Tallo flexible, hojas medianas, brotes terminales de color verde claro, fruto grande de color rojo, de excelente calidad de bebida. Susceptible a Roya (PROCAFE, 1997).

La Variedad Catisic Proviene del cruce de Caturra CIFIC 19/1 con Híbrido de Timor 832/1. De porte bajo, con entrenudos cortos, bandolas cortas, brotes verde, hojas color oscuro. Se adapta de 600 a 1,000 msnm, buena producción y calidad de bebida. Resistente a Roya (Quijano Landaverde, 2013).

La Variedad Pacamara proviene del cruce de Pacas por Maragogipe rojo, liberado en 1976 por ISIC, porte intermedio, entrenudos cortos, hoja grande corrugada, brote verde o bronceado. Excelente calidad de bebida. Se adapta de 900 a 1,600 msnm. Susceptible a Roya (PROCAFE, s.f.).

La variedad Cuscatleco proviene del híbrido Sarchimor T-5296, originado del cruce de la variedad Villa Sarchi 971/10 (mutación natural de la variedad Bourbón) y el Híbrido de Timor CIFIC 832/2, creado en el año 1,959 por el Centro de Investigaciones de las Royas del cafeto, Oeiras, Portugal, donde lo llamaron CIFIC H 361. Las siguientes generaciones fueron evaluadas en Brasil y posteriormente introducidas por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) a Centroamérica (PROCAFE, 2007) (Imagen A-4).

El 9 de abril de 1,992, a través del Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico y Modernización de la Caficultora de Centroamérica, República Dominicana, Jamaica y Panamá (PROMECAFE) fueron introducidas, a la Fundación PROCAFE, las semillas (descendencia de mezclas realizadas en Brasil) de seis líneas en la generación F5:(T-5296, T-16785, T-18137, T-18138, T-18140 y T-18141) de Sachimor, para establecer el vivero y la siembra de ensayos, en junio de 1994, en diferentes estratos de altura de la zona cafetalera (PROCAFE, 2001).

El Cuscatleco presenta forma cónica, sistema radicular abundante, porte mediano con entrenudos cortos, ramas largas, follaje verde oscuro, brote verde intenso y hojas grandes corrugadas. Producción de 45 a 65 qq/mz, fruto de muy buena calidad de bebida y resistencia a la caída por efecto de mucha lluvia (PROCAFE, s.f.).

La Variedad Bourbon es producto de una mutación espontanea del café *arábico*, presenta porte alto, bandolas largas, entrenudos largos, arquitectura abierta y frutos rojos intenso; se adapta de los 800 a 1,600 msnm, presenta excelente calidad de bebida y es susceptible a roya por que el grado de diversidad genética es bajo, debido principalmente a la biología reproductiva autógama y no posee en su base genética de resistencia a enfermedades y plagas, incluida la roya del cafeto (PROCAFE, 1997).

## **2.6. Roya del cafeto**

### **Descripción botánica**

La Roya del café es un hongo fitoparásito obligado que pertenece a la subdivisión de los Basidiomicetos, del orden Uredinales, familia Pucciniaceae, Las condiciones ideales para su reproducción se facilitan en ambientes sombríos y niveles de humedad relativa bajos. Los límites de temperatura óptimos para su desarrollo se enmarcan entre los 21 y 25° C. Dentro de estos parámetros, la germinación de las esporas tiene lugar entre las 3 y 4 horas posteriores de su liberación. Por debajo de 16° C y por encima de los 27° C las esporas no germinan. La situación del terreno, y más concretamente la altura de éste sobre el nivel del mar es otro factor

determinante en la vida de la Roya y en los daños que causa. A mayor altura, las temperaturas son más frescas y por tanto, la Roya tiene menos posibilidades de vivir o de desarrollarse. Lo mismo sucede en las zonas bajas tropicales. Por esta razón, las variedades arábicas, que se suelen cultivar generalmente en zonas intermedias son las que sufren mayores ataques. A esto hay que agregar la susceptibilidad propia de cada género y especie. (Gali, sf).

### **Ataque e infección**

El ataque de la Roya al café se inicia con la liberación de sus uredosporas - esporas-, la estructura reproductiva más importante de este hongo, que puede persistir año tras año en este estado, entre 3 y 12 horas después estas germinan, para ello se sirven de una especie de tubo de germinación que va avanzando sobre la gota de agua hasta encontrar una estoma abierta en el envés de la hoja. Inmediatamente, entre los espacios intercelulares, se empieza a desarrollar el micelio, en el que aparecen unos órganos llamados austerios, mediante los cuales, la Roya penetra en el interior de las células y empieza a alimentarse del tejido de la hoja. (PROCAFE. sf).

Entre 10 y 15 días después del inicio del ataque, ya se puede apreciar en las hojas manchas amarillentas que se van tornando de color café, a medida que se va necrosando el tejido. La aparición de nuevas uredosporas puede tener lugar a los 15 días, más o menos, aunque el periodo de incubación depende de las condiciones climáticas. En el envés de estas manchas, aparece un polvo anaranjado, al tacto parecido a óxido, constituido por varios cientos de miles de uredosporas, que con la ayuda del viento, la lluvia, el paso de animales y personas, el traslado de material vegetativo, etc. se van distribuyendo por las hojas del mismo café, de los cafetos vecinos y de los cafetales cercanos. (Gali, sf).

Las hojas más susceptibles al ataque de la Roya son las hojas jóvenes. Esto merma de inmediato al café, ya que son precisamente estas hojas, las que están iniciando su período de plena actividad fisiológica, las que aportan la mayor cantidad de nutrientes a la planta. Al ser atacadas por el hongo y quedar entre un 10 y un 30% de

su tejido necrosado, dejan de ser funcionales y, como además, el hongo produce etileno, las hojas envejecen y caen prematuramente. Si el ataque es severo, la planta reduce su crecimiento, los frutos no se desarrollan y se generan grandes pérdidas económicas. Si el problema persiste, como la planta se está desfoliando permanentemente, y por tanto debilitándose, se muere en un periodo máximo de 2 años. (PROCAFE. sf).

## **2.7. Biotecnología aplicada al café**

La biotecnología es, en términos más generales y prácticos, la aplicación de las tecnologías para el uso y aprovechamiento de los seres vivos o partes de estos para una necesidad humana. Es por ello, que desde su base abarca procesos biológicos, bioquímicos, agrícolas e industriales que permiten a partir de un conocimiento sistemático de las funciones de los organismos, crear rutas alternativas y nuevas soluciones a problemas de los cultivos, el ambiente y el ser humano (Abdelnour-Esquivel y Escalante, 1996).

Para el caso específico del café, la biotecnología se viene desarrollando desde hace más de treinta años, esfuerzos de investigación y desarrollo integral en el área de genética, biología molecular, cultivo de tejidos, fisiología y metabólica, cuyos frutos comienzan a ser cosechados (Carneiro, 1999).

### **2.7.1. Marcadores moleculares**

La biología molecular y sus rápidos avances en los últimos años han 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. Los marcadores moleculares se pueden clasificar en morfológicos y 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). Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos. Por ahora se vienen empleando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, y dispersión de especies (Bueno *et al.* 2001).

El desarrollo de marcadores moleculares en café se ha utilizado para incrementar la capacidad de discriminar entre especies y de esta manera determinar la estructura de la población en estudio, lo que redundaría en la posible selección y discriminación de genotipos deseables, una de las mayores utilidades de los marcadores generados por AFLPs es la posibilidad de convertirlos en sitios de secuenciación blanco (STS del inglés, sequence-tagged sites), o marcadores de regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCAR del inglés, sequence-characterized amplified region) de gran utilidad en diferentes estudios que pueden apoyar al entendimiento de los genes de resistencia a la roya del café a través de metodologías que permitan, la búsqueda sobre librerías genómicas (BAC Bacteria Artificial Chromosomes), ubicación en cromosomas y el desarrollo de marcadores específicos (Mahé *et al.*, 2007b) Dentro de los estudios destacados usando AFLPs cabe resaltar el logro en el desarrollo de mapas genéticos con regiones que contienen genes de importancia económica en algunos cultivos. En café, desde el punto de vista de la identificación de fragmentos de introgresión los análisis reportados por Prakash *et al.* (2004), han confirmado las virtudes de la técnica AFLP para estudios de este tipo en la búsqueda de marcadores ligados a genes de resistencia SH3, un gen que fue introgresado a

una variedad comercial de *Coffea arabica* y que proviene de la especie diploide *C. liberica*. (CIAT, 1993).

### **2.7.2. Quantitative Trait Locus (QTL)**

Al *locus* de un gen que afecta un carácter cuantitativo se le denomina en inglés “quantitative trait locus”(locus para un carácter cuantitativo) y se le conoce por la sigla QTL. Los QTL no pueden identificarse en genealogías porque sus efectos individuales están enmascarados por los efectos de los otros genes que influyen la característica y por los efectos ambientales. Sin embargo los QTL pueden localizarse si están genéticamente ligados a marcadores polimórficos de ADN, ya que el genotipo que afecta al carácter cuantitativo podrá relacionarse con el genotipo del marcador genético ligado. La ubicación de los QTL en el genoma es importante para su manipulación en programas de mejoramiento, y para poder clonarlos y estudiarlos de manera de identificar sus funciones (Wilches, 2004).

Los marcadores polimórficos de ADN son abundantes y están distribuidos por todo el genoma. Además poseen varios alelos co-dominantes de manera que resultan ideales para estudios de ligamiento de los caracteres cuantitativos. En los estudios de QTL se utiliza el mayor número posible de marcadores, ampliamente distribuidos, junto con el carácter complejo en cuestión, en generaciones sucesivas de una población genéticamente heterogénea. Luego se llevan a cabo estudios estadísticos con el fin de identificar qué marcadores de ADN están asociados con el carácter complejo, de manera que sus genotipos están siempre asociados por efectos fenotípicos que interesan. Estos marcadores de ADN identifican regiones del genoma que contienen uno o más QTL con efectos importantes sobre el carácter cuantitativo. Entonces los marcadores pueden utilizarse para estudiar la segregación de regiones importantes en programas de mejoramiento, y también como punto de partida para clonar los genes con efectos importantes sobre el carácter en cuestión (Guerrero, 2013).

### **2.7.3. Ingeniería genética (transgenesis)**

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 transformadas portadoras de un gen ajeno. Esta constituye una metodología extremadamente prometedora, pues permite la introducción de genes de interés en germoplasma 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. El objetivo fundamental de la ingeniería genética es obtener un fragmento puro de ADN en grandes cantidades. 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 hace muy difíciles de manipular, ya que la metodología de transformación permite la transferencia e integración de unos o pocos caracteres y probablemente están controlados y dependen de muchos genes (generalmente no más de dos) (Croquer, 2009).

Los estudios sobre transformación genética de café se han llevado a cabo mediante métodos biológicos (*Agrobacterium*) y métodos físicos (polietilenglicol, electroporación y biobalística) con la finalidad de estandarizar los parámetros de transformación y de introducir genes para la resistencia a antibióticos, herbicidas y plagas. (Martínez, s.f.).

### **2.7.4. Cultivo de tejidos**

Puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos. Constituye dentro de las

biotecnologías, la que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, propagación masiva de plantas, mejoramiento genético, inducción de mutaciones, selección *in vitro* y desarrollo de protocolos de regeneración de plantas para su utilización en ingeniería genética (William,1986).

Entre las técnicas de cultivo de tejido para la reproducción del café están: microestacas que consiste en obtener, a partir de un nudo ortotropico portador de yemas preexistente, una microplanta cuyos nudos pueden ser utilizados como estacas *in vitro* y así sucesivamente para obtener un gran número de individuos; cultivo de ápices provenientes directamente de campo, esta técnica es utilizada para la creación de banco de germoplasma *in vitro* debido a su lento crecimiento y embriogénesis somática cuyo objetivo es producir a partir de fragmentos de hoja embriones asexuales que después se desarrollan en plantas enteras. (Martínez, s.f.).

#### **2.7.5. Embriogénesis somática**

La embriogénesis se refiere a la formación de un embrión somático a partir de células somáticas que son el producto de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con eje radical-apical y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno. Esta estructura es capaz de crecer y formar una planta completa. En muchos aspectos de su desarrollo los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos (Abdelnour-Esquivel y Escalante, 1996).

##### **➤ Embriogénesis somática directa**

Esta ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante (Evans y Sharp, 1981).

➤ **Embriogénesis somática indirecta**

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta:

- ✓ Embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF)
- ✓ Embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF).

En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, y evolucionan completamente hasta las etapas avanzadas de desarrollo. En la segunda, los embriones somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mayor, aunque dichos grupos aparecen en un número menor de callos (Williams, 1986).

La embriogénesis somática directa procede de células proembriónicas determinadas, mientras que la embriogénesis indirecta requiere de la redeterminación de células diferenciadas, de la proliferación de callo y de la inducción de células embriónicas determinadas. Aparentemente, las células proembriónicas determinadas requieren ya sea de la síntesis de una sustancia inductora o de la eliminación de una sustancia inhibidora para reanudar su actividad mitótica y su desarrollo embriónico. En cambio, las células sometidas a una diferenciación del tipo inducción de células embriónicas determinadas necesitan tener una sustancia mitogénica o estar expuestas a concentraciones específicas de reguladores del crecimiento o cumplir ambos requisitos para entrar de nuevo al ciclo mitótico. La inactivación puede ocurrir en cualquier paso de este proceso (Sondahl et al. s.f.).

Cada fase del ciclo celular (G1, S, G2 y M) posee una maquinaria sintética específica que está bajo control. La duración de las fases S y M (síntesis del DNA y mitosis) es relativamente constante en un sistema tisular dado, mientras que la duración de G1 y G2, (fases de crecimiento anterior y posterior, respectivamente, a la síntesis del DNA) es variable. Los puntos principales de control del ciclo celular mitótico están

situados en G1 y G2. Se ha sugerido que la decisión de proliferar y el destino de las células hijas después de la mitosis ocurren en estas etapas; se postula que tanto la concentración total de reguladores del crecimiento exógenos y específicos como la relación de las concentraciones de diferentes reguladores en el medio de cultivo tienen un doble papel en la iniciación de la embriogénesis. En primer lugar, los reguladores del crecimiento manejan o bien la iniciación de la división celular, es decir, el reingreso de las células al ciclo celular mitótico en Go (un estado especial no operacional del ciclo celular), o bien puntos principales de control los de Van't Hof en G1 o en G2. En segundo lugar, los reguladores del crecimiento desempeñan un papel directo o indirecto en el control de la síntesis de los factores citoplasmicos durante las fases G1 y G2. En el momento de la citocinesis ocurriría una división mitótica cuántica que resultaría en dos células hijas fenotípicamente diferentes y comprometidas en patrones de desarrollo diferentes (Peña, 2013).

Debe comprenderse que las divisiones celulares precedentes pueden influir en la diferenciación posterior, los eventos ocurridos en los ciclos celulares pueden determinar o limitar las vías de citodiferenciación que las células puedan tomar más tarde. Un largo intervalo de tiempo puede separar una división celular reguladora de la aparición de signos visibles de citodiferenciación, se presume que durante una división celular cuántica una de las células hijas sigue siendo meristemática, mientras que la otra está determinada para desarrollarse como célula madre diferenciada (Arnold, 2002).

Los explantes utilizados para el establecimiento de cultivos primarios consisten generalmente en una gama de poblaciones fenotípicas celulares que pueden caracterizarse según su morfología celular básica, sus características bioquímicas y el tiempo de su ciclo celular mitótico. Estas células tienen diferentes destinos en su desarrollo, determinados por la diferente expresión de la secuencia del ADN. Además, algunas de estas poblaciones celulares se están dividiendo activamente mientras que otras se hallan en fases anteriores a la mitosis (G0, G1 ó G2) (Sondahl et al. s.f.).

Sería ingenuo esperar que una combinación específica de reguladores del crecimiento tuviese un efecto uniforme en poblaciones de células fenotípicamente mixtas. En cambio, se esperaría que cierta proporción de reguladores de crecimiento afectase la mitosis o la redeterminación o ambos fenómenos de una población celular fenotípicamente particular. Por tanto, se sugiere que las células embriogénicas maternas descienden de una población de células que son receptivas a una concentración reguladora del crecimiento embriogénico inductor o a cierta proporción de las concentraciones de las sustancias reguladoras del crecimiento (auxina y citocinina). Tales células están redeterminadas respecto a sus opciones de desarrollo durante una división mitótica cuántica *in vitro* que resulta en dos hijas, una de las cuales es probablemente la célula embriogénica madre (Patiño, 2010).

Parecería que los reguladores del crecimiento en particular las auxinas y las citocininas tienen dos funciones en el medio de cultivo de acondicionamiento (medio de cultivo primario) la determinación de las células embriogénicas maternas y la sincronización de las células embriogénicas maternas. Por consiguiente, esta población celular se encuentra probablemente en un estado de inactivación mitótica hasta que se subcultive en un medio de inducción embriogénico del cual se haya removido la auxina, que con frecuencia es 2,4-D. Este traslado libera probablemente las células embriogénicas maternas de la inactivación mitótica y permite el ulterior desarrollo embrionario (Megias, 2015)

➤ **Factores génicos de la embriogénesis somática.**

Para que ocurra la reprogramación en una célula somática y esta comience a diferenciar un embrión, su patrón de expresión génica debe cambiar. Es probable que esta regulación génica se deba a factores epigenéticos como la metilación del ADN y compactaciones o descompactaciones en la disposición de la cromatina, los reguladores de crecimiento, principalmente las auxinas, juegan un papel muy importante en la transducción de señales para desencadenar un patrón de expresión génica determinado. De todas las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizado en la mayoría de los casos para la inducción de ES, es el que promueve la hipermetilación del ADN con mayor facilidad. Las células somáticas, dentro de la

planta, contienen toda la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de la embriogénesis somática debe consistir entonces en la terminación de expresión de un patrón genético en el tejido del explante y su sustitución con un programa de expresión génica embriogénico. Un posible mecanismo para la regulación de la expresión génica es la metilación del ADN, que está influenciado por las auxinas; También se ha propuesto que el estrés juega un papel central en la mediación de la transducción de la señal cascada que conduce a la reprogramación de la expresión génica. Esto se traduce en una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento del callo desorganizado o al crecimiento polarizado que conduce a la embriogénesis somática (Sondahl, s.f.).

La iniciación de la vía embriogénica está restringida sólo a ciertas células que responden en el explante primario que tienen el potencial para activar los genes implicados en la generación de las células embriogénicas. La competencia para la inducción embriogénica puede ser el resultado de la variación de la sensibilidad de la auxina. Dos mecanismos parecen ser importantes para la formación *in vitro* de células embriogénicas: la división celular asimétrica y el control de la elongación celular (Peña, 2015).

La división celular asimétrica es promovida por reguladores de crecimiento que alteran la polaridad celular por la interferencia con el gradiente de pH o el campo eléctrico alrededor de las células, la habilidad para controlar la expansión de las células está asociada con los polisacáridos de la pared celular (López, 1996).

La caracterización de la expresión génica durante el desarrollo, maduración y germinación del embrión ha dado lugar a la identificación de cinco clases de desarrollo de genes: Clase 1. Genes expresados de manera constitutiva, los cuales están presentes en todas las etapas y han adquirido funciones durante el crecimiento normal de la planta. Estos genes tienen funciones de mantenimiento esenciales para muchas células vegetales, incluyendo los que están en el embrión; Clase 2. Genes específicos del embrión, la expresión está restringida al embrión adecuado y cesa

antes de o en la germinación; Clase 3. Son altamente expresados durante la embriogénesis temprana hasta la etapa de los cotiledones; Clase 4. Representan a los genes de proteínas de semillas expresados durante la expansión de cotiledones y maduración de semillas; Clase 5. Los genes expresados abundantemente en las etapas posteriores de embriogénesis hasta la maduración de la semilla. Estos genes son activado por ABA. (Peña, 2015).

➤ **Factores bioquímicos**

En un cultivo *in vitro* se diferencian dos tipos de callos, embriogénicos y no embriogénicos. Los callos embriogénicos crecen rápidamente, poseen células pequeñas e isodiamétricas y forman plantas vía embriogénesis somática, mientras que los callos no embriogénicos crecen lentamente, de manera desorganizada, poseen células irregulares, altamente vacuoladas y forman, o no, raíces o brotes vía organogénesis. En muchos casos, el potencial embriogénico es identificado por las anteriores características morfológicas pero, sin embargo, esta apreciación visual es subjetiva y, con frecuencia, sólo aplicable después de períodos prolongados de cultivo. Una identificación bioquímica temprana del potencial embriogénico sería de gran ayuda para conseguir una eficaz regeneración de plantas y para superar algunas de las dificultades surgidas, como puede ser la respuesta embriogénica dependiendo del genotipo (Piedad, 2003).

➤ **Actividad enzimática**

Algunas enzimas antioxidantes se utilizan como indicadores de la embriogénesis somática ya que parecen estar relacionadas con la regeneración de plantas. Catalasa y peroxidasa son enzimas importantes responsables de la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peroxido de Hidrogeno) producido bajo diversas condiciones adversas y así evitar que se dé el daño oxidativo relacionado con el estrés. La catalasa elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido durante β-oxidación de ácidos grasos en la fase inicial del crecimiento de plántulas. Las mayores actividades tanto de peroxidasa y catalasa durante las fases del desarrollo embrionario sugieren que la producción de especies

reactivas de oxígeno es mayor en las primeras etapas de la embriogénesis que en las etapas finales (Croquer, 2009).

El  $H_2O_2$ , generado por diversos estímulos ambientales y de desarrollo, puede actuar como una molécula de señalización que regula el desarrollo y actúa como un segundo mensajero celular capaz de inducir la expresión de genes, la síntesis de proteínas y de promover la embriogénesis somática (Piedad, 2003).

Las esterasas, un grupo de enzimas que hidrolizan los enlaces éster, aumentan la pectina y parecen tener un papel promotor en la embriogénesis. Se ha sugerido una relación de estos enzimas con cambios producidos en las paredes celulares vegetales durante la adquisición de la capacidad embriogénica. Un requerimiento para el desarrollo embriogénico de células vegetales es un contacto muy estrecho célula a célula. Se cree que la lámina media de pectinas mantiene juntas a las células vegetales y se ha propuesto que enzimas como las esterasas, que pueden unir polisacáridos de pectina covalentemente, podrían jugar un papel promotor en la embriogénesis (Cardona, s.f.).

La L-fenilalanina amonio-licasa, enzima clave involucrada en la asimilación y reciclaje de amonio, también está implicada en el proceso embriogénico; L-fenilalanina amonio-licasa cataliza la desaminación de L-fenilalanina para generar ácido transcinámico y la duración de su actividad es característicamente corta y corresponde con un período distinto del crecimiento en células cultivadas de plantas superiores. La ruta metabólica primaria vía shikimato produce ácidos fenólicos importantes, tales como el clorogénico, cafeico, p-hidroxibenzoico, trans cinámico y cumárico. Algunos de estos compuestos fenólicos actúan como precursores para la biosíntesis de la lignina. También se ha confirmado la función de ciertos fenoles como protectores de auxina, actuando para evitar su degradación. Es posible que los productos de L-fenilalanina amonio-licasa puedan estar implicados en la biosíntesis de la lignina que es necesaria durante la embriogénesis (Piedad, 2003).

La actividad malato deshidrogenasica juega un papel importante durante la germinación de embriones somáticos suministrando la energía necesaria a través del ciclo de Krebs, además cataliza la reacción de oxidación del malato y puede proporcionar NADPH para la biosíntesis reductora y la serie de reacciones implicadas en la conversión de NADP+ a NADPH puede generar CO2 interno (Megias, 2015).

Las Fosfatasa ácida catalizan la hidrólisis de ésteres del ácido fosfórico. Se clasifican en fosfatasas ácidas y alcalinas. Las ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores, mientras que las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos. La fosfatasa ácida es común en la célula y se ha detectado asociada a la pared celular, a los dictiosomas y lisosomas (Peña, 2013).

➤ **Isoenzimas.**

Las isoenzimas son múltiples formas moleculares de una misma enzima que ocurren en una misma especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificando para cada una de ellas. Las isoenzimas llevan a cabo una misma actividad catalítica, pero presentan diferentes movilidades electroforéticas, originadas por las diferencias en secuencias de aminoácidos y, por lo tanto, por las variaciones en las secuencias de ADN que codifican para estas enzimas. Las isoenzimas, o isoformas, son fácilmente detectables y su variación está a menudo asociada con las diferencias genéticas y etapas de desarrollo (Piedad, 2003).

**Fases de la embriogénesis somática**

En la embriogénesis somática se pueden distinguir cuatro fases: inducción, proliferación, maduración y germinación

➤ **Fase de inducción**

El inicio de la embriogénesis somática implica que las células del explante cambien su patrón de expresión y generen embriones somáticos. La iniciación de la vía embriogénica está restringida a la respuesta de ciertas células que pueden activar

los genes implicados en la generación de células embriogénicas. Una vez que estos genes se activan, un programa de expresión génica embriogénica reemplaza al establecido en los procesos de expresión génica de los tejidos del explante. Los factores físicos y químicos que determinan la vía embriogénica de desarrollo son un paso clave en la inducción de la embriogénesis somática. Se ha propuesto que los reguladores del crecimiento en plantas (PGRs) y el estrés, desempeñan un papel central en la señal que conduce a la reprogramación de la expresión génica, seguido de una serie de divisiones celulares que inducen tanto al crecimiento desorganizado que produce callos como al crecimiento polarizado que conduce a la embriogénesis somática (Moncada *et al.* s.f.).

➤ **Proliferación de embriones somáticos**

Una vez que las células embriogénicas se han formado, continúan proliferando y forman masas proembriogénicas (PEM). La auxina es necesaria para la proliferación de las mismas pero es inhibidora del desarrollo de los embriones somáticos. En muchos sistemas embriogénicos, la transferencia de los embriones somáticos a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento aumenta el desarrollo de introducción de embriones somáticos y su conversión en plantas. Uno de los factores que probablemente determine la baja tasa de conversión a plántulas se asocia con los efectos residuales ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Gatica *et al.* 2006).

➤ **Maduración y germinación de embriones**

El paso más crítico en la embriogénesis somática es el proceso de maduración, específicamente en la capacidad de los embriones para germinar y producir plántulas. Se han realizado numerosos estudios para ver cuáles podían ser los métodos más efectivos en la maduración de embriones somáticos y los tratamientos que han tenido éxito incluyen la adición de reguladores osmóticos, el uso de inhibidores de etileno, suplementos de ácido abscísico (ABA), estrés por falta temporal de nutrientes y desecación (Giron Velado, 1998).

El ABA se ha utilizado en cultivos de tejidos para promover la maduración de los embriones somáticos y la síntesis de las reservas de almacenamiento en los

embriones durante la maduración. El ABA también actúa como un factor de control de la germinación y latencia en los embriones somáticos y se utiliza generalmente para inducir la quiescencia durante el cultivo de tejidos vegetales (Giron Velado, 1998).

### **Factores que influyen en la embriogénesis somática**

Los reguladores del crecimiento vegetal (PGRs) están considerados como los factores más importantes en el desarrollo de la embriogénesis bajo condiciones *in vitro*. Los reguladores del crecimiento juegan un papel vital, y el equilibrio correcto o la proporción correcta de estos compuestos ejerce, con frecuencia, un papel fundamental en la optimización del desarrollo de embriones somáticos *in vitro*. Las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, son hormonas vegetales de origen natural. Entre estas hormonas, las auxinas y citoquininas son las más empleadas en este tipo de estudios. La activación de la respuesta por auxinas puede ser un acontecimiento clave en la adaptación celular y en la reprogramación genética, metabólica y fisiológica, que conduce a la competencia embriogénica de las células somáticas (Cerón, 1987)

El genotipo es el factor clave que afecta a la embriogénesis somática vegetal. La frecuencia de embriogénesis somática ha demostrado ser muy diversa a causa de la variación genotípica, incluso dentro del mismo género. No todas las especies de un mismo género pueden ser inducidas para producir embriogénesis somática; incluso, dentro de la misma especie, pueden existir variaciones dependiendo de la accesión objeto de estudio (Croquer, 2009).

La inducción de la embriogénesis somática también está influenciada por el tipo de explante utilizado. En general, el tejido con un metabolismo más alto y con un nivel de diferenciación más bajo puede promover la inducción de la embriogénesis somática. Se puede generalizar que los explantes suelen mostrar una polaridad marcada en la morfogénesis, esto puede estar relacionado con la posición del órgano o fragmento del tejido en la planta intacta (Piedad Gallegos, 2003).

Los componentes del medio basal juegan un papel complejo en la embriogénesis somática. Son cinco los principales medios con los que se logra la embriogénesis: MS (Murashige y Skoog), SH (Schenk y Hildebrandt), B5 (Gamborg y cols.), DKW (Driver y Kuniyuk) y WPM (Lloyd y McCown). En la mayor parte de los cultivos realizados, el medio MS es el considerado más eficaz (Paz Ramírez, 2000).

La fuente de carbono, así como agente osmótico en cultivos de tejidos, es la sacarosa que en el medio que produce una aceleración de la embriogénesis somática. El suministro de sacarosa en el medio de cultivo puede ser el responsable del incremento del potencial osmótico del medio y la plasmólisis de las células puede estimular la división celular e incrementar la producción de embriones somáticos. La sacarosa podría considerarse como un regulador de los genes de las proteínas y azúcares de almacenamiento, aumentando su expresión. La adición al medio de otros carbohidratos como glucosa, maltosa, fructosa junto con la sacarosa, aumenta la maduración y la germinación de los embriones somáticos. La fuente de carbono parece tener un papel esencial tanto para el crecimiento *in vitro* como para el desarrollo, afectando tanto a la embriogénesis somática como a la maduración de los embriones (Piedad Gallegos, 2003).

El nitrógeno reducido es otro de los factores más importantes tanto en la inducción embriogénica como en el desarrollo embrionario. Sus efectos dependerán de la naturaleza y proporción de los compuestos nitrogenados suministrados. Para una óptima embriogénesis somática se requieren formas de nitrógeno tanto reducidas como no reducidas. Diferentes aminoácidos tienen distintas funciones en la embriogénesis; Altas concentraciones de L-cisteína, L-glutamina y L-prolina añadidas al medio de cultivo inhibían la embriogénesis somática, La glutamina y caseína hidrolizada se usaron para promover la embriogénesis, y la L-prolina se ha demostrado que aumenta la embriogénesis somática. Hay numerosas informaciones de que la luz no es necesaria para la embriogénesis y que incluso puede inhibirla, los explantes cultivados en oscuridad durante al menos tres semanas tienden a producir

más embriones somáticos que los crecidos en luz. Varios estudios han mostrado que los cambios en el pH intracelular pueden también contribuir a la adquisición de la competencia embriogénica (Sondahl *et al.* s.f.).

### **Manejo de contaminantes.**

El éxito de los sistemas de micropropagación de plantas depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana, existen cuatro fuentes de infección: la planta, el medio nutritivo, el aire y el operador. Dentro de estas condiciones la más importante es la planta misma, por lo que el material debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro*. Existen microorganismos que en el campo no son patógenos pero en el laboratorio se convierten en una fuente principal de contaminación, por lo que se les llama vitropatógenos. 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. Para la desinfección del material vegetativo, se utiliza comúnmente Hipoclorito de Calcio (del 6 –12%) o Hipoclorito de Sodio (del 2- 5%) (Vasquez y Pereira, s.f.).

### **Principales patógenos que afectan el cultivo de tejidos.**

#### **a) Hongos filamentosos y levaduras**

La mayoría de hongos y levaduras aislados del cultivo de tejidos de plantas pertenecen a géneros y especies que están ampliamente distribuidos y pueden encontrarse en edificaciones, ambientes externos, en el aire de los laboratorios y como saprofitos o patógenos en la superficie aérea de las plantas en el campo. Algunos hongos patógenos como *Botrytis*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Aspergillus* han sido capaces de crecer inicialmente en el medio sin plantas, y lograr su establecimiento posterior en el tejido de éstas, después que el metabolismo y

crecimiento de las mismas disminuyó. Existe una estrecha correlación entre las especies y géneros de hongos y levaduras encontradas en el aire del laboratorio, los medios vertidos sin plantas y los cultivos viejos, que indica que la fuente de mayor contaminación fúngica es el aire del laboratorio, y que los hongos y levaduras pueden ser introducidos por manipulación después de la esterilización en el autoclave. Se plantea que tales microorganismos no han sido hallados de forma latente en el cultivo de tejidos y que esta contaminación llega a su punto máximo durante los meses de altos contenidos de esporas en el aire externo y en el laboratorio (Folgueras, 2001).

### **b) Bacterias**

La mayoría de bacterias aisladas como contaminantes del cultivo de tejidos son especies que no se conocen como patógenos de plantas *in vivo*. A diferencia de los hongos y levaduras, estas bacterias no producen crecimiento visible en el medio o síntomas en las plantas hasta un tiempo después de haber sido introducidas dentro del cultivo de tejidos. Esta habilidad para establecerse latentes hace que sea difícil inferir la fuente de contaminación, así como el momento en que las bacterias son detectadas en las plantas; muchas de ellas son introducidas con el explante, mientras que otras son claramente introducidas en el laboratorio durante el subcultivo. Gran parte de las bacterias aisladas de la superficie de la planta son saprofitos, pero muchas poblaciones de ciertas bacterias fitopatógenas pueden estar presentes como epifitos sobre plantas aparentemente sanas. La desinfección de la superficie del explante antes de su colocación en el medio puede ser ineficiente y dar lugar a la contaminación inicial en el medio. Ciertas bacterias se han reportado como que viven endofíticamente o que son patógenos latentes. Es razonable que los miembros de las familias Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae son contaminantes tempranos del cultivo de tejidos porque son a menudo las bacterias dominantes asociadas con la superficie aérea de las plantas desarrolladas bajo condiciones de campo (Folgueras, 2001).

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Ubicación de la investigación**

La investigación se realizó de febrero a noviembre de 2016, en el laboratorio de Biotecnología Agrícola 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 Investigaciones del Café (PROCAFE), ubicado en la ciudad de Santa Tecla con coordenadas 13°40'58"N y 89°17'14"W, departamento de La Libertad; se seleccionaron árboles de café de la variedad Bourbon identificando bandolas con hojas jóvenes. Dos semanas antes de la recolección se les aplicó un fungicida de amplio espectro, el objetivo de esta práctica era disminuir la contaminación en la fase de laboratorio. Se tomó el segundo par de hojas de cada bandola ortotrópica y se llevó al laboratorio para aplicar los diferentes tratamientos de desinfección.

#### **3.3. Etapas de la investigación**

La investigación se realizó en dos etapas: la primera fue la evaluación de métodos de desinfección superficial del material vegetativo; La segunda etapa constó de dos fases: la inducción a callo indiferenciado y la expresión del callo embriogénico.

##### **3.3.1. Etapa de desinfección**

Para la desinfección del material vegetativo se utilizaron cuatro protocolos:

- Protocolo de desinfección del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (Paz Ramírez, 2000).

Se depositaron las hojas en una caja plástica de 15X30 cm previamente identificada para llevarlas al laboratorio. Se lavaron con un jabón antibacterial (jabón de manos) y se enjuagaron con agua de chorro. Se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 10% (lejía común al 4.5%) en donde se depositaron las hojas durante 20 minutos y

después se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y luego se volvió a depositar las hojas en otra solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos y en la cámara de flujo laminar se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril y se procedió a la inoculación. el hipoclorito de sodio utilizado fue lejía común

- Protocolo de desinfección del Instituto Hondureño del Café (IHCAFE) (Paz Ramírez, 2000).

Se cosecharon las hojas en una caja plástica previamente identificada y se llevaron al laboratorio. Se limpiaron con algodón humedecido con agua, se colocaron en una solución con Benomyl 50 WP (Methyl 1-(butylcarbamoil) benzimidazol-2-Ylcarbamate) a una dosis de 2gr/L durante 30 minutos y luego se pasaron a una solución filtrada de hipoclorito de calcio al 10% (p/v) durante 10 minutos. En cámara de flujo laminar se hizo un enjuague con agua destilada estéril, se depositaron en una solución de hipoclorito de calcio al 8% (p/v) durante 20 minutos. Se terminó con un enjuague con agua destilada estéril para proceder a la inoculación.

- Protocolo de desinfección del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1993).

Se colectaron las hojas en una caja plástica previamente identificada y se llevó al laboratorio. Se hizo un lavado con agua de chorro, luego se sumergieron en etanol al 70% haciendo un enjuague rápido para pasarlo a una solución de hipoclorito de calcio al 10% (p/v) mas dos gotas de jabón para bebé, durante 20 minutos. Se procedió a la inoculación.

- Protocolo de desinfección del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, 2010).

Durante tres días consecutivos las plantas en estudio se asperjaron con una solución fungicida de Amistar® 50 WP (Azoxystrobin 50 %) a una dosis de 1 g/L. Se lavaron las hojas con detergente comercial y luego con agua destilada, se colocaron en una solución antioxidante-fungicida previamente esterilizada (30 gr/L de sacarosa, 100 mg/L de ácido ascórbico, 150 mg/L de ácido cítrico y 1 gr/L de Amistar® 50 WP

(Azoxystrobin 50 %). Las hojas en esta solución fueron sometidas a vacío parcial con una bomba de vacío (Sartorius AG D 3400 Göttingen) por 3 minutos y luego se deja en reposo por 10 minutos, luego se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 5 minutos. Se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril, finalmente las hojas se depositaron en la solución antioxidante-fungicida y se procede a la inoculación.

Los explantes fueron inoculados en un medio de Murashige y Skoog (Tabla A-1) con 0.5 mg/l de la hormona 2,4D, dejándolos en oscuridad durante un mes. Al cabo de una semana se inició la toma de datos en los tres tratamientos, evaluando por dos semanas la sobrevivencia del tejido a los métodos de desinfección y por cuatro semanas el porcentaje de contaminación de los explantes.

La eficiencia de los métodos de desinfección fue determinada por el porcentaje de contaminación del material experimental, siendo el mejor el que presente menor índice de contaminación en los tratamientos.

### **3.3.2. Etapa de inducción a callo embriogénico**

Después de finalizada la etapa de desinfección se procedió a la evaluación de medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos. El primer medio fue el propuesto por centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo (CIRAD) y el segundo utilizado por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (Cuadro 1) durante 30 días, colocando 4 explantes de 1 cm<sup>2</sup> por frasco.

Cuadro 1. Composición de medios de cultivo para la inducción a callo embriogénico en explantes de hojas de café (*Coffea arabica* L.) variedad "Bourbon".

<b>Reactivo</b>	<b>Inducción 1 (CIRAD)</b>	<b>Inducción 2 (CATIE)</b>
Macronutrientes/2*	25	25
Micronutrientes/2*	2.5	2.5
Fe EDTA/2*	2.5	2.5
Tiamina HCL	1	5
Myo Inositol	100	100
Ac. Nicotínico	1	0.5
Pyridoxina	1	0.5
Glicina	1	0
L. Cysteina	0	10
Extracto de malta	400	200
Hidrocaseina	100	100
Kinetina*	0	1
2,4 D	0.5	1
2IP	4	0
AIB	1	0
SACAROSA**	30	15
Gelrite**	4	2.2

Fuente: 1-Landaverde Parada et al, 2002  
2-Giron, Ivette. 1998.

\* Medidas en ml/L

\*\*Medidas g/L

Posteriormente, el mismo material vegetal fue transferido a un medio de expresión, el primero propuesto por CIRAD y el segundo propuesto por CATIE (Cuadro 2) durante 80 días y permaneció en condiciones de luz indirecta.

Para conocer el potencial embriogénico de la variedad en estudio se realizó 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 y se determinó embriogénico si presentó formación del embrión.

Cuadro 2. Composición de medios de cultivo para la expresión de callos embriogénicos en explantes de hojas de café (*Coffea arabica* L.) variedad "Bourbon".

Reactivo	Expresión 1 (CIRAD)	Expresión 2 (CATIE)
Macronutrientes/2*	25	25
Micronutrientes/2*	2.5	2.5
Fe EDTA/2*	2.5	2.5
Tiamina HCL	20	10
Myo Inositol	200	200
Ac. Nicotínico	0	1
Pyridoxina	0	1
L. Cysteina	20	10
Extracto de malta	800	400
Hidrocaseina	200	200
2,4 D	1	0
Sulfato de adenina	60	40
Sacarosa **	30	40
BAP	4	3
Glicina	0	2
Gelrite**	4	2.2

Fuente: 1-Landaverde Parada et al, 2002  
2-Giron, Ivette. 1998.

\* Medidas en ml/L

\*\*Medidas g/L

### 3.4. Medios de cultivo

#### 3.4.1. Medios de inducción a callos embriogénicos

Se utilizó un MS basal con combinaciones de auxina, siendo la más común el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D). Dichas combinaciones ya han sido estudiadas y propuestas por instituciones dedicadas a la investigación. El CIRAD propone la utilización de 0.5 mg/L de 2,4 D para la preparación de medio de inducción a callos embriogénicos en café, mientras que CATIE propone la utilización de 1 mg/L de 2,4 D respectivamente.

### **3.4.2. Medios de expresión de callos embriogénicos**

Se utilizó un MS basal con la adición de citocininas para la formación y expresión de callos embriogénicos. El CIRAD propone la adición de 4 mg/L de BAP para la expresión de callos embriogénicos y CATIE propone la adición de 3 mg/L de esta citocinina.

### **3.5. Condiciones físicas de crecimiento *in vitro***

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 ocho horas en oscuridad y 16 horas en luz, proporcionándole una intensidad lumínica de 1500 Lux, una humedad relativa del 60% y una temperatura promedio durante el día de 26° C.

### **3.6. Diseño estadístico**

Se utilizó un diseño Completamente al Azar; para la etapa de desinfección se evaluaron cuatro tratamientos que fueron los diferentes protocolos utilizados por instituciones dedicadas a este tipo de investigación: T1 CATIE, T2 IHCAFE, T3 CIAT y T4 INIFAP, con cuatro repeticiones de 10 unidades experimentales; y para la etapa de inducción al callo se evaluaron dos tratamientos que fueron dos medios de cultivo T1 CIRAD y T2 CATIE, con cuatro repeticiones de 10 unidades experimentales; cada unidad experimental fue un frasco de vidrio tipo Herbert® con 25 cc de medio de cultivo con cuatro explantes de 1 cm<sup>2</sup> de superficie de hoja de café. Para la etapa de expresión de callo embriogénico se evaluaron dos tratamientos: T1 CIRAD y T2 CATIE, con cuatro repeticiones de 10 unidades experimentales; cada unidad experimental fue de un frasco tipo Herbert® con 25 cc de medio de cultivo de expresión con dos explantes con callo de 1 cm<sup>2</sup> de superficie de hoja de café.

### 3.7. Diseño matemático

$$Y_{ij} = \mu + T_1 + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = la variable respuesta.

$\mu$  = Es la media general.

$T_1$  = Efecto aleatorio

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental.

### 3.8. Variables evaluadas

#### 3.8.1. Etapa de desinfección

- a) Días a la presencia y porcentaje de contaminación: durante 20 días se realizaron observaciones tres veces por semana para llevar un registro de avance de contaminación con respecto al tiempo que el explante permaneció en el medio, considerando como contaminados aquellos que tuvieron presencia de bacterias, hongos y levaduras
- b) Porcentaje de sobrevivencia: Se observó durante las dos primeras semanas, relacionando el número de explantes sobrevivientes dentro de cada tratamiento divididas entre el total de explantes y luego multiplicados por 100.

#### 3.8.2. Etapa de inducción y expresión de callo embriogénico

- Fase de inducción
  - a) Días a la inducción de callo indiferenciado: a partir de la inoculación o siembra del material vegetativo en el medio de inducción se contabilizó durante 40 días el tiempo hasta la aparición de callos indiferenciados en el explante.
  - b) Porcentaje de explante con callo indiferenciado: al finalizar los 40 días de la fase de inducción se midió esta variable, relacionando el número de explante que llegaron a formar el callo indiferenciado dentro del tratamiento entre total de explantes multiplicado por 100.

- Fase de expresión del callo embriogénico
  - a) Aspectos morfológicos de callos embriogénicos:
    - a. Durante 80 días se clasificaron los callos de cada explante de acuerdo a la textura observada (friable y semi-friable).
    - b. Color de los callos: Por su coloración los callos se clasificaron como color café y crema, durante 80 días.
  - b) Días a expresión del callo embriogénico: Durante 80 días se cuantificarán los días en que los callos indiferenciados formaron callos embriogénicos en los explantes, observando embriones en formación en el tejido
  - c) Porcentaje de explante con callo embriogénico: al finalizar los 80 días se relacionaron los explantes que presenten callos embriogénicos y se dividió entre el total de explantes multiplicados por 100.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Etapa de desinfección

#### ➤ Días a la presencia y porcentaje de contaminación

En la primera fase de evaluación, a los cinco días ya existía presencia de contaminantes en dos tratamientos y a los diez días todos los tratamientos presentaron contaminación; esto concuerda con estudios realizados por otros investigadores quienes concluyeron que es difícil erradicar los microorganismos contaminantes en explantes de hojas de café extraídos de campo abierto (FAO, 1990). Al final de la fase de 20 días de observación, los tratamientos uno (CATIE) y dos (IHACAFE) presentaron el 100% de contaminación, el tratamiento tres (CIAT) presentó un 80%, mientras que el tratamiento cuatro del INIFAP no aumentó el porcentaje de contaminación, manteniéndose en un 20% desde el día cinco hasta finalizar el día 20. (Fig. 1).

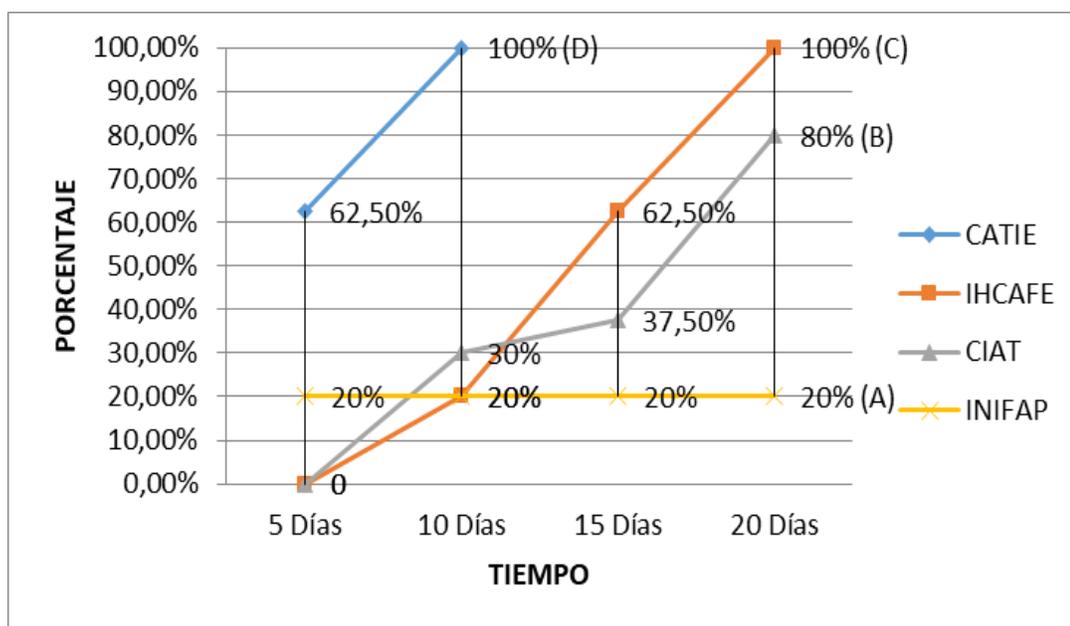


Figura 1. Días y porcentaje de contaminación en la evaluación de protocolos de desinfección en explantes de hojas de café (*Coffea arabica*) variedad "Bourbon" para la introducción *in vitro*. UES.CCAA.2016

El análisis estadístico realizado fue un modelo lineal generalizado mixto (Cuadro 3), demuestra que la diferencia entre los métodos de desinfección no es significativa en los tratamientos uno (CATIE), dos (IHACAFE) y tres (CIAT) con respecto a la cantidad

de frascos contaminados y que el tratamiento cuatro (INIFAP) presenta una diferencia significativa, en comparación con los tres tratamientos, siendo el que estadísticamente presentó los mejores resultados en cuanto a los bajos niveles de contaminación.

Cuadro 3: Modelos lineales generalizados mixtos para frascos contaminados - Medias ajustadas y errores estándares para tratamiento

Tratamiento	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
4	-2.94	0.36	0.05	0.02	A
1	-1.10	0.18	0.25	0.03	B
2	-1.10	0.18	0.25	0.03	B
3	-1.39	0.20	0.20	0.03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

El porcentaje de contaminación obtenido en esta investigación en el tratamiento cuatro se encuentra dentro del rango al obtenido por Gomez *et al* (2010) donde fue evaluada la influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café, donde se obtuvieron porcentajes de contaminación en un intervalo de 0 al 36% en hojas inmaduras pero en hojas maduras los resultados fueron del 100% de contaminación.

Cuando el material vegetal proviene de campos los porcentajes de contaminación dentro del laboratorio son altos, FAO (1990). Los resultados que se han obtenido en la investigación pueden afirmar lo anteriormente dicho debido a que el estudio se realizó con plantas provenientes de campo donde el material vegetal está expuesto a microorganismos internos y externos de difícil erradicación; Paz Ramirez (2000) sostiene que los microorganismos que se encuentran en campo pueden no ser patógenos pero en el laboratorio se convierten en una fuente principal de contaminación que compiten por nutrientes en el medio.

En esta investigación se observó el mayor porcentaje de contaminación (95%) fue de origen fúngica y un 5% de origen bacteriano; siendo *Rizoctonia* y *Cladosporium* las que se identificaron y *Bacillus subtilis*. Aunque un estudio realizado por Vargas-Castillo (2010) en *Geophila macropod*, que es una hierba arvense de importancia

agronómica por ser hospedera de insectos benéficos, presentó una alta contaminación bacteriana que alcanzó valores cercanos al 90%. Tres días después de la inoculación de los explantes, la presencia de bacterias fue evidente, observándose un exudado de coloración crema y apariencia pastosa. Por otra parte, la contaminación por hongos fue menor del 2%, donde el material fue desinfectado con etanol de 70° que es uno de los desinfectantes que se utiliza comúnmente, previo al tratamiento con hipoclorito de sodio, ambos también fueron utilizados en el tratamiento uno, dos y tres de esta investigación.

Existen una gran cantidad de eventos que pueden afectar los porcentajes de contaminación dentro del laboratorio como la edad de los explantes que 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 maduros. Según Lallana *et al.* (2006), la escasa capacidad de absorción de sustancias por parte de tejidos maduros, se debe a los depósitos de cera de mayor grosor presentes en la cutícula foliar lo cual puede atribuirse a que estas hojas presentan mayor cantidad de unidades formadoras de colonias de microorganismos, además que el crecimiento de su pared celular y la formación de ceras y ligninas epicuticulares es mayor que en hojas jóvenes, lo que dificulta la acción del agente desinfectante en los microorganismos endógenos.

#### ➤ **Porcentaje de sobrevivencia**

Durante esta fase, se evaluó por 20 días la sobrevivencia del tejido, en donde al día cero existía 100% de tejido vivo en los cuatro tratamiento, pero al finalizar la etapa de observación y evaluación los tratamiento uno (CATIE) y dos (IHCAFE) presentaron el 0% de tejido vivo; mientras que los tratamientos tres (CIAT) y cuatro (INIFAP) presentaron el 10% y el 70% respectivamente. (Figura 2), esto se debió a que las concentraciones de cloro en los tratamientos uno, dos y tres no son lo suficientemente efectivas para el control de contaminantes y oxidación de tejido; diferente en el tratamiento cuatro donde se aplicó un protocolo de desinfección antes de introducir el material a laboratorio y posterior a ello se realizó un método donde se

utilizó una cámara de vacío para favorecer la adsorción de los reactivos fungicidas y antioxidantes para garantizar la sobrevivencia del tejido.

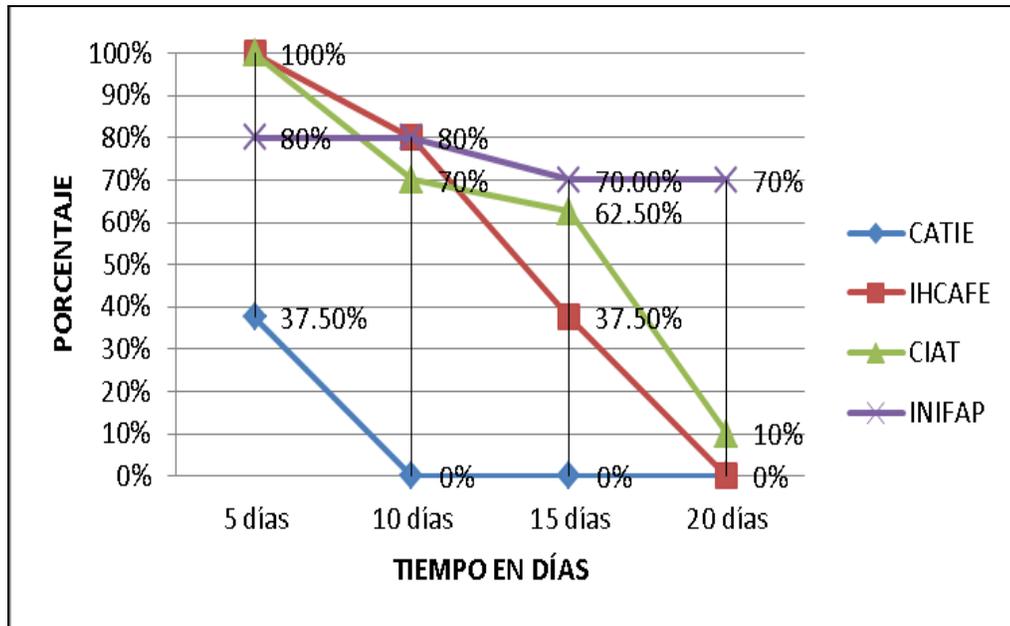


Figura 2. Comparación de protocolos de desinfección en hojas de café (*Coffea arabica*) variedad “Bourbon” para la sobrevivencia de explantes *in vitro*. UES.CCAA.2016.

## 4.2. Etapa de inducción y expresión del callo embriogénico

### 4.2.1. Fase de inducción a callo indiferenciado

- Días a la inducción y porcentaje de explantes con callo indiferenciado.

A los 15 días después de la inoculación del material, el tratamiento dos (CATIE) ya presentaba formación del callo indiferenciado y al finalizar la etapa de evaluación a los 43 días, el 70% del mismo tratamiento presentaron formación de callo; para el caso del tratamiento uno (CIRAD) no hubo buena reacción del tejido, solamente hubo 2,5% de formación de callo indiferenciado al final de esta etapa de evaluación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medios de cultivo para la inducción a callos indiferenciados en café (*Coffea arabica*) variedad “Bourbon” en 43 días de evaluación.

Tratamiento	Tiempo		
	15 días	29 días	43 días
	% de explantes con callo	% de explantes con callo	% de explantes con callo
<b>T1 CIRAD</b>	0	0	2,5
<b>T2 CATIE</b>	7,5	47,5	70

En todas las familias de plantas, el aspecto más importante para combatir la recalcitrancia durante el cultivo *in vitro* es la selección adecuada de los reguladores de crecimiento que se incorporan en el medio de cultivo (Benson, 2000). Al respecto, es muy importante tener en cuenta que los explantes se encuentran bajo el control de reguladores de crecimiento tanto endógenos como exógenos y que el balance de estos es el que determina el resultado final (Jiménez, 2005). Las auxinas son los reguladores de crecimiento más ampliamente utilizados para inducir callo con potencial embriogénico. De las auxinas disponibles, la más utilizada es el 2,4-D. La inducción de embriogénesis somática en café requiere que el medio tenga la combinación de una auxina (ácido 2,4-diclorofenoxiacético: 2,4-D) (Fernandez, R. 2010). En el cuadro 4 se observa que a los 43 días en el tratamiento dos, donde al medio se le adiciono el 2,4-D, el porcentaje de explantes con callo indiferenciado fue del 70% a diferencia del tratamiento uno donde el medio no contenía 2,4-D en vez de ello se le adiciono 2 Isopentyl adenina (2 IP); sin embargo no hubo una reacción positiva del tejido siendo el porcentaje de explantes con callo del 2,5%; influenciando también la consistencia de cada medio sobre el tejido, debido a que en el tratamiento uno se utilizó una dosis mayor de gelificante influyendo en que los reactivos que contenía el medio no pudieron ser absorbidos de una manera eficiente por el explante.

#### 4.2.2. Fase de expresión del callo embriogénico

##### Aspectos morfológicos de los callos embriogénicos.

El 90% de los callos con expresión embriogénica presentaron coloración crema y un 10 % coloración café y con un 60% de explantes con características friables y un 40% semi friables (Cuadro 5)

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 necesaria 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.

Cuadro 5. Aspectos morfológicos de callos embriogénicos en café (*Coffea arabica*) variedad "Bourbon", comparación de medios.

Tratamiento	Textura del callo		Color del callo	
	Friable	Semi friable	Café	Crema
	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje
<b>T1 CIRAD</b>	0	0	0	0
<b>T2 CATIE</b>	60	40	10	90

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 del tratamiento dos, a los 90 días, 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 considerándose como una manifestación de los primeros callos embriogénicos. El aspecto de estos callos fue similar, a los obtenidos por Sondhal (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 logro la formación de callos embriogénicos blancos y friables.

### **Días a la expresión y porcentaje de explantes con callo embriogénico.**

Los explantes provenientes de los medios de inducción después de 43 días de cultivo, se transfirieron a un medio de expresión en el cual pasaron 95 días más.

Cuadro 6. Comparación de medios de cultivo para la expresión de callos embriogénicos en café (*Coffea arabica*) variedad "Bourbon".

	<b>30 días</b>	<b>60 días</b>	<b>95 días</b>
<b>Tratamiento</b>	Explantes con expresión del embrión	Explantes con expresión del embrión	Explantes con expresión del embrión
<b>T1 CIRAD</b>	0	0	0
<b>T2 CATIE</b>	0	0	10

El cuadro 6 muestra que a partir de los 90 días, en el tratamiento dos propuesto por CATIE empezó la formación de callo embriogénico, siendo este el que presento los mejores resultados durante esta fase; con respecto al tratamiento uno no existió mayor repuesta debido a que en la fase de inducción no mostró reacción el tejido.

El porcentaje de explantes que formaron callo embriogénico (0 a 65 %) y el tiempo que tardaron en aparecer (90-95 días) difirió en los explantes; 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.



Figura 3. Proceso de inducción a embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.) variedad “Bourbon” UES.CCAA.2017

## 2. Conclusiones

- El método más eficiente de desinfección para introducir material extraído de campo al laboratorio fue el tratamiento cuatro propuesto por el INIFAP, el cual demostró reducir satisfactoriamente los microorganismos como bacterias, hongos y levaduras en los diferentes medios de cultivo así como en los explantes foliares de café variedad Bourbon.
- Los mejores resultados en la inducción a callos indiferenciados fueron obtenidos en un medio de cultivo propuesto por el CATIE, ya que a los 8 días de la inoculación presentaba formación de callos indiferenciados.
- La formación de callos indiferenciados tuvo mejor respuesta en explantes provenientes de hojas totalmente jóvenes y no de hojas sazonas o inmaduras.
- Los aspectos morfológicos encontrados en los callos embriogénicos fueron de color café y color crema, de consistencia friable a semi-friable.
- La formación de embriones somáticos fue un éxito ya que se lograron contabilizar al menos dos embriones en estado globular y de corazón por unidad experimental.

### 3. Recomendaciones

- Desinfectar en campo las plantas de café Variedad Bourbon con Azoxystrobina 50% (amistar 50 WP) en concentraciones de 1g/L durante tres días consecutivos y luego se procede a la desinfección en laboratorio con una solución antioxidante (30 gr/L de sacarosa, 100 mg/L de ácido ascórbico, 150 mg/L de ácido cítrico y 1 gr/L de Amistar® 50 WG (Azoxystrobin 50 %)) preparada y esterilizada un día antes de la inoculación.
  
- Realizar investigaciones sobre la dosis a utilizar de hipoclorito de calcio que no permita la contaminación y que no dañe el tejido foliar, así como también con otros métodos de desinfección de explantes de café provenientes del campo al laboratorio para obtener mejores resultados. .
  
- Para obtener formación de callo indiferenciado se recomienda utilizar el medio de cultivo propuesto por CATIE con la hormona 2,4-D a concentración de 1 ml/l de medio preparado y 2.2 g/l de Gelrite.
  
- Utilizar el medio de expresión propuesto por CATIE para la formación de embriones somáticos con concentraciones de 3 mg/l de BAP y 2.2 g/L de Gelrite y sin el uso de 2,4-D.
  
- Realizar investigaciones en las fases de suspensión celular, desarrollo, maduración y germinación de embriones somáticos, para irradiarlos y evaluarlos en fase de vivero para verificar si desarrollan resistencia o tolerancia ante la roya del café.
  
- Seleccionar plantas élites de café variedad Bourbon que presenten características de resistencia o tolerancia a la roya del café para proceder a la clonación y multiplicación *in vitro* vía embriogénesis somática para dar una respuesta rápida a la realidad a la que se enfrentan los caficultores de esta variedad en El Salvador.

#### **4. Bibliografía**

**Abdelnour E, A; Escalant, JV. 1996.** Conceptos básicos del cultivo de tejidos. Costa Rica. 48 p.

**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). P 12 – 13.

**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. Kadmos. 27 – 51 p.

**Carneiro, M.F. 1999.** Advances in biotechnology. Centro de Investigaçã das Ferrugens do Cafeeiro. Portugal. 8 p.

**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. 88 – 90 p.

**Cerón, F. 1987.** Uso de reguladores de crecimiento vegetal de la inducción in vitro de yemas axilares latentes de *Coffea arabica*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. Centro Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

**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.

**Croquer, Z. 2009.** Ingeniería genética aplicada al café (en línea). Venezuela. Consultado el 31 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/request?cg09060>

**Evans, D; Sharp, W. 1981.** Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture. Nueva York, Estados Unidos. 45 - 113 p.

**Folgueras, M. 2001.** Microorganismos contaminantes en la propagación masiva de *colocasia esculenta* y *Xanthosoma spp.* en la Biofábrica del MINAG en Villa Centro Agrícola (nota técnica). Cuba.

**Gali, A. sf.** Roya del cafeto. Perjuicios y beneficios para la caficultura. (Ficha técnica). México. 10 p.

**Gatica, M; Arrieta, G; Espinoza, A. 2006.** Comparison of Three in Vitro Protocols for Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Coffea Arabica* L. Cvs. Caturra and Catuaí (nota tecnica). Costa Rica.

**Giron Velado, I E. 1998.** Desarrollo y maduración de embriones somaticos de Hibridos f1 de *coffea arabica* para una producción masal. Tesis Mag. Sc. Turrialaba, CR, CATIE. 108 p.

**Gómez et al. 2010.** Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. Revista Fitotecnia Mexicana. 33(3):205-213

**ISIC (Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café). 1972.** Fisiología del cafeto. Nueva San Salvador, El Salvador, Offset ISIC Depto. Comunicaciones. 40 – 46, 175 p.

**Kuan, O. 1990.** Introducción a la técnica de cultivo de tejido. Institución Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica. 86 p.

**Lallana, MdelC; Billard, CE; Elizalde, JH; Lallana, VH. 2006.** Breve revisión sobre características de la cutícula vegetal y penetración de herbicidas. Ciencias Agrarias – Ciencias Médicas. 33(17):229-241

**Landaverde Parada, VL; López Ortiz, AS; Vásquez Flores, TC. 2002.** Estudio de inducción a callo embriogénico en variedades comerciales de café (*coffea arabica*) de El Salvador. Tesis Ing. Agr. UES, San Salvador, El Salvador. 97 p.

**León, J. 1987.** Botánica de los cultivos Tropicales. IICA(Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) San José Costa Rica. 194 – 203 p.

**Martínez, C; s.f.** Algunas tendencias de la Ingeniería Genética en la Biotecnología Forestal. 4 – 6 p.

**Moncada, E; Vielma, E; Mora, A. sf.** Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arábica L.* Variedad Catuaí Amarillo.

**Orozco C, FJ. 1990.** La hibridación interespecífica en café y las posibilidades de los híbridos triploides. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE). Colombia. p 54 - 64

**Paz Ramírez, AA. 2000.** Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *coffea arabica* a partir de explantes foliares. Tesis Lic. Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 52 p.

**Piedad Gallegos, N. 2003.** Embriogénesis somática y regeneración de plantas de *Medicago arbórea L.*: Valoración como forrajeras. Tesis Ph.D. en Ciencias Biológicas. Universidad de Salamanca, España. 172 p.

**Pierik, R. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. por Luis Ayerbe Mateosagasta. 3°ed. Madrid, España. Mundiprensa. 90 – 95 p.

**PRISMA (Programa Salvadoreño De Investigación Sobre Desarrollo Y Medio Ambiente). 2014.** Enfrentando la crisis del café desde las experiencias de las cooperativas y productores individuales de El Salvador. San Salvador, ES. 39 p.

**PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café) 1997.** Boletín Estadístico de la caficultura Salvadoreña. Nueva San Salvador, La Libertad. 1 – 20 p.

**PROCAFE (Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café) sf.** Laboratorio de cultivo de tejidos, Multiplicación *in vitro* de híbridos F1 de *coffea arabica* por la técnica de embriogénesis somática (Ficha técnica). 1 ed. La libertad, ES.

**Quijano Landaverde, J M. 2013.** Material Genético para la caficultura del futuro de El Salvador. Fundación Salvadoreña para Investigaciones del café (PROCAFE). (Diapositivas). El Salvador.

**Sondahl, MR; Nakamura, T; Sharp, WR. sf.** Propagación *in vitro* de café. Nueva Jersey, EU. 22 p.

**Vargas C, MP. 2010.** Cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (ruiz & pav. Dc) a partir de embriones cigóticos. Revista Agronomía Mesoamericana. 21(1):73-83.

**Vasquez, N; Pereira, A. sf.** Multiplicación semicomercial de materiales elites de café a través de embriogénesis somática: riesgos y beneficios (diapositivas). Turrialba, CR. 40 diapositivas.

**Williams, E; Maheswaran, M. 1986.** Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. Anuales de botanica 57. Estados Unidos.

## 5. Anexo

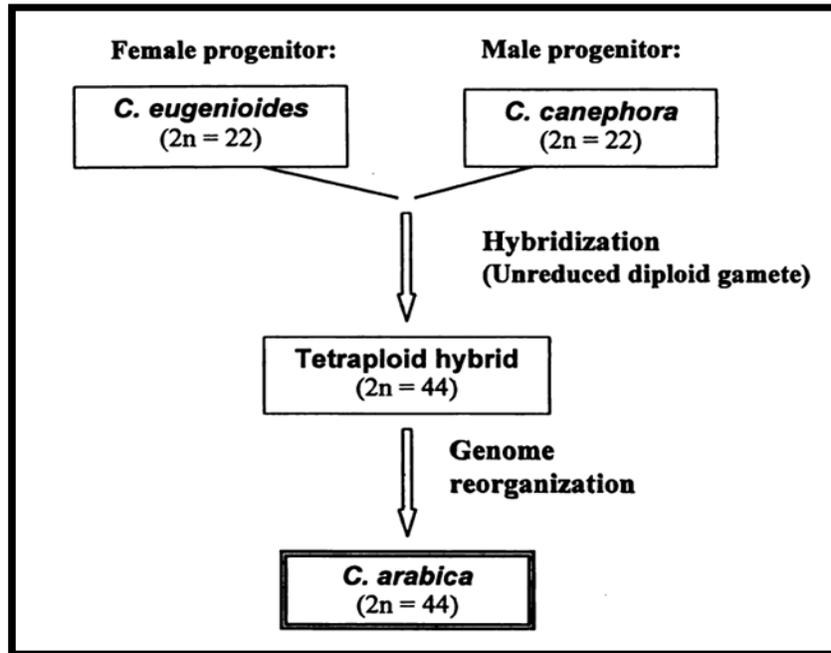


Imagen A- 1. Origen genético del café.

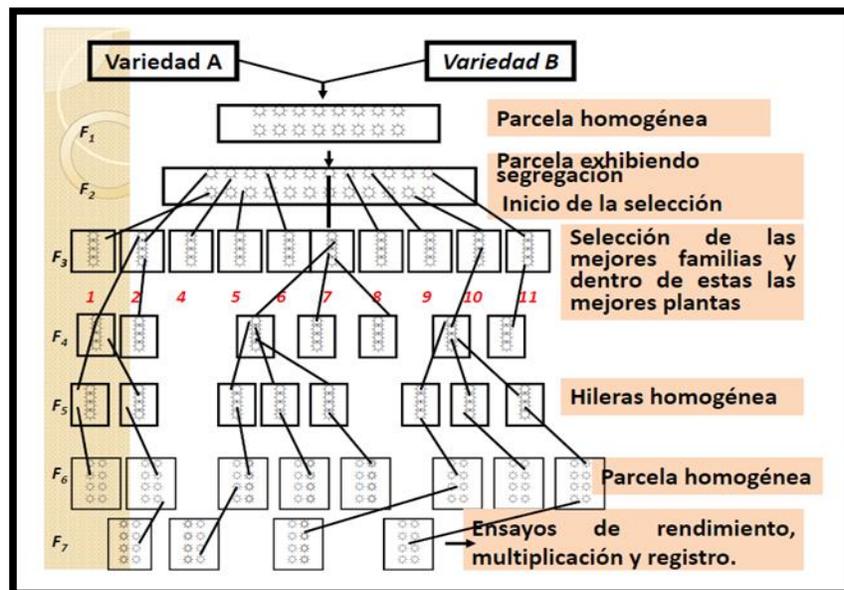
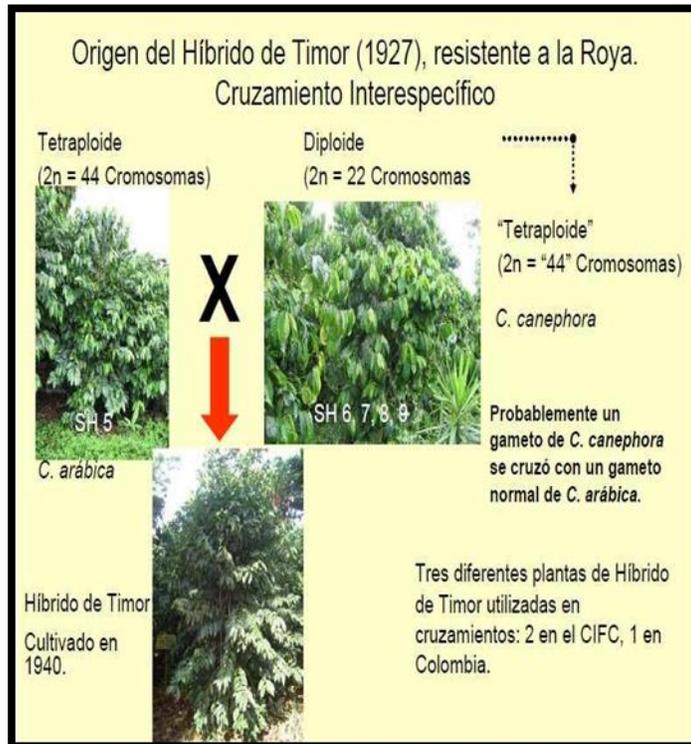
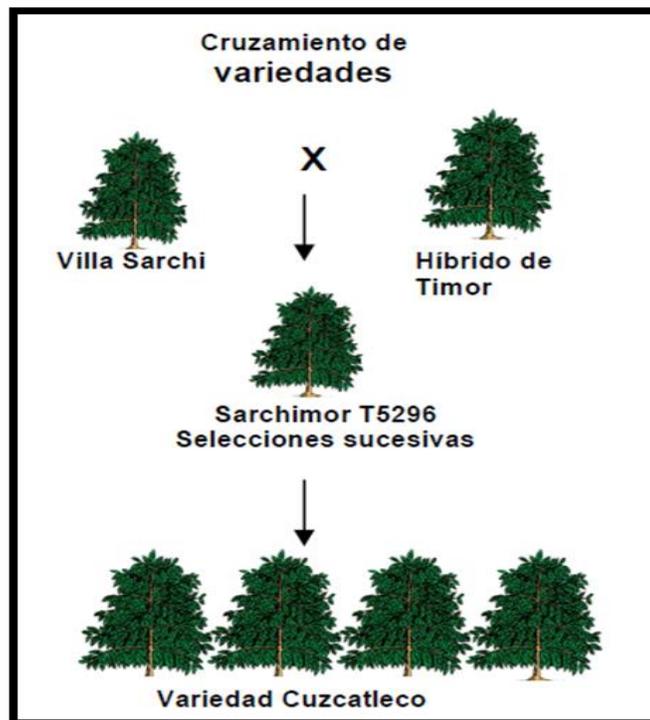


Imagen A- 2. Método convencional para la generación de una nueva variedad



**Imagen A- 3. Proceso de hibridación del café**



**Imagen A- 4. Proceso de formación de la variedad de café Cuzcatleco.**

**Tabla A- 1. Composición de Murasahige y Skoog – medio basal**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65 g/L
KNO <sub>3</sub>	1.9 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.37 g/L
CaCl <sub>2</sub> .aq	0.33 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17 g/L
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0.83 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg/L
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25 mg/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025 mg/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025 mg/L
<b>Hierro</b>	
Na <sub>2</sub> .EDTA	37.3 mg/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8 mg/L
<b>Vitaminas</b>	
Myo inositol	100
Ácido Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Glicina	2
<b>Otros reactivos</b>	
Pytagel	3.5 gr/L
Sacarosa	30 gr/L
pH: 5.7	