

Establecimiento in vitro de café var. caturra roja a partir de microesquejes

Juan Rodríguez-Layza

orcid.org/0000-0003-2663-2674

jrodriguezla@undac.edu.pe

Javier J. Gonzales-Arteaga

orcid.org/0000-0001-6196-707X

jgonzalesa@undac.edu.pe

Ladislao C. Romero-Rivas

orcid.org/0000-0002-6598-3277

lromero@undac.edu.pe

Adelmo Párraga-Quintanilla

orcid.org/0000-0001-7392-9599

aparragaq@undac.edu.pe

Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión
Oxapampa - Perú

RESUMEN

El objetivo fue establecer un protocolo para la desinfección y el establecimiento de microesquejes de café *Coffea arabica* Var. Caturra Rojo provenientes de campo, como etapa previa para la multiplicación in vitro. El diseño utilizado fue el diseño en bloques completos al azar (DBCA), los tratamientos para desinfección fueron t1, t2 y t3; mientras que, en la fase de establecimiento fueron t1, t2, t3, t4 y t5. Se encontró que el protocolo de desinfección que mejor funcionó fue t3 que utilizó benomilo y gentamicina por 10 minutos, luego el uso de hipoclorito de sodio, lejía, a 1,3 % por 30 minutos, en base a que favoreció una mayor sobrevivencia y menor fenolización de los explantes. El mejor medio de establecimiento fue el t5 que tuvo como ingredientes MS más BAP a 0,5 mg l⁻¹.

Palabras clave: protocolo; microesquejes; regulador de crecimiento; establecimiento; micropropagación.

In vitro establishment of Var. Caturra Rojo coffee from microcuttings

ABSTRACT

The objective was to establish a protocol for the disinfection and the establishment of microcuttings of coffee *Coffea arabica* Var. Red Caturra from the field, as a preliminary stage for in vitro multiplication. The design used was the randomized complete block design (DBCA), the treatments for disinfection were t1, t2 and t3; while, in the establishment phase, they were t1, t2, t3, t4 and t5. It was found that the disinfection protocol that worked best was t3 that used benomyl and gentamicin for 10 minutes, then the use of sodium hypochlorite, bleach, at 1,3% for 30 minutes, in base on the fact that it favored greater survival and less phenolization of the explants. The best of the establishment was the t5 that had as ingredients MS plus BAP at 0,5 mg l⁻¹

Keywords: protocol; microcuttings; regulator of growth; establishment or; micropropagation.

Artículo recibido: 10 Agosto. 2021

Aceptado para publicación: 07. Setiembre. 2021

Correspondencia: jrodriguezla@undac.edu.pe

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

1. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los cultivos de mayor importancia, constituye el segundo producto de exportación para Costa Rica; el más cultivado en el mundo es *Coffea arabica*, el mismo que está afectado por un gran número de enfermedades (Rojas-Lorz, 2018); asimismo, por la alta fluctuación de los precios en el mercado internacional, debido a unos pocos compradores que mantienen el comercio de este producto, pero que les reporta altas ganancias a través de sus cadenas de cafeterías (Figueroa-Hernández et al., 2015). El cultivo in vitro, es una alternativa para liberarse de un gran número de enfermedades, que pone en riesgo la producción y su rentabilidad.

Uno de los principales problemas en el cultivo in vitro de tejidos vegetales es la contaminación, por hongos, bacterias fitoplasmas y virus (Sharry et al., 2015). En la fase de introducción, implica probar protocolos, como es el caso de *C. arabica* variedad (Var.) Bourbón, donde establecieron como mejor método Inifap 2010 (Moreno & Vásquez, 2017); a pesar que ya existen métodos, cuando se trata de establecer protocolos, estos tienen que ser puestos a prueba su funcionalidad; al respecto, en la micropropagación de *C. arabica* L. Var. *Typica*, el mejor método de desinfección fue cuando se utilizó hipoclorito de calcio al 3 % más 3 gotas de Tween 80 x 100 ml⁻¹, por tiempo de 5 y 10 minutos comparados a mayor tiempo de exposición (Arevalo, 2019). El proceso en la desinfección del material biológico debe permitir eliminar toda forma de los microorganismos, con el menor daño posible para los explantes; en algunos casos se emplea sólo etanol o hipoclorito de sodio (NaOCl), lo más frecuente es la utilización de ambos, es decir, una inmersión de corta duración en etanol 70 %, seguida de una en NaOCl a diferentes concentraciones, y como mínimo de tres lavados con agua estéril, dependiendo de la especie vegetal y el tipo de explante (Mroginski & Roca, 1991).

Otro factor a controlar en el cultivo in vitro es la fenolización, la oxidación por compuestos fenólicos y otros; para evitar este proceso se ha utilizado NaOCl al 2 % p/v por 5 minutos y 0,01 g l⁻¹ de ácido ascórbico, una inmersión durante 10 minutos, y hasta los 15 días no se presentó fenolización; asimismo, señalan que a esta concentración el hipoclorito de sodio como el de calcio no son abrasivos para tejido foliar de café de Var. Castillo, Catuaí y Costa Rica 95 de seis meses de edad (Sánchez et al., 2019).

En ápices de *C. arabica*, se encontró que para la brotación de microesquejes se requiere de altas concentraciones de citoquininas; además, se han estudiado cuatro concentraciones de ácido abscísico, donde 8 mg l⁻¹ favoreció la formación de brotes secundarios por ápice inicial (Kessel,

2008). “Las respuestas diferenciadas a la concentración de reguladores depende de los explantes, condiciones y edad de plantas donadoras” (Valdés-Infante et al., 2012). Por otro lado, se han probado medios semi sólido (Phytigel 1,8 g l⁻¹) y líquidos para el cultivo in vitro de yemas axilares de café Var. Sarchimor, donde se encontró que en el primero fue superior en sobrevivencia, número de brotes por meristemo y vigorosidad, comparado al medio líquido (Morales, 2017).

Es posible la obtención de vitroplantas de café Var. Catimor, a partir de microesquejes procedentes de plantas in vivo como in vitro a través de la embriogénesis somática en medio Murashige y Skoog 1962 (MS) suplementado con distintas concentraciones de Bencilaminopurina (BAP) y Acido Naftalenacético (ANA) (De García & Rafael, 1990). El cultivo de café en el ámbito de la provincia de Oxapampa, principalmente en los distritos de Villa Rica, Oxapampa, Chontabamba y Huancabamba, es una actividad muy importante, es la fuente de ingresos económicos y está ligado a la vida sociocultural de la población humana, considerando que esta provincia es una zona cafetalera de interés para el Perú, y para mantener la producción es necesario contar con material genético libre de agentes patógenos que limitan la producción y la calidad del producto.

El empleo del cultivo in vitro de tejidos vegetales, tiene el potencial de permitir multiplicar un material vegetal de interés para el agricultor cafetalero, y llevar al campo plantas de café que garanticen la inversión, y así poder establecer cultivos altamente homogéneos y con características deseables, para esto se requiere contar con un protocolo de desinfección y un medio de establecimiento de los microesquejes provenientes de campo de café *C. arabica* Var. Caturra Rojo como etapa previa para la multiplicación.

2. ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS O MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, filial Oxapampa, Carretera Central s/n, Km 3.5, Barrio Miraflores, distrito y provincia Oxapampa, región Pasco, Perú.

Material biológico

Los explantes fueron extraídos de plantas adultas de café Var. Caturra Rojo de 10 años de edad, del tercio superior de las ramas plagiotrópicas, constituidos por el nudo apical y dos o tres nudos subyacentes, con una tijera de podar desinfectada con alcohol al 70 %, del sector Gramazú, distrito de Chontabamba, provincia de Oxapampa, Figura 1, UTM 10.517245 LS y 75.447462

LO a una altitud de 1532,09 msnm, (GPS Garmin Monterra) los cuales fueron trasladados, envueltos en papel toalla y dentro de una bolsa de polipropileno debidamente rotulada, al laboratorio de Biotecnología Vegetal.

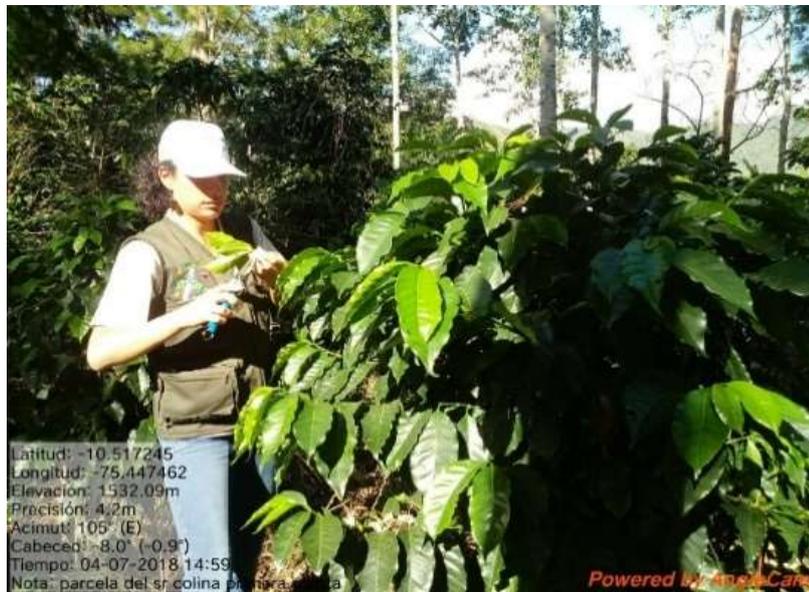


Figura 1. Colecta de material biológico, esquejes de ramas plagiotrópicas de café
Var. Caturra Rojo, Gramazú – Chontabamba.

Diseño estadístico

Para la desinfección, el diseño utilizado fue el de bloques completamente al azar, DBCA (Steel & Torrie, 1985), la unidad experimental estuvo constituida de 6 microesquejes y cinco repeticiones, los tratamientos se muestran en la Tabla 1.

Tratamientos

Tabla 1. Tratamientos en el proceso de desinfección de microesquejes de *Coffea arabica*
Var. Caturra Rojo, provenientes de campo Oxapampa-Perú.

Proceso	t1 (modificado de De García y Rafael, 1990)	t2 (modificado de Sondahl et al., 1985)	t3 (modificado de Olivera, 2015)
Lavado 3 minutos	En jabón líquido 3 %	En detergente a 1 %	En detergente a 1 %
Inmersión	En hipoclorito de calcio al 0,35 % por 20 minutos	Dentro de cámara de flujo laminar, en etanol al 96 % por 3 minutos.	En Benomilo a 1 % y Gentamicina a 500 mg l ⁻¹ por 10 minutos

Inmersión	En Benomilo y Gentamicina a 500 mg l ⁻¹ por 30 minutos	En hipoclorito de sodio al 2,6 % durante 15 minutos	Dentro cámara de flujo laminar, en hipoclorito de sodio al 1,3 % + 3 gotas 100 ml ⁻¹ Tween 20, por 30 minutos.
Lavado con agua estéril	Dentro de cámara de flujo laminar, 3 enjuagues.	3 enjuagues.	5 enjuagues.
En 300 mg l ⁻¹ de Ácido Ascórbico y 100 mg l ⁻¹ Ácido Cítrico	10 minutos	10 minutos	10 minutos

Para el establecimiento in vitro de microesquejes, también se utilizó el diseño DBCA, con cinco tratamientos, Tabla 2, y tres repeticiones.

Siembra y medio de cultivo

Para la desinfección los microesquejes del nudo apical se sembró en 5 ml de medio MS sólido, contenido en frascos de 15 ml, compuesto de sales, vitaminas y 4 mg l⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), 30 g l⁻¹ de sucrosa y 9 g l⁻¹ de agar, el pH se ajustó a 5,6; y para el establecimiento se utilizó 5 tipos de medios, tratamientos, preparados con MS y la adición de reguladores de crecimiento, Tabla 2; la esterilización en autoclave a 121°C y 15 lb pulgada⁻² durante 20 minutos e incubados a 20 °C, 59,32 μmol m⁻² s⁻¹ (LP 471 PAR) de luminosidad, 60 % de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas luz (ALION CE AHC 15A)

Tabla 2. Tratamientos en el establecimiento de microesquejes de *Coffea arabica* Var. *Caturra Rojo*, provenientes de campo Oxapampa-Perú.

Tratamiento	Descripción
t1	Medio MS sin reguladores de crecimiento
t2	Medio MS + ANA (0,2 mg l ⁻¹) + BAP (2,25 mg l ⁻¹)
t3	Medio MS + ANA (0,2 mg l ⁻¹)
t4	Medio MS + BAP (0,2 mg l ⁻¹)
t5	Medio MS + BAP (0,5 mg l ⁻¹)

Variables

En el proceso de desinfección las evaluaciones fueron realizadas a los 8, 14, 18, 25 y 32 días después de la inoculación (ddi), estas fueron hongos y bacterias, donde se consideró el número de explantes con presencia de mohos y colonia, respectivamente; la fenolización, fue número

de explantes con más del 50% de tejido que cambió de verde a marrón oscuro y sobrevivencia los que mantuvieron el tejido de color verde natural; y para la fase de establecimiento, además de las mencionadas fue considerado la brotación, aquellos que mostraron una apertura de las primeras hojas.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con el software estadístico R v4.0.4, mediante el análisis de variancia para encontrar significancia entre los tratamientos y prueba de comparación múltiple de Duncan ($\alpha = 0,05$) que sirvió para determinar el mejor método de desinfección, y el mejor medio para el establecimiento de microesquejes. Los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada de $Y+0,5$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección

El análisis de varianza, Anova, Tabla 3, muestra diferencias altamente significativas para tratamientos (métodos de desinfección) de microesquejes de *C. arabica* Var. Caturra Rojo, en sobrevivencia a los 8, 14, 18, 25 y 32 ddi, igual que fenolización excepto a la 32 ddi que fue significativa; mientras que, en las variables hongos y bacterias no hubo diferencias significativas.

Tabla 3. Anova, coeficiente de variación (CV) y valores descriptivos de tres métodos de desinfección de microesquejes de *Coffea arabica* Var. Caturra Rojo, Oxapampa-Perú.

ddi	Fuente de variación	gl	Hongos	Bacterias	Fenolización	Sobrevivencia
8	Bloques	4	0,0012ns	0,0003ns	0,0086ns	0,0122ns
	Tratamientos	2	0,0024ns	0,0003ns	0,1983**	0,1709**
	CV%		6,711	1,481	10,130	6,746
	Promedio		0,729	1,220	0,954	1,062
	Mínimo		0,707	1,155	0,707	0,707
	Máximo		0,816	1,225	1,225	1,225
14	Bloques	4	0,0008ns	0,0003ns	0,0198ns	0,0053ns
	Tratamientos	2	0,00565ns	0,0003ns	0,1184**	0,1463**
	CV%		6,916	1,481	8,020	9,933
	Promedio		0,736	1,220	1,053	1,004
	Mínimo		0,707	1,155	0,707	0,707
	Máximo		0,816	1,225	1,225	1,225
18	Bloques	4	0,0020ns	0,0003ns	0,0208ns	0,0083ns
	Tratamientos	2	0,0032ns	0,0003ns	0,1298**	0,1608**
	CV%		7,598	1,481	8,431	10,152

	Promedio		0,744	1,220	1,057	0,928
	Mínimo		0,707	1,155	0,707	0,707
	Máximo		0,816	1,225	1,225	1,225
25	Bloques	4	0,0028ns	0,0005ns	0,0086ns	0,0127ns
	Tratamientos	2	0,0099ns	0,0003ns	0,0762**	0,1472**
	CV%		10,714	2,231	5,372	7,576
	Promedio		0,764	1,215	1,094	0,893
	Mínimo		0,707	1,155	0,816	0,707
	Máximo		0,913	1,225	1,225	1,155
32	Bloques	4	0,0024ns	0,0003ns	0,0129ns	0,0114ns
	Tratamientos	2	0,0154ns	0,0003ns	0,0446*	0,1204**
	CV%		11,514	1,481	6,656	7,323
	Promedio		0,770	1,220	1,120	0,876
	Mínimo		0,707	1,155	0,816	0,707
	Máximo		0,913	1,225	1,225	1,155

** . Significativo al 1 %, * . Significativo al 5 %, ns. No significativo.

La prueba de comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, la Tabla 4, muestra que en la variable sobrevivencia a los 8 y 14 ddi, t1 fue estadísticamente igual a t3 y ambos superiores a t2; pero, a los 18 ddi t3 fue superior a t1 y t2; sin embargo, a 25 y 32 ddi los tres métodos de desinfección se diferenciaron estadísticamente, con superioridad de t3, seguido de t1 y en tercer lugar t2; en la variable fenolización a los 8 y 32 ddi, t3 fue igual a t1, ambos fueron superiores a t2, y a los 14, 18 y 25 ddi los tres tratamientos de desinfección lograron diferenciarse estadísticamente, con menor fenolización en t3, seguido de t1 y en tercer lugar t2; mientras que para presencia de hongos y bacterias no han mostrado diferencias entre los tres tratamientos utilizados.

Tabla 4. Comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, de tres métodos de desinfección de microesquejes de *Coffea arabica* Var. *Caturra Rojo*, Oxapampa-Perú.

ddi	Tratamiento	Hongos	bacterias	fenolización	sobrevivencia
8	t1	0,75 a	1,22 a	0,87 b	1,17 a
	t2	0,73 a	1,22 a	1,18 a	0,85 b
	t3	0,71 a	1,21 a	0,81 b	1,17 a
14	t1	0,77 a	1,22 a	1,04 b	1,06 a
	t2	0,73 a	1,22 a	1,21 a	0,81 b
	t3	0,71 a	1,21 a	0,90 c	1,14 a
18	t1	0,77 a	1,22 a	1,04 b	0,89 b
	t2	0,73 a	1,22 a	1,22 a	0,77 b
	t3	0,73 a	1,21 a	0,90 c	1,12 a
25	t1	0,81 a	1,22 a	1,08 b	0,92 b
	t2	0,73 a	1,21 a	1,22 a	0,71 c

	t3	0,75 a	1,21 a	0,98 c	1,04 a
	t1	0,83 a	1,22 a	1,09 b	0,91 b
32	t2	0,73 a	1,22 a	1,22 a	0,71 c
	t3	0,75 a	1,21 a	1,04 b	1,01 a

Los promedios en columna, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

En la sobrevivencia de los explantes, en los tres métodos de desinfección, hasta los 14 ddi, no fue posible observar diferencias entre t1 con t3, esto indicaría que el hipoclorito de calcio tuvo igual efecto que el hipoclorito de sodio a las concentraciones utilizadas; mientras que a los 18 días t1 es igual a t2, y a partir de esta fecha de evaluación, t3 muestra ser superior, la que se expresa mejor a los 25 y 32 ddi, la concentración baja del hipoclorito de sodio y un mayor tiempo inmersión favoreció la sobrevivencia de los explantes. Estos resultados concuerdan con el uso de hipoclorito de sodio a una concentración de 1,5 % en los tiempos de 15, 20 y 25 minutos de exposición, donde tuvieron una mayor sobrevivencia de explantes foliares de *Coffea arabica*, híbrido F1, H-434 (Ortiz-Gómez et al., 2017); asimismo, en café de las variedades Caturra Rojo y SL-28, encontraron 98 y 92 %, respectivamente, utilizando explantes de hoja expuestos durante 20 minutos en 2,5 % (20 % cloro activo) (Montes-Cruz et al., 2017). en el presente trabajo se utilizó el mismo desinfectante, pero a una concentración 1,3 % durante 30 minutos en microesquejes de café Var. Caturra Rojo.

En cuanto a la fenolización, donde a los 8 y 32, t1 es igual a t3 y ambos superiores a t2, esto indica que la concentración de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) a 0,35 % utilizada tuvo igual efecto que NaClO a 1,3 %; mientras que a 14, 18 y 25 ddi, donde estadísticamente se diferenciaron los tres tratamientos y t3 fue superior a t1 y éste superior t2, esto indicaría que la concentración utilizada de hipoclorito de sodio y el tiempo de 30 minutos favoreció una menor oxidación de los microesquejes de café Var. Caturra Rojo. En explantes de hojas de café Var. Caturra obtuvieron una fenolización de 80 % al desinfectar con hipoclorito de calcio a 5 % durante 10 minutos en medio de cultivo MS con BAP a $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ y $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de 2, 4-D (Diclorofenoxiacético) y sin contaminación (Quiñones et al., 2020); sin embargo en el presente trabajo, a las concentraciones utilizadas de hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio, se observó contaminación por hongos y bacterias.

La contaminación por hongos y bacterias, los tres métodos utilizados tuvieron igual efecto; esto podría estar relacionada con el proceso de la manipulación de los explantes, aunado a las condiciones de humedad y presencia de nutrientes en el medio de cultivo (Suárez-Padrón, 2020), esto habría favorecido el desarrollo de los contaminantes por igual en los tres

tratamientos; la contaminación por hongos y bacterias es frecuente cuando se trabaja con plantas leñosas, pero puede evitarse con el uso de “1% Povidyn por 20 minutos +15% NaClO +2 gotas Tween por 5 minutos +0,5% HgCl₂ por 5 minutos” (Indacochea et al., 2018); por otro lado, el uso de NaClO al 3 % por 5 minutos se obtuvieron contaminación en un 55 % en explantes de *Guadua angustifolia* (Correa-Ramírez et al., 2014), esto indica que el tiempo de exposición al NaClO es crucial cuando se trata de desinfección en la micropropagación de café a partir de microesquejes de plantas madre de un campo agrícola.

En la desinfección con “HgCl₂ 0.1% por 5 minutos + rifampicina (72 µg·mL⁻¹) + nistatina (200 µg·mL⁻¹) en explantes de *Senecio calvus*” en la que tuvieron muy buenos resultados frente a otros desinfectantes (Laguna-Ibarra et al., 2019); pero, su manipulación es de alto riesgo por ser un inhibidor de la cadena respiratoria y podría causar intoxicaciones con el técnico micropropagador. Asimismo, en desinfección de explantes foliares de café Var. Castillo, Catuaí y Costa Rica 95 provenientes de invernadero, lavados con solución de detergente y sumergidas en Benomyl 2.0 g l⁻¹ por una hora, seguidamente en NaClO al 2.0 % + cinco gotas de Tween 20, durante cinco minutos dieron mejores resultados (Sánchez et al., 2019), esto no concuerda con la presente investigación en que también se utilizó el mismo fungicida y el antibiótico Gentamicina, que no tuvo efecto sobre los hongos y bacterias, posiblemente por tratarse de otro tipo de explante.

Establecimiento

El análisis de varianza, Anova, Tabla 5, muestra diferencias altamente significativas para tratamientos, (medios de cultivo in vitro) de microesquejes de *C. arabica* Var. Caturra Rojo, en la variable presencia de bacterias a los 15, 25 y 29 ddi; sin embargo, en sobrevivencia fue altamente significativa a los 25 ddi, y significativa a los 7 ddi, en cambio la fenolización fue significativa solo a los 7 ddi; y para la variable presencia de hongos no hubo diferencias en las fechas evaluadas.

La prueba de comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, Tabla 6, muestra que en la variable sobrevivencia a los 15, 25 y 29 ddi, t5 estadísticamente fue superior e igual t4; mientras que t1 fue inferior; en fenolización los tratamientos t1, t3, t4 y t5 fueron estadísticamente iguales y superiores a t2 a los 7 ddi y en el resto de las fechas evaluadas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, para la contaminación con bacterias en todas las fechas de evaluación, t1 fue superior al resto de tratamientos; por otro lado, en contaminación por hongos no hubo diferencias estadísticas. En cuanto a la brotación de los explantes, el BAP a las

concentraciones de 0,2 y 0,5 mg l⁻¹ y la mezcla de 0,2 y 2,5 mg l⁻¹ de ANA y BAP, respectivamente, no fue suficiente para lograr emitir yemas.

Tabla 5. Anova, coeficiente de variación (CV) y valores descriptivos de cinco medios de cultivo en establecimiento de microesquejes de *Coffea arabica* Var. Caturra Rojo, Oxapampa-Perú.

ddi	Fuente de variación	gl	Hongos	Bacterias	Fenolización	Sobrevivencia
7	Bloques	2	0,0026ns	0,0096ns	0,0085ns	0,0055ns
	Tratamientos	4	0,0042ns	0,0207ns	0,0189*	0,0152*
	CV%		12,278	7,411	5,650	6,013
	Promedio		0,785	1,086	1,018	0,974
	Mínimo		0,707	0,913	0,913	0,816
	Máximo		0,913	1,225	1,225	1,080
15	Bloques	2	0,0124ns	0,0026ns	0,0000 ns	0,00244ns
	Tratamientos	4	0,0076ns	0,0122**	0,0038ns	0,0158ns
	CV%		14,855	2,969	4,608	8,478
	Promedio		0,830	1,191	1,182	0,839
	Mínimo		0,707	1,000	1,080	0,707
	Máximo		1,000	1,225	1,225	1,000
25	Bloques	2	0,0220ns	0,0014ns	0,0010ns	0,0051ns
	Tratamientos	4	0,0046ns	0,0074**	0,0012ns	0,0135**
	CV%		14,490	2,562	5,359	4,911
	Promedio		0,843	1,191	1,182	0,786
	Mínimo		0,707	1,080	1,080	0,707
	Máximo		1,000	1,225	1,225	0,913
29	Bloques	2	0,0220ns	0,0004ns	0,0014ns	0,0021ns
	Tratamientos	4	0,0046ns	0,0372**	0,0017ns	0,0083ns
	CV%		14,490	2,614	3,915	7,370
	Promedio		0,843	1,169	1,201	0,772
	Mínimo		0,707	0,913	1,080	0,707
	Máximo		1,000	1,225	1,225	0,913

***. Significativo al 1 %*, **. Significativo al 5 %*, ns. *No significativo*.

La sobrevivencia de los explantes, en la respuesta de los microesquejes de café Var. Caturra Rojo a los diferentes medios utilizados, a los 25 ddi, donde los tratamientos con BAP fueron superiores respecto a los a los que tuvieron ANA (t3) y la mezcla de ambos reguladores, t2, lo que indicaría que la citoquinina influenciaría en una mayor sobrevivencia; sin embargo, a los 29 ddi nuevamente se iguala al efecto producido a los 15 ddi, donde t5 fue superior igual a t2, t3 y t4; estos resultados concuerdan con una mayor sobrevivencia de explantes de *Senecio calvus* tratados con BAP frente a un testigo sin BAP (Laguna-Ibarra et al., 2019); en este trabajo

también el tratamiento sin BAP tuvo menor sobrevivencia comparados a los que tenían BAP y ANA+BAP.

Tabla 6. Comparación múltiple de Duncan, $\alpha=0,05$, de cinco medios de cultivo in vitro en establecimiento de microesquejes de Coffea arabica Var. Caturra Rojo, Oxapampa-Perú.

ddi	Tratamiento	Hongos	bacterias	fenolización	sobrevivencia
7	t1	0,81 a	0,94 b	1,00 b	1,00 a
	t2	0,74 a	1,15 a	1,15 a	0,85 b
	t3	0,74 a	1,10 a	1,00 b	1,03 a
	t4	0,81 a	1,10 a	0,94 b	1,00 a
	t5	0,81 a	1,13 a	1,00 b	1,00 a
15	t1	0,84 a	1,08 b	1,20 a	0,74 b
	t2	0,84 a	1,20 a	1,22 a	0,78 ab
	t3	0,74 a	1,22 a	1,19 a	0,88 ab
	t4	0,84 a	1,22 a	1,19 a	0,88 ab
	t5	0,88 a	1,22 a	1,13 a	0,91 a
25	t1	0,84 a	1,10 b	1,18 a	0,71 c
	t2	0,87 a	1,20 a	1,20 a	0,74 bc
	t3	0,78 a	1,22 a	1,20 a	0,78 bc
	t4	0,84 a	1,22 a	1,18 a	0,82 ab
	t5	0,88 a	1,20 a	1,15 a	0,88 a
29	t1	0,84 a	0,97 b	1,22 a	0,71 b
	t2	0,87 a	1,22 a	1,22 a	0,74 ab
	t3	0,78 a	1,20 a	1,20 a	0,78 ab
	t4	0,84 a	1,22 a	1,18 a	0,78 ab
	t5	0,88 a	1,22 a	1,18 a	0,85 a

Los promedios en columna, que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

La fenolización de los microesquejes a los 7 ddi, el medio de cultivo que tuvo la mezcla de reguladores ANA + BAP (t2) fue mayor a los demás tratamientos con estos reguladores por separado (t3, t4 y t5) los que respondieron de igual forma que t1 sin reguladores, esto indica que los explantes responden de manera particular a los medios en esta variable; en el cultivo in vitro es una estrategia para el control de la oxidación, la elección del medio, el regulador, la edad de la planta donadora y otros (Azofeifa, 2009); Pero, a 15, 25 y 29 ddi, en que fueron evaluados los cinco tratamientos no mostraron efecto en esta variable, esto indica que los microesquejes de café Var. Caturra Rojo, se habrían adaptado o recuperado del estrés en los primeros días del cultivo in vitro; los tejidos vegetales cuando son sometidos al estrés producto

de la manipulación, producen enzimas que tienen como sustrato a los polifenoles y tirosinas, cuyos productos son quinonas fitotóxicas; otro factor, es la edad de las plantas donadoras, en las de mayor edad la síntesis de precursores fenólicos es más activa que en jóvenes (Hernández & González, 2010); esto concuerda con los resultados del presente trabajo en que se presentó un elevada fenolización de los microesquejes, debido que las plantas donantes tuvieron 10 años y tampoco fueron sometidos a un pretratamiento para disminuir el efecto de la oxidación, antes de entrar al proceso in vitro.

En la contaminación, los reguladores de crecimiento ANA, BAP y en la combinación de éstos, favoreció un mayor número de explantes con presencia de bacterias frente al testigo sin reguladores; sin embargo, en la presencia de hongos éstos no mostraron diferencias entre los tratamientos durante los días evaluados 7, 15, 25 y 29 ddi, resultados que concuerdan, en que la contaminación es un problemas durante la fase de establecimiento en la micropropagación (Ortiz-Gómez et al., 2017).

La menor contaminación por bacterias observadas en el tratamiento sin reguladores durante los días de evaluación, demuestra que la presencia de reguladores estaría facilitando el crecimiento de éstas, pero sin perjudicar en la sobrevivencia que se observa en los resultados, sobre todo en el tratamiento que contiene mayor cantidad de BAP ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$); al respecto, se podría indicar que se trataría de la microbiota de los explantes inoculados obtenidos del campo (Perez, 2017). Asimismo, incrementando la concentración de BAP, favorecería la aceleración en el proceso de brotación y crecimiento a partir de los explantes utilizados (González et al., 1998).

La no brotación de los explantes, microesquejes de café Var. Caturra Rojo, podría deberse a que esta concentración no fue suficiente para la brotación; en un medio MS 50% semi sólido de Phytigel ($1,8 \text{ g l}^{-1}$) + $1,1 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D + Kin $4,3 \text{ mg l}^{-1}$ + BAP $6,75 \text{ mg l}^{-1}$ a los 21 días se inició el desarrollo de las primeras hojas con un abultamiento en la base (Morales, 2017); al respecto, a las concentraciones de 12 a 16 mg l^{-1} de BAP permitió romper la latencia de las yemas de los microesquejes de Var. Catimor (García & Rafael, 1989); asimismo, para lograr la brotación de meristemas apicales caulinares de microesquejes de *Coffea arabica*, responden a altas concentraciones de citoquininas; por otro lado, 8 mg l^{-1} de ácido abscísico favoreció a los brotes secundarios (Kessel, 2008). También, existe un efecto diferenciado en función de las concentraciones de los reguladores, ambiente y edad de las plantas donantes (Valdés-Infante et al., 2012); es posible obtener vitroplantas de café Var. Catimor de plantas in vivo, en MS +

ANA mediante embriogénesis somática (De García & Rafael, 1990), en este trabajo hasta 29 ddi no fue posible obtener a partir de microesquejes de café Var. Caturra Rojo.

4. CONCLUSIÓN O CONSIDERACIONES FINALES

En la micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Caturra Rojo, mediante microesquejes de plantas adultas provenientes de campo; donde se probaron tres protocolos de desinfección, se estableció el tratamiento (t3) el mejor, en función de la sobrevivencia y fenolización, que hace uso de benomilo a 1 % y gentamicina a 500 mg l⁻¹ durante 10 minutos seguido de inmersión en NaClO a 1,3 % + 3 gotas de Tween x 100 ml⁻¹, durante 30 minutos y 5 enjuagues con agua destilada estéril; mientras el mejor medio para el establecimiento en base la fenolización de los explantes fue el tratamiento (t5), que tuvo como componente MS más regulador de crecimiento, BAP a la concentración de 0,5 mg l⁻¹.

5. LISTA DE REFERENCIAS

- Arevalo, K. L. (2019). *Micropropagación de Coffea arabica L. Var. Typica "café" en Jaén-Perú* [universidad Nacional de Jaén]. http://m.repositorio.unj.edu.pe/bitstream/handle/UNJ/136/Arevalo_RKL.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamérica*, 20(1), 153–175. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43711514016.pdf>
- Correa-Ramírez, A. L., Moreno-Granados, E. J., & González-Carreño, E. N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 5(1), 155–169. https://www.researchgate.net/publication/316001455_Evaluacion_del_efecto_de_tratamientos_de_desinfeccion_con_hipoclorito_de_sodio_sobre_segmentos_nodales_de_Guadua_angustifolia_Kunth_para_el_establecimiento_del_cultivo_in_vitro/link/5e6e96b4299bf12e23c9e0
- De García, E., & Rafael, M. (1990). Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* " Catimor "). *Agronomía Tropical*, 40(4–6), 281–290. https://www.researchgate.net/publication/320209349_Control_de_la_oxidacion_y_contaminacion_en_microesquejes_de_cafe_Coffea_arabica_Catimor
- Figueroa-Hernández, E., Pérez-Soto, F., & Godínez-Montoya, L. (2015). La producción y el

- consumo del café. In *ECORFAN- Spain*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/64936>
- García, E., & Rafael, M. (1989). Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. 'Catimor') a partir de microesquejes cultivados in vitro. *Agronomía Tropical*, 39(4-6)(Febrero), 249–268. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=045536>
- González, M., Morejón, R., & Portilla, M. (1998). Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo In Vitro de ápices de *Coffea arabica* L. *Cultivos Tropicales*, 19(2), 37–40.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento In Vitro de frutales perennes. *Cultivos Topicales*, 31(4), 58–69. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n4/ctr15410.pdf>
- Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 63–89. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203>
- Kessel, A. (2008). Revisión Bibliográfica. Aplicación de técnicas Biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y la conservación de estas especies. *Cultivos Tropicales*, 29(3), 27–37. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?idp=1&id=193221653005&cid=54904>
- Laguna-Ibarra, Y., Cueva-López, J., Tamariz-Angeles, C., & Olivera-Gonzales, P. (2019). Efecto de reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Senecio calvus* (Asteraceae), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. *Altoandinas, Revista De Investigaciones*, 21(2), 111–121.
- Montes-Cruz, S., Toromoreno-Arévalo, L., Atiaja-Llamba, J., Lalama-Aguirre, J. M., & Salazar-Torres, S. M. (2017). Obtención de embriones somáticos de cafeto a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbón Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador. *Dom. Cien.*, 3(2), 918–942. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5889731.pdf>
- Morales, R. (2017). *Propagación in vitro de café (Coffea arabica L.) -variedades Sarchimor y Geisha- a partir de meristemos axilares y láminas foliares* [Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6113/1/CPA-2017-072.pdf>

- Moreno, L., & Vásquez, E. (2017). *Evaluación de protocolos de desinfección y medios de cultivo para la inducción a callos embriogénicos en café (Coffea arabica) variedad Bourbon en El Salvador* [Universidad de El Salvador]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/16489/1/13101662.pdf>
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In W. M. Roca & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (p. 969). http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf
- Ortiz-Gómez, N., Turiño-Peña, M., & Jiménez-Ferrer, L. (2017). Efecto de diferentes variantes para la desinfección en hojas de Coffea arabica L. en el establecimiento in vitro. *Café Cacao*, 16(1), 9–14. https://www.academia.edu/39917025/Efecto_de_diferentes_variantes_para_la_desinfección_en_hojas_de_Coffea_arabica_L._en_el_establecimiento_in_vitro
- Perez, E. (2017). *Micropropagación y biotización de Jojoba (Simmondsia chinensis L. [Scheider]) mediante bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal*. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/556>
- Quiñones, M., Yafac, N., Garavito-Salini, R., & Principe, L. (2020). Desdiferenciación celular in vitro de Coffea arabica L. “café” Var. Caturra a partir de explantes foliares. *Scientia*, 22(22), 141–148. <https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Scientia/article/view/3573/4350>
- Rojas-Lorz, L. (2018). *Evaluación de los factores que afectan la regeneración in vitro y la transformación genética en café (Coffea arabica L.) mediada por Agrobacterium tumefaciens* [Universidad de Costa Rica]. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/6180>
- Sánchez, K., Cabrera, R., & Jiménez, J. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259–264. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
- Steel, R., & Torrie, J. (1985). *Bioestadística: Principios Y Procedimientos (2.a Ed.)*. (Bogotá, Co). <https://es.scribd.com/document/367574963/Steel-Robert-G-Bioestadistica-Principios-Y-Procedimientos-2ed-pdf>

- Suárez-Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. [https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro Cultivo de Tejidos Vegetales Edición 03-03-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro_Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_Edición_03-03-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N., González, L., Velásquez, J., Rivero, D., Sourd, D., Martínez, F., & Rodríguez, J. (2012). La biotecnología como herramienta para la propagación , conservación y el mejoramiento genético del guayabo. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 14(2), 7–19. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77625401002>