

**Inducción de embriogénesis somática *in vitro*
de *Coffea arabica* a partir de explantes
foliares**

Angel Arturo Paz Ramírez

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Diciembre, 2000

**Inducción de embriogénesis somática *in vitro*
de *Coffea arabica* a partir de explantes
foliares**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

presentado por

Angel Arturo Paz Ramírez

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2000

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Angel Arturo Paz Ramírez

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2000

**Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica*
a partir de explantes foliares**

presentado por:

Angel Arturo Paz Ramírez

Aprobada:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesor Principal

Alfredo Rueda, Ph.D.
Coordinador de Area Temática

Gisela Godoy, M.A.E.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A.
Coordinador de Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Raúl Espinal, Ph.D.
Asesor

Antonio Flores, Ph.D.
Decano

Ana Margoth de Andrews, Ph.D.
Coordinador PIA Director General

Keith L. Andrews, Ph.D.
Director General

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud y sabiduría.

Al Dr. Raúl Espinal, a la Ing. Gisela Godoy y especialmente a la Ing. Dinie Espinal de Rueda, ya que fueron quienes me guiaron en el desarrollo de este estudio.

A Zoila y Erica, por su apoyo en el laboratorio.

A Reynerio Barahona y Allyn Del Cid, por su apoyo otorgado en el desarrollo del estudio.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la Secretaria de Agricultura y Ganadería de Honduras por su ayuda financiera otorgada para mi formación profesional.

Al Fondo Dotal Hondureño, por financiar parte de mi carrera dentro de El Zamorano.

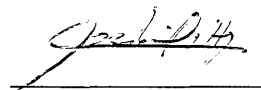
CONTENIDO

RESUMEN

Paz R. , Angel A. 2000. Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 30 p.

La producción de café es de gran importancia para la economía de Honduras, y actualmente es uno de los principales rubros de exportación. El Instituto Hondureño del Café (IHCAFE) en sus programas de fitomejoramiento, está utilizando la propagación *in vitro* (embriogénesis somática) para la producción a gran escala de los genotipos excepcionales. Sin embargo, la producción del laboratorio de micropropagación está afectada por altos niveles de contaminación y la falta de recursos para el desarrollo de protocolos específicos para la producción *in vitro* de las variedades más promisorias. Los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar el procedimiento de desinfección que conlleve al nivel más bajo de contaminación, y 2) determinar el tipo y nivel de citocininas que maximice la productividad de embriones somáticos en tres variedades de café. Se evaluó el efecto de cuatro concentraciones de hipoclorito de calcio (5, 10, 15 y 20%) en la solución desinfectante, y cuatro tiempos de sumersión de los explantes en el control de la contaminación (5, 10, 15 y 20 minutos). En un segundo ensayo se evaluó el efecto de dos tipos de citocininas (Bencilaminopurina (BAP) y kinetina), a cinco niveles de concentración cada una (0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{Mol/L}$) en las variedades de café Lempira, Caturra y Catimor en la primera fase de la etapa de inducción. En la siguiente fase de la etapa de inducción se evaluó el efecto del benomyl (1 g/L) como constituyente del medio, en el control de la contaminación. A mayor concentración de hipoclorito de calcio y mayor tiempo de sumersión de los explantes en la solución desinfectante, se obtuvo menores índices de contaminación, la cual varió entre 0 y 94%. Para cada variedad hubo un tipo y nivel de citocinina que produjo la mayor cantidad de embriones somáticos. Hubo diferencia significativa en los niveles de contaminación ($P < 0.0001$) al usar benomyl como constituyente del medio. Se concluyó que con el uso de 15% de hipoclorito de calcio y 5 minutos de sumersión de los explantes en la solución desinfectante, se obtienen los menores índices de contaminación. También, que con 30 $\mu\text{Mol/L}$ BAP, 40 $\mu\text{Mol/L}$ BAP y 40 $\mu\text{Mol/L}$ kinetina para las variedades Lempira, Caturra y Catimor, respectivamente, se obtiene la mayor producción de embriones somáticos. El benomyl como ingrediente del medio ayuda a reducir la contaminación.

Palabras claves: Benomyl, citocininas, contaminación, hipoclorito de calcio, producción de embriones.



Abelino Pitty

Portadilla.....	ii
Autoría.....	iii
Página de firmas.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Agradecimiento a patrocinadores.....	vii
Resumen.....	viii
Nota de prensa.....	ix
Contenido.....	x
Índice de Cuadros.....	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Anexos.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 EMBRIOGENESIS SOMATICA.....	4
2.2 MANEJO DE CONTAMINACION.....	7
2.3 MANEJO DE OXIDACION.....	9
3. MATERIALES Y METODOS.....	10
3.1 LOCALIZACION.....	10
3.2 MATERIALES.....	10
3.2.1 Cristalería.....	10
3.2.2 Equipo y herramientas.....	10
3.2.3 Ingredientes.....	11
3.3 METODOLOGIA.....	12
3.3.1 Ensayo de esterilización superficial de material vegetal.....	12
3.3.1.1 Obtención de explantes.....	12
3.3.1.2 Preparación del medio y soluciones desinfectantes.....	12
3.3.2 Metodología para ensayo de inducción de embriogénesis somática directa...	13
3.4 VARIABLES MEDIDAS.....	14
3.4.1 Ensayo de esterilización superficial de material vegetal.....	14
3.4.2 Ensayo de inducción de embriogénesis somática directa.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	16
4.1 CONTROL DE LA CONTAMINACION UTILIZANDO VARIOS	

	METODOS DE DESINFECCION.....	16
4.1.1	Evaluación de la concentración de hipoclorito de calcio [Ca(OCl ₂)] y tiempo de sumersión de los explantes en la solución desinfectante.....	16
4.1.2	Efecto del benomyl como ingrediente del Medio de Yasuda Post introducción en el control de la contaminación.....	18
4.2	EFFECTO DE BAP Y KIN EN LA INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA.....	20
4.2.1	Efecto de BAP y KIN en la producción de embriones en la variedad Lempira.....	20
4.2.2	Efecto de BAP y KIN en la producción de embriones en la variedad Caturra.....	23
4.2.3	Efecto de BAP y KIN en la producción de embriones en la variedad Catimor.....	26
4.2.4	Análisis económico.....	29
5.	CONCLUSIONES.....	31
6.	RECOMENDACIONES.....	32
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	33
8.	ANEXOS.....	35

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Medio de cultivo Yasuda Modificado utilizado para la inducción de embriogénesis somática <i>in vitro</i> de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	11
2	Concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempos de sumersión para explantes foliares en la inducción de embriogénesis somática directa <i>in vitro</i> de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	12
3	Niveles de BAP y KIN en $\mu\text{mol/l}$ y mg/l utilizadas en la inducción de embriogénesis somática directa <i>in vitro</i> de tres variedades de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	14
4	Escala de tabulación de datos y clasificación de los tratamientos en base a la producción de embriones durante el proceso de inducción de embriogénesis somática directa de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	15
5	Porcentaje promedio de contaminación de tres variedades de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	16
6	Efecto de cuatro dosis de hipoclorito de calcio y cuatro tiempos de sumersión de los explantes en la solución desinfectante, en el porcentaje de contaminación promedio de explantes foliares de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	18
7	Inducción de embriogénesis somática directa <i>in vitro</i> en la variedad Lempira utilizando dos citocininas y cinco concentraciones en el Medio de Yasuda Modificado, El Zamorano, Honduras, 2000.....	20
8	Inducción de embriogénesis somática directa <i>in vitro</i> en la variedad Caturra, utilizando dos citocininas y cinco concentraciones en el Medio de Yasuda Modificado, El Zamorano, Honduras, 2000.....	23
9	Inducción de embriogénesis somática directa <i>in vitro</i> en la variedad Catimor, utilizando dos citocininas y cinco concentraciones en el Medio de Yasuda Modificado, El Zamorano, Honduras, 2000.....	26
10	Estimación del incremento en costo para tener un incremento en la producción de embrioides en la inducción de embriogénesis somática <i>in vitro</i> en tres variedades de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura

1	Porcentaje de participación de vitropatógenos en la contaminación de explantes foliares de café, El Zamorano, Honduras, 2000.....	19
2	Efecto del BAP en la producción de embriones somáticos <i>in vitro</i> de café variedad Lempira, El Zamorano, Honduras, 2000.....	21
3	Efecto de KIN en la producción de embriones somáticos <i>in vitro</i> de café variedad Lempira, El Zamorano, Honduras, 2000.....	22
4	Efecto del BAP en la producción de embriones somáticos <i>in vitro</i> de café variedad Caturra, El Zamorano, Honduras, 2000.....	24
5	Efecto de KIN en la producción de embriones somáticos <i>in vitro</i> de café variedad Caturra, El Zamorano, Honduras, 2000.....	25
6	Efecto del BAP en la producción de embriones somáticos <i>in vitro</i> de café variedad Catimor, El Zamorano, Honduras, 2000.....	27
7	Efecto de KIN en la producción de embriones somáticos <i>in vitro</i> de café variedad Catimor, El Zamorano, Honduras, 2000.....	28

INDICE DE ANEXOS

Anexo

1	Medios de cultivo utilizados en la inducción de embriogénesis somática <i>in vitro</i> de café, El Zamorano, Honduras.....	36
2	Costos de los ingredientes para la elaboración de un litro de medio de Yasuda Modificado utilizado para la inducción de embriogénesis somática <i>in vitro</i> de café.....	37
3	Costos de los ingredientes para la elaboración de un litro de medio de Yasuda Post introducción utilizado para la inducción de embriogénesis somática <i>in vitro</i> de café.....	37
4	Análisis de varianza realizados en el estudio.....	38

1. INTRODUCCION

La producción de café es de gran importancia para la economía de Honduras, ya que es actualmente uno de los rubros principales en las exportaciones. Según Solangi (2000), el Instituto Hondureño del Café (IHCAFE) reporta que la caficultura nacional ha tenido un repunte durante los últimos 20 años, convirtiéndolo en la columna vertebral de la economía del país; esto se ve reflejado en las exportaciones, en la producción del grano en 15 departamentos del país (83% de los departamentos del país), en las 100 mil familias que dependen directamente de este rubro y en el millón de empleos que genera anualmente.

Según Santacreo (1992), la caficultura nacional se ha visto seriamente afectada debido al apareamiento de plagas y enfermedades endémicas como la roya del café, lo cual ha contribuido a incrementar los costos fitosanitarios debido al uso de agroquímicos. El actual uso de agroquímicos ocupa un 20 % de los costos totales de producción, lo que implica un impacto económicamente grande para el productor.

A través de los programas de fitomejoramiento se ha logrado liberar variedades resistentes a plagas y enfermedades que tienen una mayor demanda en el mercado debido a su mejor calidad de bebida y a que son más productivas. El mejoramiento es efectuado cuando se identifica un individuo con cualidades excepcionales y de utilidad para la caficultura. Una vez identificado, este individuo es estudiado para poder explotar sus genes, mismos que son eventualmente liberados al mercado. El proceso de estudio es llevado a cabo en un periodo de 35 a 40 años, por lo que es un trabajo que requiere tener paciencia, persistencia e ingenio.

A través de los años los programas de fitomejoramiento han venido realizando su trabajo por medio de métodos tradicionales que requieren de un trabajo tedioso y de bastante tiempo; pero actualmente se está buscando la forma de hacer este proceso más eficiente.

La multiplicación vegetativa es el único procedimiento que reproduce en gran escala los genotipos excepcionales (Santacreo, 1992). La multiplicación vegetativa por medio de la micropropagación ha sido recientemente utilizada por los fitomejoradores, iniciándose los estudios de este método a principios de la década de los setenta.

El uso de la micropropagación ha permitido una mayor eficiencia en cuanto a la explotación de individuos deseables; asimismo, ha permitido trabajar a niveles acelerados de mejoramiento del cafeto, ya que el tiempo de liberación de las variedades se ha

reducido de 35 a 40 años, a sólo 10 años. Según Solangi (2000), las expectativas del IHCAFE para un futuro no muy lejano son poder liberar variedades producidas en su centro de investigación o introducidas de otros países, a través de la propagación *in vitro*, y en lugar de entregar la semilla al productor se le entregara una plantita para su cultivo.

A través del tiempo y del uso de varios métodos de micropropagación del café, se ha determinado que el método más eficiente, con una mayor tasa de multiplicación, es el de embriogénesis somática a partir de hojas juveniles. Mediante la utilización de esta vía de regeneración, no solamente se obtiene un potencial de multiplicación elevado, sino que tiene la ventaja de que las hojas son abundantes y de fácil desinfección (IICA, 1997). También Barry *et al.* (2000), menciona que la embriogénesis somática es la mejor opción para la propagación masiva de clones de individuos élites en café.

El uso de la propagación *in vitro* para el cultivo del café, por parte del centro de investigación del IHCAFE, no se ha desarrollado al nivel esperado, ya que existen varios factores que no lo han permitido. Los factores más importantes se mencionan a continuación:

- Según técnicos del centro de investigación del IHCAFE (2000)¹, los niveles de contaminación de los explantes, durante la etapa de establecimiento del cultivo, son bastante elevados (hasta 70 % de contaminación).
- Según Osorio (2000), técnico de la gerencia del IHCAFE, los costos de la micropropagación son elevados, y se debe investigar, para reducir estos costos:
 - a) Protocolos de desinfección del explante, para reducir la contaminación a niveles comercialmente aceptables; y
 - b) Métodos para incrementar la formación de embriones a partir de tejido somático.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el procedimiento de desinfección que conlleve al nivel más bajo de contaminación, y el tipo y nivel de citocininas que maximice la productividad de embriones somáticos en algunas variedades de café.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos del presente estudio son:

¹ Rosendo Mejía. 2000. Embriogénesis somática en café. IHCAFE. Comunicación personal.

- a) Determinar la concentración de hipoclorito de calcio y el tiempo de exposición del material vegetal a la solución desinfectante, que se necesita para obtener los menores índices de contaminación.
- b) Evaluar el efecto del benomyl como componente del medio de cultivo, en el control de la contaminación durante la primera etapa de establecimiento del cultivo.
- c) Encontrar el tipo de citocinina más adecuado para inducir la formación de embriones somáticos.
- d) Encontrar el nivel más adecuado de citocinina para obtener el mayor número de embriones.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 EMBRIOGENESIS SOMATICA

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Hartmann y Kester, 1997).

En los sistemas de cultivo de tejidos hay cinco tipos fundamentales de regeneración vegetativa: a) alargamiento de las puntas meristemáticas, b) producción axilar de ramas, c) iniciación adventicia de ramas, d) organogénesis y e) embriogénesis (Hartmann y Kester, 1997).

Según Hartmann y Kester (1997), la embriogénesis consiste en el desarrollo de un embrión, ya sea del cigoto o de otras células de la planta, considerando la primera como reproducción sexual y la última como asexual. Los embriones asexuales son llamados embrioides o embriones somáticos. Según Pierik (1990), cuando los embriones se regeneran a partir de células o tejidos somáticos se habla de una embriogénesis somática, y se puede considerar como opuesta a la embriogénesis cigótica. La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Pérez, 1998).

El desarrollo de embriones somáticos según Pierik (1990), comprende una etapa de desdiferenciación de las células ya diferenciadas y posteriormente la división de estas. Los embriones se desarrollan a partir de células parenquimáticas vacuoladas. El desarrollo de un embrión, a partir de una célula embriogénica, se consigue generalmente sin la presencia de auxinas en el medio.

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa. También tiene autonomía frente al tejido generador, ya que histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente (Pérez, 1998). Un embrión cigótico es muy similar morfológicamente a un embrión somático, sobre todo en su desarrollo evolutivo de proembrion, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar, si es una dicotiledónea.

Según Santacero (1992), existen dos métodos de obtener embriones somáticos a partir de explantes de hoja:

1. Por medio de embriogénesis somática directa o de baja frecuencia, donde los embriones se diferencian a partir de una escasa formación de callo que aparece en los bordes de los explantes. En este caso los embriones se obtienen de una única célula inducida; y
2. Por medio de embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia, donde los embriones somáticos son obtenidos por la multiplicación de las células inducidas. Este tipo de embriogénesis se caracteriza por una fuerte formación de callo en la primera etapa, seguido de una etapa de diferenciación de los embriones somáticos a partir de esa masa de células parenquimatosas.

Figuroa y Molina (1996) mencionan que de la embriogénesis somática directa se obtiene un menor número de embriones diferenciados, pero con mayor uniformidad genética que la embriogénesis somática indirecta.

Según Pérez (1998), el desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye:

- a) Inducción de los embriones somáticos
- b) Desarrollo de los embriones somáticos
- c) Proliferación
- d) Maduración
- e) Germinación y conversión en plantas

De acuerdo a Hartmann y Kester (1997), al medio de cultivo se le añaden hormonas como citocininas y auxinas las cuales regulan el crecimiento y desarrollo del explante, a esto se le llama control hormonal, el cual se realiza por: a) la clase de hormona, b) la concentración y c) la secuencia en que se proporcionen.

La embriogénesis somática directa se obtiene en medios ricos en citocininas y desprovistos de auxinas, en cambio la embriogénesis somática indirecta se obtiene en medios ricos en auxinas en la primera etapa y rico en citocininas en las etapas posteriores de diferenciación (Santacreo, 1992).

Tanto en el café como en los árboles frutales, el grado de éxito de la embriogénesis somática varía según los genotipos cultivados (CIAT, 1991). También Hartmann y Kester (1997), mencionan que diferentes plantas responden de un modo distinto a las diversas citocininas y auxinas, debido al control hormonal natural de cada genotipo.

Por lo que para cada genotipo se recomienda estudiar:

1. La fuente del explante, el pretratamiento del explante,
2. El medio de cultivo: constituyentes orgánicos e inorgánicos, reguladores de crecimiento, osmolaridad total, y

3. Las condiciones de crecimiento: luz, temperatura, intercambio gaseoso, régimen de subcultivo y la selección de los tejidos durante los subcultivos.

Las posibilidades de conseguir embriogénesis somática son mayores cuando se utilizan explantes procedentes de plantas juveniles (Pierik, 1990). García y Menéndez (1987) mencionan que en experimentos en café llevados a cabo en el Centro de Botánica Tropical de Venezuela, se utilizaron con éxito, explantes foliares jóvenes, en buen estado y expandidos, los cuales fueron extraídos de los tres nudos superiores de tallos ortotrópicos y plagiotrópicos.

Berthouly y Guzmán (1987), mencionan que la deficiencia de algunos elementos en el explante puede ser un freno a la inducción de la embriogénesis somática, por lo que el estado fisiológico de la planta es muy importante.

Los estudios histológicos han demostrado que el tejido de callo se origina en las células del mesófilo del explante foliar (CIAT, 1991). Según técnicos del IHCAFE (2000)¹, los explantes son sembrados en un medio de inducción, y transferidos al cuarto de crecimiento donde están 55 a 60 días en oscuridad a 25 grados centígrados. El protocolo que utiliza el IHCAFE recomienda que los explantes sean colocados con el haz en contacto con el medio.

Según el CIAT (1991), los explantes foliares se cortan, excluyendo la nervadura central, los márgenes, y las porciones apicales y basales de la lamina foliar. Al eliminar la nervadura central se excluyen los domacios, que son poros profundos donde se acumulan microorganismos contaminantes, y hay alta concentración de compuestos fenólicos que promueven la oxidación.

De acuerdo con Barry *et al.* (2000), la inducción de embriogénesis somática de café se puede realizar en medios sólidos (medio de Yasuda) o líquidos (medio de Berthouly). En medios líquidos existen, desafortunadamente, problemas de calidad (anormalidades morfológicas, desarrollo asincronizado y tamaño heterogéneo) y dificultad en el manejo en la etapa embrionaria de torpedo; aunque estos problemas están siendo controlados de manera exitosa con el uso de recipientes de inmersión temporal automatizados. También, la selección manual de los embriones somáticos listos para germinar y los frecuentes subcultivos son requeridos para obtener plantas, todo esto trae como consecuencia altos costos de producción que explican el porque no hay hasta ahora una producción comercial de café *in vitro* a través de estos sistemas.

¹ Rosendo Mejía. 2000. Embriogénesis somática en café. IHCAFE. Comunicación personal.

García y Menéndez (1987) utilizaron como medio de inducción de embriones somáticos, la solución salina de Murashige y Skoog suplementada con 100 mg/l inositol, 10 mg/l de tiamina, 35 mg/l cisteína, 30 g/l sacarosa y fue solidificado con 8 g/l de agar, a un pH ajustado de 5.6.

El IHCAFE, al igual que Figueroa y Molina (1996), utilizaron el medio de inducción de embriones de Yasuda, el cual contiene: Macroelementos MS/4, 42.5 mg/l KH_2PO_4 , de oligoelementos de Yasuda, NaFeEDTA MS/2, vitaminas de Gamborg, 30 g/l sacarosa y 2.25 g/l gelrite a un pH ajustado de 5.6.

González *et al.* (1988), utilizaron como medio de inducción de embriones somáticos, las sales minerales de Murashige y Skoog, suplementadas con 100 mg/l inositol, 10 mg/l tiamina, 25 mg/l cisteína, y 20 g/l sacarosa. En el Anexo 1 se pueden observar los diferentes medios utilizados para propagar café *in vitro*.

2.2 MANEJO DE CONTAMINACION

Pérez (1998) menciona que el éxito de los sistemas de micropropagación de plantas depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana.

Según Pierik (1990), existen cuatro fuentes de infección: la planta, el medio nutritivo, el aire y el operador. Dentro de estas condiciones la más importante es la planta misma, por lo que el material debería ser bien esterilizado antes de su aislamiento *in vitro*.

Existen microorganismos que en el campo no son patógenos, pero en el laboratorio se convierten en una fuente principal de contaminación, y a éstos Pérez (1998) les llama vitropatógenos.

Según Pérez (1998), los patógenos, tienen un efecto negativo en las vitroplantas, ya que compiten con ellas por nutrientes del medio, les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la expulsión al medio de cultivo de metabolitos tóxicos.

Pierik (1990) menciona que a pesar de una adecuada esterilización química del material vegetal se pueden producir infecciones. Estas infecciones se dan por infecciones internas del material a reproducir, por una mala asepsia en el laboratorio o por parte del operador. Hartmann y Kester (1997), mencionan que los patógenos internos posiblemente no se detectan, pero los propágulos se desarrollan en el medio de cultivo a medida que crece y regenera el explante en el medio.

Según Gamborg y Phillips (1995), los patógenos contaminantes son las bacterias, levaduras y hongos, los cuales se diferencian entre ellos por su forma, textura y color que forman al crecer en el medio. La detección e identificación de estos patógenos es muy importante para tomar medidas de control.

La utilización de materiales vegetales provenientes del campo limita el éxito de la técnica de embriogénesis somática, debido a la alta contaminación por hongos y bacterias, aunque dicha contaminación es muy variable en el transcurso del año (variaciones climáticas) (Berthouly y Guzmán, 1987).

En la micropropagación de café existen varios procedimientos de desinfección que se utilizan. Según Pierik (1990), para cada clima de donde se extrae el material a reproducir, y para cada tipo de explante existe un protocolo específico de desinfección. Este protocolo varía en cuanto al tipo y la concentración del agente desinfectante y el tiempo de exposición del explante a la solución desinfectante.

Para café, Haas y Herman (1975) recomiendan una sumersión de los explantes foliares en ethanol al 70 % durante 20 segundos, y luego en una solución de hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)_2]$ al 3 % (p/v) para obtener bajos niveles de contaminación en la etapa de establecimiento.

Según el CIAT (1991), un lavado de las hojas con agua corriente, luego una sumersión en ethanol al 70 %, y finalmente una sumersión de 20 min en una solución de hipoclorito de calcio al 10% (p/v) conteniendo unas gotas de tween 80, es un protocolo que ha tenido éxito en la micropropagación de café. Con respecto al ethanol, luego de varias pruebas, el CIAT (1991), descubrió que es tóxico para los explantes de hojas del cafeto.

Figuroa y Molina (1996), mencionan que en café, las hojas deben ser lavadas con agua corriente, luego sumergidas durante cinco minutos en una solución de benomyl (1g/l), y seguidamente lavadas con agua destilada. A continuación se mantienen 30 min en una solución de hipoclorito de sodio al 5.25%, para después enjuagarlas tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, las hojas se vuelven a mantener en una solución de hipoclorito de sodio al 2.625% durante 30 min y se procede a hacer tres enjuagues con agua destilada estéril antes de realizar los cortes para extraer los explantes y proceder a la siembra.

Según el protocolo de desinfección seguido por el Centro de Investigación del IHCAFE, existen dos alternativas para disminuir los niveles de contaminación:

1. Al cosechar las hojas se procede a limpiarlas con agua y algodón, se colocan en una solución de benomyl (2 g/l) durante 30 min y luego se sumergen en una solución

- filtrada de hipoclorito de calcio al 10% (p/v) durante 10 min. Seguidamente, a nivel de la cámara de flujo laminar, se hace un enjuague con agua destilada estéril, para pasar después a una solución previamente filtrada de hipoclorito de calcio al 8 % (p/v), durante 20 min. Finalmente se hace un último enjuague con agua destilada estéril y se procede a la siembra.
2. Para la segunda alternativa, luego de cosechar los explantes, se realiza una limpieza con algodón mas agua y jabón líquido, seguido de un enjuague con agua destilada estéril, para proceder luego a una sumersión de 30 min en una solución de benomyl a razón de 2 g/l. Pasados los 30 min, se vuelve a hacer dos o tres enjuagues con agua destilada estéril para luego sumergir los explantes en una solución de hipoclorito de calcio filtrado al 10% durante 30 min. Posteriormente, a nivel de la cámara de flujo laminar, se hacen dos enjuagues con agua destilada estéril y se sumergen los explantes en una solución de hipoclorito de calcio filtrado al 8% durante 20 min. Finalmente se hacen tres enjuagues con agua destilada estéril antes de proceder a la siembra.

Pierik (1990) menciona que el hipoclorito de calcio es un químico en forma de polvo, que se mezcla fácilmente con el agua y que penetra en los tejidos vegetales con más lentitud que el hipoclorito de sodio, que es otro químico utilizado en la desinfección de explantes. El lavado del material con agua limpia ayuda a controlar la contaminación. La adición de Tween 20 u 80 al líquido desinfectante, a razón de dos a tres gotas por cada 100 ml de solución desinfectante, disminuye la tensión superficial del explante, lo cual promueve un mejor contacto entre el explante y la solución desinfectante. Según Dirr y Heuser (1987), el Tween al disminuir la tensión superficial, permite una mejor penetración de la solución desinfectante.

Según Londoño y Orozco (1986), se han realizado varias pruebas de desinfección que no han resultado exitosas debido a los altos índices de contaminación resultantes, pero se espera que con el uso de fungicidas como el benomyl se controle mejor la contaminación. El CENICAFE ha encontrado que el uso de benomyl ayuda a controlar el crecimiento y desarrollo de los hongos *in vitro* hasta en un 90 %. Bustamante (2000) afirma que el benomyl también funciona como una citocinina que promueve la formación de embriones somáticos, por lo que este fungicida se está utilizando en la mayoría de los protocolos de desinfección de explantes foliares de café.

2.3 MANEJO DE OXIDACION

Según Dirr y Heuser (1987), la oxidación es otro factor que afecta la producción de plantas a través de micropropagación. La oxidación se origina a partir de compuestos

polifenólicos, los que traen como consecuencia el oscurecimiento del medio; se puede reducir evitando el uso de explantes con altos compuestos polifenólicos, inhibiendo la acción de las polifenoloxidasas, disminuyendo el contenido de oxígeno y haciendo varios subcultivos. La oxidación afecta más cuando se utiliza la propagación por estacas, ya que estas son ricas en compuestos polifenólicos. Para controlar la oxidación en el cultivo *in vitro* de café se ha utilizado cisteína y PVP.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 LOCALIZACION

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Cristalería

Para realizar este estudio se utilizó la siguiente cristalería:

- Beakers
- Probetas
- Pipetas
- Frascos Mason
- Tubos de ensayo grueso (25 x 150 mm)
- Frascos volumétricos
- Embudos
- Platos Petri

Toda la cristalería utilizada fue debidamente lavada conalconox, enjuagada con agua corriente y luego con agua destilada. Se utilizó el autoclave para esterilizar el medio de cultivo y los tubos de ensayo, evitando así cualquier contaminación.

3.2.2 Equipo y herramientas

Para poder llevar a cabo el experimento se trabajó con las siguientes herramientas y equipo técnico:

Herramientas:

- Pinzas
- Bisturí # 21
- Barras magnéticas
- Toallas de papel
- Bandejas de acero inoxidable
- Gradillas para tubos gruesos
- Mascarillas y gabachas
- Papel filtro de 9.0 cm.
- Papel parafilm
- Mecheros

Equipo:

- Balanza milimétrica
- Destilador de agua
- Medidor de pH
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave

3.2.3 Ingredientes

En el experimento se utilizó como base el Medio de Yasuda Modificado (Cuadro 1) para inducir la producción de embriones somáticos, que es el medio utilizado por el Centro de Investigación del IHCAFE.

Cuadro 1. Medio de cultivo Yasuda Modificado utilizado para la inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Macroelementos MS/4	Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)
KNO ₃	475.00
NH ₄ NO ₃	412.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	110.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	92.50
KH ₂ PO ₄	42.50
KH ₂ PO ₄ ¹	42.50

Oligoelementos de Yasuda	Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)
MnSO ₄ .H ₂ O	0.6835
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.4300
H ₃ BO ₃	0.3100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0050
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0125

Solución de hierro	Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)
FeNaEDTA	50.00

¹ Aparte de la solución madre, se pesó y se añadió al medio.

Vitaminas de Gamborg	Concentración final en el medio de cultivo (mg/l)	
Tiamina HCl		10.0
Acido nicotínico	1.0	
Piridoxina HCl	1.0	
Inositol		100.0

pH= 5.6

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Ensayo de esterilización superficial de material vegetal

Se hicieron pruebas de desinfección utilizando tres variedades de café (Lempira, Icatú, Catimor). Cada variedad se expuso a cuatro concentraciones de hipoclorito de calcio y a cuatro tiempos de sumersión como se especifica en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempos de sumersión para explantes foliares en la inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tiempo (min)	Concentración (%) de hipoclorito de calcio [Ca(Ocl) ₂] (p/v)			
	5	10	15	20
5	5,5	10,5	15,5	20,5
10	5,10	10,10	15,10	20,10
15	5,15	10,15	15,15	20,15
20	5,20	10,20	15,20	20,20

3.3.1.1 Obtención de explantes. Los explantes fueron obtenidos de material procedente directamente del campo, proporcionados por el Centro de Investigación del IHCAFE y por una finca comercial de la misma zona. Estos fueron seleccionados de plantas jóvenes y de hojas apicales en pleno crecimiento. Se transportaron dentro de una caja en capas divididas por toallas de papel para evitar su deshidratación.

3.3.1.2 Preparación del medio y soluciones desinfectantes. Se prepararon 2880 ml de Medio de Yasuda Modificado (Cuadro 1), el cual fue transferido a tubos de ensayo gruesos, a razón de 10 ml por contenedor. Posteriormente se procedió a taponarlos, identificarlos de acuerdo a los tratamientos y a esterilizarlos en el autoclave durante 20 min a 15 PSI y 250 °F.

Teniendo listo el medio se preparó la solución de hipoclorito de calcio al 5% (p/v), diluyendo 20 g de hipoclorito de calcio en 400 ml de agua destilada y posteriormente se filtró. Se tomaron 10 hojas de la variedad Lempira y se lavaron con agua y algodón, y luego se sumergieron durante 30 min en una solución de benomyl (2 g/l). Seguidamente fueron sumergidas en la solución de hipoclorito de calcio (5%) y se llevaron a la cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70%. Luego de mantener las hojas durante cinco minutos en la solución desinfectante, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, para luego ser divididas en explantes cuadrados de 1 cm², eliminando la nervadura central y las orillas de la hoja. Se colocó un explante por tubo, con el haz de la hoja expuesto al medio y se sembraron seis tubos por tratamiento.

Posteriormente se esperó que pasaran cinco minutos para sembrar el tratamiento de 5% de hipoclorito de calcio y diez minutos de sumersión, tomando otras dos hojas de la variedad Lempira para luego dividir las y sembrarlas. A los 15 y 20 min se repitió el proceso, teniendo así sembrados los tratamientos de 5% de hipoclorito de calcio para la variedad Lempira. Luego se colocó papel parafilm a los tubos y fueron colocados en cajas tapadas con una manta oscura dentro del cuarto de crecimiento a 25 °C.

El experimento fue llevado a cabo de igual forma con la variedad Icatú y Catimor pero con una nueva solución de 5% de hipoclorito de calcio filtrado para cada variedad, ya que según Pierik (1990), el hipoclorito de calcio sólo puede almacenarse por tiempo limitado. Luego de completados todos los tratamientos de 5% hipoclorito de calcio y 5, 10, 15, 20 min como tiempos de exposición, se procedió a preparar la solución de hipoclorito de calcio al 10% para llevar a cabo el mismo procedimiento anterior con las tres variedades y los cuatro tiempos de sumersión del explante. El proceso se realizó de igual manera para las concentraciones de 15 y 20 % hipoclorito de calcio, volviéndose el proceso de filtración cada vez más lento.

A los 15 días después de la siembra, se transfirieron los explantes sanos al Medio de Yasuda Post introducción, también utilizado por el Centro de investigación del IHCAFE, el cual es similar al primero, con la excepción de que no lleva benomyl ni cisteína, y el BAP es reducido a 1.2 mg/l.

También se realizó un ensayo para determinar si la inclusión de benomyl en el Medio de Yasuda de Post introducción ayudaba a controlar la contaminación. Este se llevó a cabo

en conjunto con el ensayo del efecto de las citocininas en el Medio de Yasuda Modificado cuya metodología se explica en el apartado 3.3.2.

3.3.2 Ensayo de inducción de embriogénesis somática directa

Luego de haber determinado el tratamiento de desinfección a utilizar según los resultados obtenidos en las pruebas de desinfección, se procedió a realizar las pruebas de inducción de embriogénesis somática directa, manejando los medios de cultivo que utiliza el IHCAFE como base.

En el protocolo que utiliza el IHCAFE (Medio Yasuda Modificado), se recomienda utilizar benzilamino purina (BAP) como hormona inductora de embriogénesis. La kinetina (KIN) es otra citocinina que se utiliza para inducir la formación de embriones en ciertos genotipos, por lo que esta hormona también se tomó en cuenta dentro del estudio. Se evaluó el efecto de BAP y KIN en la formación de embriones para tres variedades de café (Lempira, Caturra, Catimor).

Para cada variedad se probaron cuatro niveles de cada hormona, incluyendo un testigo, esto implica 30 tratamientos, los cuales se pueden observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Niveles de BAP y KIN utilizados en la inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* de tres variedades de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Variedades											
Lempira				Caturra				Catimor			
BAP		KIN		BAP		KIN		BAP		KIN	
$\mu\text{mol/l}$	mg/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l	$\mu\text{mol/l}$	mg/l
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	2.25	10	2.15	10	2.25	10	2.15	10	2.25	10	2.15
					5						
20	4.50	20	4.30	20	4.50	20	4.30	20	4.50	20	4.30
					0						
30	6.75	30	6.45	30	6.75	30	6.45	30	6.75	30	6.45
					5						
40	9.00	40	8.60	40	9.00	40	8.60	40	9.00	40	8.60
					0						

Se prepararon tres tandas de 4500 ml de Medio de Yasuda Modificado para sembrar los explantes de cada una de las tres variedades utilizadas. En estos medios se reemplazaron las dosis y el tipo de citocinina recomendada en el Medio de Yasuda Modificado de acuerdo a los tratamientos anteriormente mencionados.

Se sembraron 450 tubos gruesos por cada variedad de café (Lempira, Caturra, Catimor), teniendo en total 1350 tubos. El protocolo seguido para la siembra fue igual al de las pruebas de desinfección utilizando 15% de $\text{Ca}(\text{OCl}_2)$ con cinco minutos de sumersión de los explantes, y se sembró en base a los tratamientos de las citocininas.

A los 15 días los explantes fueron trasladados al Medio de Yasuda Post introducción, donde el 50% de los tubos tenían incluido benomyl (1 g/l) dentro del medio, y el otro 50% no lo incluía.

En la primera parte de este ensayo se pretendía ver el efecto de las citocininas en los primeros 15 días (Medio de Yasuda Modificado). Para la segunda parte se uniformizó la concentración de citocininas en el Medio de Yasuda Post introducción. Para los tratamientos con BAP se usó lo recomendado por el Medio de Yasuda Post introducción (1.2 mg/l), y para los tratamientos con KIN se usó el equivalente al BAP en $\mu\text{mol/l}$ (1.14 g/l).

3.4 VARIABLES MEDIDAS

3.4.1 Ensayo de esterilización superficial de material vegetal.

Se evaluó el número de explantes contaminados por cada tratamiento de desinfección y se calculó el porcentaje de contaminación para cada tratamiento. De la misma forma se analizó el efecto del benomyl en el control de la contaminación durante la post-introducción.

Con estos datos se hizo un análisis estadístico, para el cual se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Los datos de porcentaje fueron transformados a arcoseno de la raíz cuadrada de éstos, para tener una mejor distribución, y luego se realizó un análisis de varianza y la separación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Para realizar este análisis se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®]).

3.4.2 Ensayo de inducción de embriogénesis somática directa.

Se evaluó la producción de embriones de cada variedad con cada concentración y tipo de citocinina, de acuerdo al porcentaje del área potencial de producción de embriones directos y callo embriogénico de los explantes. Se utilizó la escala de clasificación que se presenta en el Cuadro 4, donde se presenta el método de clasificación y de tabulación de los datos para realizar el análisis estadístico. También se realizó un análisis de costos para los tratamientos con mayor producción de embriones.

Cuadro 4. Escala de tabulación de datos y clasificación de los tratamientos en base a la producción de embriones durante el proceso de inducción de embriogénesis somática directa de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tabulación	Clasificación (% de área foliar)	Producción de embriones
1	0	Ninguna
2	5 – 33	Leve
3	34 – 66	Media
4	67 - 100	Alta

En base a esta clasificación y utilizando un DCA se realizó: a) un análisis de regresión para evaluar el comportamiento de la producción de embriones de cada variedad con cada tipo de hormona, b) un análisis de varianza y la separación de medias de Tukey ($P < 0.05$), con el programa SAS, realizando, previo a esto, la conversión de los datos de porcentaje a arcoseno de la raíz cuadrada.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 CONTROL DE LA CONTAMINACION UTILIZANDO VARIOS METODOS DE DESINFECCION

4.1.1 Evaluación de la concentración de hipoclorito de calcio [Ca(OCl₂)] y tiempo de sumersión de los explantes en la solución desinfectante.

Se evaluó la contaminación de las variedades en el Medio de Yasuda Modificado y en el Medio de Yasuda Post introducción independientemente de los tratamientos (Cuadro 5), siendo menor significativamente ($P < 0.0001$) el porcentaje de contaminación de la variedad Lempira comparado a la contaminación de las otras variedades. Probablemente, la contaminación se elevó en el Medio de Yasuda Post introducción debido a la expresión tardía de los patógenos endógenos que provienen del material en el campo. Los explantes de la variedad Lempira fueron obtenidos de los campos del IHCAFE y los explantes de las variedades Icatú y Catimor se obtuvieron de los campos de una finca comercial, donde no había un control fitosanitario adecuado, por lo que se muestra una diferencia entre la contaminación de la variedad Lempira y la contaminación observada en las otras variedades.

Cuadro 5. Porcentaje promedio de contaminación de tres variedades de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Variedad	Contaminación (%)	
	Medio Yasuda modificado	Medio Yasuda Post introducción
Lempira	18 a	28 a
Icatú	24 b	40 ab
Catimor	24 b	44 b
Total	22	37

El efecto sobre el control de la contaminación del tiempo de sumersión de los explantes (5, 10, 15 y 20 min) en la solución desinfectante no fue significativamente diferente ($P < 0.0001$), por lo que para fines prácticos utilizar el tiempo de cinco minutos facilita y agiliza el proceso de siembra de los explantes. El control de la contaminación de las soluciones desinfectantes de hipoclorito de calcio (5%, 10%, 15% y 20%) fue diferente significativamente ($P > 0.0001$), excepto para las concentraciones de 15% y 20% cuyo

efecto fue estadísticamente el mismo, teniendo éstas un mejor control de la contaminación.

El modelo estadístico utilizado para evaluar los tratamientos de hipoclorito de calcio fue altamente significativo ($P < 0.0001$), con $R^2 = 0.87$ y $CV = 31.55\%$ (Anexo 4). La separación de medias se presenta en el Cuadro 6 donde se nota el efecto del hipoclorito de calcio en el control de la contaminación.

Los tratamientos con 15% y 20% hipoclorito de calcio tuvieron excelentes efectos desinfectantes con niveles bajos de contaminación, que están en un rango de 0% a 21% de contaminación de los explantes. De los tratamientos con mejor control de la contaminación, el tratamiento de 15% hipoclorito de calcio y cinco minutos de sumersión del explante es el más práctico y económico.

Los tratamientos con 5% hipoclorito de calcio presentaron un control de la contaminación semejante ($P < 0.0001$), independientemente de cuanto tiempo estuvo el explante expuesto a la solución desinfectante, y este control fue bajo, teniendo un rango de 60% a 94% de contaminación en promedio.

Se notó que al aumentar la concentración de hipoclorito de calcio en la solución desinfectante la contaminación fue menor, pero también se observó un efecto negativo sobre los explantes, donde a medida aumentaba dicha concentración, los explantes mostraban un mayor daño por necrosis y/o clorosis en las orillas.

Cuadro 6. Efecto de cuatro dosis de hipoclorito de calcio y cuatro tiempos de sumersión de los explantes en la solución desinfectante, en el porcentaje de contaminación promedio de explantes foliares de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tratamiento	Hipoclorito de calcio (%)	Tiempo de exposición (min)	Contaminación (%)
1	5	5	94 a
2	5	10	83 ab
3	5	15	77 ab
4	5	20	60 abc
5	10	5	55 abcd
6	10	10	49 abcd
7	10	15	49 bcd
8	10	20	44 bcde
13	20	5	21 cdef
11	15	15	16 cdef
12	15	20	16 cdef
14	20	10	16 cdef
10	15	10	10 def
15	20	15	5 ef
16	20	20	5 ef
9	15	5	0 f

4.1.2 Efecto del benomyl como ingrediente del Medio de Yasuda Post introducción en el control de la contaminación.

El incluir benomyl en el Medio de Yasuda Post introducción ayudó a controlar la contaminación de los explantes, mostrando una diferencia significativa ($P < 0.0001$) con respecto a la no utilización de este fungicida ($R^2 = 0.74$ / $CV = 20.54$) (Anexo 4).

La variedad Lempira presentó 30% de contaminación total, y fue diferente significativamente ($P < 0.0001$), en comparación con la contaminación total de la variedad Caturra y Catimor que tuvieron 68% y 70% de contaminación total respectivamente; aclarando que los explantes de la variedad Lempira se sembraron en época seca, en cambio los explantes de las variedades Caturra y Catimor fueron recolectados en el periodo de inicio de lluvias, por lo que la diferencia de la contaminación entre las variedades no se le puede atribuir solamente al benomyl. Además, el benomyl no afectó la cantidad de embriones producidos por explante, aunque se desconoce aún el efecto del fungicida en la calidad de éstos.

El benomyl en el Medio de Yasuda Post introducción probablemente ayudó a controlar el crecimiento de hongos del medio ambiente que pudieron infestar al explante al realizar el cambio de medio.

Se observó que la contaminación se desarrolló gradualmente, de manera que pasados dos meses después de haber trasladado el material al Medio de Yasuda Post introducción, y aún en plena producción de embriones, la contaminación continuaba apareciendo en los tubos de ensayo. Para evaluar esto, se realizó un análisis fitopatológico de los diferentes patógenos que crecieron en el medio, para saber cual fue el origen de la contaminación en cada variedad. Los resultados se presentan en la figura 1.

Durante el desarrollo del ensayo no se observó ningún problema por oxidación de los explantes que tuviera un efecto negativo en la producción de embriones.

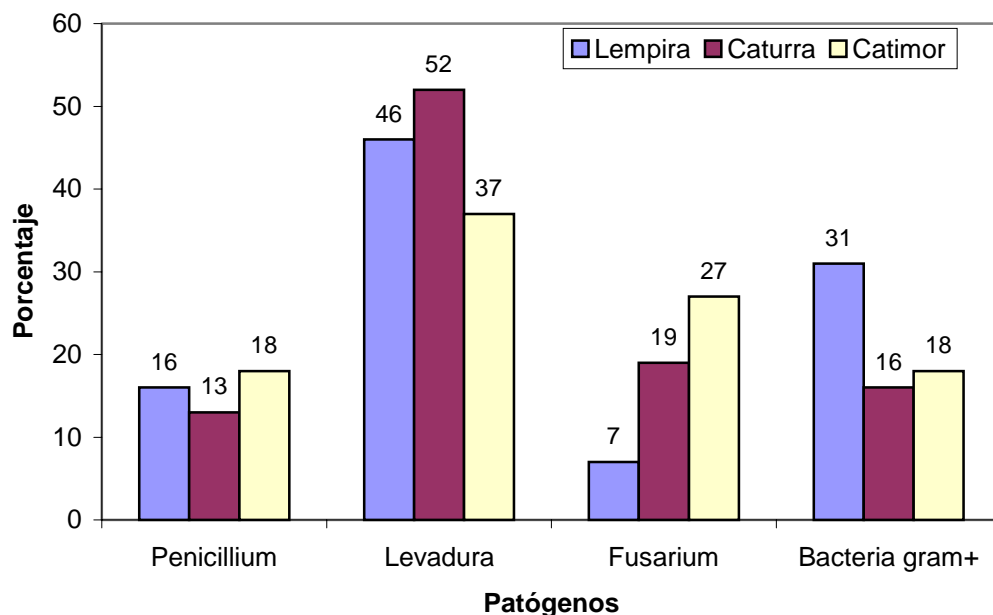


Figura 1. Porcentaje de participación de vitropatógenos en la contaminación de explantes foliares de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Según Pérez (1998), el posible origen de la contaminación por estos vitropatógenos es el siguiente:

Penicillium: Contaminantes diseminados por insectos en el laboratorio (ácaros, thrips y hormigas) y el ambiente.

Levaduras: Contaminantes que vienen con el explante inicial.

Fusarium: Contaminantes diseminados por insectos en el laboratorio (ácaros, thrips y hormigas) y el ambiente.

Bacterias gram +: Contaminantes que vienen con el explante inicial.

En las tres variedades se mostró un comportamiento similar de la participación en la contaminación por parte de los diferentes vitropatógenos, siendo las levaduras la principal fuente de contaminación.

4.2 EFECTO DE BAP Y KIN EN LA INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA

La producción de embriones inducida con varias concentraciones de BAP y KIN varió entre cada variedad de café utilizada en el ensayo. Cada variedad respondió mejor a un tipo de hormona y a una concentración específica de hormona.

4.2.1 Efecto de BAP y KIN en la producción de embriones en la variedad Lempira.

El modelo estadístico utilizado para analizar los datos de la variedad Lempira fue altamente significativo ($P < 0.0001$), con un $R^2 = 0.97$ y un $CV = 4.58$ (Anexo 4). La separación de medias de los tratamientos se muestra en el Cuadro 7 donde se puede ver el efecto de cada una de las hormonas y su concentración en el Medio de Yasuda Modificado.

Cuadro 7. Inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* en la variedad Lempira, utilizando dos citocininas y cinco concentraciones en el Medio de Yasuda Modificado, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tratamiento	Hormona	Dosis ($\mu\text{mol/l}$)	Benomyl (g/l)	Producción de embriones (%)
9	BAP	30	0	77 a
10	BAP	30	1	70 b
19	KIN	40	0	55 c
20	KIN	40	1	53 c
12	BAP	40	1	52 c
17	KIN	30	0	51 c
11	BAP	40	0	50 cd
18	KIN	30	1	49 cd
8	BAP	20	1	45 d
16	KIN	20	1	45 d
7	BAP	20	0	40 e
15	KIN	20	0	39 ef
5	BAP	10	0	38 ef
14	KIN	10	1	37 ef
13	KIN	10	0	35 f
6	BAP	10	1	35 f
1	BAP	0	0	16 g
4	KIN	0	1	12 h
3	KIN	0	0	9.7 hi
2	BAP	0	1	9 i

En la variedad Lempira el uso de BAP en el Medio de Yasuda Modificado a una concentración de 30 $\mu\text{mol/l}$, fue el tratamiento que indujo a la mayor producción de embriones, dicha producción es clasificada como alta producción de embriones. En este caso hubo un efecto negativo en la producción de embriones al utilizar benomyl en el Medio de Yasuda Post introducción. El añadir benomyl o no en el medio, no produjo ninguna diferencia significativa en la producción, pero al interactuar con la citocinina, se observó un efecto en la producción de embrioides.

Se hizo un análisis de regresión para observar el efecto de BAP y la KIN en la producción de embriones de la variedad Lempira:

La producción de embriones somáticos en la variedad Lempira, inducida con BAP se comportó así:

$$Y=0.379437 + 0.011270 X + 0.001094 X^2 - 2.7605 \times 10^{-5} X^3$$

$$R^2= 0.8602$$

$$CV= 11.94$$

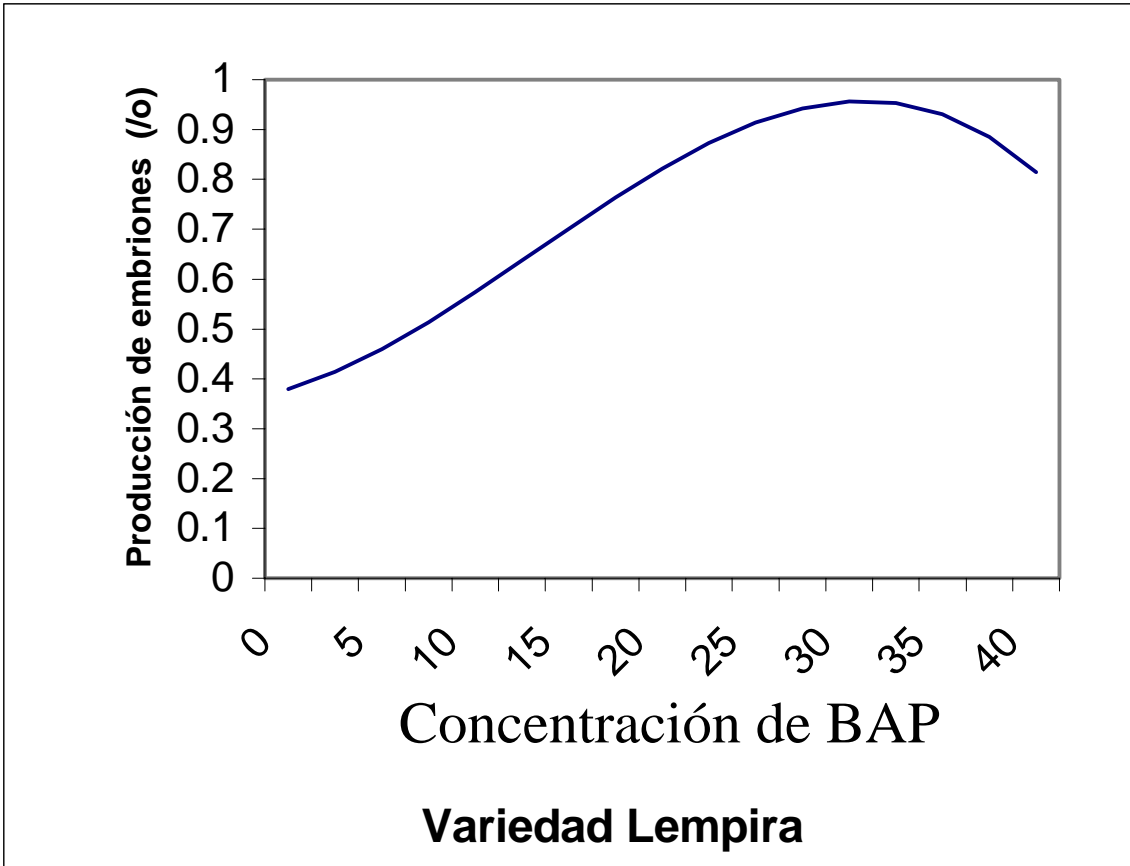


Figura 2. Efecto del BAP en la producción de embriones somáticos *in vitro* de café variedad Lempira, El Zamorano, Honduras, 2000.

Como se puede apreciar en la Figura 2, la mayor producción de embriones somáticos en la variedad Lempira inducidos con BAP, fue a una concentración de 30 $\mu\text{mol/l}$; a partir de esa concentración la producción de embriones somáticos comienza a reducirse.

La producción de embriones somáticos en la variedad Lempira, inducida con KIN se comportó así:

$$Y=0.340288 + 0.040578 X - 0.001381 X^2 + 1.6736 \times 10^{-5} X^3$$

$$R^2= 0.9505$$

$$CV= 6.07$$

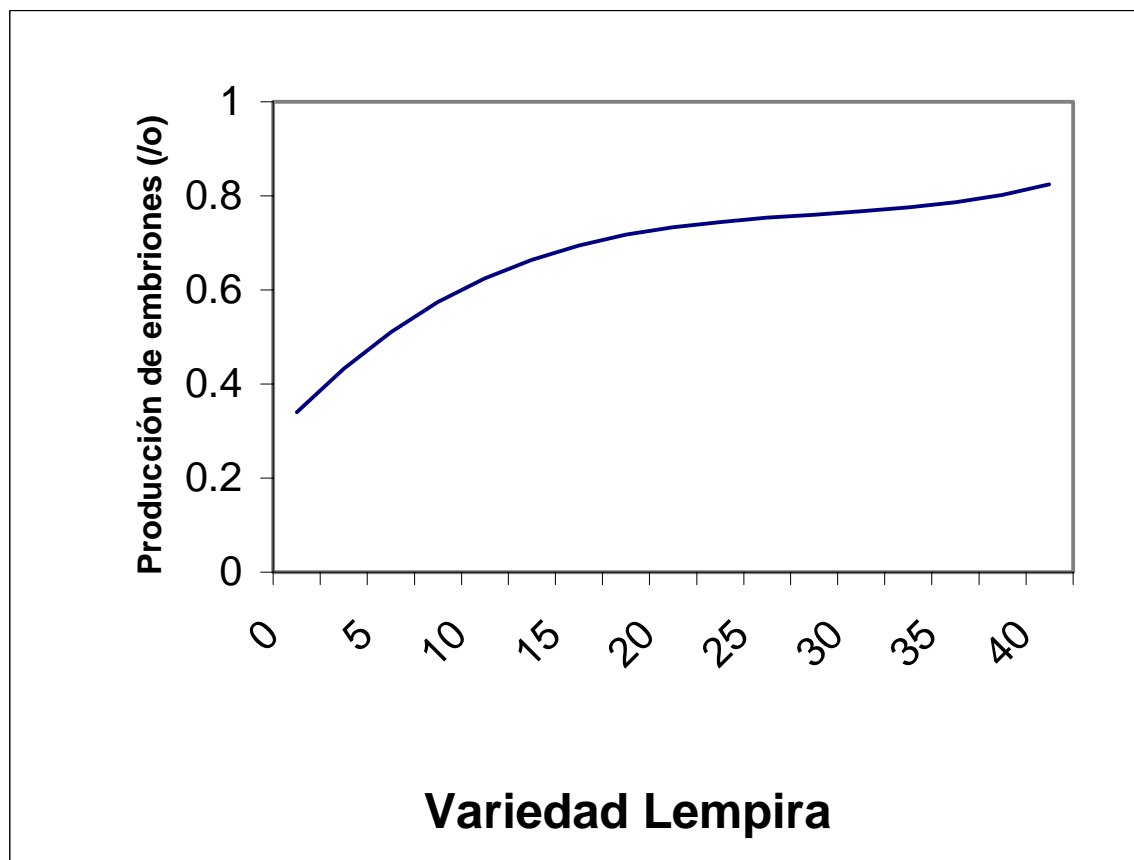


Figura 3. Efecto de KIN en la producción de embriones somáticos *in vitro* de café variedad Lempira, El Zamorano, Honduras, 2000.

En la Figura 3 se observa que la mayor producción de embriones somáticos en la variedad Lempira, inducidos con KIN, es cuando se utilizó una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$. Esta tendencia sugiere que si la concentración de KIN continúa aumentando, la producción de embriones somáticos se puede ver favorecida.

4.2.2 Efecto de BAP y KIN en la producción de embriones en la variedad Caturra.

Concentración de KIN ($\mu\text{mol/l}$)

El modelo estadístico utilizado para analizar los datos de la variedad Caturra fue altamente significativo ($P < 0.0001$), con un $R^2 = 0.97$ y un $CV = 4.08$ (Anexo 4). La separación de medias de los tratamientos se muestra en el Cuadro 8 donde se puede observar el efecto de cada una de las hormonas y su concentración en el Medio de Yasuda Modificado.

Cuadro 8. Inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* en la variedad Caturra, utilizando dos citocininas y cinco concentraciones en el Medio de Yasuda Modificado, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tratamiento	Hormona	Dosis ($\mu\text{mol/l}$)	Benomyl (g/l)	Producción de embriones (%)
12	BAP	40	1	53 a
11	BAP	40	0	51 a
17	KIN	30	0	47 b
18	KIN	30	1	45 b
10	BAP	30	1	45 b
9	BAP	30	0	40 c
19	KIN	40	0	36 d
20	KIN	40	1	32 e
16	KIN	20	1	32 e
15	KIN	20	0	31 e
8	BAP	20	1	26 f
7	BAP	20	0	25 f
13	KIN	10	0	20 g
14	KIN	10	1	19 gh
5	BAP	10	0	19 gh
6	BAP	10	1	17 h
1	BAP	0	0	16 h
4	KIN	0	1	16 h
3	KIN	0	0	12 i
2	BAP	0	1	9 j

En la variedad Caturra el uso de BAP en el Medio de Yasuda Modificado a una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$, fue el tratamiento que indujo la mayor producción de embriones somáticos, la cual se mantuvo dentro de la escala como una producción media.

Se hizo un análisis de regresión para observar el efecto de BAP y la KIN en la producción de embriones de la variedad Caturra:

La producción de embriones somáticos en la variedad Caturra, inducida con BAP se comportó así:

$$Y=0.366877 + 0.000638 X^2 - 9.039 \times 10^{-6} X^3$$

$$R^2= 0.9436$$

$$CV= 7.21$$

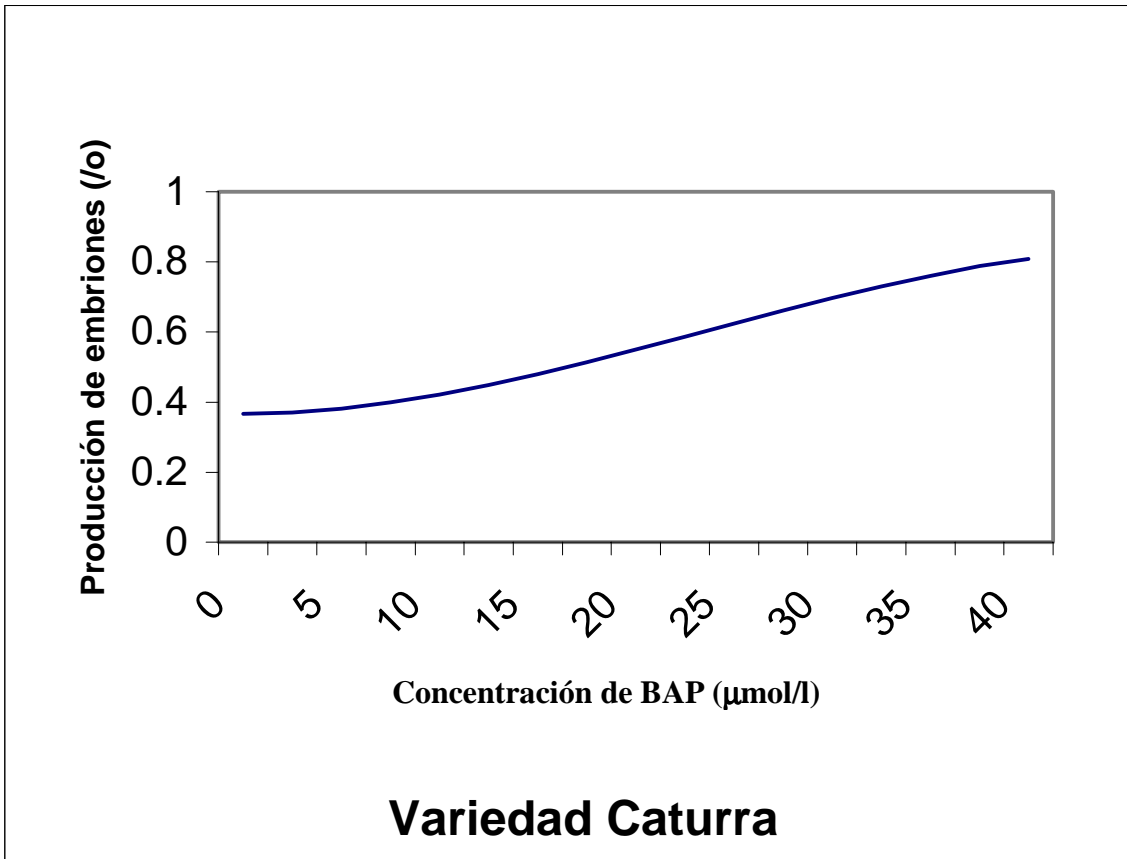


Figura 4. Efecto del BAP en la producción de embriones somáticos *in vitro* de café variedad Caturra, El Zamorano, Honduras, 2000.

En la Figura 4 se puede apreciar que la mayor producción de embriones somáticos en la variedad Caturra, inducidos con BAP, se observó a una concentración de 40 µmol/l. La tendencia que se observa sugiere que la producción de embriones somáticos puede ser favorecida si se aumenta la concentración de BAP a mayor de 40 µmol/l.

La producción de embriones somáticos en la variedad Caturra, inducida con KIN se comportó así:
 $Y=0.386791 - 0.00562 X + 0.001416 X^2 - 2.8148 \times 10^{-5} X^3$
 $R^2= 0.9531$

CV= 5.12

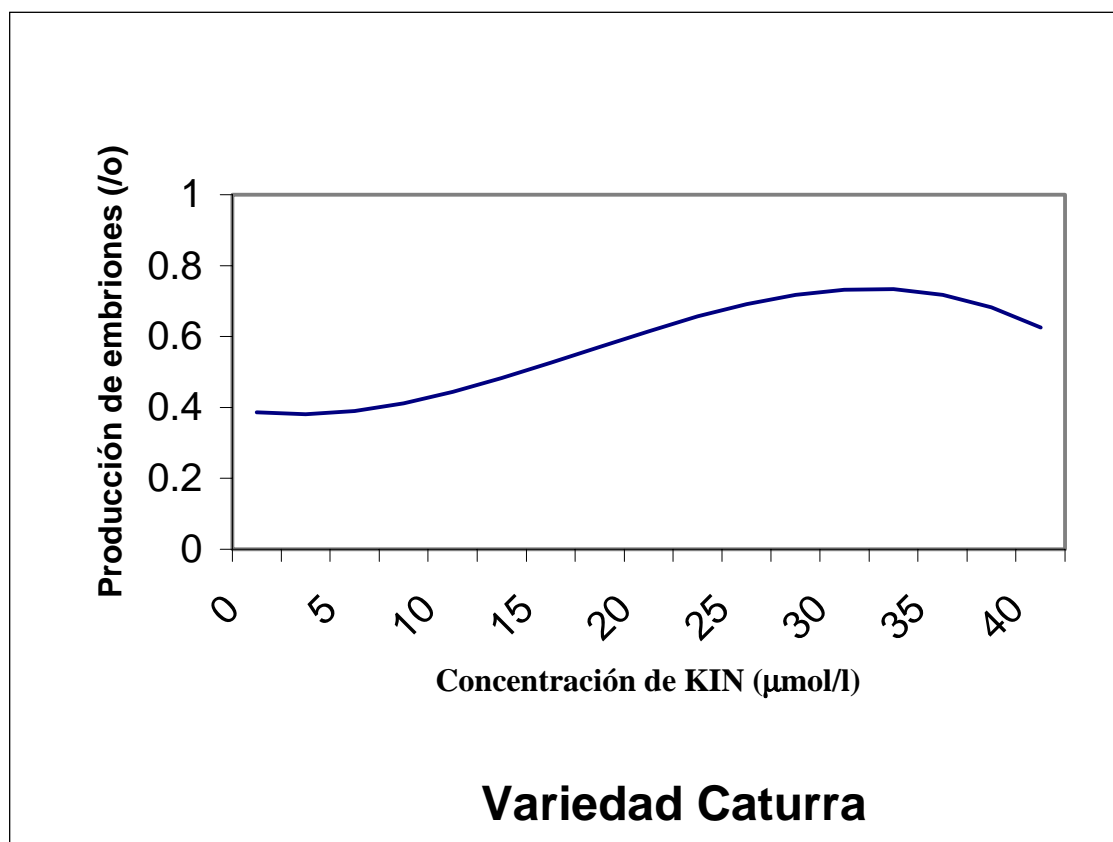


Figura 5. Efecto de KIN en la producción de embriones somáticos *in vitro* de café variedad Caturra, El Zamorano, Honduras, 2000.

Como se puede observar en la Figura 5, el pico de producción de embriones somáticos en la variedad Caturra, inducidos con KIN, es cuando se utiliza una concentración de 30 µmol/l, a partir de esta concentración, la producción de embriones somáticos comienza a bajar.

4.2.3 Efecto de BAP y KIN en la producción de embriones en la variedad Catimor.

El modelo estadístico utilizado para analizar los datos de la variedad Catimor fue altamente significativo ($P < 0.0001$), con un $R^2 = 0.98$ y un $CV = 3.88$ (Anexo 4). La separación de medias de los tratamientos se muestra en el Cuadro 9 donde se puede observar el efecto de cada una de las hormonas y su concentración en el Medio de Yasuda Modificado.

Cuadro 9. Inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* en la variedad Catimor, utilizando dos citocininas y cinco concentraciones en el Medio de Yasuda Modificado, El Zamorano, Honduras, 2000.

Tratamiento	Hormona	Dosis ($\mu\text{mol/l}$)	Benomyl (g/l)	Producción de embriones (%)
20	KIN	40	1	66 a
19	KIN	40	0	63 ab
18	KIN	30	1	62 abc
17	KIN	30	0	60 bcd
12	BAP	40	1	58 cde
11	BAP	40	0	57 de
10	BAP	30	1	55 ef
9	BAP	30	0	51 f
8	BAP	20	1	42 g
16	KIN	20	1	40 g
7	BAP	20	0	39 gh
15	KIN	20	0	39 gh
13	KIN	10	0	35 hi
5	BAP	10	0	33 i
14	KIN	10	1	33 i
6	BAP	10	1	33 i
4	KIN	0	1	11 j
1	BAP	0	0	10 j
3	KIN	0	0	9 j
2	BAP	0	1	9 j

En la variedad Catimor el uso de KIN en el Medio de Yasuda Modificado a una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$, fue el tratamiento que indujo a la mayor producción de embriones somáticos, la cual se mantuvo dentro de la escala como una producción media casi alta.

Se hizo un análisis de regresión para ver el efecto de BAP y KIN en la producción de embriones de la variedad Catimor:

La producción de embriones somáticos en la variedad Catimor, inducida con BAP se comportó así:

$$Y = 0.317776 + 0.036765 X - 0.001079 X^2 + 1.2560 \times 10^{-5} X^3$$

$$R^2 = 0.9690$$

$$CV = 5.34$$

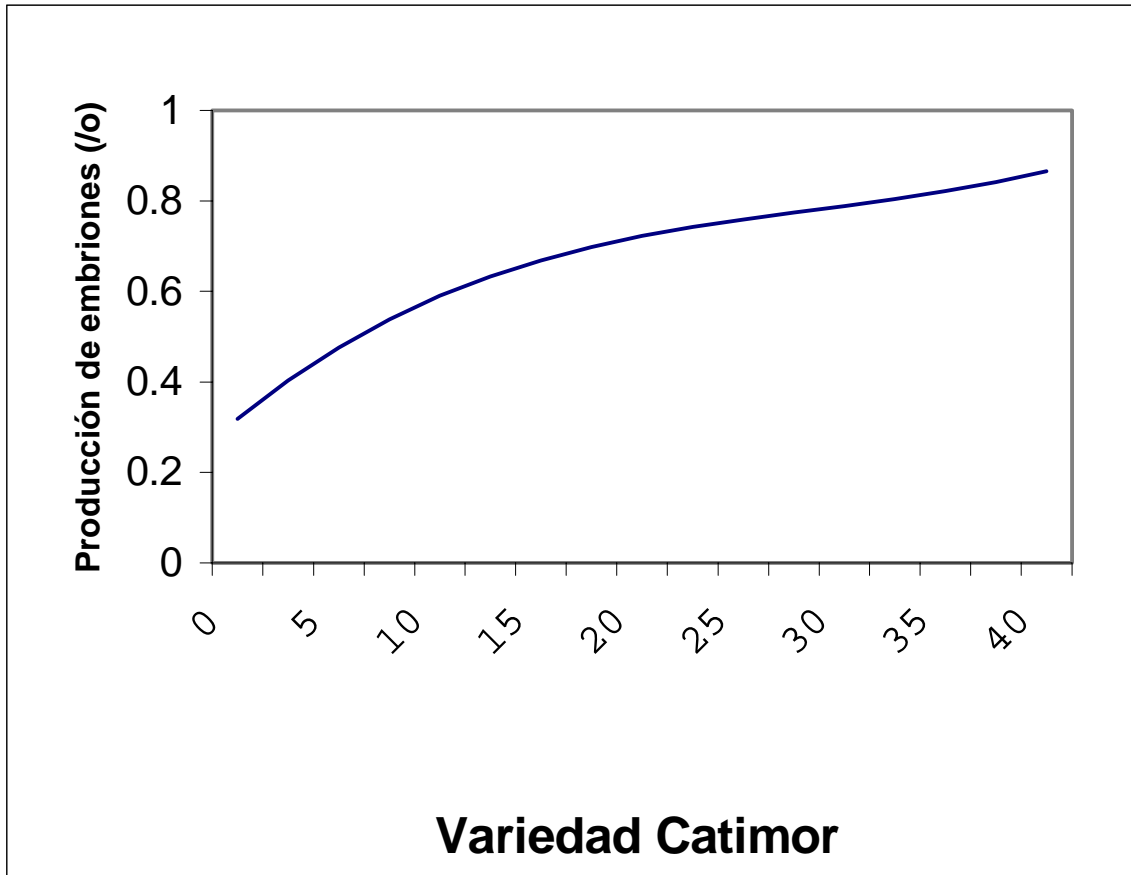


Figura 6. Efecto del BAP en la producción de embriones somáticos *in vitro* de café variedad Catimor, El Zamorano, Honduras, 2000.

En la Figura 6 se puede notar que el pico de producción de embriones somáticos en la variedad Catimor, inducidos con BAP, es cuando se utiliza una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$, a partir de esta concentración, los datos sugieren, que puede haber un incremento en la producción de embriones somáticos si se aumenta la concentración de la hormona.

La producción de embriones somáticos en la variedad Catimor, inducida con KIN se comportó así:

$$Y=0.342743 + 0.025133 X - 0.000257 X^2$$

$$R^2= 0.9520$$

$$CV= 7.08$$

Concentración de BAP ($\mu\text{mol/l}$)

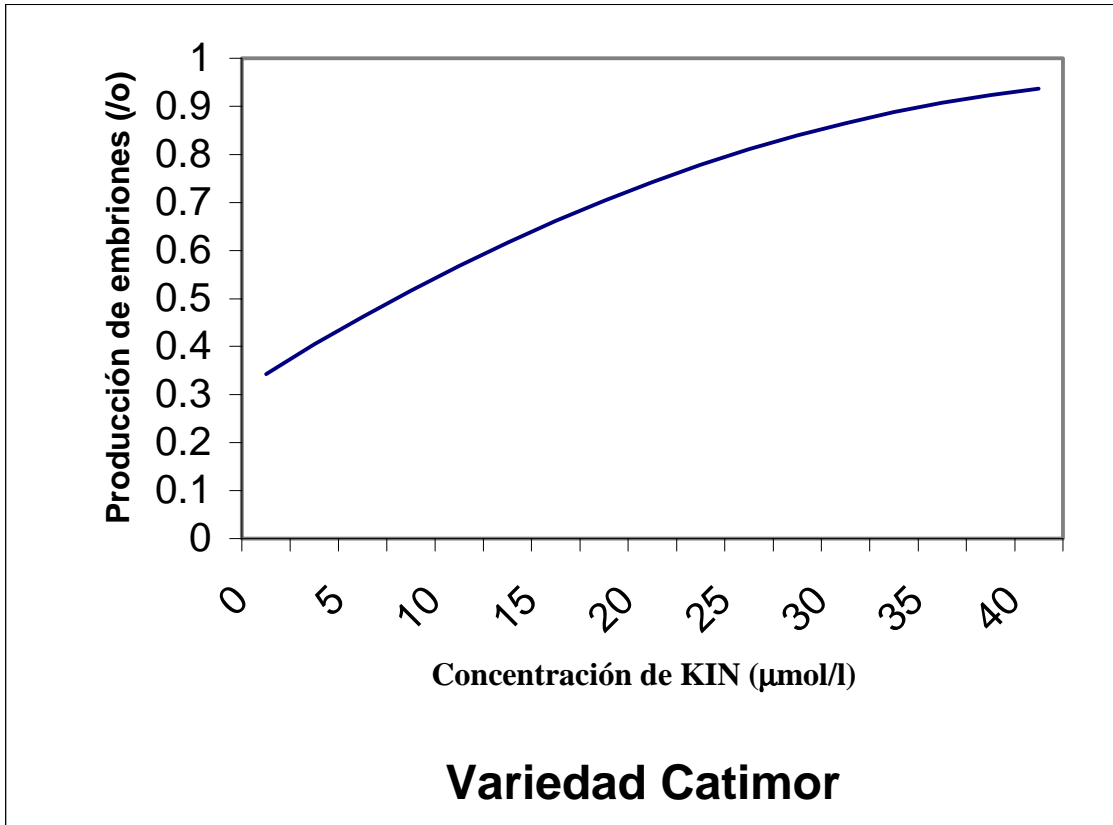


Figura 7. Efecto de KIN en la producción de embriones somáticos *in vitro* de café variedad Catimor, El Zamorano, Honduras, 2000.

En la Figura 7 se puede notar que el pico de producción de embriones somáticos en la variedad Catimor, inducidos con KIN, es cuando se utiliza una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$, a partir de esta concentración, los datos sugieren, que puede haber un incremento en la producción de embriones somáticos si se aumenta la concentración de la hormona en el medio.

4.2.4 Análisis económico

Se realizó un análisis de costos, con el objetivo de evaluar el incremento en costo en que se incurre al utilizar un tratamiento con mayor producción de embrioides, comparándolo con el costo del tratamiento

que tiene una producción de embrioides menor más cercana a éste. Los resultados pueden observarse en el Cuadro 10 donde se observa que la diferencia en costos por utilizar el tipo y la concentración de hormona, que induce la mayor producción de embriones somáticos para cada variedad, es mínima. Se recomienda técnica y económicamente utilizar la hormona y la concentración que induce el mayor número de embriones somáticos en cada variedad, independiente del costo.

La causa de una diferencia económica mínima entre los tratamientos, se debe a que la diferencia entre el precio de BAP y KIN es mínima. La KIN tiene un costo mayor de 0.02\$/g comparado al BAP, y además, se utiliza menos KIN que BAP para llegar a la misma dosis en $\mu\text{mol/l}$, ya que la KIN tiene un peso molecular más bajo que el BAP. El complemento de estos dos factores produjo que la diferencia económica sea mínima, Para poder observar la diferencia en costos, se analizó el incremento en costos en 1, 10, 50 y 100 litros de medio en los diez tratamientos que tuvieron los mayores índices de producción de embrioides. En el Anexo 2 se observan los costos por litro de medio de Yasuda Modificado y Yasuda Post introducción.

5. CONCLUSIONES

- La solución desinfectante con 15% de hipoclorito de calcio y cinco minutos de sumersión de los explantes, es la que disminuye más los índices de contaminación.
- El uso de benomyl en el Medio de Yasuda Post introducción reduce la contaminación de los explantes foliares, y al interactuar con las hormonas promueve la producción de embrioides.
- Para la variedad de café Lempira, el uso de BAP a una concentración de 30 $\mu\text{mol/l}$ induce una mayor producción de embriones directos de los explantes foliares.
- Para la variedad de café Caturra, el uso de BAP a una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$ induce una mayor producción de embriones directos de los explantes foliares.
- Para la variedad de café Catimor, el uso de KIN y BAP a una concentración de 40 $\mu\text{mol/l}$ induce una mayor producción de embriones directos de los explantes foliares.

6. RECOMENDACIONES

Despues de realizar este estudio, se recomienda que se ponga en práctica las siguientes sugerencias:

- Propagar explantes provenientes de plantas madres sanas que estén en condiciones ambientales de campo con baja humedad relativa o con ambiente controlado bajo invernadero y que estén bajo un programa de fitoprotección. Tambien hacer análisis fitopatológico y de contenido de insectos de los explantes a propagar, antes de introducirlos en el laboratorio para su multiplicación.
- Se debería utilizar benomyl en el Medio de Yasuda Post introducción para disminuir los niveles de contaminación que existe y asi aumentar los rendimientos de producción de embriones somáticos en el laboratorio.
- Estudiar el efecto de la presencia de benomyl en el medio, en el desarrollo posterior de los embriones somáticos.
- Utilizar el medio de micropropagación de café de Berthouly (1996), ya que según Etienne (2000)¹, es el medio que induce a una mayor producción de embriones, e implementar un sistema con recipientes de inmersión temporal automatizado, para aumentar la eficiencia en la proliferación de embriones.
- Investigar el efecto de la humedad relativa ambiental de donde se extraen los explantes en los niveles de contaminación que se obtienen *in vitro*.
- Evaluar el efecto negativo de altas concentraciones de la solución desinfectante sobre la producción de embriones, y comparar este efecto con el de la reducción en contaminación.
- Evaluar la producción de embriones somáticos en la variedad Lempira con concentraciones mayores a 40 $\mu\text{Mol/L}$ de KIN.
- Evaluar la producción de embriones somáticos en la variedad Caturra con concentraciones mayores a 40 $\mu\text{Mol/L}$ de BAP.
- Evaluar la producción de embriones somáticos en la variedad Catimor con concentraciones mayores a 40 $\mu\text{Mol/L}$ de KIN y BAP.

¹ Hervé Etienne. 2000. Embrigénesis somática en café. CIRAD. Comunicación personal.

Anexo 1. Medios de cultivo utilizados en la inducción de embriogénesis somática *in vitro* de café.

Componentes	MS ¹	Sondahl <i>et al.</i> 1984 1	Sondahl <i>et al.</i> 1984 2	Sondahl <i>et al.</i> 1984 Pre- incubación	Sondahl and Sharp 1977(a)	Yasuda <i>et al.</i> 1985
Macronutrientes (meq/l)						
NO ₃ ⁻	39.40	24.72	39.40	19.70	47.89	9.85
PO ₄ ³⁻	3.74	3.26	3.74	1.87	1.87	1.87
SO ₄ ²⁻	3.00	4.05	3.00	1.50	1.50	0.75
Cl ⁻	5.99	2.04	5.99	3.00	3.00	1.50
K ⁺	20.04	24.72	20.04	10.02	38.21	5.32
Ca ²⁺	5.99	2.04	5.99	3.00	3.00	1.50
Na ⁺	---	1.08	---	---	---	---
Mg ²⁺	3.00	2.02	3.00	1.50	1.50	0.75
NH ₄ ⁺	20.61	2.02	20.61	10.30	10.30	5.15
Micronutrientes (mg/l)						
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.300	13.200	5.600	11.200	11.200	11.200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.600	2.000	2.150	4.300	4.300	4.300
H ₃ BO ₃	6.200	3.000	1.550	3.100	6.100	3.100
KI	0.830	0.750	0.210	0.420	0.830	---
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.006	0.012	0.025	0.050
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.250	0.250	0.060	0.130	0.250	0.125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.006	0.013	0.025	---
NaFeEDTA (mM)	0.100	0.100	0.025	0.050	0.050	0.060
Vitaminas (mg/l)						
<i>myo</i> -inositol	100.0	99.00	99.00	99.0	99.0	100.0
Tiamina HCL	0.1	10.10	10.10	10.1	10.1	10.0
Acido nicotínico	0.5	1.85	1.85	---	---	1.0
Piridoxina HCL	0.5	3.10	3.10	---	---	1.0
Aminoácidos (mg/l)						
Glicina	2	---	---	---	---	---
L-cysteina HCL	---	78.8	---	33	33	---
Otros suplementos (g/l)						

¹ Murashige y Skoog

PVP-40	---	1.00	---	---	---	---
Carbón activado	---	2.50	---	---	---	---
Streptomicina	---	---	1	---	---	---

Fuente: George E.F. (1996)

Anexo 2. Costo de los ingredientes para la elaboración de un litro de Medio de Yasuda Modificado utilizado para la inducción de embriogénesis somática *in vitro* de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Ingrediente	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (\$)	Total
Macros MS/4	25.0	ml	0.002846640	0.071166000
KH ₂ PO ₄	42.5	mg	0.000137000	0.005822500
Oligoelementos	1.0	ml	0.000164093	0.000164093
Yasuda				
NaFe EDTA	2.5	ml	0.001400000	0.003500000
Inositol	100.0	mg	0.000328000	0.032800000
Acido nicotínico	1.0	mg	0.000120000	0.000120000
Piridoxina	1.0	mg	0.000680000	0.000680000
Tiamina	10.0	mg	0.000362000	0.003620000
Benomyl	1.0	gr	0.033333300	0.033333300
Cisteina	50.0	mg	0.000464000	0.023200000
Sacarosa	30.0	gr	0.039800000	1.194000000
Phytigel	3.0	gr	0.236000000	0.708000000
BAP	5.0	mg	0.000076000	0.000380000
				2.076785893

Anexo 3. Costo de los ingredientes para la elaboración de un litro de medio de Yasuda Post introducción utilizado para la inducción de embriogénesis somática *in vitro* de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Ingrediente	Cantidad	Unidad	Precio/unidad (\$)	Total
Macros MS/4	25.0	ml	0.002846640	0.071166000
KH ₂ PO ₄	42.5	mg	0.000137000	0.005822500
Oligoelementos	1.0	ml	0.000164093	0.000164093
Yasuda				
NaFe EDTA	2.5	ml	0.001400000	0.003500000
Inositol	100.0	mg	0.000328000	0.032800000
Acido nicotínico	1.0	mg	0.000120000	0.000120000

Piridoxina	1.0	mg	0.000680000	0.000680000
Tiamina	10.0	mg	0.000362000	0.003620000
Sacarosa	30.0	gr	0.039800000	1.194000000
Phytigel	3.0	gr	0.236000000	0.708000000
BAP	1.2	mg	0.000076000	0.000091200
				<hr/>
				2.019963793

Anexo 4. Análisis de varianza de los factores investigados durante el proceso de inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

ANDEVA para los tratamientos de hipoclorito de calcio

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	P > F
Model	17	8.405	0.494	12.62	0.0001
o					
Error	30	1.170	0.039		
Total	47	9.58			

ANDEVA para los tratamientos de benomyl

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	P > F
Model	12	4.003	0.333	11.45	0.0001
o					
Error	47	1.369	0.0291		
Total	59	5.372			

ANDEVA para los tratamientos de hormonas en variedad Lempira

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	P > F
Model	19	7.987	0.4203	427.28	0.0001
o					
Error	180	0.177	0.00098		
Total	199	8.164			

ANDEVA para los tratamientos de hormonas en variedad Caturra

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	P > F
Model	19	4.493	0.2365	444.91	0.0001
o					
Error	180	0.095	0.00053		
Total	199	4.589			

ANDEVA para los tratamientos de hormonas en variedad Catimor

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	P > F
Model	19	8.592	0.4522	660.73	0.0001
o					
Error	180	0.123	0.00068		
Total	199	8.716			

Cuadro 10. Estimación del incremento en costo para tener un incremento en la producción de embrioides en la inducción de embriogénesis somática directa *in vitro* de tres variedades de café, El Zamorano, Honduras, 2000.

Hormona	Dosis*	Producción de embrioides (%)	Costos/litro (\$)	Incremento en costo (centavos\$)				
				1 litro	10 litros	50 litros	100 litros	
BAP	30	77 a	2,076918893	0,000	0,00	0,00	0,00	
BAP	30	70 b	2,076918893	-0,029	-0,29	-1,43	-2,87	L
KIN	40	55 c	2,077205693	0,000	0,00	0,00	0,00	E
KIN	40	53 c	2,077205693	0,012	0,12	0,58	1,16	M
BAP	40	52 c	2,077089893	0,008	0,08	0,42	0,84	P
KIN	30	51 c	2,077005743	-0,008	-0,08	-0,42	-0,84	I
BAP	40	50 cd	2,077089893	0,008	0,08	0,42	0,84	R
KIN	30	49 cd	2,077005743	0,026	0,26	1,29	2,58	A
BAP	20	45 d	2,076747893	-0,006	-0,06	-0,29	-0,58	
KIN	20	45 d	2,076805793	-0,028	-0,28	-1,42	-2,84	
BAP	40	53 a	2,077089893	0,000	0,00	0,00	0,00	
BAP	40	51 a	2,077089893	0,008	0,08	0,42	0,84	C
KIN	30	47 b	2,077005743	0,000	0,00	0,00	0,00	A
KIN	30	45 b	2,077005743	0,009	0,09	0,43	0,87	T
BAP	30	45 b	2,076918893	0,000	0,00	0,00	0,00	U
BAP	30	40 c	2,076918893	-0,029	-0,29	-1,43	-2,87	R
KIN	40	36 d	2,077205693	0,000	0,00	0,00	0,00	R
KIN	40	32 e	2,077205693	0,040	0,40	2,00	4,00	A
KIN	20	32 e	2,076805793	0,000	0,00	0,00	0,00	
KIN	20	31 e	2,076805793	-0,040	-0,40	-2,00	-4,00	
KIN	40	66 a	2,077205693	0,000	0,00	0,00	0,00	
KIN	40	63 ab	2,077205693	0,020	0,20	1,00	2,00	C
KIN	30	62 abc	2,077005743	0,000	0,00	0,00	0,00	A
KIN	30	60 bcd	2,077005743	-0,008	-0,08	-0,42	-0,84	T
BAP	40	58 cde	2,077089893	0,000	0,00	0,00	0,00	I