



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CARRERA DE AGRONOMÍA.

TRABAJO DE TITULACIÓN

ESPECIALIDAD:

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

“Establecimiento y callogénesis en explantes foliares de *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner”.

MODALIDAD:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Autor:

EULER BERNABE SUÁREZ ROLDÁN

DIRECTORA:

ING. LILIANA COROZO QUIÑONEZ MG. SC.

SANTA ANA – MANABÍ – ECUADOR

2017

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ.

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA.

**Título: Establecimiento y calogénesis en explantes foliares de *Coffea canephora*
Pierre ex A.Froehner**

TESIS DE GRADO

**Sometida a consideración del tribunal de revisión y evaluación del trabajo de
titulación y legalizada por el honorable consejo directivo como requisito previo a la
obtención del título de**

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADO POR:

CERTIFICACIÓN

Ingeniera agrónomo

LILIANA COROZO QUIÑONEZ MG. SC.

Certifica:

Que el trabajo de titulación “**Establecimiento y callogénesis en explantes foliares de *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner**” es trabajo original del egresado Euler Bernabé Suárez Roldán el cual fue realizado bajo mi dirección.

Ing. Liliana Corozo Quiñónez Mg. Sc

DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

DEDICATORIA.

A Dios por todas las bendiciones proveídas, las mismas que han llegado en los momentos justos y necesarios.

A mi madre Luzmila Asunción Roldán y mi padre Indauro Victoriano Suárez Cedeño y mis hermanos por su ayuda incondicional brindada, siendo aquello fortaleza indispensable en los logros alcanzados tanto pedagógicos como cotidianos.

A todos los docentes que contribuyeron con sus conocimientos teóricos y prácticos además de sus consejos y críticas constructivas durante la formación como Ing. Agrónomo.

A mis amigos, personal administrativo y de servicio, quienes dando lo mejor de sí aportan su granito de arcilla cuando son requeridos.

Atentamente

Euler Suárez Roldán

AGRADECIMIENTO.

A quienes conforman y han conformado la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, por hacer de esta un ambiente acogedor, práctico y sobre todo de calidad para el desarrollo de mi formación académica.

A mi tutora la Ing. Liliana Corozo Quiñónez Mg Sc, por el aporte de sus conocimientos, críticas constructivas y ayuda incondicional durante el desarrollo de toda la investigación.

A mi revisor el Ing. Antonio Torres García PhD, por las sugerencias realizadas, aportando positivamente a la investigación.

A la Ing. Fátima Macías Ponce, por el aporte práctico teórico brindado para el desarrollo de la investigación de manera eficiente en el Laboratorio de Biotecnología.

Atentamente

Euler Suárez Roldán

RESUMEN

Con la finalidad de obtener callos indiferenciados y posteriormente embriogénicos de tres clones de *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner, se estableció una metodología para la inducción a callogénesis con base en el establecimiento de explantes para su posterior inducción a callo indiferenciado seguido de un cultivo de estos en medio de diferenciación. En la fase de establecimiento se evaluó el porcentaje de contaminación y sobrevivencia con base en las seis metodologías de desinfección, observando que los mejores resultados se obtuvieron cuando se asperjan las plantas en campo con fungicida Benlate (1ml/litro) un día antes de la colecta de las hojas. Los medios que contenían 2mg.L^{-1} de 2,4D + 1mg.L^{-1} de 6-BAP (M1) y 2mg.L^{-1} de ANA + 1mg.L^{-1} de 6-BAP (M2) indujeron callos indiferenciados (friable y no friable), sin embargo, mejores resultados en la formación de callos friables se manifestaron en M2, favoreciendo notablemente la formación de callos embriogénicos, los mismos que una vez introducidos en 6-BAP a 2mg.L^{-1} (medio de diferenciación) mostraron facilidad en formar embriones somáticos.

Palabras clave: Café, Robusta, *in vitro*, hormonas, fungicida.

SUMMARY

In order to obtain undifferentiated calluses and later embryogenic of three clones of *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner, a methodology was established for callogenesis induction based on the establishment of explants for their subsequent induction to undifferentiated callus followed by a culture of these in differentiation medium. In the establishment phase the percentage of contamination and survival was evaluated based on six disinfection methodologies, observing that the best results were obtained when the plants were sprayed in the field with Benlate fungicide (1ml / liter) one day before the collection of the leaves. Medium containing 2mg.L⁻¹ of 2,4D + 1mg.L⁻¹ of 6-BAP (M1) and 2mg.L⁻¹ of ANA + 1mg.L⁻¹ of 6-BAP (M2) induced undifferentiated calluses (friable and non-friable), but better results in the formation of friable callus were manifested in M2, favoring notably the formation of embryogenic callus, the same as once introduced in 6-BAP at 2mg.L⁻¹ (differentiation medium) showed ease in forming somatic embryos.

Keywords: Robusta coffee, *in vitro*, hormones, fungicide.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

	Paginas.
1. Introducción	14
2. Antecedentes	16
3. Justificación.....	18
4. Objetivos	20
5. Marco referencial	21
5.1. Generalidades.....	21
5.2. Origen y distribución de <i>Coffea canephora</i> P.....	21
5.3. Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	21
5.4. Importancia económica.....	22
5.5. Métodos de propagación.....	23
5.5.1. Sexual.....	23
5.5.2. Asexual.....	24
5.5.3. Cultivo de células y tejidos vegetales.....	24
5.5.4. Metodología utilizada en cultivo de células y tejidos vegetales in vitro.....	25
5.5.4.1. Métodos de desinfección.....	25
5.5.4.2. Medios de cultivos.....	26
5.5.4.3. Propagación por microestacas.....	27
5.5.4.4. Embriogénesis somática.....	27
5.6. Importancia de la micropropagación en <i>Coffea canephora</i>	29
6. Diseño metodológico.....	30
6.1. Ubicación.....	30
6.1.1. Material experimental.....	30
6.1.2. Condiciones físicas de crecimiento.....	30
6.2. Metodología.....	31
6.2.1.1. Establecimiento.....	31
6.2.1.2. Tratamientos de desinfección.....	32
6.2.1.3. Callogénesis.....	37
6.2.1.4. Inducción a callo indiferenciado y embriogénico.....	37
6.3. Diseño experimental.....	39
6.3.2. Variables evaluadas.....	39
6.3.3. Variables evaluadas en el establecimiento.....	39
6.3.4. Variables evaluadas en callogénesis.....	40
7. Resultados y discusión.....	41
7.1. Etapa de establecimiento.....	41
7.1.1. Porcentaje de sobrevivencia a los 7 días.....	41
7.1.2. Porcentaje de contaminación y oxidación a los 7 días.....	42
7.2. Etapa de callogénesis.....	44
7.2.1. Fase de inducción a callo indiferenciado.....	44
7.2.1.1. Días a inducción de callo indiferenciado (dici).....	44

8.2.1.2. Porcentaje de explantes con callo indiferenciado (%eci).....	46
7.2.2. Aspectos morfológicos de callos indiferenciados.	47
7.2.2.1. Color de callo.....	47
7.2.2.2. Tipo de callo.....	47
8.2. Fase de expresión a callo embriogénico.	49
8.2.1. Días a expresión de callo embriogénico (dece).	49
8.2.2. Porcentaje de explantes con callo embriogénico (%ece).....	50
9. Conclusiones.	52
10. Recomendaciones.	53
11. Bibliografía.....	54
12. Anexos.....	57

ÍNDICE DE IMÁGENES.

Paginas.

- Imagen 1 Edad y posición de explantes foliares utilizados de *C. canephora*: (A) Se muestran tipos de hojas de izquierda a derecha; hoja madura, inmadura y joven, esta última fue el tipo de hoja que se utilizó. (B) Posición de los explantes en la hoja..... 35
- Imagen 2 Desinfección y siembra de explantes: (A) Lavado de hojas con detergente y tween₂₀. (C) Inmersión de hojas en amistar top. (D) y (E) Siembra de explantes en medio de cultivo en cajas de petri. 36
- Imagen 3 Imágenes de inicio de formación de callos indiferenciados (A) Callos semifriables. (B) Callos friables..... 45
- Imagen 4 Imágenes de callos después de las ocho semanas de cultivo (A) Callos friables de color blanco crema. (B) Callos semifriables de color café claro..... 48
- Imagen 5 Callos embriogénicos al final de las diez semanas de cultivo. (A) Callos embriogénicos friables generados a partir del medio M₁: 2,4D a 2mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1mg.L⁻¹. (B) Callos embriogénico semifriables originados a partir del medio M₂: ANA a 2MG.L⁻¹ + 6-BAP a 1MG.L⁻¹. 51

ÍNDICE DE CUADROS.

	Paginas.
Cuadro 1 Metodologías de desinfección del material vegetal.....	34
Cuadro 2 Composición química de los medios de establecimiento, expresión e inducción.....	38
Cuadro 3 Efecto de clones y desinfecciones en la contaminación y sobrevivencia del número de explantes foliares de tres clones de <i>C. canephora</i>	42
Cuadro 4 Efecto de dos medios de cultivo en la inducción a callo indiferenciado en explantes foliares de tres clones de <i>C. Canephora</i>	46
Cuadro 5 Efecto de dos medios de cultivo en tres clones en la expresión de las características morfológicas del callo indiferenciado en explantes foliares de <i>C. canephora</i>	47
Cuadro 6 Efecto de dos medios de cultivo en la expresión a callo embriogénico de explantes foliares de tres clones de <i>C. Canephora</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS.

	Paginas.
Tabla 1 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	57
Tabla 2 Comparación de medias. Test: Tukey alfa=0.05.....	57
Tabla 3 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	57
Tabla 4 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	58
Tabla 5 Porcentaje de explantes sanos y perdidos y fuentes de contaminación en el establecimiento.....	58
Tabla 6 Número y porcentaje de explantes y su fuente de contaminación y explantes sobrevivientes por tratamiento y repetición Clon 1.	58
Tabla 7 Número y porcentaje de explantes y su fuente de contaminación y explantes sobrevivientes por tratamiento y repetición Clon 2.	59
Tabla 8 Número y porcentaje de explantes y su fuente de contaminación y explantes sobrevivientes por tratamiento y repetición Clon 3.	59
Tabla 9 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	60
Tabla 10 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	60
Tabla 11 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	60
Tabla 12 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	60
Tabla 13 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	60
Tabla 14 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	61
Tabla 15 Comparación de medias. test:Tukey alfa=0.05.....	61
Tabla 16 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	61
Tabla 17 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	61
Tabla 18 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	62
Tabla 19 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	62
Tabla 20 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	62
Tabla 21 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	62
Tabla 22 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	62

Tabla 23 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	63
Tabla 24 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	63
Tabla 25 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	63
Tabla 26 Análisis de la varianza (SC tipo III).....	63
Tabla 27 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	63
Tabla 28 Comparación de medias. Test:Tukey alfa=0.05.....	64
Tabla 29 Porcentajes totales de las variables medidas en los aspectos morfológicos de los callos indiferenciados.	64
Tabla 30 Días y porcentajes totales de las variables medidas en la inducción a callo indiferenciado y expresión a callo embriogénico.....	64
Tabla 31 Número de explantes de las variables medidas en la fase de inducción a callo indiferenciado.....	65
Tabla 32 Número de explantes de las variables medidas en la fase de inducción a callo indiferenciado correspondientes a aspectos morfológicos de los callos indiferenciados (color de callo).....	65
Tabla 33 Número de explantes de las variables medidas en la fase de expresión de callo embriogénico.....	66
Tabla 34 Número de explantes de las variables medidas en la fase de inducción a callo indiferenciado correspondientes a aspectos morfológicos de los callos indiferenciados (tipo de callo).....	67

1. INTRODUCCIÓN

El café ha sido desde su introducción al país, un componente importante en los productos de exportación ecuatoriana y de la economía mundial. Ecuador posee gran capacidad como productor de esta especie, convirtiéndose en uno de los pocos países en el mundo que exporta todos los tipos de café: arábigo lavado, arábigo natural y robusta. Es así que diferentes ecosistemas permiten que los cultivos de *Coffea* se den a lo largo y ancho del país (Costa, Sierra, Amazonía, y las Islas Galápagos). Es así que la ubicación geográfica del país, ha convertido a este cultivo en uno de los mejores producidos en América del Sur y de los más demandados en Europa y Estados Unidos (COFENAC 2011, 12-13).

En Ecuador, la producción de arábigo, considerado el de mejor calidad se concentra específicamente en las provincias de Manabí, Loja y las estribaciones de la Cordillera Occidental de los Andes, en tanto que el robusta se cultiva en la Amazonía, es decir, en Sucumbíos y Orellana, en su mayor porcentaje. Existen alrededor de 199.215 hectáreas de café, de las cuales 62.830 ha son de *Coffea canephora* y 136.385 ha de *Coffea arabica*. La industria cafetera ecuatoriana procesa cada año aproximadamente 102.300 toneladas de café, especialmente como materia prima para café soluble (COFENAC 2011). Considerando que existen cafetales abandonados y otras áreas en crecimiento, se estima que solo el 75% de la superficie total corresponde a cafetales en producción efectivamente cosechados (PROECUADOR 2016, 4-6).

El cultivo de café enfrenta problemas fitosanitarios, los cuales han desmejorado las plantaciones en el país, esto ha causado un decrecimiento de la producción, por lo que existe la necesidad de reemplazar estas plantaciones con materiales resistentes y/o tolerante, para realizar la renovación de los cafetales en nuestro país, se requiere el empleo de metodologías de propagación eficientes en tiempo y calidad de material obtenido (COFENAC 2011, 23-24).

Las especies de cafeto más cultivadas a nivel mundial (*Coffea arábica* y *Coffea canephora*), se propagan por diversos métodos de propagación, el *Coffea arábica* es autógena y da origen a variedades comerciales producidas por semilla, mientras que *Coffea canephora*, es alógama siendo así que al reproducirse de forma sexual genera individuos diferentes a los progenitores (Duicela, Chilán y Muñoz 2014, 49-57). Sin embargo, para reproducir plantas elites y llevarlas a campos de producción se pueden

utilizar las técnicas de cultivo de tejido vegetales *in vitro* entre ellas la propagación por microestacas y la embriogénesis somática, técnicas que han sido ampliamente estudiadas y perfeccionadas y han logrado tener éxito en su aplicación (López, Iracheta, y otros 2011, 646).

Los métodos tradicionales de propagación en café, son fiables para la obtención de plantas comerciales, sin embargo las investigaciones realizadas en reproducción *in vitro* de *Coffea* spp, representan una alternativa ventajosa para la obtención masiva de plantas, pero existen detalles por solucionar como se mencionan en investigaciones de Sánchez Maria (2004, 21); Paz (2000, 36) que consignan la respuesta diferencial de los genotipos para tolerar los desinfectantes durante el establecimiento aséptico, debido a problemas de contaminación y oxidación que limitan la respuesta morfogénica.

En la fase inicial del proceso de propagación *in vitro*, es fundamental definir el agente desinfectante y la concentración para cada genotipo, mediante el cual se logren generar explantes sanos para inducir la embriogénesis somática (López, Iracheta, y otros 2011, 646), el éxito de la embriogénesis somática y el tipo de callo que se va a generar, dependerá del estado fisiológico del explante y de la interacción con los agentes desinfectantes, los cuales podrían generar cambios epigenéticos que afectan la inducción de la morfogénesis (Mroginski, Sansberro y Flaschland 2010, 17-18).

Adicionalmente, los problemas de oxidación y contaminación de plantas cultivadas *in vitro* causan inconvenientes en el establecimiento de explantes foliares de especies leñosas, reduciendo directamente la cantidad de explantes viables (Azofeifa 2009, 154-155). Es por ello que la idea de evaluar explantes foliares de *Coffea canephora* en fase de establecimiento utilizando diferentes métodos de desinfección, se convierte en una alternativa para llegar con éxito a callogénesis *in vitro* posibilitando la formación de embriones somáticos.

2. ANTECEDENTES

La propagación *in vitro* consiste, en cultivar fragmentos de tejido de una planta, bajo condiciones de esterilidad, en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas en un medio de cultivo que puede ser sólido, semisólido, o líquido. Las diferentes posibilidades que ofrece el cultivo *in vitro* son: La obtención de haploides, obtención de plantas libres de virus, e hibridación somática. Además la multiplicación vegetativa es el único procedimiento para reproducir a gran escala los genotipos sobresalientes, cuya fijación por vía sexual no pueden considerarse por diversas razones, como la incompatibilidad y la depuración genética prolongada (Landaverde, López y Vásquez 2002, 25-26).

Las técnicas de cultivo de tejidos en *Coffea canephora* son utilizadas con la finalidad de multiplicar rápidamente los genotipos en regiones donde la multiplicación por esquejes presenta problemas, o bien, para acelerar la instalación de jardines clonales. La multiplicación vegetativa del café utilizando las técnicas de cultivo *in vitro* se puede llevar a cabo por dos vías la organogénesis y la embriogénesis somática (Acosta 2015, 10-11).

La propagación *in vitro* por microestacas (meristemas) se clasifica dentro de la organogénesis la cual consiste en el cultivo de un nudo o entre nudo proveniente de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose múltiples plantas idénticas a la planta madre (De Guglielmo 2009, 476; Lozano 2014, 9).

La embriogénesis somática, es un método de propagación masiva que permiten obtener gran cantidad de plantas de calidad e inocuidad, el tiempo que lleva obtener plantas está relacionado al tipo de explante, medio de cultivo y tipo de embriogénesis somática. Asimismo la eficiencia del proceso está en relación a la metodología del mismo, la cual en la actualidad es muy diversa y poco estandarizada, por ende la obtención de resultados es amplia (López, Iracheta, y otros 2010, 205-207).

El primer trabajo en cultivo de tejido en café fue realizado por Starisky en 1970, quién obtuvo callosidades de ápice de ramas ortótropas de *C. canephora*, *C. arabica* y *C. liberica*. Con esta obtuvo además, embriones somáticos y plantas. Luego

en 1975, Herman y Hass inducen por primera vez, la neoformación de embriones somáticos a partir de secciones de hoja en *C. arabica*. En 1977 Sondhal y Sharp reportaron embriogénesis somática de alta y baja frecuencia en *C. Arabica*, a partir de explantes de diferentes órganos de las plantas (hojas, tallos, pecíolos, frutos inmaduros, etc.) usando el medio de Murashige y Skoog con diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas (Landaverde, López y Vásquez 2002, 25-26).

El cultivo de tejidos y células vegetales en café no es nuevo, pero para varios países de América Latina lo es, se han realizado algunas investigaciones en café en embriogénesis somática con importantes resultados, apuntando a ser eficientes durante este proceso. En México se evaluó el potencial embriogénico de tres diferentes tipos de explantes provenientes de hojas inmaduras, jóvenes y maduras, concluyendo según López, Iracheta, y otros (2010, 656) que el tejido óptimo para generar embriones somáticos es el joven. En Ecuador Acosta (2015), trabajó en embriogénesis somática en *Coffea canephora* y *Coffea arabica* con la finalidad de estandarizar protocolos para su adopción en sistemas de propagación masal, concluyendo que es necesario trabajar con diferentes variedades además de diversas combinaciones y dosis de hormonas para la inducción a embriones somáticos, puesto que la respuesta a estos, no ocurrió.

3. JUSTIFICACIÓN

El sector cafetalero ecuatoriano tiene relevante importancia en los órdenes económico, social y ecológico. La importancia económica del cultivo y producción de café radica en su aporte de divisas al Estado y la generación de ingresos para las familias cafetaleras y otros actores de la cadena productiva como: transportistas, comerciantes, exportadores, industriales, obreros vinculados a los procesos productivos y de procesamiento, entre otros, que dependen de las contingencias de producción y precios del café, en el mercado internacional (Duicela, Chilán, y otros 2016).

Hasta 1876, el cultivo y producción de este producto se encontraba en una etapa incipiente. Al abrirse el Ecuador al comercio mundial se dió un impulso significativo a su producción alcanzando un cierto grado de desarrollo, hasta constituirse el café en un producto de exportación importante para la economía de la nación. Sin embargo, las plantaciones establecidas son de edad avanzada, de bajo rendimiento, susceptibles a plagas y enfermedades y la renovación de las mismas, con los recursos genéticos mejorados mediante los métodos tradicionales de siembra por semilla, requieren de mucho tiempo para incorporar los nuevos recursos a los campos de los productores (COFENAC 2011, 23-24).

Una alternativa para disponer de mayor número de plantas con características agronómicas deseables, a bajo costo, libres de plagas y enfermedades y en menor tiempo y costo, son las técnicas de cultivos de tejidos. Los altos índices de contaminación y oxidación en el establecimiento *in vitro* de segmentos de hoja de genotipos de *Coffea canephora*, constituyen una limitante para llegar con éxito a callogénesis y lógicamente posibilitar la embriogénesis somática (Mroginski, Sansberro y Flaschland 2010, 17).

Cabe mencionar que, la Universidad Técnica de Manabí de acuerdo a su artículo 5 del Reglamento de Becas¹ para los y las Estudiantes, establece que “las becas de graduación, consiste en la entrega por una sola ocasión de un bono de graduación que le permita al estudiante la adquisición de materiales o insumos de hasta USD\$ 4,000,00 (cuatro mil 00/100 dólares americanos) para estudiantes que están por realizar su trabajo

¹ Reglamento de Becas para los y las Estudiantes de la Universidad Técnica de Manabí, mismo que fue discutido y aprobado por el H. Consejo Universitario en sesiones del 23 de octubre y 8 de noviembre de 2012.

de graduación en la modalidad que se establece en este reglamento”, es por ello que para el desarrollo de esta investigación se otorgó USD\$ 4,000,00 los mismos que se emplearon en la adecuación del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad, contribuyendo en el desarrollo de esta investigación y a su vez adquirir conocimiento técnico-científico-universitario, con la finalidad de elevar el nivel académico de los y las estudiantes que se forman como ingenieros Agrónomos.

4. OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar el establecimiento y calogénesis *in vitro* de explantes foliares de *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner.

ESPECÍFICOS

- Determinar el tratamiento óptimo para la desinfección de explantes foliares en el establecimiento *in vitro*.
- Determinar la mejor concentración de auxinas y citoquininas para la inducción a calogénesis.

5. MARCO REFERENCIAL

5.1. Generalidades

El café fue introducido por inmigrantes franceses en América Central a principios del siglo XVIII, pero luego los holandeses extendieron su cultivo hacia América del Sur. El cultivo de café permitió una ampliación de la frontera agrícola en varios países americanos y fue un factor determinante para el crecimiento de la población en terrenos que antes tenían escaso valor (Mijael 2008; Duicela, Chilán, y otros 2016).

El género *Coffea*, está integrado por 103 especies todas diploides y alógamas como la especie *canephora* pero la especie *arábica* es tetraploide y autógama (Enriquez, Duicela y Chilan 2014, 27).

Desde el punto de vista económico, este género es el más importante de la familia Rubiaceae, dos de sus especies *Coffea arábica* L. (variedad arábica) y *Coffea canephora* P (variedad Robusta) se cultivan en diversos países de América, África y Asia. Para la mayoría de los países productores de café, este cultivo representa el principal producto agrícola de exportación (González, y otros 2007, 121).

5.2. Origen y distribución de *Coffea canephora* P.

Es originario de África y zonas tropicales de Guinea y el Congo, se introdujo al Sureste de Asia en 1900, a Ecuador se realizaron introducciones en 1951, 1964, 1972, 1977 y 1986, procedentes del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE- Costa Rica). Las introducciones de *Coffea canephora* P. se establecieron en bancos de germoplasma en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicada en el cantón Quevedo (Enriquez, Duicela y Chilan 2014).

5.3. Clasificación taxonómica y descripción botánica.

La clasificación taxonómica según Roskov, y otros (2016) se define de la siguiente manera:

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Gentianales.

Familia: Rubiaceae.

Género: *Coffea*

Especie: *canephora*

Nombre científico: *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner.

El café robusta es un árbol con copa irregular, posee un sistema radical pivotante con raíces laterales y raicillas, de tallo con eje ortotrópico monocaule o multicaule, de ramas plagiotropicas primarias, secundarias y terciarias, sus hojas son elípticas o lanceoladas, oblongas de ápice agudo, tiene inflorescencias axilares de 3 a 5 cimas, su fruto es una drupa elipsoidal o suboblonga de contenido de cafeína de 1,3 a 5,2. En porcentaje de materia seca, posee fecundación alógama, su estructura genética es diploide con un número de cromosomas de $2n=22$ (Duicela, Chilán y Muñoz 2014).

5.4. Importancia económica.

La importancia económica está basada en el consumo interno y las exportaciones, sectores que poseen considerable demanda de elaborados de café, es así que la gran necesidad de consumo deriva a su vez un dinamismo del sector caficultor, que en su cadena productiva intervienen, siendo económicamente beneficiados, además un valor a resaltar es el gran número de familias que están inmersas en la producción, es así que, es importante el beneficio económico que se genera, de manera directa e indirecta mediante la cadena de producción (PROECUADOR 2013, 5-6).

De los cafetos arábigo y robusta se derivan productos elaborados por industrias y empresas pequeñas y medianas como: café en grano verde, café tostado y/o tostado y molido, café soluble instantáneo, sea este en spray, aglomerado y liofilizado (Galindo 2011, 11).

La producción de café arábigo se da en casi todo el país: Costa, Sierra, Amazonia y Galápagos, esto se debe a sus condiciones climáticas favorables, aunque existen lugares donde su cultivo es preponderante. Tal es el caso del cantón jipijapa de la provincia de Manabí. La superficie únicamente de café en Manabí ocupa un 38,6%, Sucumbíos el 17,36%, Orellana el 11,89%, el Oro 7,67%, Loja el 4,01%, y la diferencia está representada por otras provincias, sin embargo, en superficie asociada de café, Manabí ocupa un 24,25%, Los Ríos 17,9%, Guayas 9,22%, Esmeraldas 7,94%, Pichincha 13,90, Bolívar un 7,05%, y el resto en otras provincias productoras, además es importante mencionar que el café *canephora* (robusta) se encuentra en: Orellana, Sucumbíos, Napo, Pichincha, Guayas, Los Ríos, y Santo Domingo de los Tsáchilas, sin

embargo su producción tradicional estaba concentrada en la región Amazónica específicamente en Sucumbíos y Orellana (PROECUADOR 2013, 4-5).

La superficie total cultivada es de 199,215 hectáreas, de los cuales 62.830 hectáreas son de café robusta lo que corresponde a una producción del 38 % del total de producción del país. Mientras que los datos del sector privado, basado en consumo y la producción exportable, presentan cifras de 113,000 hectáreas totales de café, de las cuales 30,000 hectáreas son área de café robusta, equivalente en volumen de producción de 100,000 sacos de 60 kilos (COFENAC 2011).

Los principales países destino de las exportaciones de café y sus derivados en forma descendiente hasta el 2012 son: Colombia (23,52 %), Alemania (22,38 %), Polonia (20,31 %), Rusia (14,51 %), Estados Unidos (3,38 %), Japón (2,10 %), Holanda (2,18 %), Reino Unido (2,32 %), Turquía (1,85 %), Perú (1,34 %) y otros países que representan el (6,12 %) (PROECUADOR 2013, 14-16)

5.5. Métodos de propagación.

5.5.1. Sexual.

La especie *Coffea* es de naturaleza alogámica, es decir, de libre polinización, condición que le da variabilidad fenotípica, siendo cada semilla un híbrido proveniente de un libre cruzamiento entre dos plantas genéticamente compatibles. La propagación sexual en esta especie, consiste en el uso de semilla botánica, obtenida de un grupo selecto de genotipos de alto valor genético, recomendados por organismos oficiales, los mismos que para este fin deben reunir condiciones según lo mencionan Duicela, Chilán y Muñoz (2014, 49):

- Lote conformado por un mínimo de 4 clones seleccionados.
- Aislamiento del lote de multiplicación de otros cafetales por lo menos 500 metros de distancia, separado con barreras naturales (montañas), para evitar contaminación genética.

La obtención de plantas, se lleva a cabo en los respectivos semilleros y viveros, posteriormente estas son llevadas al lugar definitivo de siembra. Es importante mencionar, que la propagación también se puede realizar a través de “siembra directa” depositando las semillas en fundas de polietileno, tubetes de plásticos de forma cónica,

y bandejas plásticas destinadas para viveros, con un volumen mínimo requerido de 500cc, conteniendo sustratos enriquecidos.

5.5.2. Asexual.

Para la propagación asexual se colectan brotes de plantas “cabeza de clon”, que se colocaran en fundas con sustratos enriquecidos para su enraizamiento usando hormonas como el ácido indolbutírico y ácido naftalacético, por un periodo de 70 a 120 días (Duicela, Chilán y Muñoz 2014).

5.5.3. Cultivo de células y tejidos vegetales.

Se refiere a un conjunto de técnicas utilizadas para cultivar células, tejidos u órganos vegetales *in vitro* bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos contaminantes basados en el principio de totipotencia, mismo que se fundamenta en que cualquier célula vegetal, contiene una copia íntegra del material genético de la planta que pertenece sin importar su función o posición en ella, por ende en teoría tiene la capacidad de generar una nueva planta (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 227).

El proceso de transformación de una célula a una planta, tiempos atrás era denominado diferenciación celular, pero actualmente se conoce como organogénesis, las primeras investigaciones realizadas sus resultados eran generales, ejemplo de esto, se atribuía al ambiente el cambio durante la diferenciación celular, pero fue Haberlandt en 1898 quien aisló células y tejidos de plantas vegetales superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su estudio, dando origen a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales por lo que es considerado como padre de esta técnica (Radice 2010, 26).

Después del trabajo realizado por Haberlandt, en los años 1934-1939, White en Estados Unidos y Gautheret en Francia, demostraron de forma definitiva la posibilidad de cultivar células y tejidos vegetales *in vitro*, además en esos años, hubieron dos grandes descubrimientos; primero la identificación de las auxinas como reguladores naturales de crecimiento y segundo el reconocimiento de las vitaminas del complejo B esenciales en el crecimiento de las plantas (Calva y Perez 2005, 4).

En 1934 Gautheret, cultivo células de cambium de algunas especies en una solución mineral, con glucosa y cloruro de cisteína. Encontró que dichas células proliferaban por algunos meses y que adicionando vitaminas y ácido indolacético (AIA) se estimulaba considerablemente su crecimiento. Más tarde en 1939 White reportó el establecimiento

de cultivos similares pero a partir de tejidos tumorales de un híbrido de *Nicotiana glauca* XN. Langsdorffi. Estos investigadores junto con Nobecourt quien reportó en ese mismo año el establecimiento de un cultivo similar a partir de zanahoria, son los tres investigadores considerados pioneros de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales (Calva y Perez 2005, 4).

5.5.4. Metodología utilizada en cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*.

El procedimiento general consiste en un medio de cultivo gelificado sembrar un fragmento de tejido u órgano vegetal llamado explante, previamente desinfectado para eliminar todo organismo contaminante que se encuentre en este. El cultivo se mantiene en condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad relativa controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen al desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones (Pedroza 2008).

5.5.4.1. Métodos de desinfección.

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas con microorganismos patógenos que en condiciones de campo no las afectan, sin embargo cuando se realiza una incisión de uno de sus órganos y es cultivado *in vitro*, el crecimiento de estos patógenos limita la respuesta del explante del órgano vegetal cultivado. Cuando se trabaja con tejidos adultos de plantas que crecen en campo, el porcentaje de contaminación es alto, haciéndose necesaria la estricta desinfección superficial (Mroginski, Sansberro y Flaschland 2010, 19).

Para la desinfección del material vegetativo, se utiliza comúnmente hipoclorito de calcio o hipoclorito de sodio, adicionalmente se recomienda la adición de un agente tensoactivo (por ejemplo tween-20), para permitir que el explante este en mejor contacto con el desinfectante químico. Es difícil obtener una desinfección superficial que no dañe el tejido cuando el explante es muy sensible como los brotes apicales, además no se puede generalizar sobre el tipo de desinfectante o concentración a utilizar, debido a que cada especie y tipo de explante es un caso particular, lo que resalta la importancia de experimentar con diferentes métodos, utilizando un número reducido de explantes (Mroginski, Sansberro y Flaschland 2010, 19).

La concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación del explante, es la más adecuada, si es más diluida que esta no eliminará los microorganismos y si es más elevada dañará el explante. Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes jóvenes son más limpios que los viejos, materiales que crecen en invernaderos son más limpios, en comparación con los de campo y entre más pequeño sea el explante al introducir al cultivo *in vitro* menor será la contaminación a eliminar, sin embargo el tamaño debe ser adecuado para facilitar el establecimiento del tejido. Otra recomendación es la utilización de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección (Mroginski, Sansberro y Flaschland 2010, 19).

Las infecciones internas pueden constituir un problema importante son causadas por microorganismos que se encuentran en el interior de la planta, y no pueden ser eliminados por la desinfección superficial. Hay dos formas de combatir este problema: cultivando meristemos (porque los microorganismos no se encuentran presentes en estos) o la adición de antibióticos al medio de cultivo (Landaverde, López y Vásquez 2002, 28).

5.5.4.2. Medios de cultivos.

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas, descritas a lo largo de numerosos experimentos, los cuales proporcionan al cultivo *in vitro* una composición balanceada, de nutrientes y hormonas, para mantener su viabilidad, estimular su diferenciación y regular su crecimiento (Mroginski, Sansberro y Flaschland 2010; Ramirez, Guevara y Escobar 2012),

Existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan en el cultivo de tejidos vegetales; estas fórmulas generalmente recibieron el nombre de investigadores como por ejemplo: las sales de Murashige et al (1962) BMS, las sales minerales de White BW, las sales de Shenk y Hildebrandt (1972) BSH, Heller CH, Erickson ER, Lins-Maierkoop LS, Gambor BS. Los constituyentes de un medio de cultivo vegetal pueden clasificarse en sales inorgánicas (minerales), compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y materiales inertes (Landaverde, López y Vásquez 2002, 30).

5.5.4.3. Propagación por microestacas.

La propagación *in vitro* por microestacas consiste en obtener a partir de un nudo portador de yemas preexistentes, una microplanta cuyos nudos pueden ser utilizados como estacas *in vitro* y así tener sucesivamente un gran número de individuos. Dicha metodología incluye los siguientes pasos: cultivo de segmentos de tallos ortotrópicos, y obtención *in vitro* de nuevos tallos ortotrópicos, multiplicación clonal *in vitro* enraizamiento y aclimatación. Esta técnica fue desarrollada por Dublin y Custer (1980) cuyo principio tiene como base la del esqueje hortícola pero realizado *in vitro* (Berthouly 1989).

La principal ventaja de las microestacas está garantizada por una propagación conforme a la planta progenitora, lo cual ha sido ampliamente comprobado con experimentos en el campo. La alta contaminación por hongos y bacterias es importante, además la oxidación fenólica es muy frecuente en este tipo de material, estas dos etapas de cultivo son las más difíciles de superar, una vez establecido el cultivo *in vitro* se constituye un banco de germoplasma para trabajar con la multiplicación masiva del material vegetal (Berthouly 1989).

5.5.4.4. Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar a un embrión cigótico sin que medie la fertilización de las gametas (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 127). En el cafeto la embriogénesis somática generalmente puede ser obtenida a partir de partes de la planta tales como tallos, hojas (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 127).

- Tipos de embriogénesis somática.

Embriogénesis Somática Directa o de baja frecuencia (LSFE); se realiza en una sola fase por cultivo en un medio único y permite la obtención solamente de embriones somáticos en cantidades limitadas. Se caracteriza por la aparición de embriones aislados bien constituidos, de uno a diez por explante observados después de 13-15 semanas en un medio de inducción (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 127).

Embriogénesis Somática Indirecta o de alta frecuencia (HSFE); se produce un callo secundario denominado callo embriogénico de alta frecuencia, ya que permite obtener una alta cantidad de embriones somáticos, se desarrolla en dos fases de cultivo por

segmento vegetal, en un primer medio para iniciar la proliferación de callos y luego en un segundo medio para desarrollar células embriogénicas en embriones (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 127).

Los embriones somáticos completamente diferenciados, pueden pasar por un medio de generación donde se desarrollan las raíces y los tallos hasta la formación de la plántula de 4 a 5 pares de hojas aptas para ser transferidas a condiciones *in vivo* los embriones aparecen más tardíamente que en el caso de embriogénesis somática directa, ocurriendo de 16 a 20 semanas. En los cultivos de tipo HSFE, la cantidad de embriones varía de 100 embriones por explante (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 127-128)

Etapas de la embriogénesis somática indirecta.

El número y nombres de las fases que posee la embriogénesis somática indirecta, pueden variar según los autores que hagan referencia a ella se detalla a continuación algunas etapas según (Pedroza 2008):

- a) Inducción o caulogenesis o inducción del potencial embriogénico de las células de los explantes. Es la fase más importante y más difícil, en esta etapa se da una transición de las células somáticas ($2n$ cromosomas) en células embriogénicas capaces de producir embriones somáticos, y a esta transición se llama desdiferenciación. La inducción es una etapa difícil, debido a que se desconocen los factores genéticos o fisiológicos responsables de ella como el encontrar condiciones favorables a todos los genotipos que en ocasiones dentro de una misma especie sus diferentes variedades pueden tener distintas reacciones.
- b) Proliferación del callo embriogénico en suspensiones celulares u obtención de cepas embriogénicas. Esta etapa se inicia con la selección y multiplicación de los callos (células indiferenciadas) con el fin de obtener cepas embriogénicas.
- c) Expresión embriogénica y desarrollo de los embriones somáticos. En esta fase las células embriogénicas o predeterminadas de las masas pro embriogénicas evolucionan y se convierten en embriones somáticos viables: los embriones se manifiestan al inicio en estado globular luego en estado corazón y finalmente en estado torpedo esta transformación ocurre en dos o tres meses.
- d) Maduración de embriones somáticos o conversión de embriones en plántulas sobre medio semisólido, la maduración es un periodo de transición entre las

fases de desarrollo y germinación del embrión, participando grupos de genes distintos; dándose además una acumulación de reservas proteicas, glúcidos y lípidos realizándose una desecación. Las reacciones hídricas entre el embrión y el ambiente juegan un papel determinante en el desarrollo del embrión y especial en la maduración.

5.6. Importancia de la micropropagación en *Coffea canephora*.

Dada las características del café en cuanto a crecimiento (planta perenne de crecimiento lento que produce la primera cosecha a partir de los 3 años de edad) el mejoramiento mediante métodos tradicionales basados en la selección, cruces con individuos seleccionados y propagación de dichos individuos, puede implicar largos periodos de tiempo por ello la combinación, de métodos de mejoramiento y de transformación genética ofrece una alternativa para el mejoramiento de esta planta (De Guglielmo 2009, 475).

En relación a las técnicas de cultivo de tejidos, la micropropagación es una alternativa desarrollada para la producción a gran escala de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60. La principal ventaja de esta técnica se basa en la multiplicación rápida del material vegetal clonal libre de enfermedades, fisiológicamente uniforme y con un desarrollo normal (Santana, y otros 2004).

Para la reproducción clonal masiva *in vitro* en café (*Coffea sp.*) existen métodos de propagación bien desarrollados. Siendo la embriogénesis somática el método *in vitro* más eficiente. Sin embargo, debe estudiarse la estabilidad genética de las plantas regeneradas por dicho método, ya que, cuando un tejido pasa por las condiciones de cultivo *in vitro*, sobre todo cuando la regeneración ocurre pasando por una etapa de callo, pueden originarse variaciones genéticas; dicho fenómeno se denomina variación somaclonal (Calva y Perez 2005, 4).

En general los estudios realizados en café sobre cultivo *in vitro* junto con la transformación genética, son investigaciones que pueden ser utilizadas para mejorar el rendimiento y la calidad del cultivo de café, e incluso para estimular y potencializar su cultivo, puesto que sus derivados (café instantáneo y otros) presenta gran demanda nacional e internacional (De Guglielmo 2009, 483).

6. DISEÑO METODOLOGICO.

6.1. Ubicación.

La presente investigación se realizó durante los meses de diciembre 2016 a junio del 2017, en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la parroquia Lodana del cantón Santa Ana, provincia de Manabí; localizada geográficamente a 01° 09`de latitud sur y 80° 21` longitud Oeste con una altitud de 47 msnm.

6.1.1. Material experimental.

El material vegetal fuente de explante, fueron tres genotipos (cabezas de clon) de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner variedad robusta: Clon 1; GCNU-1, Clon 2; GCNU-2, Clon 3; JGO-3. Estos fueron colectados en un banco de germoplasma ubicado en el sitio Pitiambi, cantón Echeandía, provincia de Bolívar en los predios del productor Javier Roldan como parte del proyecto de investigación “Selección y difusión de clones de café robusta (*Coffea canephora* Perre ex Froehner) en el litoral ecuatoriano” realizado por Duicela, y otros (2016) con la colaboración de la Empresa Solubles Instantáneos S.A (SICA). Los clones utilizados poseen características agronómicas deseables como resistencia a roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Br) y alta productividad.

6.1.2. Condiciones físicas de crecimiento.

El material vegetal en la etapa de establecimiento, se colocó en un cuarto de crecimiento, en condiciones controladas de fotoperiodo de 24 horas de luz indirecta, temperatura de 24 ± 2 °C y una humedad relativa del 70%, luego bajo estas condiciones el mismo material se transfirió a medios de inducción pero con la modificación en el fotoperiodo a 16h luz indirecta/ 8h oscuridad, para la fase de expresión se mantuvieron las condiciones normales de cultivo.

6.2. Metodología.

Para el establecimiento *in vitro* de los materiales, se utilizó la metodología descrita por Molina y Figueroa (1996) con algunas modificaciones. La investigación se desarrolló con base en dos etapas, la primera que consistió en el establecimiento de segmentos de hoja, efectuándose varios tratamientos de desinfección a los mismos (**Cuadro1**).

6.2.1.1. Establecimiento.

- Factores estudiados

Factor A: Material genético.

Niveles del factor A.

C₁. GCNU-1 (CLON 1).

C₂. GCNU-2 (CLON 2).

C₃. JGO-3 (CLON 3).

Factor B: Desinfecciones.

Niveles del factor B.

D₁. Asperjar las plantas en campo con fungicida un día antes de la colecta de las muestras, en el laboratorio se realizó el lavado de hojas por 5 minutos con detergente más Tween₂₀, seguido de la inmersión de estas en amistar top (fungicida) por 30 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se las trato con una solución al 5% de hipoclorito de sodio más Tween₂₀.

D₂. Asperjar las plantas en campo con fungicida un día antes de la colecta de las muestras, en el laboratorio se realizó el lavado de hojas por 5 minutos con detergente más Tween₂₀, seguido de la inmersión de estas en amistar top (fungicida) por 45 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se las trato con una solución al 10% de hipoclorito de sodio más Tween₂₀.

D₃. Asperjar las plantas en campo con fungicida un día antes de la colecta de las muestras, en el laboratorio se realizó el lavado de hojas por 5 minutos con detergente más Tween₂₀, seguido de la inmersión de estas en amistar top (fungicida) por 60 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se las trato con una solución al 15% de hipoclorito de sodio más Tween₂₀.

D₄. En el laboratorio se realizó el lavado de hojas por 5 minutos con detergente más Tween₂₀, seguido de la inmersión de estas en amistar top (fungicida) por 30 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se las trato con una solución al 5% de hipoclorito de sodio más Tween₂₀.

D₅. En el laboratorio se realizó el lavado de hojas por 5 minutos con detergente más Tween₂₀, seguido de la inmersión de estas en amistar top (fungicida) por 45 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se las trato con una solución al 10% de hipoclorito de sodio más Tween₂₀.

D₆. En el laboratorio se realizó el lavado de hojas por 5 minutos con detergente más Tween₂₀, seguido de la inmersión de estas en amistar top (fungicida) por 60 minutos, posteriormente en la cámara de flujo laminar se las trato con una solución al 15% de hipoclorito de sodio más Tween₂₀.

Tratamientos

C ₁ D ₁ .	C ₂ D ₁ .	C ₃ D ₁ .
C ₁ D ₂ .	C ₂ D ₂ .	C ₃ D ₂ .
C ₁ D ₃ .	C ₂ D ₃ .	C ₃ D ₃ .
C ₁ D ₄ .	C ₂ D ₄ .	C ₃ D ₄ .
C ₁ D ₅ .	C ₂ D ₅ .	C ₃ D ₅ .
C ₁ D ₆ .	C ₂ D ₆ .	C ₃ D ₆ .

6.2.1.2. Tratamientos de desinfección.

En el campo, las plantas donadoras de explantes, se trataron un día antes de la colecta de las hojas, con Benlate[®] (fungicida) en dosis de 1 gramo/litro.

Las hojas colectadas se colocaron en una solución con 2 ml de detergente líquido comercial en 1000 ml de agua destilada y 10 gotas de Tween₂₀ por 5 minutos en agitación constante, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada, para continuar con el tratamiento de varios tiempos de inmersión (30, 45 y 60 minutos) en Amistar Top[®] fungicida, con el fin de eliminar agentes contaminantes externos como hongos del tejido vegetal tratado.

En condiciones de cámara de flujo laminar, el material vegetal antes tratado se colocó en diferentes tiempos y concentraciones (5, 10 y 15 %) de hipoclorito de sodio (NaOCl, cloro comercial a 5,25 % por litro), más una gota de Tween₂₀ por 100 ml de solución, realizado cada uno de los tratamientos el material vegetal tratado se enjuagó tres veces con agua estéril.

El material fuente de explante fueron hojas jóvenes tomados de la parte media de la hoja excluyendo la nervadura central y los márgenes (**Imagen 1**) con la finalidad de tener uniformidad de tejido en los explantes y excluir el tejido con altas probabilidades de contaminación en la cámara de flujo laminar, se cortó secciones de aproximadamente 1 cm² sobre papel kraft estéril con la finalidad de disminuir la contaminación y a sus vez eliminar el agua sobrante en las hojas durante la desinfección, para escindir las hojas se utilizaron pinzas estériles y 50 ml de alcohol al 95 % en un vaso de 200 cc donde se introducían y después se flameaban en un mechero, se dejaban brevemente enfriar y se continuaba con la incisión de los explantes (**Imagen 2**).

Los explantes consecutivamente eran depositados por 40 minutos en una solución estéril de cisteína 100mg/L, rápidamente se colocaban sobre papel Kraft estéril para que sea

absorbida la solución sobrante del tejido, e inmediatamente colocarlos en cajas de Petri con 20 ml del medio de establecimiento (**Cuadro 2**) Murashige y Skoog (1962), complementado con 30 gr/l de sacarosa y 100 mg/l de ácido ascórbico, pH ajustado a 5.7 y esterilizado en autoclave a 121°C, por 20 minutos. Este medio se utilizó como precultivo durante 7 días para seleccionar los explantes que estén completamente sanos (sin hongos, bacterias u oxidados), para establecer el ensayo con los tratamientos estudiados.

Cuadro 1 Metodologías de desinfección del material vegetal.

LUGAR DE ACTIVIDAD.	METODOLOGÍA					
	D ¹	D ²	D ³	D ⁴	D ⁵	D ⁶
En campo	**	**	**	***	***	***
Laboratorio, como pre desinfección. (inmersiones)	Detergente /Tween ₂₀ por 5 minutos.	Detergente /Tween ₂₀ por 5 minutos.	Detergente /Tween ₂₀ por 5 minutos.	Detergente /Tween ₂₀ por 5 minutos.	Detergente /Tween ₂₀ por 5 minutos.	Detergente /Tween ₂₀ por 5 minutos.
	Amistar top®/ Tween ₂₀ , por 30 minutos	Amistar top®/ Tween ₂₀ , por 45 minutos	Amistar top®/Tween ₂₀ por 60 minutos	Amistar top®/Tween ₂₀ por 30 minutos	Amistar top®/Tween ₂₀ por 45 minutos	Amistar top®/Tween ₂₀ por 60 minutos
Cámara de flujo laminar (desinfecciones)	5% NaClO/ Tween ₂₀ por 20 minutos.	10% NaClO/ Tween ₂₀ por 15 minutos.	15% NaClO/ Tween ₂₀ por 10 minutos.	5% NaClO/ Tween ₂₀ por 20 minutos.	10% NaClO/ Tween ₂₀ por 15 minutos.	15% NaClO/ Tween ₂₀ por 10 minutos.

D: Desinfección.

** : Asperjar las plantas con fungicida, 1 día antes de coleccionar las muestras.

*** : Sin asperjar las plantas con fungicida, antes de coleccionar las muestras.

Nota: en todos los tratamientos de inmersión se realizaron tres lavados con agua estéril, se utilizó NaOCl al 5.25% (cloro comercial) las dosis utilizadas están en litros, para el fungicida Amistar top® fue de 1ml⁻¹ para Tween₂₀ la dosis fueron 10gotas⁻¹

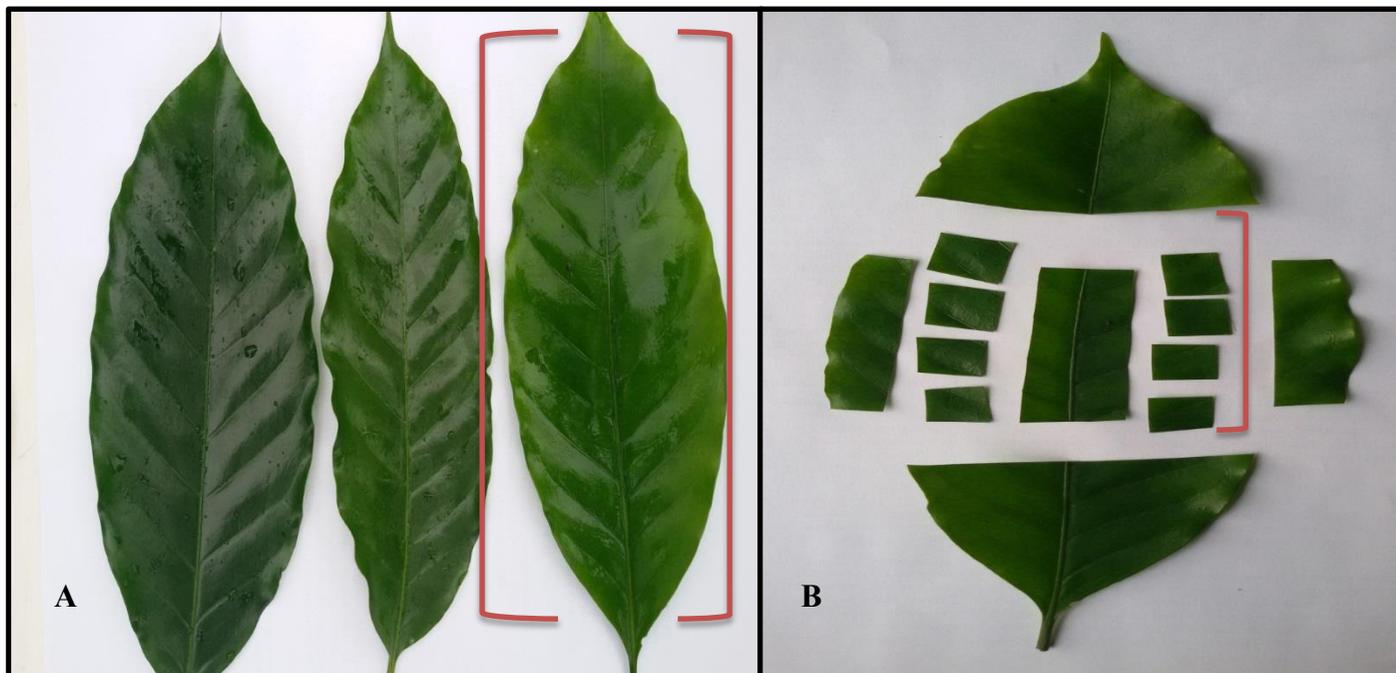


Imagen 1 Edad y posición de explantes foliares utilizados de *C. canephora*: **(A)** Se muestran tipos de hojas de izquierda a derecha; hoja madura, inmadura y joven, esta última fue el tipo de hoja que se utilizó. **(B)** Posición de los explantes en la hoja.

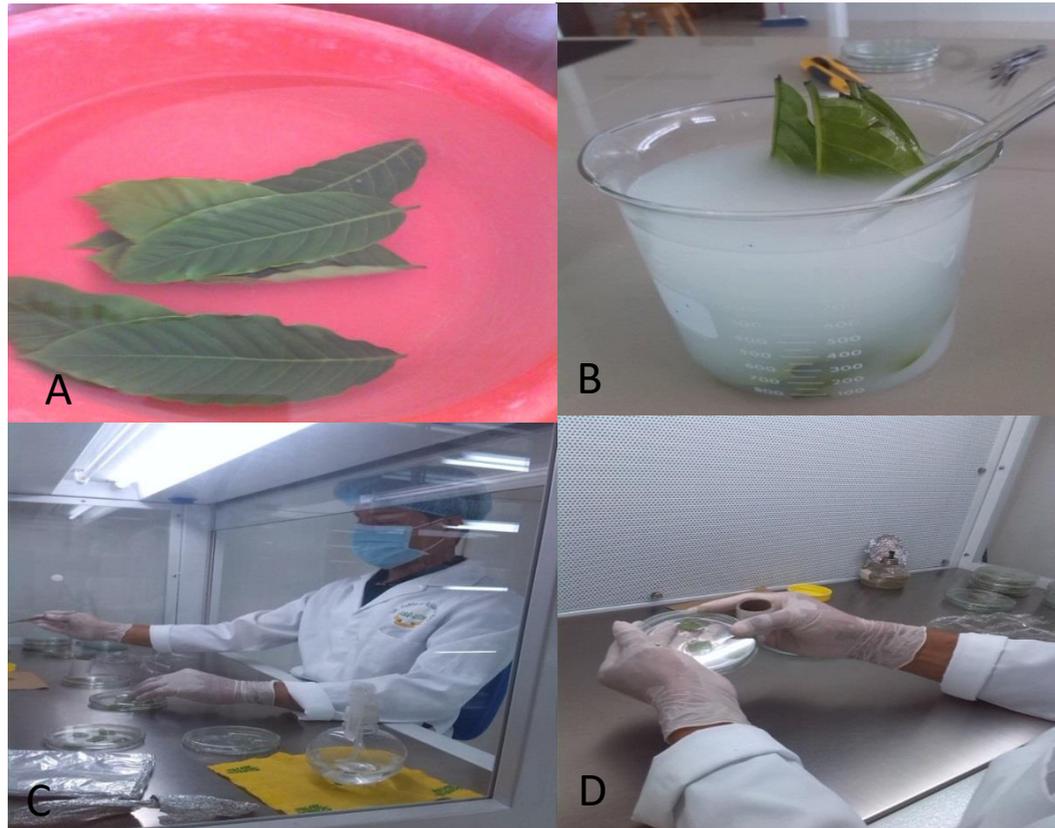


Imagen 2 Desinfección y siembra de explantes: (A) (B) Lavado de hojas con detergente y Tween₂₀. (C) Inmersión de hojas en amistar top. (D) y (E) Siembra de explantes en medio de cultivo en cajas de Petri.

6.2.1.3. Callogénesis.

En la segunda etapa los explantes que resultaron libres de contaminación en el establecimiento se utilizaron en la callogénesis para inducción de callogénesis.

Factores estudiados.

Factor A: Materiales genético.

Niveles del factor A.

C₁.GCNU-1(CLON 1). C₂. GCNU- 3(CLON 2). C₃. JGO-3(CLON 8).

Factor B: Dosis de hormonas.

Niveles del factor A.

M₁ = 2,4 D 2mg + BAP 1mg

M₂ = ANA 2mg + BAP 1mg

Tratamientos.

T₁: C₁ M₁.

T₂: C₁ M₂.

T₃: C₂ M₁.

T₃: C₂ M₂.

T₄: C₃ M₁.

T₅: C₃M₂.

6.2.1.4. Inducción a callo indiferenciado y embriogénico.

Los explantes en el medio de inducción se cultivaron durante ocho semanas, posteriormente se los transfirió a un medio de expresión (**Cuadro 2**) y permanecieron en condiciones de luz indirecta, por 12 semanas, para conocer el potencial embriogénico de tres clones en estudio, tomando en cuenta, la observación y clasificación de características morfológicas como color y el tipo, así también el tiempo en días necesarios para la expresión de callos embriogénicos y el porcentaje de explantes con estos callos.

Cuadro 2 Composición química de los medios de establecimiento, expresión e inducción.

COMPOSICIÓN.	ESTABLECIMIENTO	INDUCCIÓN.		EXPRESIÓN.
		M ₁	M ₂	
Sales mixtas MS.	4.30 g.L ⁻¹ .			
Vitaminas MS.	5 cc.L ⁻¹ .			
Meso-inositol.	0.10 g ⁻¹ .	0.10 g.L ⁻¹ .	0.10 g.L ⁻¹ .	0.10 g.L ⁻¹ .
Ácido ascórbico.	100 mg.L ⁻¹ .			
Gellan Gum.	3 g.L ⁻¹ .			
Sacarosa.	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹
2,4D	0	2 mg.L ⁻¹ .	0	0
ANA	0	0	2 mg.L ⁻¹ .	0
6-BAP	0	1mg.L ⁻¹ .	1 mg.L ⁻¹ .	2mg.L ⁻¹ .

MS: Medio completo Murashige y Skoog, 1962.

6-BAP: 6-bencilaminopurina.

ANA: Acido naftalacetico.

2,4D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

M₁: Medio uno.

M₂: Medio dos.

Nota: En todos los medios el pH se ajustó a 5,7.

6.3. Diseño experimental.

Para la etapa de establecimiento se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 6x3, para conocer la interacción entre las clones con los métodos de desinfección. El mismo que contenía 18 tratamientos con 3 repeticiones por tratamiento. Cada tratamiento constó de 108 explantes dividido en 3 repeticiones constituidas cada una por 36 explantes, conformada por 6 cajas de Petri con 6 explantes cada una. En la etapa de callogénesis se utilizó el mismo diseño con un arreglo factorial 2x3, para conocer la interacción de los clones con los medios. Conformado por 6 tratamientos con tres repeticiones. Cada tratamiento constó de 18 explantes dividido en 3 repeticiones constituidas por 6 explantes cada una por caja de Petri.

6.3.1. Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos en la etapa de establecimiento y callogénesis, se realizó un análisis de varianza usando el procedimiento ANOVA en el programa estadístico InfoStat (versión: 20-07-2017), la comparación de las medias se efectuó mediante la prueba de Tukey, utilizando un nivel de significancia del 0.05.

6.3.2. Variables evaluadas.

6.3.3. Variables evaluadas en el establecimiento.

A) Porcentaje de sobrevivencia a los 7 días.

Este se consideró como la diferencia existente entre contaminados y oxidados, los datos se analizaron estadísticamente, por cada genotipo y metodología de desinfección.

B) Porcentaje de contaminación y oxidación a los 7 días.

Se evaluó el porcentaje de segmentos de hojas (explantes) contaminados por bacterias, hongos, y oxidados, las evaluaciones se realizaron diariamente durante 7 días, después de la siembra de los 108 explantes, por tratamiento y materiales.

Para la evaluación de contaminación y oxidación se evaluaron 108 explantes por tratamiento dividido en tres repeticiones conformadas por 36 explantes cada una, las variables de respuesta fueron explantes oxidados, contaminados por hongos, bacterias y

explantes sanos, los datos se analizaron estadísticamente, por cada genotipo y metodología de desinfección.

6.3.4. Variables evaluadas en callogénesis.

- Fase de inducción a callo indiferenciado.

A) Días a inducción de callo indiferenciado (DICI).

Se contabilizó el tiempo en días a partir de la siembra de los explantes en los medios de inducción hasta la aparición de callos indiferenciados durante 8 semanas.

B) Porcentaje de explantes con callo indiferenciado (%ECI)

Esta variable fue medida, relacionando el número de explantes que llegaron a formar callo indiferenciado por tratamiento con el total de explantes y multiplicando por 100, al final de las 8 semanas.

- Aspectos morfológicos de los callos indiferenciados basados en la metodología de Landaverde, López y Vásquez (2002).

A) Color de los callos: Por su coloración los callos se clasificaron como color blanco crema y café claro, evaluados durante 8 semanas.

B) Tipo de callo: Durante 8 semanas se clasificaron los callos de cada explante de acuerdo a la textura observada (friable, Semifriable).

- Fase de expresión de callo embriogénico.

A) Días a expresión de callo embriogénico (DECE).

Durante 12 semanas se cuantificó los días en que los callos indiferenciados formaron callos embriogénicos en los explantes.

B) Porcentaje de explantes con callo embriogénico (% ECE).

Para esta variable se relacionó el número de explantes dentro de los tratamientos que formaron callo embriogénico al cabo de 12 semanas en el medio de expresión.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO.

Durante esta fase se evaluó por 7 días la sobrevivencia del tejido en los diferentes métodos de desinfección en los clones en estudio.

7.1.1. PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA A LOS 7 DÍAS.

La sobrevivencia de explantes fue mayor en el clon JGO-3 (clon 3) como se puede observar en el **Cuadro 3**, las concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas fueron toleradas por el tejido vegetal en estudio. Cuando se utilizó una concentración baja de 5% y 10%, se pudo observar que no se consigue una eliminación eficiente de los contaminantes superficiales del tejido en tratamiento, no obstante el tiempo de desinfección juega un papel importante, los tiempos establecidos en los tratamientos antes mencionados se ajustan a un tiempo lógico de tratamiento, lo que concuerda con López, Iracheta, y otros (2011, 656) estos mencionan que con tiempos y dosis altas se obtiene una buena desinfección pero contribuyen a unos altos niveles de oxidación.

Cuando se asperjó Benlate 1ml/litro a las plantas en campo y en el laboratorio las hojas se lavaron con detergente más 5 gotas de Tween₂₀ después se sumergieron en una solución de Amistar top 1ml/litro y posteriormente para la siembra se trataron con hipoclorito de sodio al 15 % (D₃), tal como indica el análisis estadístico en el **Cuadro 3** es el de mejor resultado, por lo que no afectó al tejido tratado produciéndole necrosis, y además se consiguió eliminar agentes contaminantes superficiales, obteniendo así un promedio del 87 % de sobrevivencia lo cual es un alto porcentaje según lo concluido por López, Iracheta, y otros (2011, 656) quienes recomiendan la utilización de dosis bajas de hipoclorito de sodio.

La variación de las medias entre clones no fue significativa (**Cuadro 3**), esto se debe a que la cantidad de explantes sobrevivientes está en relación directa a la metodología de desinfección e incidiendo mínimamente el tipo de clon, siendo la causa principal la contaminación de hongos endófitos, lo cual está en estrecha relación con la aplicación del fungicida en campo, porque los hongos superficiales no fueron inconveniente puesto que con la desinfección 3 (D₃) la contaminación fue del 0 %.

7.1.2. PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN Y OXIDACIÓN A LOS 7 DÍAS.

La eficiencia de los métodos de desinfección se estableció por el porcentaje de contaminación y oxidación del material experimental, siendo mejor aquel que menor índice de contaminación y oxidación obtuvo de los tres clones en estudio. Como se observa en la **Cuadro 3**, con el método de desinfección tres (D₃) en el cual se asperjó Benlate a las plantas en campo y en el laboratorio las hojas se lavaron con detergente más Tween₂₀ después se sumergieron en una solución de Amistar top y posteriormente para la siembra se trataron con hipoclorito de sodio se observaron los niveles más bajos de contaminación de explantes correspondientes a 4,67 con relación a 36,00 como media general que en porcentaje representa 12,97 %, resultado muy aceptable según lo descrito por Mroginski, Sansberro y Flaschland (2010, 19) que mencionan porcentajes del 10 % de contaminación dentro de un experimento.

Cuadro 3 Efecto de clones y desinfecciones en la contaminación y sobrevivencia del número de explantes foliares de tres clones de *C. canephora*.

TRATAMIENTOS	LABORATORIO	
	N de explantes contaminados	N de explantes sobrevivientes
Efecto de Clones		
Clon 1	23,17	13,28
Clon 2	21,89	14,61
Clon 3	21,17	15,33
Efecto de la desinfección		
Desinfección 1	9,00b	27,00b
Desinfección 2	11,00b	25,00b
Desinfección 3	4,67c	31,33a
Desinfección 4	35,78a	1,11c
Desinfección 5	36,00a	1,00c
Desinfección 6	36,00a	1,00c
CV (%)	11,45	17,41
Probabilidad ANOVA		
Clones	0,0694 ^{NS}	0,0575 ^{NS}
desinfección	<0,0001**	<0,0001**
Clones x Desinfección	0,4308 ^{NS}	0,4530 ^{NS}

^{NS} No significativo; ^{**} Altamente significativo N media.

El análisis de varianza realizado (**Cuadro 3**) muestra que la diferencia entre los métodos de desinfección es altamente significativa <0,0001, con respecto a los porcentajes de contaminación. Entre los clones, y la interacción entre clones y desinfecciones la diferencia estadísticamente no fue significativa.

La principal causa de pérdida de explantes fueron agentes contaminantes predominando los hongos endófitos, la presencia de estos fue del 100 % cuando no se aplicó fungicida en campo como es el caso de los tratamientos D₄, D₅, D₆, a excepción del D₄ en el clon 1 que presentó un 35,78 (**Cuadro 3**) correspondiente al 98,14 % y respectivamente un 1,85 % de sobrevivencia (**Anexo 3, tabla 7**) que estadísticamente no es representativo, demostrándose que la aplicación del fungicida como pre tratamiento en el laboratorio elimina hongos externos pero no influye de manera directa sobre la eliminación de hongos endófitos del tejido, siendo así que este tipo de contaminantes tuvieron mayor presencia en los tejidos tratados coincidiendo con Sánchez y Salaverría (2004, 21-26).

La respuesta de un tejido cuando es separado de la planta donadora contribuye a que el pre tratamiento realizado en el laboratorio con fungicidas no resulte del todo eficaz, puesto que este pierde la capacidad de movilizar de manera eficiente el fungicida aplicado como pre tratamiento, ya que la movilización de estos productos es eficaz, vía xilema o/y floema (sistémico), o ya sea por difusión de gases (translaminar) o por contacto, estas condiciones se dan eficientemente en la planta, a excepción de fungicidas por contacto, que aplicados a un tejido separado (hoja) por su propiedad tienen un leve efecto el cual no es suficiente para un eficiente control de hongos endófitos concordando con lo mencionado por Mroginski, Sansberro y Flaschland (2010, 19).

En el caso de los explantes perdidos por contaminación de bacterias sus porcentajes fluctúan entre 2,31 en el clon1, 0,77 clon 3 y 0,61 en el clon 2 (**Anexo 3, tabla 6**), porcentajes manejables según lo descrito por Mroginski, Sansberro y Flaschland (2010, 19).

La pérdida de explantes por oxidación entre clones se dio en bajos porcentajes (0.8 y 1.4 %) (**Anexo 3, tabla 6**), mostrando en el análisis de varianza la no diferencia estadística entre clones lo que probablemente se deba a que el tejido no fue afectado por los métodos de desinfección probados, atribuido a la utilización de cisteína (100 mg/L) antes de la siembra y después de escindir los explantes y la utilización de ácido ascórbico (100 mg/L) en el medio, su efectuada sin duda alguna disminuyó los posibles casos de oxidación, asegurando de esta manera la viabilidad del proceso coincidiendo con lo mencionado por Sánchez y Salaverría (2004, 21-26) quienes mencionan que la adición de antioxidantes al medio o como pre tratamiento reducen la

oxidación, tomando en consideración lo indicado por Mittler (2002, 405-410) quien señala que la oxidación constituye uno de los problemas más serios desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro*.

7.2. ETAPA DE CALLOGÉNESIS.

7.2.1. FASE DE INDUCCIÓN A CALLO INDIFERENCIADO.

Después de la etapa de desinfección y seleccionados los explantes sanos de los tres clones en estudio, se evaluó por 56 días contabilizando los mismos a partir de la siembra de los explantes en los medios de inducción (M_1 y M_2), hasta la aparición de callos indiferenciados, en estos medios se utilizó combinaciones de una citoquinina (6-BAP a 1 mg.L^{-1}) para los dos medios y dos auxinas (2,4D y ANA a 2 mg.L^{-1}) con la finalidad de conocer la eficiencia de estas en la generación de callo indiferenciado y posteriormente conocer la potencialidad embriogénica de estos, por medio de las siguientes variables Días a inducción de callo indiferenciado (DICI) y Porcentaje de explantes con callo indiferenciado (% ECI).

7.2.1.1. DÍAS A INDUCCIÓN DE CALLO INDIFERENCIADO (DICI).

A los 7 días los explantes del clon 2 en el medio de cultivo 1 (M_1 : 2,4D a 2 mg.L^{-1} + 6-BAP a 1 mg.L^{-1}) iniciaron la formación de callo indiferenciado siendo el tratamiento que menos tiempo tardó en formarlos, aunque estadísticamente el valor no es significativo en la interacción clones por medios por repetición como se muestra en el análisis de varianza del **Cuadro 4**, puesto que en comparación con los demás clones evaluados hay una diferencia de 1-3 días es decir que la formación de callos indiferenciados está entre 7-10 días. Resultados importantes en comparación con los de Landaverde, López y Vásquez (2002, 59) quienes obtuvieron un promedio de 19-21 días. En el Anexo 8, tabla 33, se muestra el comportamiento de los tratamientos con respecto al tiempo de formación de los callos indiferenciados (**Imagen 3**).

El número de días que un explante tarda en formar callo indiferenciado es muy variable fluctúa entre 19-21 días (Paz 2000), mientras que Carimi y otros (1994) mencionan 14 días.

Los resultados en esta investigación fluctuaron entre 7-10 días, los tiempos antes mencionados dependen principalmente:

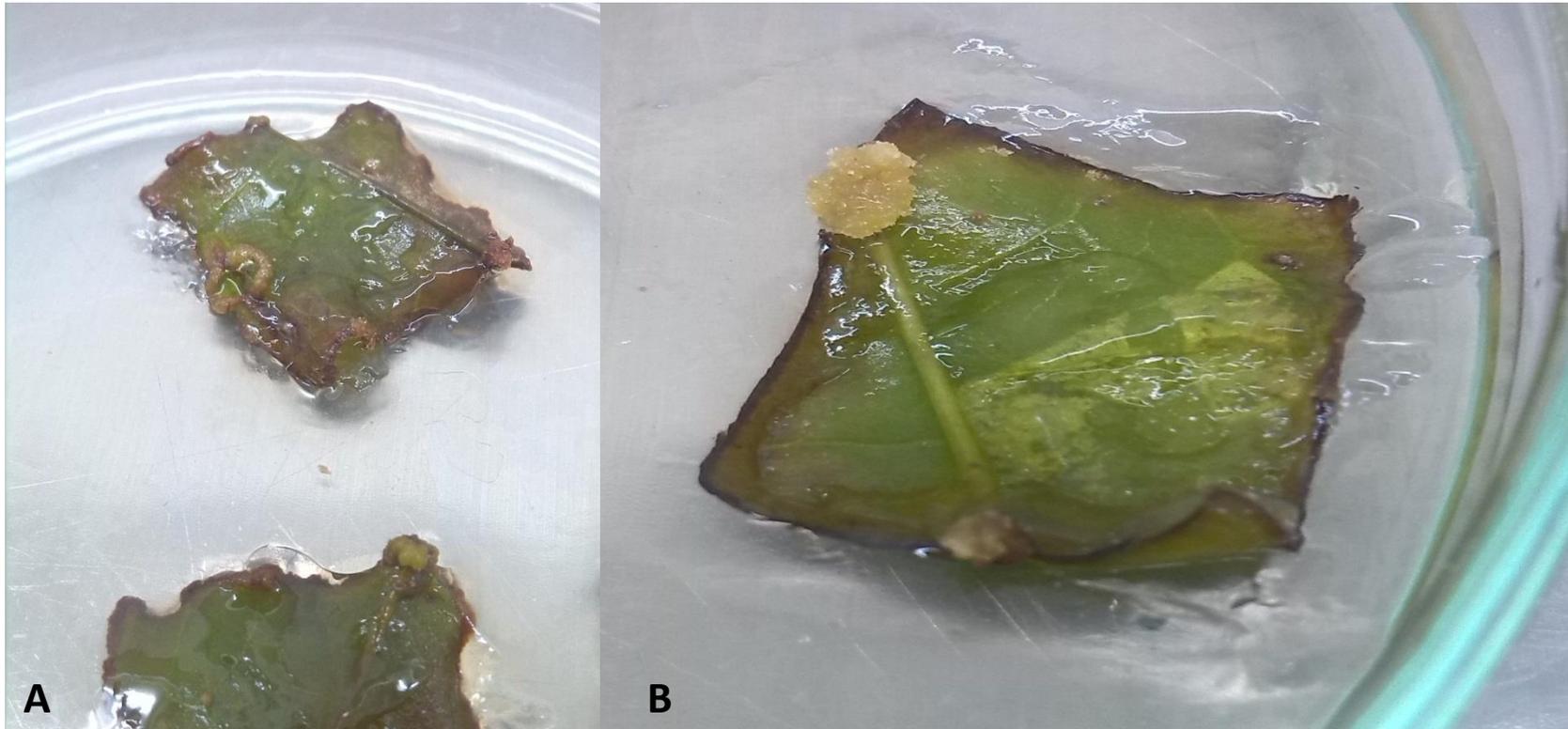


Imagen 3 Imágenes de inicio de formación de callos indiferenciados **(A)** Callos semifriables. **(B)** Callos friables.

Del tipo de embriogénesis que se realice, de alta y baja frecuencia, puesto que en la primera al utilizar dos medios uno de establecimiento y otro de inducción la presencia de callos indiferenciados tiende a ser en menor tiempo mientras que en la segunda al utilizar un solo medio inducción la cantidad de estos tiende a ser menor (Ramirez, Guevara y Escobar 2012, 129-130), no obstante la presencia y cantidad de reguladores de crecimiento (hormonas citoquininas y/o auxinas) es indispensable para la expresión de callos indiferenciados (González, Santana y López 2001).

Cuadro 4 Efecto de dos medios de cultivo en la inducción a callo indiferenciado en explantes foliares de tres clones de *C. canephora*.

Tratamientos	LABORATORIO
	DICI
Efecto de Clones	
Clon 1	9,00
Clon 2	8,00
Clon 3	9,50
Efecto de medio hormonal	
Medio 1	7,67a
Medio 2	10,00b
CV (%)	4,00
Probabilidad ANOVA	
Clones	<0,0002**
Medios	<0,0001**
Repetición	>0,9999 ^{NS}
Clones x Medios x Repetición	>0,9999 ^{NS}

DICI: *Días a inducción de callo indiferenciado*; ^{NS} *No significativo*; ** *Altamente significativo*.

7.2.1.2. PORCENTAJE DE EXPLANTES CON CALLO INDIFERENCIADO (%ECI).

Para esta variable no se realizó análisis estadístico puesto que el 100% de explantes formaron callos indiferenciados (**Anexos, Tabla 35**), siendo así que los dos medios utilizados (**M₁**: 2,4D a 2 mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1 mg.L⁻¹; **M₂**: ANA a 2 mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1 mg.L⁻¹) ambos presentaron eficiencia para formar callos indiferenciados en los tres clones en estudio, además concuerdan con los resultados obtenidos por González (2003,18) quien menciona que se puede lograr obtener callos indiferenciados con la utilización de una citoquinina sola o en combinación con una auxina.

7.2.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE CALLOS INDIFERENCIADOS.

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

7.2.2.1. COLOR DE CALLO.

El análisis estadístico realizado (**Cuadro 5**) para las variables Color de callo café claro (CCCC) y Color de callo blanco crema (CCBC) muestra que las fuentes de variación no presentan diferencia significativa entre clones, o clones por medios, pero si en los medios siendo esta 0,0131* para ambas variables, demostrando que en el medio 2 (M₂: ANA a 2 mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1 mg.L⁻¹) se formaron mayor cantidad de callos de color blanco crema (CCBC) con una media de 5,00a además coinciden con los resultados obtenidos por Ramos, y otros (2009, 22) quienes también obtuvieron callos de color blanco crema con características friables en su mayoría (ver **Imagen 4**).

Cuadro 5 Efecto de dos medios de cultivo en tres clones en la expresión de las características morfológicas del callo indiferenciado en explantes foliares de *C. canephora*.

Tratamientos	LABORATORIO			
	CCCC	CCBC	ECF	ECSF
Efecto de Clones				
Clon 1	2,17	3,83	3,83	2,17
Clon 2	2,5	3,50	3,5	2,50
Clon 3	2,34	3,67	3,67	2,34
Efecto de medio hormonal				
Medio 1	3,67a	2,34b	2,34b	6,67a
Medio 2	1,01b	5,00a	5,00a	1,01b
CV (%)	80,29	51,2	51,2	80,29
Probabilidad ANOVA				
Clones	0,9544 ^{NS}	0,9540 ^{NS}	0,9540 ^{NS}	0,9544 ^{NS}
Medios	0,0131*	0,0131*	0,0131*	0,0131*
Clones x Medios	0,8689 ^{NS}	0,8711 ^{NS}	0,8711 ^{NS}	0,8689 ^{NS}

CCCC: *Color de callo café claro*; CCBC: *Color de callo blanco crema*. ECF: *explantes con callo friable*; ECSF: *explantes con callo semifriable*; ^{NS} *No significativo*; **Significativo*.

7.2.2.2. TIPO DE CALLO.

El análisis estadístico realizado **Cuadro 5** para las variables explantes con callos friables (ECF) y explantes con callo semifriable (ECSF) muestran que la mayoría de estos fueron friables con una media de 5,00a, provenientes del medio 2 que en su mayoría presentaron callos de color blanco crema, resultados que coinciden con los de:



Imagen 4 Imágenes de callos después de las ocho semanas de cultivo **(A)** Callos friables de color blanco crema. **(B)** Callos semifriables de color café claro.

De Rezende, y otros (2003, 107-116) quienes también obtuvieron callos de color blanco crema con características friables en su mayoría.

Esto se debe a que cuando se generan callos a partir de ANA+6-BAP (medio 2) los callos tienden a ser friables, lo contrario sucede cuando se utiliza 2,4D+6-BAP (medio 2) puesto que la dosis utilizada de 2,4D a 2 mg.L^{-1} en esta investigación se puede considerar alta según lo descrito por Moncada y Mora (2010, 23) quienes mencionan buenos resultados con dosis de 2,4D a 0.3 mg.L^{-1} . Se puede decir de manera precisa lo antes mencionado porque cabe destacar que en esta investigación se estandarizo, edad, área y tamaño de los explantes tomados de las hojas en estudio fuente de material experimental esto se realizó con tres clones, variables que tienden a ser fuente de variación en este resultado según varias investigaciones destacando las de Gatica (2002, 81); López, y otros (2011, 212).

7.2.3. FASE DE EXPRESIÓN A CALLO EMBRIOGÉNICO.

Transcurridos 8 semanas en los medios de inducción los explantes provenientes de estos se transfirieron a un medio de expresión (6-BAP a 2 mg.L^{-1}) en el cual se mantuvieron por 12 semanas, con la finalidad de conocer la potencialidad embriogénica de estos, por medio de las siguientes variables; Días a expresión de callo embriogénico (DECE) y porcentaje de explantes con callo embriogénico (% ECE).

7.2.3.1. DÍAS A EXPRESIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO (DECE).

En Cuadro 6 se muestra que las fuentes de variación presentan diferencia significativa entre clones y medios o clones por medios, un dato importante a destacar es el medio dos en el cual se formaron callos embriogénicos en menor tiempo entre 37-42 días (**Anexo 8, tabla 37**) en comparación con el tiempo tomado por del medio uno que esta entre 65-72 días, variación que está en fusión a que los explantes que provenían del medio 1 tardaron mayor tiempo en expresar características embriogénicas atribuyéndole tal efecto a la presencia elevada del 2,4D a 2 mg.L^{-1} utilizada en esta investigación considerada alta según lo descrito por Moncada y Mora (2010, 23) quienes mencionan que con dosis de 2,4D a 0.3 mg.L^{-1} tiende a reducirse el efecto inhibitorio de la hormona en la expresión del callo embriogénico, puesto que las condiciones de cultivo y hormonales se estandarizaron, tomando en consideración estas como posible fuente de variación.

Cuadro 6 Efecto de dos medios de cultivo, en la expresión a callo embriogénico de explantes foliares de tres clones de *C. canephora*.

Tratamientos	LABORATORIO	
	DECE	% ECE
Efecto de Clones		
Clon 1	56,50	3,83
Clon 2	54,50	3,50
Clon 3	51,00	3,67
Efecto de medio hormonal		
Medio 1	68,67b	3,34b
Medio 2	39,33a	5,00a
CV (%)	1,73	51,2
Probabilidad ANOVA		
Clones	<0,0001**	0,9540 ^{NS}
Medios	<0,0001**	0,0160*
Repetición	>0,9999 ^{NS}	0,4941 ^{NS}
Clones x Medios x Repetición	>0,9999 ^{NS}	0,6570 ^{NS}

(DECE): Días a expresión de callo embriogénico; (% ECE): porcentaje de explantes con callo embriogénico; ^{NS} No significativo; **Altamente significativo * Significativo.

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

El porcentaje de explantes con callo embriogénico por clon fue mayor numéricamente (Anexo 8, tabla 37) en el clon 1 aunque no estadísticamente como se muestra en el cuadro 6, la diferencia entre medias en los medios de cultivo muestra claramente que el porcentaje de explantes con callo embriogénico provienen del medio dos, en lo que respecta a las fuentes de variación no presentan diferencia significativa entre clones, o clones por medios por repeticiones, pero si entre medios con un 0,0160 resultado que demuestra lo antes mencionado, en total se obtuvo un porcentaje de 61,11% (**Anexo 8, tabla 34**) (**Imagen 5**) de explantes con callo embriogénico resultado aceptable que se acerca al obtenido por Landaverde, López y Vásquez (2002, 62) quienes reportan en general valores por debajo del 43% de explantes con callo embriogénico en las variedades de *Coffea ssp*, utilizadas.

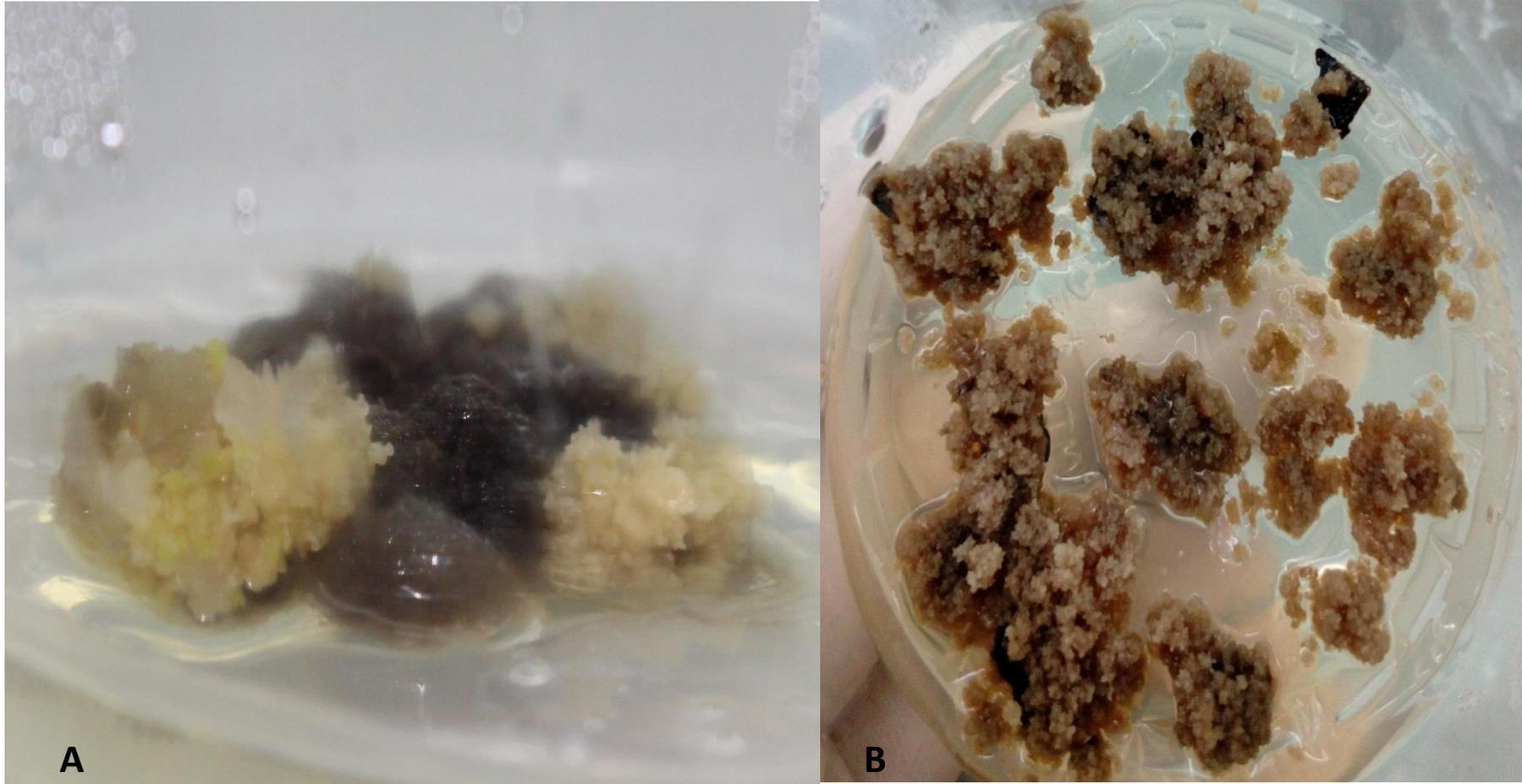


Imagen 5 Callos embriogénicos al final de las diez semanas de cultivo. **(A)** Callos embriogénicos friables generados a partir del medio M_1 : 2,4D a 2 mg.L^{-1} + 6-BAP a 1 mg.L^{-1} . **(B)** Callos embriogénico semifriables originados a partir del medio M_2 : ANA a 2 mg.L^{-1} + 6-BAP a 1 mg.L^{-1} .

8. CONCLUSIONES.

- De las metodologías de desinfección evaluadas ninguna afectó negativamente al tejido por ende no provocaron muerte inmediata de este en los tres clones, indicando que las cantidades de hipoclorito de sodio en los tiempos de inmersión fueron tolerados por los mismos. El método más eficiente para la desinfección de explantes foliares de los tres clones fue el D₃ en el cual se asperjó a las plantas en campo fungicida Benlate (1ml/litro) un día antes de la colecta de las hojas las mismas que en el laboratorio se lavaron por 5 minutos con detergente más 5 gotas de Tween₂₀ posteriormente se empleó un tiempo de 60 minutos de inmersión en Amistar top (1ml/litro) y consecutivamente en la cámara de flujo laminar se sumergieron por 10 minutos de inmersión del tejido vegetal en hipoclorito de sodio (NaClO) al 15%, con esta metodología se logró los niveles más bajos de contaminación y oxidación.

- El medio de inducción **M₂** ANA a 2mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1mg.L⁻¹ fue el de mejor resultado para la inducción a callo indiferenciado. Los explantes de los genotipos evaluados en esta investigación formaron callos friables de color blanco crema y semifriables de color café claro los primeros en su mayoría provenientes del medio **M₂**: ANA a 2 mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1 mg.L⁻¹ y los segundos por lo general del **M₁**: 2,4D a 2 mg.L⁻¹ + 6-BAP a 1 mg.L⁻¹. Se evidenció en los tres clones una respuesta a la callogénesis similar. No obstante la mayor cantidad de explantes con callo embriogénico la presento el clon 1, pero en general se tuvo un porcentaje de 61,11 %.

9. RECOMENDACIONES.

- Para el establecimiento de explantes foliares con material proveniente de campo de los tres clones utilizados se recomienda como protocolo de desinfección utilizar la metodología 3 de esta investigación.
- Es favorable utilizar el medio de inducción M_2 ANA a 2mg.L^{-1} + 6-BAP a 1mg.L^{-1} para la inducción a callo indiferenciado además se recomienda evaluar en la inducción a callo indiferenciado las siguientes hormonas en las dosis: ANA a 1mg.L^{-1} + 6-BAP a 2mg.L^{-1} con la finalidad de elevar el número de explantes friables. Para obtener gran cantidad de embriones somáticos a partir de material de campo, se recomienda seguir con la metodología utilizada en esta investigación conocida también como embriogénesis somática de alta frecuencia (HSFE).

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta, José. Embriogénesis somática en café (*Coffea canephora* y *Coffea arabica*) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. Tesis para la obtención del título de biólogo, Guayaquil: Universidad de Guayaquil, 2015.
- Afreen, F, S Zobayed, y T Kozai. «Photoautotrophic culture of *Coffea arabica* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos.» *Ann. Bot.*, 2002: 11-19.
- ANECAFE. Asociación Nacional de Exportadores de Café. 15 de Junio de 2012. <http://www.anecafe.org.ec/quienes-somos> (último acceso: 15 de Junio de 2017).
- Azofeifa, Álvaro. «Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro.» *Agronomía Mesoamericana*, 2009: 153-175.
- Berthouly. «Micropropagación del café.» Seminario sobre biotecnología. Xalapa-México.: Roussos, R. Gutiérrez, M., 1989. 25.
- Berthouly, M. «Micropropagación del café.» Memorias. Xalapa: Roussos, R; Gutiérrez, M, 12-15 de Abril de 1986.
- Calva, Graciano, y Josefina Perez. «Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro.» *Revista Digital Universitaria*, 2005: 16.
- Carimi, F, F De Pasquale, y F Grulio. «Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*).» *Plant cell, tissue and organ culture*, 1994: 209- 211.
- COFENAC. «El Sector Cafetalero Ecuatoriano (Diagnostico).» Consejo Cafetalero Nacional (COFENAC), 2011: 53.
- COFENAC. Influencia de métodos de beneficio sobre la calidad organoléptica del café arábigo. . boletín divulgativo, Portoviejo: EC, 2010.
- De Guglielmo, Zoraya. «Ingeniería genética aplicada al café.» *UDO Agrícola*, 2009: 475-486.
- De Rezende, M, M Pasqual, A Pereira, D Costa, D Bortolotti, y D Ferreira. «Embriogénesis somática indirecta en explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv.» *Ciência Agrotec Lavras*, 2003: 107-116.
- Duicela, Luis, Willian Chilán, Rubén Corral, Mariano Muñoz, y Francisco Romero. «Selección y difusión de clones de café robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner).» *Solubles Instantaneos S. A. (SICA)*, 2016: 66.
- Duicela, Luis, Williams Chilán, y Robinson Muñoz. «Multiplicación sexual y asexual de café robusta.» En *Guía técnica para la producción y poscosecha del café robusta*, de Gustavo Enriquez, Luis Duicela y Williams Chilán, 49-57. Ecuador: COFENAC - SICA, 2014.
- Enriquez, Gustavo, Luis Duicela, y Willian Chilan. «Germoplasma de café robusta .» En *Guía Técnica para la producción y poscosecha del café robusta*, de Gustavo Enriquez y Luis Duicela, 259. Ecuador: COFENAC- SICA, 2014.

- Galindo, Xiomara. Produccion e industrialización de café solubles Caso: Solubles Instantáneos . Tesis para optar el título de Economista, Guayaquil: Universidad de Guayaquil, 2011.
- Gatica, Andres. Regeneracion de plantas de café (Coffea arabica cv. Caturra y Catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. Informe de práctica de especialidad, Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2002.
- González, M, N Santana, y C López. «Efecto de la composición del medio de cultivo y el genotipo de la inducción de la embriogénesis somática en clones de Coffea canephora P. Var Robusta.» Cultivos Tropicales, 2001: 17-21.
- González, Maria. «Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de cafeto (Coffea canephora P.)» Revista Colombiana de Biotecnología , 2003: 16-22.
- Gonzalez, Maria, Annia Hernández, Luis Barrios, Miguel Velázquez, y Ana. Hernández. «Efecto antagónico de un producto biológico obtenido de Burkholderia cepacia Palleroni y Holmes contra Capnodium ssp. en plántulas de café (Coffea canephora P.) crecidas in vitro e in vivo.» Revista mexicana de fitopatología, 2007: 8.
- Landaverde, Vilma, Alba López, y Teresa Vásquez. Estudio de induccion a callo embriogénico en variedades comerciales de café (Coffea arabica) de el Salvador. Tesis para optar al título de Ingeniero Agronomo, San Salvador: Universidad de el Salvador- Facultad de Ciencias Agronómicas , 2002.
- Levitus, Gabriela, Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp, y Luis Mroginski. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argentina: ArgenBio, 2010.
- López, Pablo, y otros. «Influencia del explante y el medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café.» Fitotec. Mex., 2010: 204-213.
- López, Pablo, y otros. «Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de Coffea spp. cultivados in vitro.» Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2011: 645-657.
- Lozano, Guillermo. Propagación in vitro de café (Coffea arabica) -variedad Lempira- a partir de meristemas. Tesis previo a la obtención del título de Ingeniero Agronomo, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, 2014.
- Mijael, R. Cultivo del café. Perú: Biblioteca Nacional del Perú, 2008.
- Mittler, R. «oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.» Trends in Plant science, 2002: 405-410.
- Molina, A, y P Figueroa. «Propagación por microestacas y por embriogénesis somática en el cultivo in vitro del café.» I Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (memorias). Guatemala: NS, 1996. 97-102.

- Moncada, Maria, y Argenis Mora. «Inducción in vitro de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de Coffea arábica L. Variedad Catuaí Amarillo.» Academia, 2010 f.a: 23-28.
- Mroginski, Luis, Pedro Sansberro, y Eduardo Flaschland. «Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales.» En Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, de Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski, 650. Argentina: ARGENBIO-INTA, 2010.
- Murashige, T, y F Skoog. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.» *Physiol Plant*, 1962: 473-497.
- Paz, A. Inducción de Embriogénesis somática in vitro de Coffea arabica a partir de explantes foliares. Tesis para optar a Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Lic, Honduras: Zamorano , 2000.
- Pedroza, Jaime. Aplicacion del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro . Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas , 2008.
- PROEcuador. «Análisis Sectorial Café Verde.» Instituto de Promocion de Exportaciones e Inversiones, 2016: 13.
- PROEcuador. «Análisis sectorial de café.» Direccion de inteligencia/PROEcuador, 2013: 52.
- Radice, Silvia. «Morfogénesis.» En Biotecnología y Mejoramiento vegetal II, de Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski, 650. Argentina: INTA, 2010.
- Ramirez, Hernando, Maria Guevara, y Roosevelt Escobar. Cultivo de tejidos vegetales. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 2012.
- Ramos, R, y otros. «Plant regeneration through somatic embryogenesis in three ethiopian Coffea arabica Lin. hybrids.» *Biotecnología Vegetal*, 2009: 19-26.
- Roskov, Y, y otros. Catalogue of Life. 1 de Diciembre de 2016. www.catalogueoflife.org/col (último acceso: 1 de Diciembre de 2016).
- Sánchez, M, y J Salaverría. «Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (Fragaria*ananassa Duch.)» *UDO Agrícola*, 2004: 21-26.
- Santana, N, y otros. «Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (Coffea canephora) clones.» *Biol.-Plant*, 2004: 95-101.
- Yuffá, Menéndez, y A Rios. «Estabilidad en los patrones de proteínas de plántulas de café regeneradas por embriogénesis somática.» *Revista Internacional de Botanica Experimental ΦYTON*, 2008: 49-64.

11. ANEXOS.

Anexo1. ANOVA y prueba de Tukey en la variable porcentaje de sobrevivencia a los 7 días.

Tabla 1 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9959.07	19	524.16	83.29	<0.0001
rep	14.04	2	7.02	1.12	0.3395
clon	39.15	2	19.57	3.11	0.0575
desin	9842.15	5	1968.43	312.80	<0.0001
clon*desin	63.74	10	6.37	1.01	0.4530
Error	213.96	34	6.29		
Total	10173.04	53			

Tabla 2 Comparación de medias. Test: Tukey Alfa=0.05

Clon	Medias	n	E.E.
3	15.33	18	0.59 A
2	14.61	18	0.59 A B
1	13.28	18	0.59 B

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

Anexo2. ANOVA y prueba de Tukey en la variable porcentaje de contaminación y oxidación a los 7 días.

Tabla 3 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10666.41	19	561.39	87.84	<0.0001
rep	12.70	2	6.35	0.99	0.3806
clon	36.93	2	18.46	2.89	0.0694
desin	10550.15	5	2110.03	330.15	<0.0001
clon*desin	66.63	10	6.66	1.04	0.4308
Error	217.30	34	6.39		
Total	10883.70	53			

Tabla 4 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05
Error: 6.3911 gl: 34

Clon	Medias	n	E.E.
1	23.17	18	0.60 A
2	21.89	18	0.60 A
3	21.17	18	0.60 A

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

Anexo 3. Porcentaje total, por repetición y por tratamientos de explantes perdidos y sobrevivientes de las variables medidas en el establecimiento.

Tabla 5 Porcentaje de explantes sanos y perdidos y fuentes de contaminación en el establecimiento.

Causa de pérdida de explantes foliares de <i>C.canephora</i> .			Total	
Bacterias.	Hongos.	Oxidación.	Sanos.	Perdidos.
1,23%	59,10%	0,97%	38,68%	61,31%

Tabla 6 Número y porcentaje de explantes y su fuente de contaminación y explantes sobrevivientes por tratamiento y repetición clon 1.

R	C	D	BA	%	HO	%	OX	%	PE	%	SO	%
1	1	1	0		11		3				22	
2	1	1	1	1	10	26,81	1	4,62	35	27,77	24	69,44
3	1	1	0		8		1				27	
1	1	2	0		10		0				26	
2	1	2	2	2	12	35,18	0	0	40	37,03	22	62,96
3	1	2	0		16		0				20	
1	1	3	0		11		0				25	
2	1	3	0	0	3	18,51	0	0	20	18,51	33	81,48
3	1	3	0		6		0				30	
1	1	4	0		34		0				2	
2	1	4	0	0	36	98,14	0	0	106	98,14	0	1,85
3	1	4	0		36		0				0	
1	1	5	0		36		0				0	
2	1	5	4	4	32	96,29	0	0	108	100	0	0
3	1	5	0		36		0				0	
1	1	6	0		36		0				0	
2	1	6	0	8	36	92,59	0	0	108	100	0	0
3	1	6	8		28		0				0	
Total			15	2,31	397	61,27	5	0,77	417	64,35	231	35,65

R: Repetición; C: Clon; D: Desinfección; BA: Bacterias; %: Porcentaje; HO: Hongos; OX: Oxidados; PE: Perdidos; SO: Sobrevivientes.

Tabla 7 Número y porcentaje de explantes y su fuente de contaminación y explantes sobrevivientes por tratamiento y repetición clon 2.

R	C	D	BA	%	HO	%	OX	%	PE	%	SO	%
1	2	1	0		13		0				23	
2	2	1	3	2,77	4	24,07	0	0	29	26,85	29	73,14
3	2	1	0		9		0				27	
1	2	2	0		8		7				21	
2	2	2	0	0,92	5	18,51	0	6,48	28	19,44	31	74,07
3	2	2	1		7		0				28	
1	2	3	0		3		0				33	
2	2	3	0	0	6	12,03	0	0	13	12,03	30	87,96
3	2	3	0		4		0				32	
1	2	4	0		36		0				0	
2	2	4	0	0	36	100,00	0	0	108	0	0	0
3	2	4	0		36		0				0	
1	2	5	0		34		2				0	
2	2	5	0	0	36	100,00	0	1,85	108	0	0	0
3	2	5	0		36		0				0	
1	2	6	0		36		0				0	
2	2	6	0	0	36	100,00	0	0	108	0	0	0
3	2	6	0		36		0				0	
Total			4,00	0,61	381,00	58,79	9,00	1,38	394	60,80	254,00	39,19

R: Repetición; C: Clon; D: Desinfección; BA: Bacterias; %: Porcentaje; HO: Hongos; OX: Oxidados; PE: Perdidos; SO: Sobrevivientes.

Tabla 8 Número y porcentaje de explantes y su fuente de contaminación y explantes sobrevivientes por tratamiento y repetición clon 3.

R	C	D	BA	%	HO	%	OX	%	PE	%	SO	%
1	3	1	3		3		4				26	
2	3	1	0	2,77	5	9,25	0	3,7	17	12,03	31	84,25
3	3	1	0		2		0				34	
1	3	2	0		9		0				27	
2	3	2	2	1,85	14	26,85	0	0	31	28,7	20	71,29
3	3	2	0		6		0				30	
1	3	3	0		2		0				34	
2	3	3	0	0	3	8,33	0	0	9	8,33	33	91,66
3	3	3	0		4		0				32	
1	3	4	0		35		1				0	
2	3	4	0	0	36	98,14	0	0,92	108	100	0	0
3	3	4	0		36		0				0	
1	3	5	0		36		0				0	
2	3	5	0	0	36	100,00	0	0	108	100	0	0
3	3	5	0		36		0				0	
1	3	6	0		36		0				0	
2	3	6	0	0	36	100,00	0	0	108	100	0	0
3	3	6	0		36		0				0	
Total			5,00	0,77	371,00	57,25	5,00	0,77	381	58,79	267,00	41,20

R: Repetición; C: Clon; D: Desinfección; BA: Bacterias; %: Porcentaje; HO: Hongos; OX: Oxidados; PE: Perdidos; SO: Sobrevivientes.

Anexo 4. ANOVA y prueba de Tukey en la variable Días a Inducción de Callo Indiferenciado (DICI).

Tabla 9 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,50	9	3,50	28,00	<0.0001
rep	0,00	2	0,00	0,00	0,0002
clon	7,00	2	3.50	28,00	<0.0001
medio	24,50	1	24,50	196,00	>0,9999
clon*medio*rep	0,00	4	0.00	0,00	>0,9999
Error	1,00	8	0,13		
Total	32,50	17			

Tabla 10 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Clon	Medias	n	E.E.
3	9.50	6	0.00A
1	9.00	6	0.00 B
2	8.00	6	0.00 C

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

Tabla 11 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Clon	Medias	n	E.E.
2	10.00	9	0.00 A
1	7.67	9	0.00 B

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

Anexo 5. ANOVA y prueba de Tukey en la variable Aspectos morfológicos de los callos indiferenciados; Color de Callo Café Claro (CCCC).

Tabla 12 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38.52	7	5.50	1.56	0.2516
rep	5.29	2	2.65	0.75	0.4964
clon	0.33	2	0.17	0.05	0.9544
medio	31.89	1	31.89	9.06	0.0131
clon*medio	1.00	2	0.50	0.14	0.8689
Error	35.20	10	3.52		
Total	73.2	17			

Tabla 13 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5200 gl: 10

Clon	Medias	n	E.E.
2	2.50	6	0.77A
3	2.34	6	0.77A
1	2.17	6	0.77A

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

Anexo 6. ANOVA y prueba de Tukey en la variable Aspectos morfológicos de los callos indiferenciados; Color de Callo Blanco Crema (CCBC).

Tabla 14 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38.59	7	5.51	1.56	0.2516
rep	5.32	2	2.66	0.75	0.4953
clon	0.33	2	0.17	0.05	0.9540
medio	31.95	1	31.95	9.06	0.0131
clon*medio	0.99	2	0.49	0.14	0.8711
Error	35.27	10	3.53		
Total	73.85	17			

Tabla 15 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Clon	Medias	n	E.E.
1	3.83	6	0.77A
3	3.67	6	0.77A
2	3.50	6	0.77A

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

Tabla 16 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Medio	Medias	n	E.E.
1	5.00	9	0.63A
2	2.34	9	0.63 B

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

Anexo 7. ANOVA y prueba de Tukey en la variable Aspectos morfológicos de los callos indiferenciados; Explantes con Callo Friable (ECF).

Tabla 17 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38.59	7	5.51	1.56	0.2516
rep	5.32	2	2.66	0.75	0.4953
clon	0.33	2	0.17	0.05	0.9540
medio	31.95	1	31.95	9.06	0.0131
clon*medio	0.99	2	0.49	0.14	0.8711
Error	35.27	10	3.53		
Total	73.85	17			

Tabla 18 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Clon	Medias	n	E.E.
1	3.83	6	0.77A
3	3.67	6	0.77A
2	3.50	6	0.77A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Tabla 19** Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Medio	Medias	n	E.E.
2	5.00	9	0.63A
1	2.34	9	0.63 B

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

Anexo 8. ANOVA y prueba de Tukey en la variable Aspectos morfológicos de los callos indiferenciados; Explantos con Callo Semifriable (ECSF).

Tabla 20 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	<u>p-valor</u>
Modelo.	38.52	7	5.50	1.56	0.2516
rep	5.29	2	2.65	0.75	0.4964
clon	0.33	2	0.17	0.05	0.9544
medio	31.89	1	31.89	9.06	0.0131
clon*medio	1.00	2	0.50	0.14	0.8689
Error	35.20	10	3.52		
Total	73.72	17			

Tabla 21 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5200 gl: 10

Clon	Medias	n	E.E.
2	2.50	6	0.77A
3	2.34	6	0.77A
1	2.17	6	0.77A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Tabla 22** Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Medio	Medias	n	E.E.
1	3.67	9	0.63A
2	1.01	9	0.63 B

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

Anexo 9. ANOVA y prueba de Tukey en la variable Días a Expresión de Callo Embriogénico (DECE).

Tabla 23 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3965,00	9	440,56	503,49	<0,0001
Clon	93,00	2	46,50	53,14	<0,0001
Medio	3872,00	1	3872,00	4425,14	<0,0001
Replica	0,00	2	0,00	0,00	>0,9999
clon*medio*rep	0,00	4	0,00	0,00	>0,9999
Error	7	8	0,88		
Total	3972.00	17			

Tabla 24 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 0,850 gl: 8

Clon	Medias	n	E.E.
3	51,00	6	0,38A
2	54,50	6	0,38 B
1	56,50	6	0,38 C

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

Tabla 25 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 0,8750 gl: 8

Medio	Medias	n	E.E.
2	39,33	9	0.31A
1	68,67	9	0.31 B

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

Anexo 10. ANOVA y prueba de Tukey en la variable porcentaje de Explantes con Callo Embriogénico (%ECE).

Tabla 26 Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38.59	7	5.51	1.56	0.2516
rep	5.32	2	2.66	0.75	0.4964
clon	0.33	2	0.17	0.05	0.9540
desin	31.95	1	31.95	9.06	0.0131
clon*desin	0.99	2	0.49	0.14	0.8711
Error	35.27	10	3.53		
Total	73.85	17			

Tabla 27 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Clon	Medias	n	E.E.
1.00	3.83	6	0.77A
3.00	3.67	6	0.77A
2.00	3.50	6	0.77A

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

Tabla 28 Comparación de medias. Test:Tukey Alfa=0.05

Error: 3.5267 gl: 10

Medio	Medias	n	E.E.
2.00	5.00	9	0.63A
1.00	2.34	9	0.63 B

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

Anexo 11. Datos obtenidos de la fase de callogénesis de cada uno de los clones.

Tabla 29 Porcentajes totales de las variables medidas en los aspectos morfológicos de los callos indiferenciados.

VARIABLES			
Color de callo		Tipo de callo	
CCCC	CCBC	ECF	ECSF
38,88%	61,11%	61,11%	38,88

CCCC: *Color de callo café claro*; CCBC: *Color de callo blanco crema*; ECF: *Explantes con callo friable*; ECSF: *Explantes con callo Semifriable*.

Tabla 30 Días y Porcentajes totales de las variables medidas en la inducción a callo indiferenciado y expresión a callo embriogénico.

VARIABLES			
DICI	%ECI	DECE	%ECE
7-10 Días	100%	37-72 Días	61.11%

DICI: *Días a inducción de callo indiferenciado*; %ECF: *Porcentaje de explantes con callo friable*; DECE: *Días a expresión de callo embriogénico*; ECE: *Explantes con callo embriogénico*.

Tabla 31 Número de explantes de las variables medidas en la fase de inducción a callo indiferenciado.

Replica	Clon	Medio	DICI	%ECI	%
1	1	1	8	6	
2	1	1	8	6	100
3	1	1	8	6	
1	1	2	10	6	
2	1	2	10	6	100
3	1	2	10	6	
1	2	1	7	6	
2	2	1	7	6	100
3	2	1	7	6	
1	2	2	9	6	
2	2	2	9	6	100
3	2	2	9	6	
1	3	1	8	6	
2	3	1	8	6	100
3	3	1	8	6	
1	3	2	11	6	
2	3	2	11	6	100
3	3	2	11	6	
Total				108	100

DICI: *Días a inducción de callo indiferenciado*; %ECF: *Porcentaje de explantes con callo friable*.

Tabla 32 Número de explantes de las variables medidas en la fase de inducción a callo indiferenciado correspondientes a aspectos morfológicos de los callos indiferenciados (color de callo).

Replica	Clon	Medio	CCCC	%	CCBC	%
1	1	1	3		3	
2	1	1	4	55,55	2	44,44
3	1	1	3		3	
1	1	2	3		3	
2	1	2	0	16,66	6	83,33
3	1	2	0		6	
1	2	1	2		4	
2	2	1	4	61,11	2	38,88
3	2	1	5		1	
1	2	2	2		4	
2	2	2	0	22,22	6	77,77
3	2	2	2		4	
1	3	1	6		0	
2	3	1	6	66,66	0	33,33
3	3	1	0		6	
1	3	2	2		4	
2	3	2	0	11,11	6	88,88
3	3	2	0		6	
Total			42	38,88	66	61,11

CCCC: *Color de callo café claro*; CCBC: *Color de callo blanco crema*.

Tabla 33 Número de explantes de las variables medidas en la fase de expresión de callo embriogénico.

Replica	Clon	Medio	DECE	%ECE	%
1	1	1	72	3	
2	1	1	72	2	44,44
3	1	1	72	3	
1	1	2	41	3	
2	1	2	41	6	83,33
3	1	2	41	6	
1	2	1	69	4	
2	2	1	69	2	38,88
3	2	1	69	1	
1	2	2	40	4	
2	2	2	40	6	77,77
3	2	2	40	4	
1	3	1	65	0	
2	3	1	65	0	33,33
3	3	1	65	6	
1	3	2	37	4	
2	3	2	37	6	88,88
3	3	2	37	6	
Total				66	61,11

DECE: *Días a expresión de callo embriogénico*; ECE: *Explantes con callo embriogénico*

Tabla 34 Número de explantes de las variables medidas en la fase de inducción a callo indiferenciado correspondientes a aspectos morfológicos de los callos indiferenciados (tipo de callo).

Replica	Clon	Medio	ECF	%	ECSF	%
1	1	1	3		3	
2	1	1	2	44,44	4	55,55
3	1	1	3		3	
1	1	2	3		3	
2	1	2	6	83,33	0	16,66
3	1	2	6		0	
1	2	1	4		2	
2	2	1	2	38,88	4	61,11
3	2	1	1		5	
1	2	2	4		2	
2	2	2	6	77,77	0	22,22
3	2	2	4		2	
1	3	1	0		6	
2	3	1	0	33,33	6	66,66
3	3	1	6		0	
1	3	2	4		2	
2	3	2	6	88,88	0	11,11
3	3	2	6		0	
Total			66	61	42	38,88

ECF: *explantes con callo friable*; ECSF: *explantes con callo semifriable*.