

Departamento De Ingeniería Química Y Bioquímica

Ingeniería Bioquímica

Informe Técnico De Residencia Profesional

Nombre Del Proyecto

“Embriogénesis Somática del *Coffea spp.*”

Presenta:

Angélica Farrera Roa

Asesor:

Dr. Carlos Alberto Lecona Guzmán

Co-Asesor:

Dr. Federico A. Gutiérrez Miceli

Tuxtla Gutiérrez Chiapas; México. A 19 de Diciembre 2016

Índice

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.....	0
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. OBJETIVOS.....	8
3.1. Objetivo general	8
3.2. Objetivo específico.....	8
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE PARTICIPACIÓN	9
4.1 Lugar donde se realizó el estudio	9
4.2 Misión	9
4.3 Visión.....	9
5. PROBLEMAS A RESOLVER.....	10
6. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	11
7. FUNDAMENTO TEÓRICO	12
7.1. Historia del café.....	12
7.1.1. Café en el mundo.....	13
7.1.2. Datos económicos.....	13
7.1.3. Principales productores de Café del mundo	14
7.1.4. Principales productores de Café a nivel nacional.....	15
7.2. Descripción botánica	15
7.2.1. Morfología de Café.....	16
7.3. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES	19
7.3.1. Broca	19
7.3.2. Minador de hojas de café.....	20
7.3.3. Pie negro.....	21

7.3.4.	Ojo de gallo	21
7.3.5.	Nematodos en el área de Mal de Viñas.....	22
7.3.6.	Antracnosis	23
7.3.7.	Roya.....	24
7.4.	TÉCNICA DE CULTIVO <i>in vitro</i>	26
7.4.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de material vegetal.....	26
7.4.2.	Embriogénesis somática.....	29
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
8.1.	Acondicionamiento de planta madre.....	31
8.2.	Protocolo de desinfección.....	31
8.2.1.	Primer Protocolo de Desinfección.....	31
8.2.2.	Segundo Protocolo de Desinfección	32
8.3.	Medio de Cultivo	32
8.3.1.	Primer Diseño experimental.....	33
8.3.2.	Segundo Diseño experimental	34
8.3.3.	Tercer Diseño experimental Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) Líquido....	35
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
9.1.	Respuestas obtenidas del Primer Protocolo de desinfección –	36
	Primer medio de cultivo.....	36
9.2.	Respuestas obtenidas del Protocolo de desinfección estandarizado -	38
	Medio de cultivo complementado	38
9.3.	Formación de embriones somáticos en medio líquido MS.....	42
10.	CONCLUSIONES.....	44
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

Figuras

Figura 1. Origen y distribución geográfica del cafeto. ⁵ La línea punteada hace referencia a la distribución de <i>Coffea canephora</i> ; la línea recta hace referencia a la distribución de <i>Coffea arábica</i>	12
Figura 2. Semilla de Café.....	17
Figura 3. Partes internas del fruto de Café.....	17
Figura 4. Flores de Café.....	18
Figura 5. Hoja de Café, presentación del envés.....	19
Figura 6. Escarabajo <i>Hypothenemus hampei</i>	19
Figura 7. 8. Polilla <i>Perileucoptera coffeella</i> (1). Hoja de café dañada (2).	20
Figura 9. Pudrición de raíces de cafeto ocasionada por el hongo <i>Rosellinia bunodes</i>	21
Figura 10. Hoja y fruto afectados por el hongo <i>Mycena citricolor</i>	22
Figura 11. Raíces afectadas por nematodos del género <i>Pratylenchus</i>	23
Figura 12. Planta con síntomas de antracnosis, ocasionada por el hongo llamado <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	23
Figura 13. Hoja enferma causada por el hongo <i>Hemileia vastatrix</i> , manchas amarillas con apariencia de “polvo” fino en el envés (1). Hoja sana (2).	24
Figura 14. Micropropagación in vitro. Modificado de Edwin F. George, A. Hall y Klerk (2008). 28	
Figura 15. Representación esquemática de las diferentes etapas de la embriogénesis somática del café. S-0 Embrión Madre: S-1 embrión primario: S-2 embrión globular: S-3 elongación de embrión: S-4 embrión corazón primario: S-5 embrión corazón: S-6 embrión torpedo: S-7 embrión cotidelonario. ²⁰	30
Figura 16. Variabilidad de respuestas en explantes foliares en la inducción de callos embriogénicos, primer protocolo de desinfección y medio MS normal con dos diferentes tratamientos: 4 AC y 6CC* (A) Tipos de hoja de izquierda a derecha: hoja inmadura, hoja joven y hoja madura. (B) Explante de hoja joven se aprecia un engrosamiento y expansión del tejido. (C) Obtención de brote a partir de yemas axilares con tratamiento 4 AC. (D) Fenolización en explantes de tejido foliar con tratamiento 4 AC. (E) Crecimiento de callos en las orillas de tejido foliar. (F) Explante de hoja joven con alta producción de callos embriogénico, el embrión somático obtenido presento una biomasa organizada de color verde claro.	36
Figura 17. Oxidación en explantes foliares de <i>Coffea</i> spp.	37
Figura 18. Variabilidad de respuestas en explantes foliares en la inducción de callos embriogénicos, segundo protocolo de desinfección y medio MS normal con 0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 -D. (A) Explante de hoja joven con alta producción de callos. (B) Explante de hoja inmadura se aprecia una expansión del tejido. (C) Obtención de embriogénesis somática directa. (D) Explante de hoja inmadura con crecimiento de callos embriogénicos en etapa globular. (E) Acercamiento de callo embriogénico donde se observan embriones en etapa globular. (f) Explante de hoja joven con crecimiento de callos en el contorno.	39
Figura 19. Embriones presentes en diferentes estadios, S-2 embrión globular: S-4 embrión corazón primario: S-6 embrión torpedo.....	40
Figura 20. Respuestas en explantes foliares previas a inducción de callos embriogénicos, segundo protocolo de desinfección y medio MS normal con 0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 -D. (a) Embriones	

somáticos en etapa globular. (b) inducción de crecimiento de embriones somáticos en medio líquido. (c) Disgregación de embriones en etapa globular. (d) Embriones somáticos de 3 semanas en medio líquido.	42
Figura 21. Medio líquido con callos embriogénicos y callos esponjosos que le dan apariencia turbia. CE Callo esponjoso: S-5 embrión somático en estadía corazón.	43

Cuadros

Cuadro 1. Principales Productores de Café a nivel mundial en el año 2015. International Coffee Organization. ⁶	14
Cuadro 2. Clasificación botánica del café anterior:	16
Cuadro 3. Clasificación botánica del café actual:	16
Cuadro 4. Tratamientos empleados para evaluación de respuestas en tejido foliar de <i>Coffee spp.</i> evaluando las hormonas BAP (6- Benzilaminopurina), ANA (Ácido naftalacetico) y 2,4- D (Acido 2,3 Diclorofenoxiacetico).....	33
Cuadro 5. Medios de cultivo utilizados durante el experimento con <i>Coffee spp.</i>	34

Graficas

Grafica 1. Porcentaje de respuesta con respecto a los tratamientos usados durante la evaluación del Primer estudio.	38
Grafica 2. Porcentaje de respuestas obtenidas en el Protocolo de desinfección estandarizado y Medio de cultivo complementado.	41

RESUMEN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado, a nivel mundial (11.2×10^6 ha) y nacional (697 mil ha). A nivel nacional México ocupa el 9° lugar como productor, aportando el 3.2 %¹, sin embargo, esta especie es susceptible a distintas enfermedades como la Roya causada por el hongo *Hemileia vastatrix* causando grandes pérdidas económicas a los productores. Es por ello que se han buscado alternativas aplicando técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro* con gran potencial de multiplicación a bajos costos de producción como lo es la embriogénesis somática. En el presente trabajo se hizo empleo del método de embriogénesis somática empleando Acido 2,4- Diclorofenoxiacético 2 mg/L y Benzilaminopurina 0.5 mg/L como reguladores hormonales, en el que se logró obtener embriones somáticos a partir de una serie de modificaciones y complementación de agentes antioxidantes durante el desarrollo del experimento, generando un protocolo eficaz en el que se redujo la fenolización y contaminación, y un medio de cultivo que aumentó significativamente las respuestas en los explantes foliares de *Coffea spp.*

1. INTRODUCCIÓN

Coffea spp. es un arbusto de la familia de las rubiáceas, en la actualidad tiene un valor económico y social de suma importancia², sin embargo el sector cafetalero está sufriendo actualmente una gran crisis debido a enfermedades y plagas que atacan al cafeto, el hongo *Hemilia vastatrix* conocido comúnmente como roya de café es una de las enfermedades que más han atacado los cafetales provocando grandes pérdidas económicas.

La roya del café apareció por primera vez en Centroamérica en 1976, pero nunca había afectado la producción tan gravemente como se viene dado actualmente³.

El impacto económico de la roya del café en la región de Centroamérica y Caribe es alto. Al final del ciclo cafetalero 2013/2014 se estimó que el 16.4 % de la producción de café de la región de Centroamérica se perdió por la roya, el área afectada estimada es de 593,037 Hectáreas (54.8 % del total). Provocando pérdidas de cosechas de 3.5 millones de sacos de 60 kilos (19 % del total), con \$499 millones (16 % del total) ³.

En el ámbito nacional Chiapas es el primer productor de café con una participación de 34.8%, Veracruz con 25.2%, Oaxaca y Puebla con un 28%, por lo que 4 estados aportan el 88% del total nacional.

Nuestro país en busca de mejorar la baja tasa de multiplicación de este cultivo debido a la roya de café, se han explorado diferentes alternativas biológicas para la multiplicación de plantas de café por medio de cultivo de tejidos. Ha quedado demostrado que mediante modificaciones en la composición química del medio de cultivo, especialmente del balance Citocininas/ Auxinas, así como otras condiciones físicas y químicas del cultivo, es posible inducir la diferenciación de tejidos vegetales; sin embargo, pueden ocurrir variaciones en la respuesta, dependiendo de la variedad y de las condiciones del cultivo⁴ .

2. JUSTIFICACIÓN

Las plagas y enfermedades de las distintas variedades de Café son una gran problemática para la economía de comerciantes y productores de Café al reducir la calidad del producto y bajar la tasa de producción, por lo que la biotecnología ofrece alternativas para la generación de nuevas variedades de café de mejor calidad, resistentes a plagas y enfermedades, y ambientes extremas. Por lo que una de las soluciones a esta gran problemática se encuentra el cultivo *in vitro* a través de la vía de embriogénesis somática que es una técnica a bajos costos de productividad con gran rentabilidad, que a la par busca el mejoramiento del Café haciéndola más resistentes a estos agentes Patógenos inclusive aumentando la productividad del cafeto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Obtener de embriones somáticos a partir de explantes foliares de *Coffee spp.* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) líquido.

3.2. Objetivo específico

- Estandarizar un protocolo de desinfección de explantes foliares de *Coffee spp*
- Definir las concentraciones más adecuadas de los reguladores de crecimiento para inducir la embriogénesis somática en *Coffee spp.*
- Analizar el efecto - respuesta de los reguladores hormonales en los explantes foliares de *Caffee spp.*

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE PARTICIPACIÓN

4.1 Lugar donde se realizó el estudio

- Laboratorio Biotecnológico De Chiapas S.A. de C.V. Localizado en 2° Andador Norte Núm. 624 Col. Albania Baja, C.P. 29010, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, edificio Z en planta alta, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, localizado en carretera panamericana Km. 1080 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

4.2 Misión

- Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

- Laboratorio Biotecnológico De Chiapas

Realizamos investigación científica, formamos recursos humanos, divulgamos conocimiento, desarrollamos y transferimos tecnología e impulsamos el desarrollo de la sociedad en armonía con el medio ambiente.

4.3 Visión

- Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

- Laboratorio Biotecnológico De Chiapas

Ser una institución líder, reconocida local, nacional e internacionalmente, innovadora en la generación y aplicación del conocimiento en beneficio de la humanidad.

5. PROBLEMAS A RESOLVER

- La roya del café provocada por el hongo *Hemilia vastatrix* a provocado pérdidas de cosechas de 3.5 millones de sacos de 60 kilos (19 % del total), con valor de \$499 millones (2013-2014). Al ser una enfermedad de bajo tiempo de multiplicación (3 a 4 horas) y de gran agresividad ya que este ataca el sistema endógeno del cafeto presentando manchas amarillas de apariencia polvorienta en el envés de la hoja, afecta severamente a la planta conduciéndola a una muerte descendiente. Su diseminación por esporas permite que esta enfermedad se disipé con mayor facilidad en los cafetales a través de corrientes de viento y por lluvias que arrastran las esporas, haciendo que esta enfermedad tenga una alto potencial de propagación.
- La fenolización de tejidos cultivados *in vitro*, por oxidación de compuestos fenólicos o la presencia de radicales libres, es un fenómeno que se presenta con frecuencia en estos métodos de cultivo vegetal ocasionando daño e inclusive muerte celular, por lo que estudiaron medidas y estrategias para solventar estos problemas.
- El material vegetal a experimentar se encuentra de forma *ex vitro* e implantado directamente en suelo, por lo que la carga microbiana es elevada y las condiciones ambientales como la variación de humedad son un factor que influye en su desarrollo. Por lo que se buscó su acondicionamiento para elevar su valor nutricional y así su grado de desarrollo sea elevado y libre de enfermedades.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

▪ Alcances

Se estandarizo un protocolo de desinfección en el que se logró reducir el índice de contaminación (por agentes microbianos) y de fenolización en los explantes foliares por frasco. En el que se redujo el tiempo de inmersión de los agentes desinfectantes ya que estos provocan un alto nivel de estrés en los tejidos vegetales así como la complementación de agentes antioxidantes que permiten reducir la fenolización en el tejido foliar de *Coffea spp.*

Se obtuvieron las concentraciones más adecuadas de Acido 2,4 - Diclorofenoxiacetico y Benzilaminopurina como reguladores hormonales para inducción de embriones somáticos.

A partir de un medio complementado y ajustado a las necesidades abióticas exógenas o endógenas del sistema, se obtuvieron callos embriogénicos que dieron origen a embriones somáticos en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) líquido.

▪ Limitaciones

Debido a la fenolización en los explantes foliares la respuesta era menor y retardado comparada con los explantes que no presentaban fenolización.

Los explantes que presentaban mayor fenolización por área, a un determinado tiempo les provocaba necrozamiento.

7. FUNDAMENTO TEÓRICO

7.1. Historia del café.

El consumo de café comenzó en la zona etíope de Kefa o Kaffa hace 3.500 (tres mil quinientos) años. La tribu de los Oromo consumía granos de café molido y mezclado con grasa animal enrollados en bolitas, lo consideraban un alimento sustantivo para sus viajes.¹

El cafeto es un árbol que crece en regiones húmedas, calurosas y en alturas que varían entre 800 y 1500 m de altitud para el *Coffea arábica*. No resiste al hielo, por eso se desarrollan principalmente entre el trópico de cáncer y trópico de capricornio.

- Asia y Oceanía: Vietnam, Indonesia e India
- América latina: Brasil (principal productor mundial), Colombia y México.
- El resto viene de África: Etiopia y muchos países menos desarrollados (PMD) como Burundi.

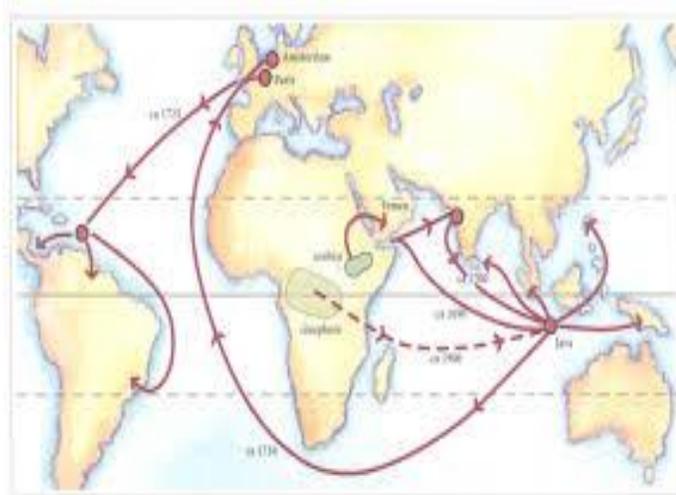


Figura 1. Origen y distribución geográfica del cafeto.⁵ La línea punteada hace referencia a la distribución de *Coffea canephora*; la línea recta hace referencia a la distribución de *Coffea arábica*.

El café puede ser cultivado en zonas de montanos o en llanuras, lo importante que el clima tenga un periodo seco y otro húmedo (zona intertropical húmeda). Es la única tetraploide ($2n = 4x = 44$ cromosomas) y especies autógamas del género *Coffea*, que contiene 80 especies.

7.1.1. Café en el mundo

El café es la segunda mercancía comercializada en el mundo, tras el petróleo. Se estima en 125 millones el número de personas que vive del cultivo del café, incluyendo 25 millones de pequeños productores. Cada año se beben 400.000 millones de tazas de café. Por tanto, en juego existen demasiados intereses económicos y sociales extremadamente importantes.

7.1.2. Datos económicos

La producción mundial es superior a 100 millones de bolsas desde hace varios años (120 millones en 2002, 102 millones en 2003), la unidad de medida es la bolsa de 60 kg. De esta producción, se exportan más de 80 millones de bolsas cada año (88 millones en 2002, 84 millones en 2003). El mayor productor es, con mucha diferencia, Brasil, especialmente el estado de São Paulo donde se sitúa el primer puerto cafetero del mundo: el puerto de Santos, seguido por Colombia y Vietnam (el productor más importante de robusta).

El ascenso y descenso de los precios del café se han presentado en la historia por diversos factores. En 1987 Vietnam la sobre productividad y exportación provocó la caída del precio hasta el año 2004 debido al aumento de consumo en China y en Rusia.

Ahora muchos agricultores de café pueden vivir de sus productos, pero no en todas las etapas, pues el aumento del precio del petróleo encarece los costes de transporte, la torrefacción y el empaquetado de los granos de café.

Se utilizan varias clasificaciones para etiquetar el café producido bajo ciertos estándares ambientales o de trabajo. Por ejemplo, bird-friendly o el shade-grown se producen en las regiones donde la sombra natural (producida por los árboles) se utiliza para proteger las plantas del café durante parte de la estación de crecimiento.

El café orgánico se produce bajo estrictas pautas de certificación, y se produce sin utilizar pesticidas artificiales potencialmente dañinos. El café convencional es producido utilizando más pesticidas que cualquier otro cultivo agrícola el algodón es el segundo.

El café de comercio justo es producido por pequeños productores de café; garantizando para estos productores un precio mínimo, aunque históricamente con precios bajos, los actuales mínimos de comercio justo son más bajos que el precio de mercado de sólo unos pocos años antes. USA es la principal organización que supervisa actualmente las prácticas comerciales de comercio justo del café en los Estados Unidos, mientras que la Fairtrade Foundation hace lo propio en el Reino Unido.

7.1.3. Principales productores de Café del mundo

El mayor productor de café del mundo sigue siendo Brasil, a pesar de que Vietnam consiguió recientemente la segunda posición en el mercado gracias a las grandes cantidades de café tipo Robusta (*Coffea canephora*) que produce.

En el siguiente cuadro pueden verse los principales países productores de café del mundo en el año 2015 ordenados según el porcentaje de producción mundial:

Cuadro 1. Principales Productores de Café a nivel mundial en el año 2015. International Coffee Organization.⁶

Principales Productores De Café Del Mundo En El Año 2015			
Puesto	País	Producción (En Miles De Kg)	% De Producción Mundial
1	Brasil	2.594.100	30,16%
2	Vietnam	1.650.000	19,18%
3	Colombia	810.000	9,42%
4	Indonesia	660.000	7,67%
5	Etiopía	384.000	4,46%
6	India	350.000	4,07%
7	Honduras	345.000	4,01%
8	Uganda	285.000	3,32%
9	México	234.000	2,72%
10	Guatemala	204.000	2,37%
11	Perú	192.000	2,23%
12	Nicaragua	130.000	1,52%
13	Costa de Marfil	108.000	1,26%
14	Costa Rica	89.520	1,04%
15	Kenia	50.000	0,58%
16	Papúa Nueva Guinea	48.000	0,56%
17	El Salvador	45.701	0,53%
18	Ecuador	42.000	0,49%
19	Camerún	34.200	0,40%

7.1.4. Principales productores de Café a nivel nacional

La producción de café en México está distribuida en 13 estados cafetaleros, destacando Chiapas con una participación de 34.8%, Veracruz con 25.2%, Puebla y Oaxaca con un 28%. Estos estados son los principales productores en donde se aportan el 88% de la producción debido a que México cuenta con condiciones ideales para el cultivo del café, con zonas montañosas del sureste del país que se encuentran a altitudes mayores a 900 metros sobre el nivel del mar, así como temperaturas que van de los 17.5 a 25.3°C.

En México, la variedad que se produce es la denominada “arábiga” (*Coffea arábica*) y del tipo robusta (*Coffea canephora*). La cafeticultura en México representa una actividad fundamental en el sector agrícola, no sólo por el valor de su producción, sino además por ser un importante generador de divisas, además por las bondades que ofrece al ser un cultivo de gran relevancia ambiental, puesto que el 99% de los predios cafetaleros se establecen bajo sombra.

La superficie total de producción es de 697 mil 366 hectáreas pertenecientes a 511,669 productores. Del total de la superficie de café, el 97 % corresponde a las variedades arábicas y un 3 % a las robustas, estas últimas ocupadas para la industria de los solubles.⁷

7.2. Descripción botánica

El café había sido estudiado por más de dos siglos antes de que Linneo (1737) lo describiera en términos modernos. Linneo clasificó el cafeto en un grupo de plantas afines y creó para él el género *Coffea*. Más tarde Jussie incorporó ese grupo de plantas dentro de la familia de las Rubiáceas.

A esta familia pertenecen la gardenia y la ipecacuana. La familia de las Rubiáceas posee, según el Profesor Augusto Chevalier, más 500 géneros y de 6 a 8 mil especies descritas. Menciona además este autor que el género *Coffea* pertenecen unas sesenta especies. De otra parte, se han señalado como cafetos botánicamente otro grupo de Rubiáceas, cuyos frutos se asemejan bastante a los del género *Coffea* y que están desprovistos de cafeína.

Clasificación

Cuadro 2. Clasificación botánica del café anterior:

Reino	Plantae
Clase	Dicotiledóneas
Sub-clase	Gamopétalas inferiorvariadas
Orden	Rubiales
Familia	Rubiáceas
Género	<i>Coffea</i>
Especies	<i>arabica, canephora, liberica</i>

Cuadro 3. Clasificación botánica del café actual:

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Asteridae
Orden	Rubiales
Familia	Rubiáceae
Género	<i>Coffea</i>
Especies	<i>arabica, canephora, liberica</i>

7.2.1. Morfología de Café

El cafeto, es una planta gimnosperma, leñosa, perennifolia, de producción bianual que prefiere crecer bajo sombra. Por lo general, el cultivo del cafeto siempre estuvo asociado a diversos árboles frutales y a algunos vegetales que le daban sombra y lo protegían de las heladas, como matas de plátano y árboles de mango, mamey, cítricos y aguacates. La superficie del terreno ocupado por un cafetal debe mantenerse libre de malezas. Para describirlo, se partirá del centro de interés que es el fruto y específicamente la semilla.⁸

▪ Semilla

Ésta consta de dos núcleos, cada uno de ellos con un grano de café con forma plana-convexa, el grano de café está encerrado en un casco semirrígido transparente, de aspecto apergaminado, que corresponde a la pared del núcleo. Una vez retirado, el grano de café verde se observa rodeado de una piel plateada adherida, que se corresponde con el tegumento de la semilla.



Figura 2. Semilla de Café.

- **Fruto**

El fruto de cafeto es una drupa poliesperma. Es carnoso, de color verde al principio; pero al madurar rojo o púrpura, raramente amarillo, llamado cereza de café, es de forma ovalada o elipsoidal ligeramente aplanada.

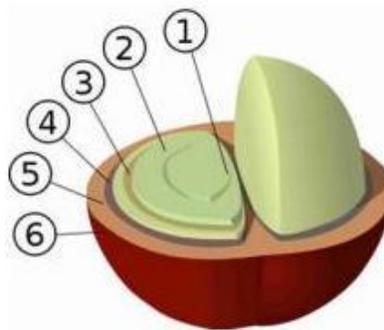


Figura 3. Partes internas del fruto de Café.

Las partes del fruto del interior al exterior son:

1. Embrión: localizado en la superficie convexa de la semilla, orientado hacia el extremo en forma puntiaguda y conformada por un hipocotilo y dos cotiledones.
2. Endospermo: La semilla propiamente constituida.
3. Espermoderma: (Película plateada), envuelve la semilla (integumento seminal).
4. Endocarpio: (Pergamino, cascarilla), cubierta corécea de color crema a marrón que envuelve la semilla.
5. Mesocarpio: (Mucílago, baba), de consistencia gelatinosa y color cremoso.
6. Epicarpio: (Cutícula, cáscara, pulpa), de color rojo o amarillo en su madurez, jugoso y envuelve todas las demás partes del fruto.

- **Inflorescencia**

El cafeto posee una inflorescencia llamada Pacaya. La inflorescencia del café es una cima de eje muy corto que posee flores pequeñas, de color blanco y de olor fragante en número variado. La florecida alcanza su plenitud el cuarto o quinto año.



Figura 4. Flores de Café.

Los granos de polen en la especie canephora y liberica son fácilmente transportados por brisas leves mientras que en la especie arábica no, debido a que son pesados y pegajosos.

Las especies canephora y liberica son especies alógamas y los arábigos son autógamos. En las especies donde ocurre la polinización cruzada el elemento polinizador principal es el viento y luego los insectos.

En los arábigos el 94% de la polinización es autopolinización y sólo en un 6% puede ocurrir polinización cruzada.

- **Hojas**

Las hojas aparecen en las ramas laterales o plagiotrópicas en un mismo plano y en posición opuesta. Tiene un pecíolo corto, plano en la parte superior y convexo en la inferior. La lámina es de textura fina, fuerte y ondulada. Su forma varía de ovalada (elíptica) a lanceolada. El haz de la hoja es de color verde brillante y verde claro mate en el envés. Su tamaño puede variar de tres a seis pulgadas de largo.

La vida de las hojas en la especie arábica es de siete a ocho meses mientras que en la canéphora es de siete a diez meses. La cantidad y distribución de follaje dependerá de la cantidad de sombra que posee el cafetal en el campo.



Figura 5. Hoja de Café, presentación del envés.

7.3. PRINCIPALES PLAGAS Y ENFERMEDADES

Existen muchas especies de insectos y enfermedades que están asociados al cultivo de café causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos, algunas de importancia potencial, ocasional o clave. Estas plagas y enfermedades son en parte las responsables de las grandes pérdidas agroeconómicas tanto a nivel nacional como a nivel mundial.⁹

7.3.1. Broca

El daño es causado por el escarabajo *Hypothenemus hampei*, que pertenece a la familia Curculionide – orden Coleóptera. Es un insecto pequeño que mide 2 mm y de color negro a marrón oscuro.



Figura 6. Escarabajo *Hypothenemus hampei*.

Plaga exclusiva del café (no posee hospedantes alternantes). El adulto entra perforando los frutos por la cicatriz de la corola (frutos preferentemente maduros). Una vez dentro las

hembras ponen huevos, que eclosionan y se desarrollan al interior del cerezo. La ovoposición cesa cuando termina la campaña de producción de frutos en la campaña.

El desarrollo del huevo a adulto demora 29 días y dependiendo de la temperatura puede variar de 24 a 61 días.

Las hembras adultas pueden vivir de 81 a 282 días, siendo el promedio 156 días. Los adultos machos solo viven de 40 a 50 días. Las hembras durante su vida depositan hasta 70 huevos. La relación de hembra a macho es 9: 1.

El escarabajo *Hypothenemus hampei* provoca grandes daños a la planta: caída de flores ,caída de granos verdes picados (lechosos), destrucción de granos maduros, perforaciones de frutos, reducción del peso de granos, pérdida de calidad Pudriciones de granos por hongos.

7.3.2. Minador de hojas de café

El daño es causado por la polilla *Perileucoptera coffeella*, que pertenece a la familia *Lyonetidae*, orden *Lepidoptera*.



Figura 7. 8. Polilla *Perileucoptera coffeella* (1). Hoja de café dañada (2).

Los adultos se mantienen inactivos durante el día, permanecen quietos en el envés de las hojas, ovipositan en el haz de las hojas, durante la noche la larva emergida penetra dentro de la piel de las hojas consumiendo la parte interna.

El daño que provoca en las hojas se caracteriza por la forma de ampolla que al comienzo son verde claras pero luego se vuelven de color pardo o marrón oscuro. Ante infestaciones intensas puede causar defoliación, disminución del rendimiento y la calidad del grano.

7.3.3. Pie negro

Esta enfermedad es ocasionada por el hongo *Rosellinia bunodes*. Provoca la pudrición de raíces, con la corteza desorganizada y de color negro. En la parte aérea se observa amarillamiento, marchitez, defoliación y muerte de las hojas.



Figura 9. Pudrición de raíces de café ocasionada por el hongo *Rosellinia bunodes*.

Las aplicaciones de Oxidocloruro de Cobre son una alternativa de combate a esta enfermedad si se detectan los síntomas a tiempo. Este mismo producto se puede usar en hoyos dejados al extraer las plantas enfermas. Favorecer la aireación y exposición solar de los hoyos en donde estuvo la planta enferma, reducir al mínimo la fuente de inóculo (retirar la planta enferma con todo y raíces) son métodos preventivos ante esta enfermedad causada por el hongo *Rosellinia bunodes*.

7.3.4. Ojo de gallo

Esta enfermedad es causada por el hongo *Mycena citricolor*. Se manifiesta principalmente en lugares montañosos donde hay alta humedad (superior al 80%), temperatura alrededor de 20 °C, exceso de sombra en los cafetales y variedades susceptibles. El daño que ocasiona consiste en que el hongo provoca caída de hojas, frutos, muerte de brotes jóvenes y causa bajo rendimiento. El hongo sobrevive en las lesiones que se observan sobre las hojas viejas, esporádicamente en frutos enfermos que quedaron en la planta o tejidos enfermos de las ramas.



Figura 10. Hoja y fruto afectados por el hongo *Mycena citricolor*

Dichas lesiones son de color blanquecino, tienen aspecto seco y de aproximadamente medio centímetro de diámetro. Aquí sobrevive el hongo de un año para otro y es allí donde se origina el inóculo primario, o sea aquel que da inicio a la enfermedad.

Los principales factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad son: períodos prolongados de hojas mojadas, terrenos con pendiente sin exposición directa del sol durante la mañana, manejo de más de tres ejes después de la resepa, deficiencia en planificación de programas de fertilización, manejo de enfermedades y presencia de cultivares susceptibles como el Catimor, entre otros. La enfermedad inicia paralelamente a las lluvias de abril a mayo.

7.3.5. Nematodos en el área de Mal de Viñas

Existen antecedentes que relacionan a los nematodos como agentes causantes del síndrome del mal de viñas, conjuntamente con la acidez del suelo y la falta de sombra en los cafetales. Los nematodos son organismos con apariencia de pequeñas lombrices que se alimentan de las raíces de los cultivos, llegando a provocar daños importantes bajo condiciones de suelo y clima favorables.

Los nematodos del género *Pratylenchus* son los que predominan en las áreas susceptibles al mal de viñas. Estos nematodos provocan lesiones en las raíces. En el punto de infección se desarrolla una necrosis en la superficie de la raíz, ocasionando además, descortezamiento de las raicillas. En las raíces más gruesas hay extensas áreas necrosadas.



Figura 11. Raíces afectadas por nematodos del género *Pratylenchus*

Por ser organismos pequeños, el diagnóstico de esta plaga sólo puede ser confirmado con el análisis nematológico en el laboratorio. Para ello, se debe realizar un muestreo en todos los lotes de la finca en que se manifiesten parches de plantas amarillas y defoliadas, con crecimiento pobre y poco vigor.

7.3.6. Antracnosis

Es ocasionada por el hongo llamado *Colletotrichum gloeosporioides*. Este puede afectar tallo, ramas, hojas, flores y frutos en diferentes fases de desarrollo. En las plantas afectadas se observan ramas, iniciando en su ápice o muerte descendente. En hojas y frutos se pueden ver lesiones negras, profundas de diferente tamaño.



Figura 12. Planta con síntomas de antracnosis, ocasionada por el hongo llamado *Colletotrichum gloeosporioides*.

En los frutos la infección puede observarse como una mancha necrótica que avanza siguiendo un patrón circular, transversal al pedúnculo.

El hongo ocasiona caída de flores, hojas y frutos, y es diseminado a través de las esporas acarreadas a cortas distancias por salpique de lluvia o durante la realización de las labores de campo y a largas distancias por medio de plántulas infectadas.

La antracnosis es una enfermedad que se encuentra diseminada en cafetales de todo el país afectando además del café a diversos cultivos y árboles, en los cafetales afectados por mal de viñas, éste patógeno encuentra las condiciones ideales para infectar y agravar la condición de las plantas afectadas.

7.3.7. Roya

Una de las principales enfermedades en las especies de *Coffea* son causadas por la roya (*Hemileia vastatrix*), esta enfermedad debilita las plantas y provoca que el fruto del café caiga antes de su maduración.

El café es el único hospedero conocido de este hongo perteneciente al Phylum *Basidiomycota*, Orden Uredinales, Familia Pucciniaceae. Considerado un parásito obligado, no puede sobrevivir en el suelo o en material vegetal inerte; hasta la fecha no ha sido posible su cultivo en laboratorio.



Figura 13. Hoja enferma causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, manchas amarillas con apariencia de “polvo” fino en el envés (1). Hoja sana (2).

"En los últimos tres años las condiciones climáticas han favorecido la propagación del hongo, debido a una combinación de altas temperaturas y lluvias".^{1º}

Dicha plaga, ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix*, tiende a reproducirse en condiciones de humedad y calor, en temperaturas que oscilan entre los 18 y 24 °C.

Una epidemia de la roya presenta tres fases claramente identificables en procesos denominados policíclicos. Una fase lenta con infección de unas pocas hojas; posteriormente una fase rápida o explosiva y una fase terminal o máxima.

Los síntomas corresponden a lesiones cloróticas, inicialmente con decoloración de áreas de la hoja, especialmente hacia los márgenes, donde tiende a acumularse más agua, y posteriormente con gran presencia de urediniosporas del hongo que se reconoce como el polvillo amarillo o naranja ubicado por el envés de la hoja afectada. Los cultivos atacados disminuyen drásticamente su producción porque se afecta la economía energética de la hoja, la cual es responsable de tres procesos vitales (fotosíntesis, respiración y transpiración); al ser atacada reduce su funcionamiento y puede incluso desprenderse del árbol. A mayor número de hojas enfermas, mayor es el impacto de la producción.¹¹

El agua es esencial para la dispersión y germinación de las esporas del hongo, la existencia de una epidemia de roya del café requiere de lluvia. Algunas investigaciones han concluido que la dispersión de la roya por el aire es de poca o ninguna importancia y que las salpicaduras de la lluvia son el agente principal, no solamente para la dispersión, sino también para la liberación de esporas.

7.4. TÉCNICA DE CULTIVO *in vitro*

El cultivo *in vitro* (término que literalmente significa en vidrio), incluye muchas técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar, entre otros recursos, material vegetal en condiciones controladas y asépticas. El cultivo *in vitro*, constituye un paso fundamental en la obtención y regeneración de plantas genéticamente modificadas, o transgénicas, mediante técnicas de ingeniería genética.

7.4.1. Cultivo *in vitro* de material vegetal

“Cultivo de tejidos vegetales” es una descripción genérica que involucra diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo las de protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas.¹²

Esta técnica tiene numerosas aplicaciones:

- Propagación masiva de plantas, especialmente beneficiosa para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año
- Obtención de plantas libres de virus
- Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma: material de un conjunto de individuos que representa la variabilidad genética de una población vegetal
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas, incluyendo obtención de plantas transgénicas

- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, las células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad se denomina totipotencialidad celular, y es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en distintos órganos de la planta. Básicamente, la reproducción asexual se puede realizar debido a que las células vegetales poseen un mecanismo de división mitótico, mediante el cual cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo.

La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre. La potencialidad de una célula diferenciada (una célula de conducción, epidérmica, etc.) para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta.

Así, las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- Una des diferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos (llamados así porque son estructuras similares a un embrión pero que no se originaron por unión de gametos).
- Una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos).

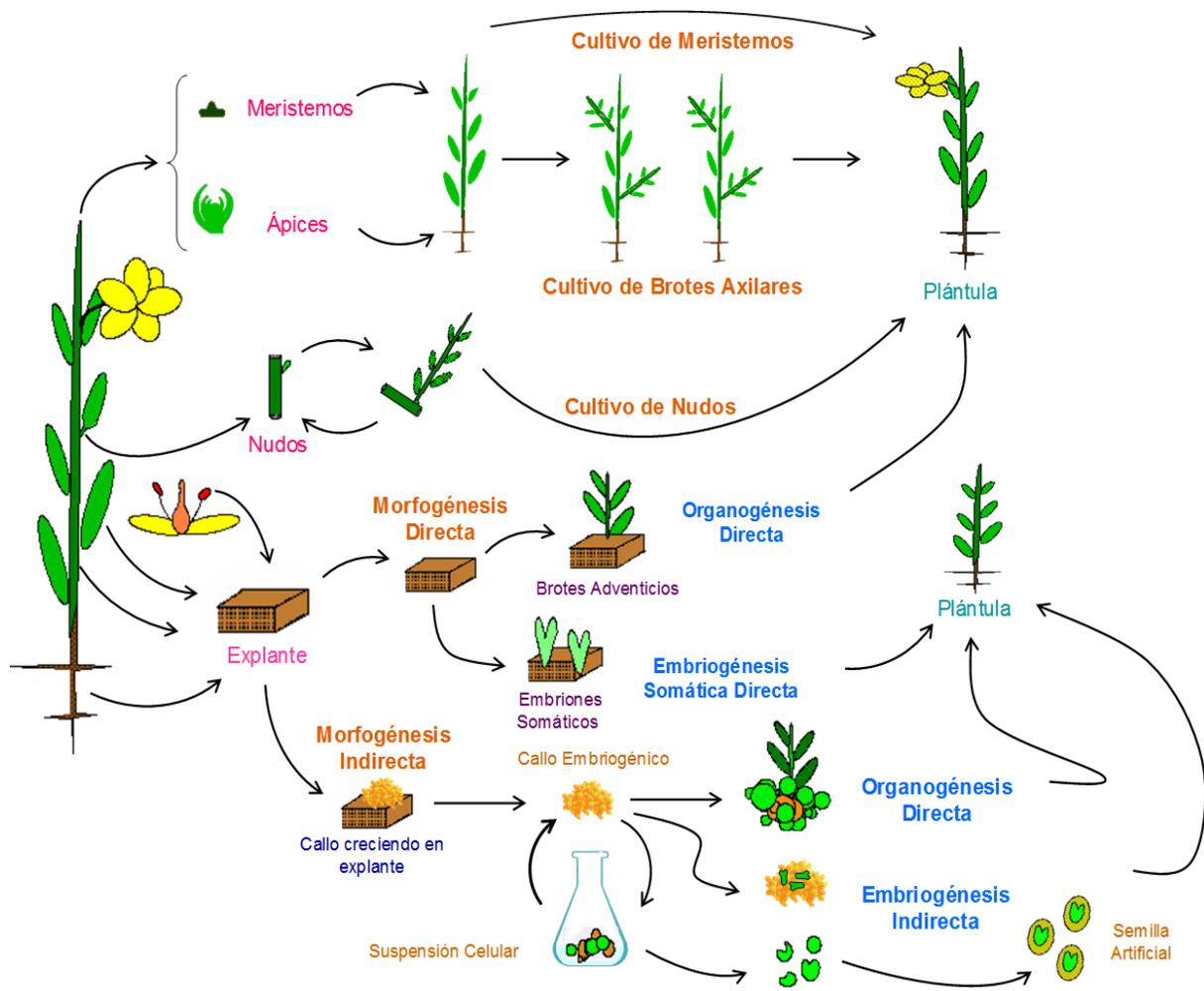


Figura 14. Micropropagación *in vitro*. Modificado de Edwin F. George, A. Hall y Klerk (2008).

La propagación vegetativa se ha utilizado ampliamente en distintas fases de los programas de conservación y mejora de muchas especies.

El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denomina explante, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas. Se demostró el efecto de la combinación de Citoquininas con Auxinas para promover la organogénesis.¹³

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. El éxito en la propagación de una planta dependerá de lograr la expresión de la potencialidad

celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. Para lograrlo, debe inducirse primero la dediferenciación y luego la rediferenciación celular.

En todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Esos compuestos, denominados reguladores del crecimiento, son los que se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta.

Para lograr la propagación vegetativa se ha de disponer de una vía de regeneración de plantas («ramets») a partir de células, tejidos o porciones de la planta donante («ortet») que sea fiable, reproducible, aplicable a distintos genotipos, y altamente productiva.¹⁴

7.4.2. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES) es un proceso que implica la formación de embriones a partir de células somáticas vegetales.¹⁵ Estos embriones poseen, al igual que los embriones cigóticos, una estructura bipolar con ápices de tallo y de raíz.¹⁶ Algunos autores indican que los embriones somáticos tienen un origen unicelular, mientras que otros proponen orígenes tanto unicelular como multicelular.¹⁷

Entre estas técnicas, la embriogénesis somática tiene el mayor potencial de multiplicación, permite numerosas simplificaciones técnicas, y debe implicar, en consecuencia los costes de producción más bajos.

Esta vía de regeneración consiste, por tanto, en la obtención de auténticas semillas somáticas, que tienen su origen en células somáticas de la planta donante, las cuales se «reprograman» y siguen un patrón de desarrollo idéntico al del embrión de origen cigótico. Al no ser la célula inicial producto de un proceso de recombinación y fusión de gametos, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante. Actualmente, la vía de regeneración que cumple con los requisitos que se mencionaron anteriormente para lograr una óptima propagación vegetativa, y que por tanto se considera como la más adecuada para la micropropagación de especies forestales, es la embriogénesis somática.¹⁸

La capacidad para producir embriones somáticos está genéticamente determinada¹⁹ , por lo que la respuesta ante tratamientos varía según la especie con la cual se esté trabajando.

Investigadores hicieron posible representar las diferentes etapas de diferenciación embrionaria en este sistema. Existen ocho etapas difusas reconocidas en el proceso de embriogénesis somática en cultivos de tejidos de café: el patrón de desarrollo de la embriogénesis somática se basaron en las observaciones SEM (Escaneado en microscopio electrónico) de la embriogénesis somática en cultivos de tejidos de café.

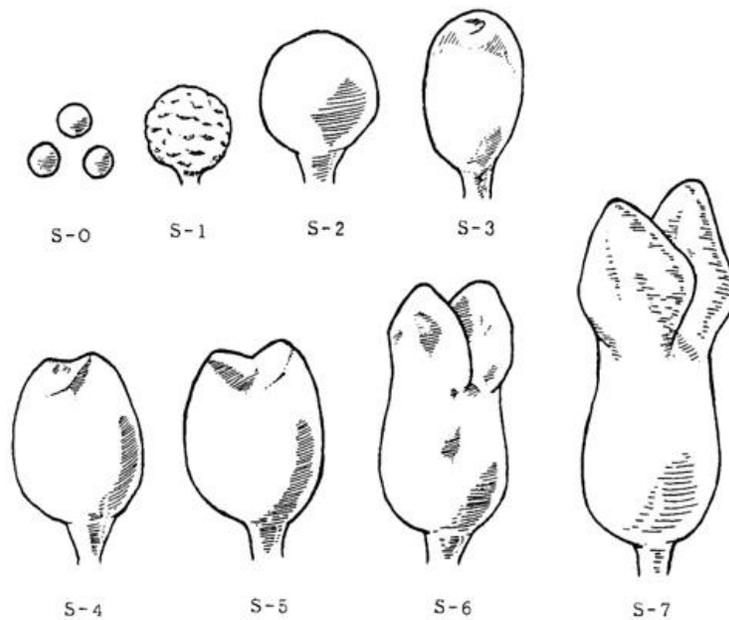


Figura 15. Representación esquemática de las diferentes etapas de la embriogénesis somática del café. S-0 Embrión Madre: S-1 embrión primario: S-2 embrión globular: S-3 elongación de embrión: S-4 embrión corazón primario: S-5 embrión corazón: S-6 embrión torpedo: S-7 embrión cotidelonario.²⁰

En la mayoría de especies el proceso de regeneración de plantas mediante embriogénesis somática se divide en varias etapas. En cada una existen variaciones en cuanto a las condiciones de cultivo, los reguladores de crecimiento, los medios de cultivo utilizados, entre otras.¹⁸

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Acondicionamiento de planta madre

La planta madre fue recuperada de una plantación de Café en el Municipio de Jiquipilas la cual fue infestada de Roya, demostrando resistencia a esta enfermedad contagiada por el hongo *Hemileia vastratrix*, actualmente se encuentra en el invernadero del Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, cada mes se le aplica Fertilizante DAP® y se realizan pre-tratamientos en condiciones higiénicas controladas para elevar su nivel nutricional y su óptimo desarrollo posterior del cultivo *in vitro*, se le agregaron tratamientos 2 veces a la semana asperjando Captan® y Agromisin® 2.5 g/L, que son insecticidas que actúan a nivel sistemático.

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes foliares libre de agentes patógenos, con un nivel nutricional alto y un grado de desarrollo adecuado.

8.2. Protocolo de desinfección

8.2.1. Primer Protocolo de Desinfección

1-. Se cortaron de la planta madre las hojas jóvenes y sanas (libres de daño físico) para lavar en agua corriente con detergente líquido Axion® posterior al lavado se deja en agitación en una solución de Agromisin® y Captan® al 25% o 2.5 gr/L durante 5 min.

2-. En la campana de flujo laminar se prosiguió con los lavados empleando Etanol al 70% por 5 min y Cloro al 30% por 15 min (por cada lavado se realizaron 3 enjuagues con agua estéril durante 1 min).

3-. Una vez que los explantes estuviesen estériles, en un vidrio de disección se realizaban cortes de 1 cm x 1 cm excluyendo la nervadura central de las hojas.

4-. Se colocaron de 3 a 4 explantes por frasco procurando que el envés quedara en contacto con el medio semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962), al finalizar se sellaron los frascos con Plastipack®.

8.2.2. Segundo Protocolo de Desinfección

- 1-. Se cortaron de la planta madre las hojas jóvenes y sanas (libres de daño físico) para lavar en agua corriente con detergente líquido Axion® posterior al lavado se deja en agitación en una solución de Agromisin® y Captan® al 25% o 2.5 gr/L durante 15 min.
- 2-. Con ayuda de pinzas se retiran las hojas de la solución de Agromisin® y Captan® al 25% y se dejan en agitación en agua con Tween 80 5 gotas/L durante 10 min.
- 3-. Se escurre el agua con Tween 80, se coloca en 500 mL. de agua destilada con 3 gotas de Nanopartículas de plata y se deja actuar durante 10 min.
- 4-. Nuevamente se escurre el agua y se agrega una solución antioxidante conformado por Ácido Ascórbico 200 mg/L y Ácido Cítrico 200 mg/L durante 5 min.
- 5-. En la campana de flujo laminar se prosiguió con los lavados empleando Etanol al 70% por 2 min y Cloro al 30% por 7 min (por cada lavado se realizaron 3 enjuagues con agua estéril durante 1 min). Se procuró que los desinfectantes permanecieran en frascos cerrados para evitar evaporación, los lavados se realizaron en frascos procurando un mesclado durante el tiempo de lavado.
- 6-. Una vez que los explantes estuviesen estériles, en un vidrio de disección se realizaban cortes de 1 cm x 1 cm excluyendo la nervadura central de las hojas.
- 7-. Se colocaron de 3 a 4 explantes por frasco procurando que el envés quedara en contacto con el medio semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962), al finalizar se sellaron los frascos con Plastipack®.

8.3. Medio de Cultivo

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento (6- Benzil-aminopurina, Ácido naftalenácético y Acido 2,4- Diclorofenoxiacético) en la regeneración *in vitro* de *Coffea spp.* se utilizaron medios de cultivos semisólidos constituidos por sales minerales MS

(Murashige y Skoog, 1962) previamente esterilizados en condición de 15 lb/in² durante 15 minutos.

Las concentraciones de los reguladores hormonales se evaluaron por tratamientos en los que se hacen uso de las hormonas BAP (6- Benzilaminopurina), ANA (Acido naftalenácetico) y 2,4- D (Acido 2,4- Diclorofenoxiacético).

Cuadro 4. Tratamientos empleados para evaluación de respuestas en tejido foliar de *Coffea spp.* evaluando las hormonas BAP (6- Benzilaminopurina), ANA (Ácido naftalacético) y 2,4- D (Acido 2,3 Diclorofenoxiacético)

Tratamientos	Concentración (mg/L)		
	BAP	ANA	2,4 - D
1 C	2.0	-	-
2 C	-	2.0	-
3 C	-	-	2.0
4 AC	0.5	-	2.0
5 BC	1.0	-	2.0
6 CC	2.0	-	2.0
7 Ac	0.5	2.0	-
8 Bc	1.0	2.0	-
9 Cc	2.0	2.0	-

8.3.1. Primer Diseño experimental

Se evaluaron los nueve tratamientos para identificar que reguladores hormonales y a que concentración se obtenían mejores resultados a un tiempo definido.

Este estudio fue llevado a cabo bajo un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones, cada unidad experimental (UE) estuvo conformada por 3 explantes foliares. Transcurridas las 4 semanas, se procedió a evaluar las respuestas de los tejidos.

El material vegetal una vez implantado se mantuvo en la cámara bioclimática a una temperatura de 26 ± 1 °C y 79,5 $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ de iluminación con un fotoperiodo de 16 horas de luz durante 4 semanas. Dependiendo de las respuestas obtenidas se sembraban cada 5 semanas para cambiarlas a un medio semisólido nuevo.

8.3.2. Segundo Diseño experimental

Una vez que obtuvo las concentraciones hormonales (Acido 2,4- Diclorofenoxiacetico 2 mg/L y Benzilaminopurina 0.5 mg/L) ideales se persistió en el mejoramiento y acondicionamiento del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) semisólido con agentes antioxidantes; ácido cítrico y ácido ascórbico como antioxidante.

Este estudio fue llevado a cabo bajo un diseño experimental completamente al azar con 25 repeticiones, cada unidad experimental (UE) estuvo conformada por 3 - 4 explantes foliares.

El material vegetal una vez implantado se mantuvo en la cámara bioclimática a una temperatura de 26 ± 1 °C en oscuridad durante 6 semanas. La evaluación de respuesta se realizó por semana. Se realizaban resiembras para renovar medio MS cada 4 semanas. Una vez que se obtenían callos embriogénicos se expusieron a fotoperiodo de 16 horas de luz.

Cuadro 5. Medios de cultivo utilizados durante el experimento con *Coffee spp.*

Componentes	Concentración (mg/L)		
	DEX MSS ₁	DEX MSS ₂	DEX ML ₃
Sales MS (Murashige y Skoog, 1962)	MS	½ MS	½ MS
Tiamina HCl	1.0	0.5	0.5
Piridoxina	5.0	2.5	2.5
Ácido nicotínico	5.0	2.5	2.5
Glicina	20.0	10.0	10.0
Mioinositol	1.0	0.5	0.5
Ácido cítrico	-	200.0	200.0
Ácido ascórbico	-	200.0	200.0
2,4 – D	-	2.0	2.0
BAP	-	0.5	0.5
Nanopartículas de plata	-	0.5	0.5
Sacarosa	30,000	30,000	30,000

* 1.(DEX MSS) Primer diseño experimental en medio semisólido, 2.(DEX MSS) Segundo diseño experimental, 3.(DEX ML) Tercer diseño experimental en medio líquido.

Se realizaron tres diseños experimentales evaluando como repuesta la callogenesis. Los medios de cultivos empleados son descritos en el Cuadro 5, el pH de los medios de cultivo se ajustaron a 5.7 ± 0.1 ajustado con NaOH o HCl 0.1 N y adición de 2.5 g L^{-1} Phytigel®. Los medios fueron esterilizados en autoclave en condición de 15 lb/in^2 durante 15 minutos.

8.3.3. Tercer Diseño experimental Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) Liquido.

Una vez que el tamaño del callo embriogénico era considerable se pasaba a medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) liquido con la misma complementación del medio para inducción (DEX ML), se agregaron 50 ml del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) liquido en matraces de 250 mL., se esterilizaron en condición de 15 lb/in^2 durante 15 minutos.

Los matraces se colocaron en condiciones de luz continua en agitación de 100 rpm en agitadora Max Q 3000. Se realizaron resiembras cada 20 días, con la ayuda de micropipeta se recuperaron los embriones para transferirlos a medio de cultivo nuevo.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Respuestas obtenidas del Primer Protocolo de desinfección – Primer medio de cultivo

De acuerdo a los tratamientos empleados en el primer experimento, donde se obtuvieron respuestas, fueron en los tratamientos 4 AC (0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 –D) y 6CC (2 mg BAP, 0.5 mg 2,4 – D). Donde se lograron obtener brotes a partir de yemas axilares y callos embriogénicos a diferencia de los tratamientos 1C, 2C que no se obtuvieron ni un tipo de respuesta ya que la hoja no presento cambios en su morfología, en los tratamientos 3C, 5BC, 7Ac, 8 Bc y 9 Cc se obtuvieron respuesta morfológicas en pequeñas apariencias y en cantidades de frasco, mas sin embargo no se consideraron como concentraciones idóneas para inducción de callos embriogénicos o embriones somáticos debido a su baja respuesta y a que las respuestas obtenidas fueron en apariencia al presentar engrosamiento y alargamiento de hoja y no se obtuvieron de callos en los tratamientos 7Ac y 8 Cc mientras que en los tratamientos 5 BC y 9 Cc se presentaron crecimiento de callos pero en largos lapsos de tiempo y bajos rendimientos.

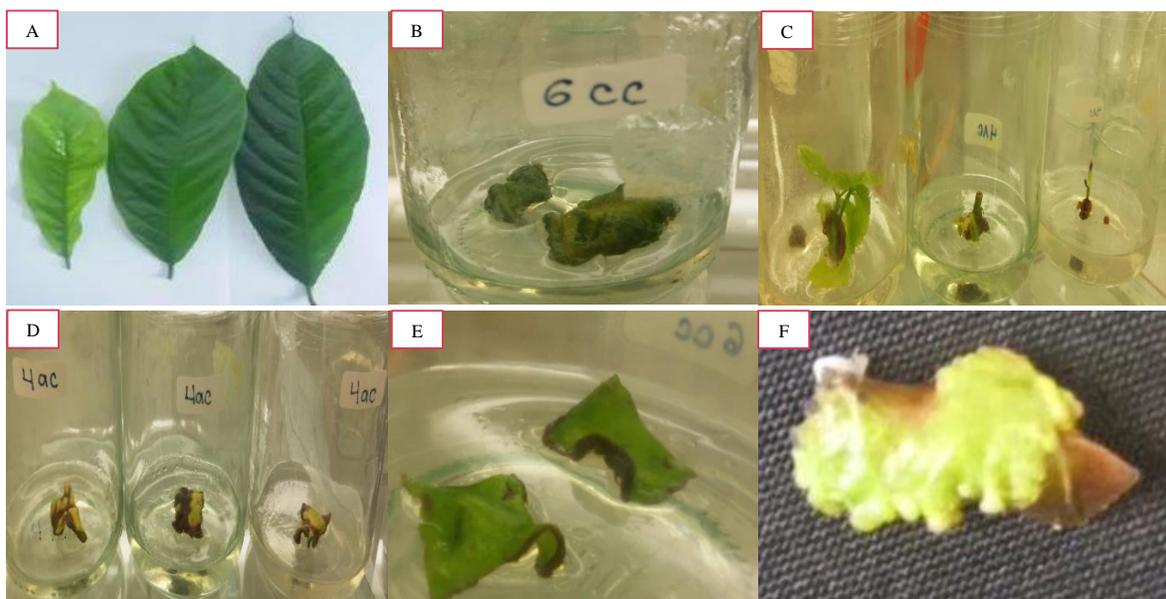


Figura 16. Variabilidad de respuestas en explantes foliares en la inducción de callos embriogénicos, primer protocolo de desinfección y medio MS normal con dos diferentes tratamientos: 4 AC y 6CC*

(A) Tipos de hoja de izquierda a derecha: hoja inmadura, hoja joven y hoja madura. (B) Explante de hoja joven se aprecia un engrosamiento y expansión del tejido. (C) Obtención de brote a partir de yemas axilares con tratamiento 4 AC. (D) Fenolización en explantes de tejido foliar con tratamiento 4 AC. (E) Crecimiento de callos en las orillas de tejido foliar. (F) Explante de hoja joven con alta producción de callos embriogénico, el embrión somático obtenido presentó una biomasa organizada de color verde claro.

*4 AC: 0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 -D. 6CC:2 mg BAP, 0.5 mg 2,4 -D

Dentro de los problemas que se presentaron fue el grado de contaminación con un total de 65%, 28.3% provocado por bacteria y 36.7% por hongo, y un total de fenolización de 80% presente en los explantes foliares.

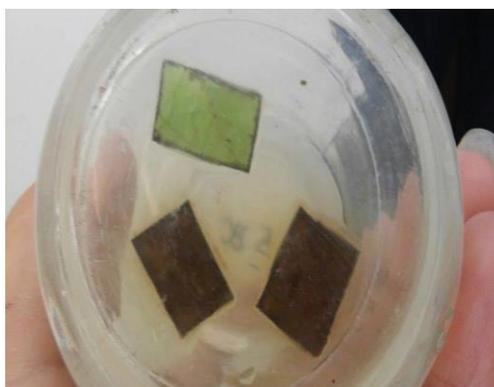
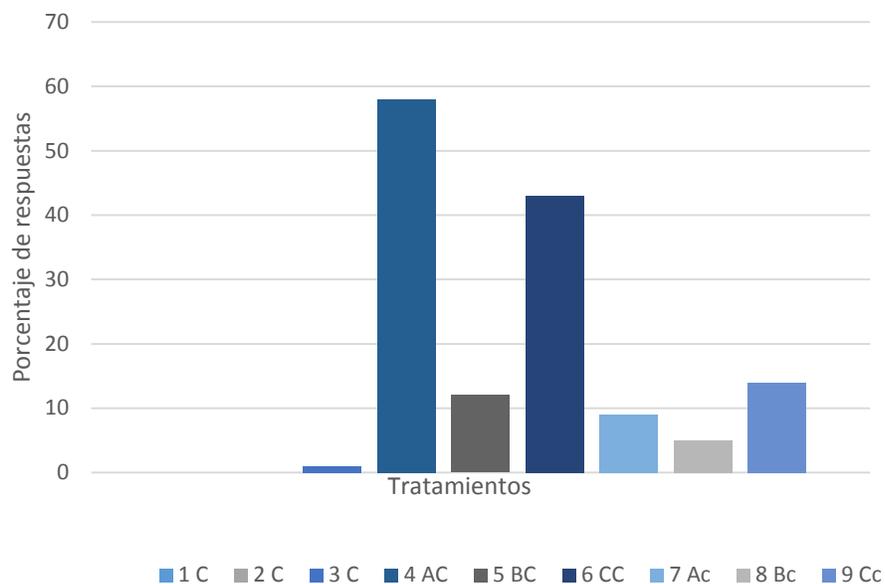


Figura 17. Oxidación en explantes foliares de *Coffea spp.*

Algunos explantes que presentaban fenolización presentaron respuestas morfológicas. La fenolización en los explantes podría explicarse por el alto contenido de fenoles en el tejido foliar endógenamente, la oxidación del compuesto fenólico catalizado por la enzima polifenol oxidasa para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño celular e incluso la muerte celular¹⁹. El *Coffea spp.* tiene un alto contenido fenólico, investigadores realizaron análisis demostrando el contenido de fenoles totales, presentando valores en el intervalo de $1129 \pm 0,000$ a $2582 \pm 0,000$ mg EAG/ g café.²¹



Grafica 1. Porcentaje de respuesta con respecto a los tratamientos usados durante la evaluación del Primer estudio.

Se observa que aquellos tratamientos que solo contenían un regulador de crecimiento vegetal no presentaron ningún tipo de respuesta. En contraste aquel tratamiento que estuvo en balance hormonal (Auxina/Citoquininas) mantuvieron un porcentaje de respuesta que van del 5 al 14 % mínimo y de 43 a 58% máximo.

9.2. Respuestas obtenidas del Protocolo de desinfección estandarizado - Medio de cultivo complementado

El acondicionamiento del medio de cultivo MS semisólido permitió mejoras en los resultados que se obtuvieron, se presentaron respuestas morfológicas a un menor tiempo comparado con el primer protocolo, por lo que se rectifica que la modificación eficiente el protocolo de obtención de embriones somáticos.

A continuación se presentan algunas de las respuestas obtenidas del mejor tratamiento 4 AC. 0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 -D de los experimentos que se realizaron evaluando las respuestas morfológicas de acuerdo a las concentraciones hormonales.

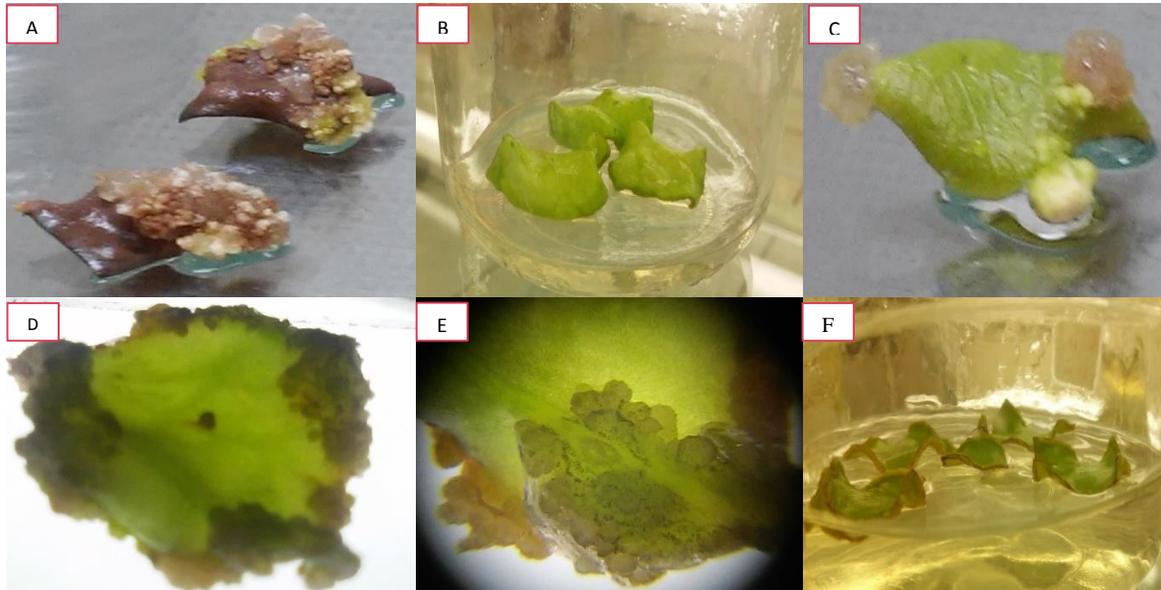


Figura 18. Variabilidad de respuestas en explantes foliares en la inducción de callos embriogénicos, segundo protocolo de desinfección y medio MS normal con 0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 -D. (A) Explante de hoja joven con alta producción de callos. (B) Explante de hoja inmadura se aprecia una expansión del tejido. (C) Obtención de embriogénesis somática directa. (D) Explante de hoja inmadura con crecimiento de callos embriogénicos en etapa globular. (E) Acercamiento de callo embriogénico donde se observan embriones en etapa globular. (f) Explante de hoja joven con crecimiento de callos en el contorno.

Se presentaron respuestas sincrónicas y asincrónicas, morfológicas y morfogenéticas en el tejido foliar del *Coffea spp.* En la Figura 18. se presentaron algunas de las respuestas obtenidas en el segundo protocolo, en el que se obtuvieron embriones a partir de morfogénesis directa e indirecta ya que se presentaron callos que es una ruta indirecta que dio origen a un determinado tiempo el desarrollo de callos embriogénicos, también se observa el crecimiento directo de embriones somáticos como se presenta en la Figura C que el crecimiento se está presenciando directamente del tejido foliar de café.

También se obtuvieron distintas morfologías en los callos por lo que a partir de su apariencia se definieron callos compactos a los callos color blanco y de apariencia vidriosa, callos friables a los de color amarillo y de crecimiento uniforme y callo algodonoso a que tenía apariencia húmeda y suave, a veces de color café y otras color gris.

Las primeras respuestas se presenciaban en las orillas ya que al realizar los cortes los tejidos quedaban en contacto de manera directa con el medio de cultivo rico en nutrientes que permitió su rápida respuesta, también fue notorio la respuesta desorganizada ya que un mismo Explante se presentaron callos y embriones, esta variante de respuesta pueden ser debido a los gradientes de concentración de hormonas vegetales que se presentan de manera endógena de forma natural en los tejidos vegetales por lo que se presentaron respuestas desorganizadas en los explantes foliares.

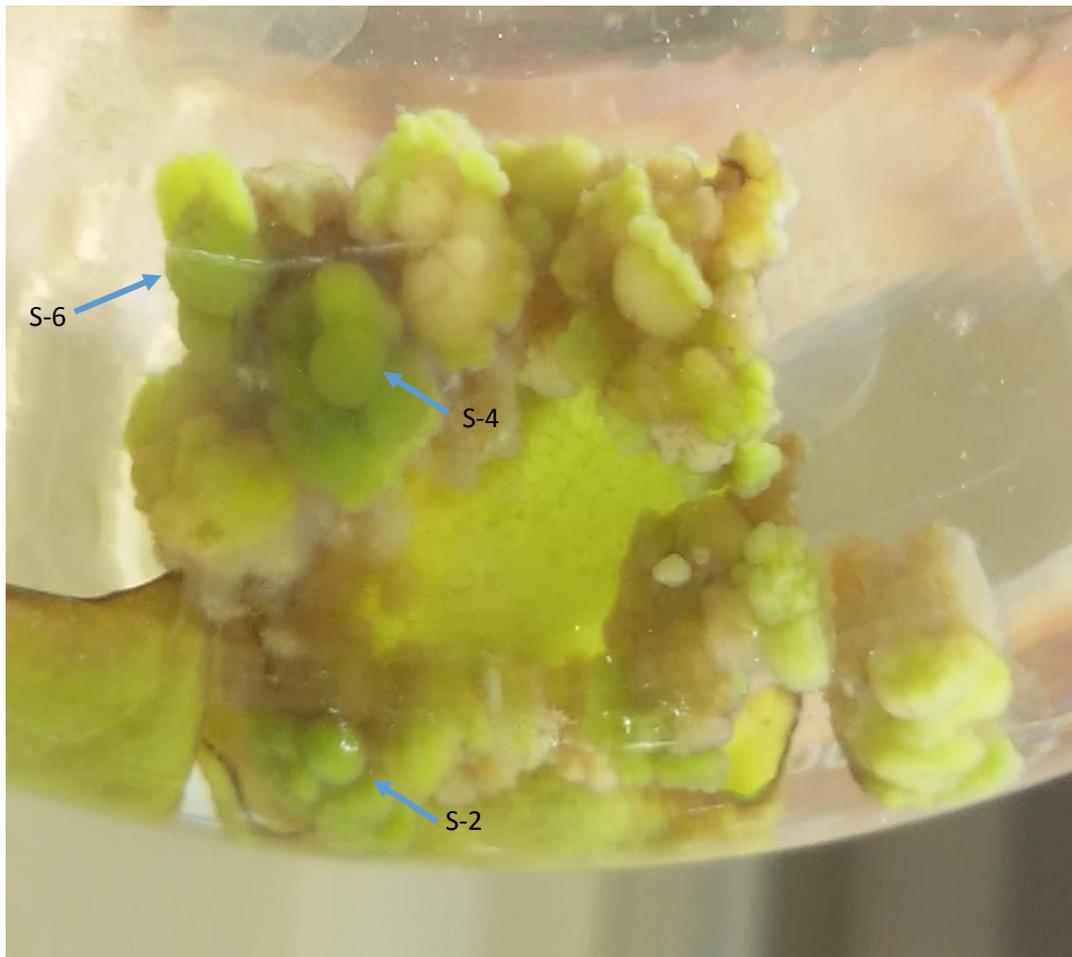
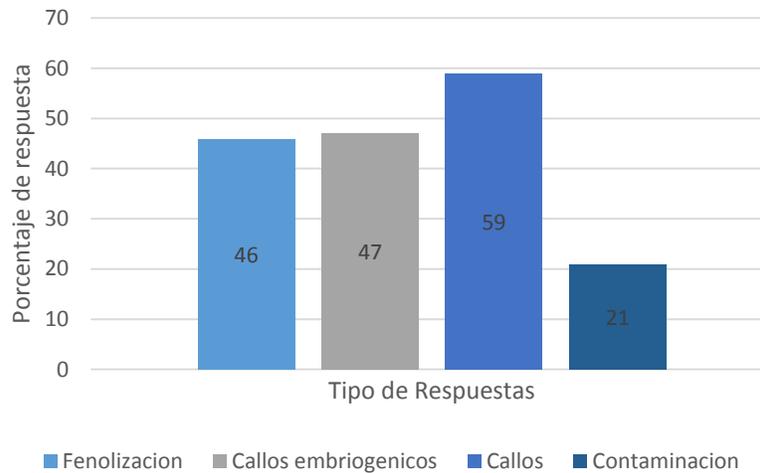


Figura 19. Embriones presentes en diferentes estadios, S-2 embrión globular: S-4 embrión corazón primario: S-6 embrión torpedo.

Obtención de embriones en explante foliar en diferentes estadios, su crecimiento asincrónico puede atribuirse al contacto directo que tenían con el medio semisólido y a los gradientes de concentración presentes en el tejido.



Grafica 2. Porcentaje de respuestas obtenidas en el Protocolo de desinfección estandarizado y Medio de cultivo complementado.

Haciendo una comparación respecto a las respuestas obtenidas del primer experimento y el último, se aprecia una mejora, se observa el incremento en la obtención de respuestas una reducción de fenolización en los explantes de un 35% y contaminación de un 44% (mayormente causada por hongo), lo que nos indica que la combinación del 2,4-D (2 mg/L) y BAP (0.5 mg/L) es la combinación más adecuada para inducir embriogénesis somática directa en explantes foliares de *Coffea spp.*, y que en los agentes antioxidantes en conjunto juegan un papel fundamental en la reducción de fenolización en los explantes incrementando respuestas morfogénicas, esto debido a que al presentar menor fenolización en los explantes hay mayor índice de respuesta y formación de callos embriogénicos. Estas respuestas favorables dieron origen a un tercer proceso, en el que se buscó un medio idóneo que permitiera la disgregación de los embriones y callos embriogénicos, así como su desarrollo de estos embriones somáticos.

9.3. Formación de embriones somáticos en medio líquido MS

Una vez que se pasaron a medio líquido se observó crecimiento de los embriones inducidos en medio líquido así como multiplicación de embriones somáticos en los explantes, esto debido a que en medio líquido hay mayor área de contacto nutrientes-tejido vegetal por lo que la multiplicación y disgregación de embriones somático son respuestas que se esperaban.

El movimiento de cizalla que originaba la agitación facilito la disgregación de los embriones y permitió la homogeneidad de los nutrientes en el medio líquido del sistema.

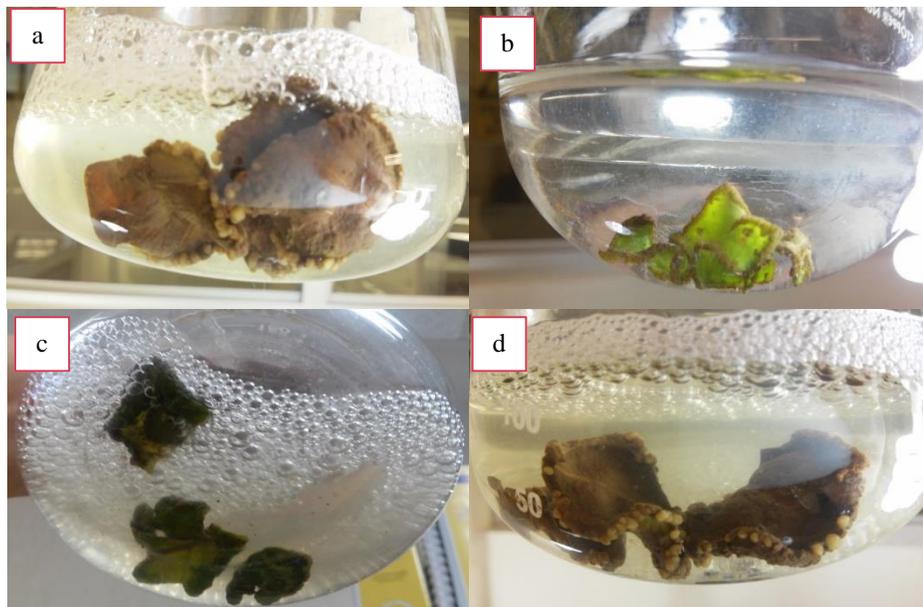


Figura 20. Respuestas en explantes foliares previas a inducción de callos embriogénicos, segundo protocolo de desinfección y medio MS normal con 0.5 mg BAP, 2 mg 2,4 -D. (a) Embriones somáticos en etapa globular. (b) inducción de crecimiento de embriones somáticos en medio líquido. (c) Disgregación de embriones en etapa globular. (d) Embriones somáticos de 3 semanas en medio líquido.

Los embriones somáticos varían en tamaño y color, esto relacionado al estrés del tejido, puesto que los tejidos que presentaban fenolización el color de los callos eran de color blancos y los tejidos que no presentaban fenolización los callos presentaban color verde claro.

Los callos esponjosos que se transferían al medio líquido le daban apariencia turbia esto debido a que las células quedaban en suspensión en el medio como se muestra en la figura que se presenta a continuación.

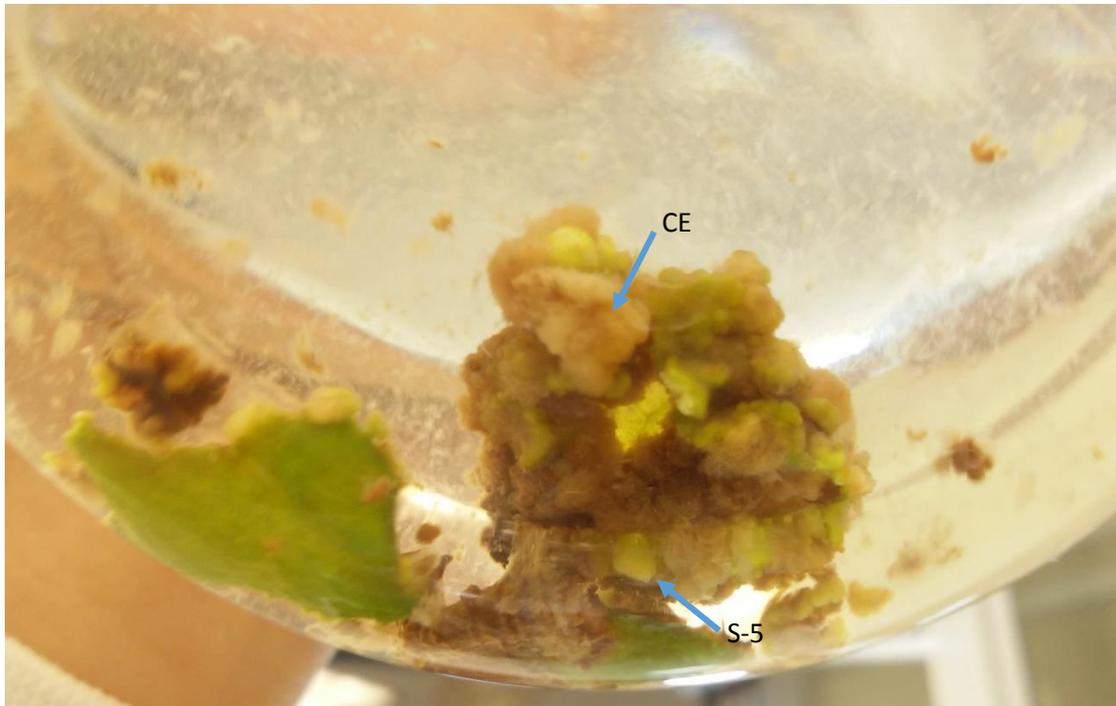


Figura 21. Medio líquido con callos embriogénicos y callos esponjosos que le dan apariencia turbia.
CE Callo esponjoso: S-5 embrión somático en estadio corazón.

10. CONCLUSIONES

El acondicionamiento de la planta madre y un protocolo capaz de lograr una buena desinfección, aumento las posibilidades de obtener explantes asépticos y un protocolo estandarizado que aumenta la respuesta morfológica en tejidos foliares, esto debido a que un tejido sano responde mejor que un tejido enfermo o dañado.

La combinación de Ac. Ascórbico (200 mg/L) y Ac. Cítrico (200 mg/L) permiten disminuir la fenolización de los explantes foliares de Coffea.

Para la generación de una respuesta organogénica, aquellos tratamientos con balance de Auxina/Citoquininas, especialmente aquellos tratamientos en los cuales se emplearon concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.

La combinación del 2,4-D (2 mg/L) y BAP (0.5 mg/L) es la combinación más adecuada para inducir embriogénesis somática directa en explantes foliares de Coffea.

La relación de hormonas 2,4-D (2 mg/L) y BAP (0.5 mg/L) permite obtener embriogénesis directa e indirecta.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. SAGARPA.2012. Impactos en Café www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Caf%C3%A9.pdf
2. CEFP. 2011. Centro de Estudios de las Finanzas Públicas. Disponible en: www.cefp.gob.mx. Aceptado: 03/11/2013.
3. PROMECAFE. Visto 15 de mayo de 2014. La caficultura y roya de café-problemas económicos. Disponible en: <http://promecafe.org/web/index.php?option.com>
4. Roca, W. 1983. Cultivo de tejidos en yuca. *In*: Yuca: Investigación, Producción y Utilización. Domínguez C. (Comp.) Doc. N° 50. CIAT. Cali, Colombia. p. 153-163.
5. History, 2011. Especial de Café. Recuperado el 8 de Septiembre de 2013, de [www.youtube.com: http://www.youtube.com/watch?v=rAnauldbD2s](http://www.youtube.com/watch?v=rAnauldbD2s)
6. International Coffee Organization. Principales Productores de Café a nivel mundial en el año 2015. Disponible en la página: www.ico.org
7. SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Convención Internacional del Café México 2015. Disponible en la página: www.sagarpa.gob.mx
8. Gómez O. 2010. Botánica de la planta de café. Guía para la innovación de la caficultura. CRS y FUNDESYRAM. El Salvador, San Salvador Pag.11-12-13-14. Disponible en la página: www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=2729
9. ANACAFE. Asociación Nacional del Café. El manejo de plagas y enfermedades en viñas. Guatemala, Centro América. Disponible en la página: info@anacafe.org [www.anacafe.org/glifos/index.php/Mal de Vinas Manejo Plagas#Muestreo para diagnóstico de Nemátodos](http://www.anacafe.org/glifos/index.php/Mal%20de%20Vinas%20Manejo%20Plagas#Muestreo%20para%20diagn%C3%B3stico%20de%20Nem%C3%A1todos)
10. Leporowski, 2013. BBC. La roya: el despiadado enemigo del café que ataca a Centroamérica.
11. CropLife Latín América. Organización Gremial Internacional. Roya del Cafeto (*Hemileia vastratrix*). Disponible en la página: www.croplifela.org/es/proteccion-de-cultivos/plaga-del-mes/roya-del-cafeto.html

12. PQBio. Por Que Biotecnología, 2007.® Copyright ArgenBio. Programa Educativo de ArgenBio. Cultivo *in vitro* de plantas y su relación con la Biotecnología. Cuaderno Núm. 35. Disponible en la página: porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=35
13. Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54 (1): 1-7.
14. Historia y geografía. Delacroix (Maisons- Alfort)
15. M. Toribio. et. al. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal.
16. Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
17. Lelu, M. A., Klimaszewska, K. K., Jones, C., Ward, C., Von Aderkas, P. and Charest, P. J. 1993. A laboratory guide to somatic em A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch. Petawawa National Forestry Institute. Canada. Publications Distribution Centre.
18. Carman, J. G. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures occurrence and behaviour. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26: 746-753.
19. Terzi, M. and Lo Schiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, S.S. (ed). *Plant tissue culture: applications and limitations*. The Netherlands: Elsevier.
20. Nacamura et. Al, 1992. Studes on Somatic Embryoegenesis of Coffee by scannig Electron microscope. Faculty of agricultura, Nagoya University, Nagoya 463-01, Japan.
21. Fonseca L. et. al. 2014. Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de SANTANDER (Colombia). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Págs. 228-236