



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



## TESIS

CON EL TEMA:

**“Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya  
(*Hemileia vastatrix*) en plantas de café”**

QUE PRESENTAN:

**LUIS ANGEL GARIBAY MEDINA  
MARIA DE JESUS ROBLES PEREZ**

ASESORA:

**DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES**

REVISORES:

**DR. ISAAC ANDRADE GONZALEZX  
DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI ZAPATA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIEROS EN AGRONOMIA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. MARZO, 2023.



Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **21/febrero/2023**

No. DE OFICIO: D.SA/349/2023  
ASUNTO: Autorización de impresión  
definitiva y digitalización

**C. LUIS ANGEL GARIBAY MEDINA**  
**C. MARIA DE JESUS ROBLES PEREZ**  
**PASANTES DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN AGRONOMÍA**  
**P R E S E N T E**

Dado que el Comité dictaminó como **APROBADA** su TITULACIÓN INTEGRAL OPCIÓN I ( TESIS ), con el tema **“Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (*Hemileia vastatrix*) en plantas de café”** y determinó que dan cumplimiento con los requisitos establecidos, se les notifica que tienen la autorización para su impresión definitiva y digitalización.

Sin otro particular quedo de usted.

**ATENTAMENTE**

*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Educar para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro*

**C. MARÍA ISABEL BECERRA RODRÍGUEZ DE TLAJOMULCO**  
**DIRECTORA DEL PLANTEL**



C.c.p.- Coordinación de Apoyo a la Titulación. - Edificio  
C.c.p.- Minutario. -

MIBR/AIBR/ALOC/mjhc





Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **20/FEBRERO/2023**

No. DE OFICIO: D.SA/DCA/087/2023  
ASUNTO: Liberación de proyecto para  
la titulación integral.

**ICE. ANA LUISA GARCIA CORRALEJO**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**  
**P R E S E N T E**

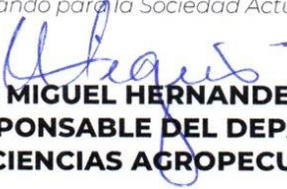
Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

<b>NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:</b>	LUIS ANGEL GARIBAY MEDINA
<b>NO. DE CONTROL:</b>	18940102
<b>PRODUCTO:</b>	OPCIÓN I ( TESIS )
<b>CARRERA:</b>	INGENIERÍA EN AGRONOMIA
<b>NOMBRE DEL PROYECTO:</b>	<b>"Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) en plantas de café"</b>

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro

  
**ING. MIGUEL HERNANDEZ FLORES**  
**RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO**  
**DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



 <b>DRA. MAYRA ITZCALOTZIN</b> <b>MONTERO CORTES</b> Nombre y firma del asesor	 <b>DR. ISAAC ANDRADE GONZALEZ</b> Nombre y firma del revisor	 <b>DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI</b> <b>ZAPATA</b> Nombre y firma del revisor
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

C.c.p.- Expediente.  
MHF/mjhc\*





Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **20/FEBRERO/2023**

No. DE OFICIO: D.SA/DCA/086/2023  
ASUNTO: Liberación de proyecto para  
la titulación integral.

**ICE. ANA LUISA GARCIA CORRALEJO**  
**JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES**  
**P R E S E N T E**

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

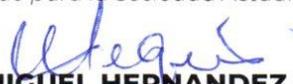
<b>NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:</b>	MARIA DE JESUS ROBLES PEREZ
<b>NO. DE CONTROL:</b>	18940104
<b>PRODUCTO:</b>	OPCIÓN I ( TESIS )
<b>CARRERA:</b>	INGENIERÍA EN AGRONOMIA
<b>NOMBRE DEL PROYECTO:</b>	<b>"Evaluación de métodos de conservación e inoculación de roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) en plantas de café"</b>

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

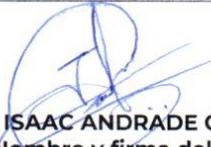
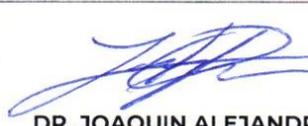
**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro



  
**ING. MIGUEL HERNANDEZ FLORES**  
**RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO**  
**DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

S.E.P.  
TECNM  
14DIT0003B  
IT TLAJOMULCO  
DEPARTAMENTO  
CIENCIAS  
AGROPECUARIAS

 <b>DRA. MAYRA ITZCALOTZIN</b> <b>MONTERO CORTES</b> Nombre y firma del asesor	 <b>DR. ISAAC ANDRADE GONZALEZ</b> Nombre y firma del revisor	 <b>DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI</b> <b>ZAPATA</b> Nombre y firma del revisor
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

C.c.p.- Expediente.  
MHF/mjhc\*



## **Agradecimientos**

Agradecemos a Dios por la vida, a nuestros padres por apoyarnos a lo largo de toda nuestra existencia y por respetar nuestras decisiones.

A la Dra. Mayra I. Montero Cortes por su paciencia y apoyo desde que era nuestra profesora y por aceptarnos en su laboratorio durante las residencias y desarrollo de esta tesis.

Agradecemos a todos nuestros profesores por sus enseñanzas y a nuestros compañeros por estar siempre cerca de nosotros en las buenas y malas brindándonos su apoyo y amistad.

## Resumen

En los últimos años el cultivo de café en diferentes países del mundo y estados de México se ha visto afectado por *Hemileia Vastatrix*, la gravedad de esta plaga compromete la estabilidad de los huertos productores afectando el rendimiento de producción en sus cosechas por lo que se han implementado métodos de control que ayudan a combatir este problema mas no a eliminarlo. En el presente trabajo se realizaron diferentes experimentos cuyo propósito en común es poder realizar estudios de la roya de café en cualquier época del año logrando mantenerla siempre viable para cualquier prueba.

Durante el proyecto se trabajó con cuatro experimentos en los cuales se utilizaron diferentes tipos de material vegetal, el primero fueron semillas de café en una prueba de germinación en la cual permanecieron algunas semanas en medio de cultivo y posteriormente fueron colocadas en sustrato aun in vitro, posterior a realizar una recolección de roya de café y de hacer un raspado a las hojas se extrajo la roya de estas y se aisló para conservarse en refrigeración bajo condiciones óptimas preservando su viabilidad, con esta roya se hicieron los otros tres experimentos. El segundo experimento consistió en realizar la infección de plantas de café in vitro producto del primer experimento, en el experimento número tres de igual manera se realizó una inoculación de roya pero utilizando hojas de plantas adultas dentro de cajas petri y en condiciones de cámara húmeda, finalmente el cuarto experimento consistió en realizar pruebas para evaluar diferentes sustancias y las mezclas entre ellas a diferentes concentraciones para determinar qué tan eficaces serían como crioprotectores buscando utilizar la o las mejores en un proceso posterior de liofilización como método de conservación de las urediniosporas de café.

# Índice

Agradecimientos.....	i
Resumen .....	ii
Índice .....	iii
I. Introducción.....	1
II. Marco Teórico .....	2
2.1 Origen .....	2
2.2 Distribución .....	3
2.3 Clasificación Taxonómica .....	4
2.4 Importancia económica mundial y nacional.....	4
2.5 Generalidades.....	8
2.5.1 Características botánicas y fisiológicas .....	11
2.5.1.1 Morfología del fruto.....	14
2.5.2 Aspectos taxonómicos .....	15
2.5.3 Estructura genética .....	16
2.6 La germinación.....	17
2.6.1 Proceso de la germinación de semillas .....	17
2.7 Fitohormonas .....	18
2.8 Cultivo in vitro .....	19
2.8.1 Componentes nutricionales de los medios de cultivos.....	21
2.8.1.1 Principales componentes de los medios de cultivos: .....	21
2.8.2 Problemas asociados al cultivo in vitro .....	23
2.9 Propagación del cultivo de café .....	24
2.9.1 Propagación sexual .....	24
2.9.2 Propagación asexual .....	25
2.9.2.1 Propagación por injertos.....	26
2.9.2.2 Propagación por estacas .....	26
2.9.2.3 Propagación por esquejes. ....	27
2.9.2.4 Cultivo de tejidos.....	27
2.9.2.4.1 Propagación por organogénesis (microesquejes o microestacas).....	28
2.9.2.4.2 Propagación por embriogénesis somática .....	28
2.10 Principales plagas y enfermedades relevantes en cultivo de café. ....	31
2.10.1 Principales plagas del café.....	31

2.10.2 Principales enfermedades del café.....	33
2.10.2.1 Introducción al género de Roya ( <i>Hemileia vastatrix</i> ).....	35
2.10.2.2 Clasificación taxonómica .....	36
2.10.2.3 Impacto económico de la plaga a nivel mundial .....	37
2.10.2.4 Aspectos biológicos y ecológicos.....	38
2.10.2.4.1 Ciclo de vida .....	38
2.10.2.4.2 Descripción morfológica .....	38
2.10.2.4.3 Daños y síntomas .....	39
2.10.2.5 Aspectos epidemiológicos .....	40
2.10.2.5.1 Epidemiología de la plaga .....	40
2.10.2.5.2 Sobrevivencia .....	40
2.10.2.5.3 Dispersión.....	40
2.10.2.5.4 Multiplicación.....	41
2.10.2.6 Control químico de la roya en planta de café.....	42
2.10.2.7 Control biológico de la roya de café.....	42
2.10.2.7.1 Control biológico clásico. ....	43
2.10.2.7.1.1 Control biológico aumentativo .....	43
2.10.2.7.1.2 Control biológico mediante conservación .....	44
2.10.2.7.2 Manejo integrado del cultivo de café (MIP) .....	44
2.10.2.7.3 Microorganismos antagonistas .....	44
2.10.2.7.3.1 <i>Trichoderma Harzianum</i> .....	44
2.10.2.7.3.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	45
2.11 Fotorreceptores.....	45
2.11.1 Fotometría .....	47
2.11.2 Luz LED .....	49
3. Justificación.....	51
4. Objetivos.....	52
Objetivo general:.....	52
Objetivos específicos:.....	52
5. Materiales y métodos .....	53
5.1 Ensayo de germinación de semillas y desarrollo de plántulas café ( <i>Coffea arabica</i> ) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible .....	53
5.1.1 Localización del experimento.....	53

5.1.2 Material vegetal .....	53
5.1.3 Protocolo de desinfección de semillas de café .....	54
5.1.4 Preparación de Medio de Cultivo para la germinación .....	54
5.1.4.1 Esterilización de medio de cultivo y herramientas de trabajo de laboratorio .....	55
5.1.5 Siembra de las semillas en medio de cultivo .....	56
5.1.6 Establecimiento del experimento.....	56
5.1.7 Evaluación de la germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas de café.....	57
5.1.8 Diseño experimental .....	57
5.2 Ensayo: Aislamiento, Viabilidad y Métodos de conservación (Liofilización) de la roya del café.....	58
5.2.1 Material vegetal .....	58
5.2.2 Raspado de hojas para extracción de roya.....	58
5.2.3 Desinfección de las Uredinosporas.....	58
5.2.4 Suspensión de roya en agua destilada.....	59
5.2.5 Lectura de uredinosporas de roya mediante cámara de Neubauer .....	59
5.2.6 Pruebas de liofilización de crioprotectores.....	59
5.2.6.1 Disolución de crioprotectores .....	59
5.2.7 Liofilización de roya en crioprotectores.....	60
5.2.7.1 Determinación de células viables .....	61
5.3 Ensayo de la infección de la roya en hojas y plantas de café en condiciones in vitro .....	62
5.3.1 Material vegetal .....	62
5.3.2 Material biológico .....	62
5.3.3 Preparación del inoculo .....	62
5.3.3.1 Desinfección de las Uredinosporas.....	62
5.3.3.2 Desinfección de material base y material vegetal .....	63
5.3.4 Inoculación de roya ( <i>Hemileia vastatrix</i> ) en hojas y plantas de café .....	63
5.3.5 Establecimiento del experimento .....	64
5.3.6 Evaluación de infección de hojas y plantas de café en condiciones in vitro .....	65
6. Resultados y discusiones .....	66
6.1 Ensayo No. 1, evaluación de la germinación de semillas de café ( <i>Coffea arabica</i> ) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible .....	66
6.1.1 Ensayo No. 1, evaluación del desarrollo de plántulas de café ( <i>Coffea arabica</i> ) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible .....	70
6.1.2 Ensayo No. 2, evaluación de la germinación de semillas de café ( <i>Coffea arabica</i> ) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible .....	73

<b>6.2 Ensayo: Aislamiento, Viabilidad y Métodos de conservación (Liofilización) de la roya del café.....</b>	<b>80</b>
<b>6.2.1 Evaluaciones (Pruebas de liofilización de crioprotectores.) .....</b>	<b>80</b>
<b>6.2.2 Evaluación (Disolución de crioprotectores).....</b>	<b>84</b>
<b>6.2.3 Determinación de células viables .....</b>	<b>85</b>
<b>6.3 Ensayo de la infección de la roya en hojas y plantas de café en condiciones in vitro .....</b>	<b>87</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>95</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>97</b>

## I. Introducción

Esta tesis tiene como propósito presentar el proceso y los resultados del proyecto en el que se estuvo trabajando a lo largo de estas semanas en conjunto a otro compañero de ingeniería y uno más de maestría.

La roya del café *Hemileia Vastarix* está clasificada taxonómicamente como parte del reino *Fungi*, de acuerdo con la norma internacional para medidas (NIM) n°5, glosario de términos fitosanitarios, cumple con la definición de plaga cuarentenaria, ya que esta plaga se encuentra presente bajo control oficial en el país y puede causar pérdidas económicas en cultivos hospedantes.

El cultivo del café es considerado como el producto agrícola más importante en el comercio internacional y una mínima reducción en el rendimiento o un ligero aumento en los costos de producción de este cultivo por efecto de *Hemileia Vastatrix*, puede tener un gran impacto en los cafecultores y en los países cuyas economías son totalmente dependientes de las exportaciones (APS, 2011)

Se decidió trabajar en este proyecto debido a la necesidad de implementar una estrategia para conservar la roya y posteriormente encontrar la mejor estrategia para su control y erradicación. Para lograr evaluar los métodos de inoculación y conservación de roya era necesario tener plantas de café por lo cual a inicios del proyecto se trabajó con semillas las cuales fueron sembradas en medio de cultivo MS para germinación en frascos de cristal bajo medios estériles en campana de flujo laminar, a pesar de seguir los protocolos de desinfección de semillas, de materiales y herramientas la mayoría de las repeticiones se vieron involucradas con contaminación por trichoderma, posterior a esto se estuvo realizando el cambio de medio de cultivo y la desinfección de las semillas antes de pasarlas de un frasco a otro, algunas aún sin germinar, se trabajó con 5 tratamientos diferentes los cuales constan de luz de diferentes colores; luz blanca, luz morada, luz azul luz roja y el último tratamiento fue bajo la oscuridad. Semanalmente se realizó una evaluación detallada de cada una de las semillas tomando cuatro parámetros; la germinación, oxidación fenólica, contaminación y la mortandad de semillas.

Para trabajar con la roya fue necesario realizar una recolección de hojas extraídas de plantas adultas provenientes de una donación de un pequeño huerto de traspatio de una persona del municipio de Tlajomulco para posteriormente en laboratorio realizar un raspado para aislar las

urediniosporas aun amarillas. El propósito de aislar la roya fue facilitar el manejo de esta para empezar con la evaluación de los métodos de conservación e inoculación.

Para la conservación de la roya se trabajó con leche descremada, trehalosa, glicerol y combinaciones de estos tres crioprotectores en diferentes concentraciones, algunas repeticiones pasaron por la autoclave para su esterilización y algunas otras no, obteniendo como resultado que 6 de las combinaciones de leche descremada con los otros crioprotectores eran más viables que el resto.

## **II. Marco Teórico**

### **2.1 Origen**

Todavía no está claro cómo nace y se populariza la palabra “café”. Las primeras formas de la palabra en inglés (coffee), en francés (café), en alemán (kaffe) y en italiano (caffè) indican una derivación del árabe y/o del turco (Diccionario de etimología, 2021).

La historia del café empieza en el cuerno de África, en Etiopía, sobre el siglo IX. Se sabe el origen geográfico, la provincia de Kaffa, pero no el momento exacto, ya que no existen documentos sobre cuándo el hombre empezó a consumir granos de café.

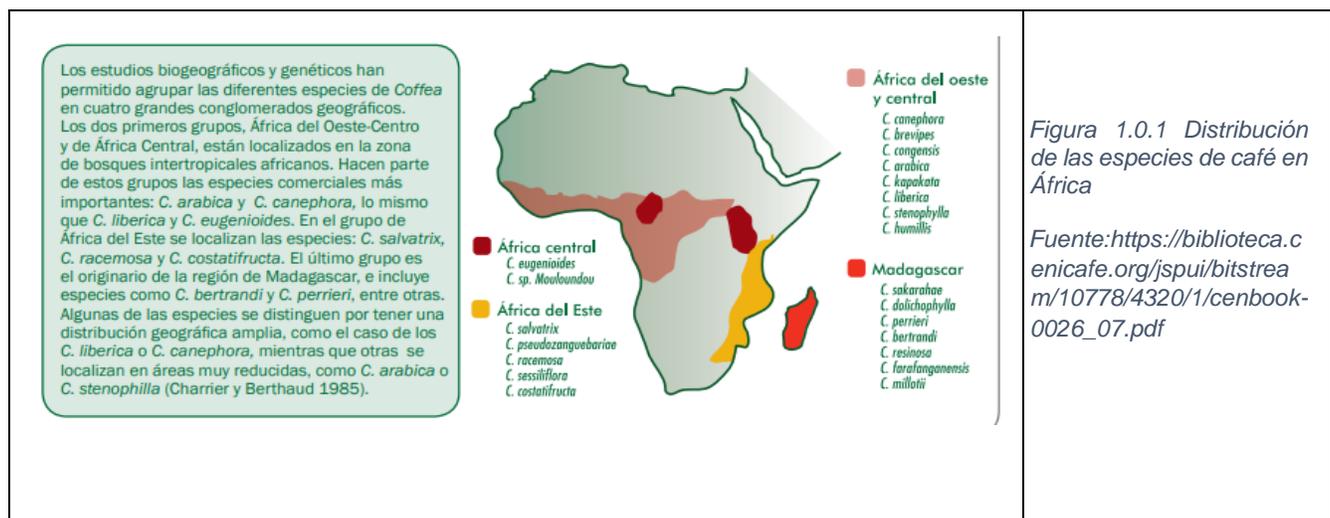
A lo largo de los siglos, se narraron numerosas leyendas e historias sobre el origen y descubrimiento del café. La más reportada es sobre un pastor llamado Khaldi o Kaldi que notó que sus cabras, incluyendo la más vieja, estaban frenéticas; en otras palabras, corrían y brincaban. Al mirar esto, se dio cuenta de que sus cabras estaban actuando de esta manera extraña después de comer bayas rojas de un arbusto. Estas bayas rojas eran los frutos del café, las drupas carnosas que cubrían las semillas del café (Yılmaz, Acar-Tek, & Sözlü, 2017) (Crozier, Ashihara, & Tomas-Barberan, 2011). Conocer el origen y la fecha exacta de este evento no es sencillo, pero se sabe que la planta silvestre del café (*Coffea arabica*) es originaria de Etiopía, donde fue descubierta alrededor del año 850 d.C. (Folmer, 2016).

No está claro cómo, cuándo y quién exportó el café a Arabia, pero está establecido que el primer país al que se llevó café para cultivar desde Etiopía fue Yemen (antigua Arabia Felix). Posteriormente, desde Yemen se exportó café a la India (1600), Sri Lanka (Ceilán; 1600–1696), Java (1690 y 1699) y Reunión (Borbón; 1715 - 1718). A mediados del siglo XV, los árabes comenzaron a consumir café como bebida, y luego se introdujo en otros países en diferentes momentos, como Roma en 1625, Francia en 1644/1671, Oxford en 1650, Londres en 1652, Marsella en 1659, Ámsterdam en 1663, París en 1675, Hamburgo en 1679, etc. La

llegada del café a Europa se atribuye a un comerciante holandés a principios del siglo XVII y, a principios del siglo XVIII, se embarcaron las primeras plantas a Ámsterdam (Folmer, 2016) (Teketay, 1998).

## 2.2 Distribución

El café pertenece a la gran familia de las *Rubiaceas*, compuesta por 500 géneros y más de 6.000 especies, la mayoría de origen tropical y con amplia distribución geográfica. A esta familia pertenecen no solamente el café (género *Coffea*) sino también árboles frutales como el borojó (*Borojoa patinoi*), *Ixora sp.* y plantas medicinales como la ipecacuana (*Psychotria ipecacuanha*), o la *Cinchona spp.*, de la cual se extrae la quinina (Bridson, 1988). De todos los géneros que constituyen las Rubiaceas, el género *Coffea* es el de mayor importancia económica. De acuerdo con diferentes estudios, este género originario del África, se considera reciente al compararlo con otros grupos taxonómicos como los relacionados con el conglomerado de los *Rosides* donde se encuentran especies vegetales como el arroz (*Oriza sativa*) y *Arabidopsis thaliana*. Actualmente el café se clasifica dentro del conglomerado filogenético de los *Asterides*, del cual hace parte entre otros, el género *Solanum* del que se separó hace aproximadamente 89 millones de años. De las 103 especies descritas en el género *Coffea*, 41 son originarias del África continental, donde se distribuyen a lo largo de la zona tropical húmeda (Figura 1.0.1). Aproximadamente 59 se encuentran silvestres en la isla de Madagascar, mientras que al menos tres, son originarias de las islas Mascarenas, particularmente de Mauricius y las Islas de la Reunión (Davis et al., 2006).



## 2.3 Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica del café

<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden:</b>	<i>Gentianales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Rubiaceae</i>
<b>Subfamilia:</b>	<i>Ixoroideae</i>
<b>Tribu:</b>	<i>Coffeae</i>
<b>Género:</b>	<i>Coffea</i>

(Peter, 2006)

## 2.4 Importancia económica mundial y nacional

El café es uno de los productos básicos agrícolas más comercializados en el mundo y sustenta los medios de subsistencia de 100 millones de personas en todo el mundo (Pendergrast, 2010). Solo en 2014, aproximadamente 26 millones de agricultores en 52 países cultivaron más de 8,5 millones de toneladas de café, acumulando un valor de US\$39 mil millones en esos países (Hirons, y otros, 2018). El valor minorista del café es significativamente más alto, con ventas que alcanzaron los \$ 87 mil millones en los Estados Unidos en 2019 (Rhiney, y otros, 2021). Los pequeños agricultores, por lo general con terrenos de 5 hectáreas o menos, dominan la producción en la mayoría de las principales regiones de cultivo.

América Latina es una región clave para la producción de café, ya que representa aproximadamente el 60 % del suministro mundial de café y el 80 % del café arábica mundial (ITC 2011). Millones de agricultores, trabajadores agrícolas y otros trabajadores en toda la región dependen de la producción, compra y procesamiento del café para su sustento (Canet Brenes et al. 2016) (CABI 2018). El café siempre ha desempeñado un papel integral en la economía de la región, y las exportaciones de café continúan siendo una fuente importante de generación de ingresos, aunque la contribución general del café al PIB nacional ha disminuido en las últimas décadas (CABI 2018).

Los principales productores de café son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopia, Honduras, Uganda, India, Guatemala, Perú, México, Nicaragua, China, Mlasia y Costa Rica (Figura 1.0.2).

En Brasil, mayor productor de café en el mundo, los sistemas de producción consisten en extensas plantaciones de monocultura sumamente tecnificada y un fuerte uso de sustancias agroquímicas. En México, por contraste, el café lo producen generalmente cafetaleros organizados a nivel de comunidad, con parcelas menores de dos hectáreas, sobre pendientes costeras y bajo la sombra de múltiples estratos de agrobosque. El origen de esta situación se remonta a la historia agraria y cultural del país, la sabiduría autóctona literalmente se apropió de este cultivo exótico y lo adecuó a los sistemas agroforestales nativos. Una buena parte de la caficultura orgánica se realiza en comunidades indígenas de los estados de Oaxaca, Chiapas, Guerrero y algunos otros estados.

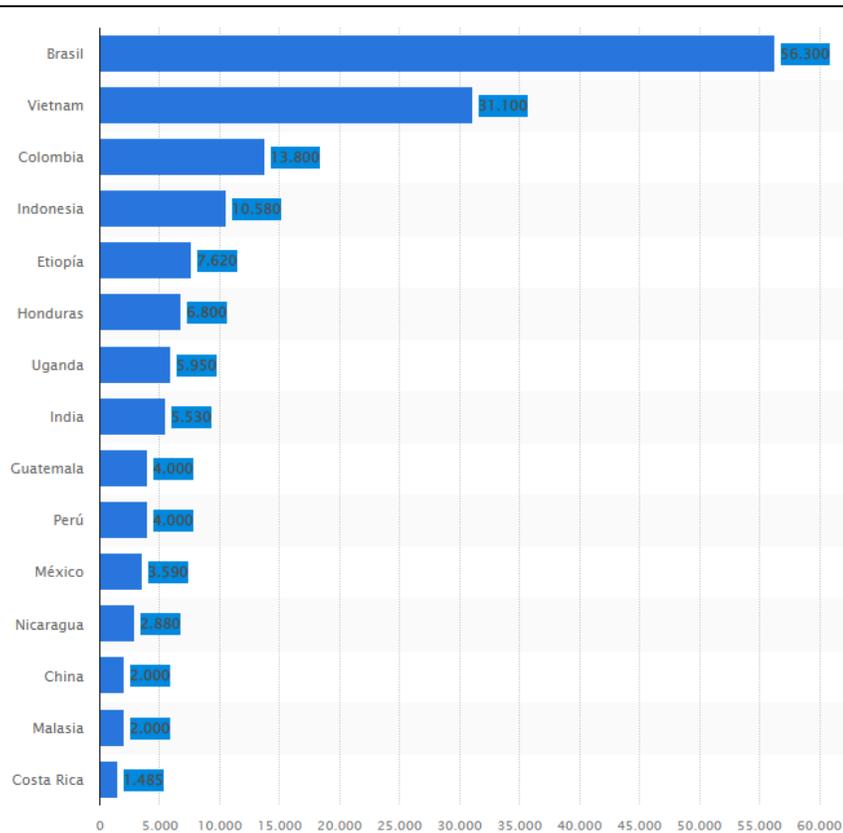


Figura 1.0.2 Ranking de los 15 principales países productores de café a nivel mundial en 2022 (en miles de sacos de 60 kilogramos)

Fuente: <https://es.statista.com/estadisticas/600243/ranking-de-los-principales-productores-de-cafe-a-nivel-mundial/>

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), México ya no ocupa un lugar relevante en cuanto a la producción de café en el mundo, Nuestro país se encuentra en el 11º lugar en cuanto a la producción mundial de café (CEDRSSA, 2019).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en su más reciente reporte México: Café anual 2019, señala que nuestro país emplea a más de 515,000 productores, de los cuales 310,000 de ellos cultivan una hectárea, con el 85% de población indígena; ubicándose en 15 estados y 480 municipios.

Durante el ciclo cafetalero 2017/2018 se destinaron 712,015 hectáreas al cultivo del café, de la cuales se cosecharon 629,798 hectáreas. El 94.1% de la producción se ubica en cinco entidades del país siendo la cafecultura una actividad predominante gracias a los volúmenes de producción logrados por sus condiciones geográficas y climáticas: los estados como Chiapas aporta 41.3%, Veracruz el 24.4%, Puebla el 15.8%, Oaxaca 8.2%, Guerrero el 4.5% y otros estados sólo participan con 5.9% de la producción nacional (Figura 1.0.3).



\*Fuente: SIAP

Figura 1.0.3 Producción de café cereza en México, principales estados, durante el ciclo 2017/2018

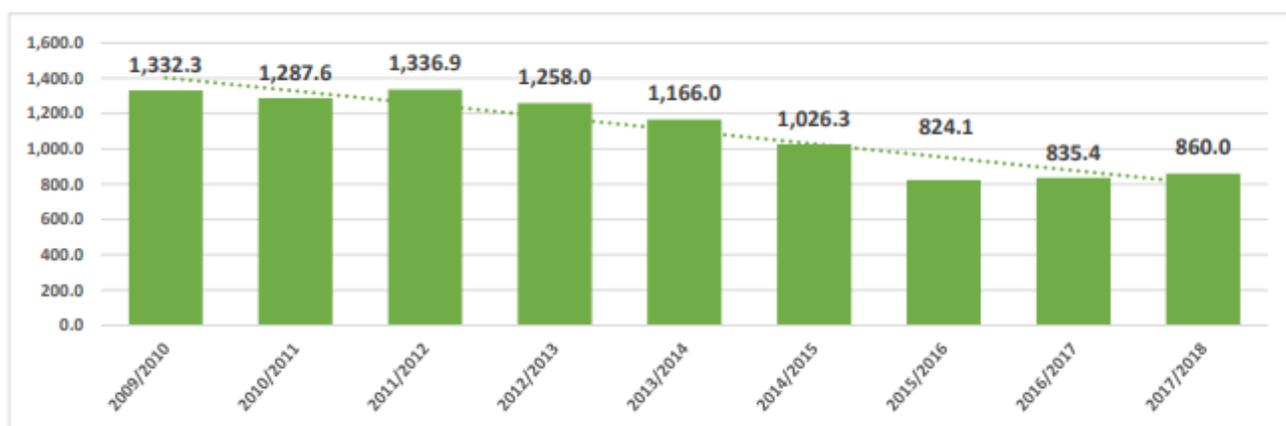
Fuente:<http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/94Caf%C3%A9%20-Producci%C3%B3n%20y%20Consumo.pdf>

Aproximadamente el 96% del café producido en el país es variedad Arábica, mientras el 4% es Robusta. Además, cabe subrayar que el 3.2% de la superficie cultivada en café es orgánico (CEDRSSA, 2019).

México es el mayor exportador de café orgánico del mundo, 50% que representa una quinta parte del volumen total de café).

Para el presente año de 2019 la producción de café, incremente debido a la incorporación de 200,000 hectáreas cultivadas del grano.

Durante el ciclo 2017/2018 la producción del café cereza se ubicó en 860.0 millones de toneladas, que represento un incremento de 2.9% respecto al año anterior, aunado a que durante el ciclo 2015/2016 se registró una disminución en la producción de este grano. Durante los últimos años, la producción de café cereza se redujo a una tasa promedio anual de 4.7% (Figura 1.0.4).



\*Fuente: SIAP

Figura 1.0.4 Producción anual de café cereza en la última década (miles de toneladas)

Fuente:<http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/94Caf%C3%A9%20-Producci%C3%B3n%20y%20Consumo.pdf>

En años recientes, la presencia de la roya del café en las entidades productoras es el principal factor que explica la reducción en la cosecha nacional del café.

La producción de café, se ha visto afectada por los efectos del cambio climático, debido al aumento de la temperatura, aunado a la disminución de las precipitaciones fluviales, lo cual genera que no se cubran las necesidades naturales para la producción agrícola. El café necesita un rango óptimo de temperatura y condiciones hídricas particulares para su producción.

Otro factor que perjudica la producción de café es la Roya del café, plaga que ha afectado el sector cafetalero en México desde 2012, lo que, ha provocado una reducción en la producción

de más de 50% entre 2012 y 2016, propiciando el debilitamiento de árboles y e infecciones severas, que tienen como consecuencia la muerte de la vegetación (CEDRSSA, 2019).

## 2.5 Generalidades

El cafeto es una planta arbustiva o un árbol de poca altura, 4.5 a 6 metros, aunque en condiciones silvestres puede alcanzar mayor altura. La corteza del tronco es de color gris claro y las hojas de unos doce centímetros de largo son de un verde oscuro brillante. Las flores son pequeñas, blancas y olorosas; la floración que sólo dura unos cuantos días atrae a los insectos polinizadores. El estilo puede ser muy largo y sobresalir de la corola. El fruto se clasifica como una drupa indehisciente, formado por dos semillas. Cada semilla tiene una grieta muy característica, la cual se conoce como la “*sutura coffeanum*” (Davis et al., 2006). Los frutos se desarrollan durante los 6 a 7 meses siguientes a la floración; son bayas llamadas cerezas que maduran de un color carmesí brillante. dentro se encuentran, cubiertos por una pulpa dulce, dos semillas o granos y más raramente sólo uno. Una planta tarda de 5 a 8 años para estar en plena producción y esta dura de 15 a 20 años.

En la actualidad dos tercios de todo el café se cultivan en América Latina donde llegó vía Europa en el siglo XVIII. De las numerosas especies de cafeto, sólo tres son de importancia comercial, pero dos solamente se utilizan ampliamente, ***Coffea arabica*** es la que más se cultiva y tiene la mayor demanda, crece en tierras altas, entre mil y dos mil metros. ***C. robusta*** es una variedad más resistente que se cultiva a menor altura y lluvia; es importante en la preparación de mezclas y es utilizada para elaborar café instantáneo, aunque ambas variedades son de gran importancia económica existen diferencias notorias entre ellas (Tabla 2). ***C. liberica*** es también resistente y de tierras bajas.

Algunos cafetos tienen un rendimiento de 0.9 a 1.3 kg (2 a 3 lb) aunque se considera como promedio anual 0.45 kg (1lb). La cosecha del café es una actividad que ocupa una mano de obra numerosa y calificada. La cosecha mecánica es relativamente reciente y se realiza en

grandes plantaciones, después se tienen que separar las cerezas maduras de las no maduras para lo cual se han diseñado métodos ópticos.

El café siempre se cultivó bajo la sombra de árboles hasta hace unos 30-40 años. En los años setenta unos caficultores empezaron a plantar arbustos enanos que producen cosechas más altas y no requieren de sombra, pero sí de fertilizantes y plaguicidas y cuidados constantes. Se talaron los árboles de sombra.

El procesamiento de las cerezas puede ser por vía húmeda (café lavado) lo que aumenta el sabor ácido del café o por vía seca.

**Tabla 1. Diferencias entre el café Arábica y el Robusta**

	<u>Arábica</u>	<u>Robusta</u>
<b>Fecha de descripción de la especie</b>	1753	1895
<b>Cromosomas (2n)</b>	44	22
<b>Tiempo que tarda desde la flor hasta la cereza madura</b>	9 meses	10 - 11 meses
<b>Floración</b>	después de las lluvias	Irregular
<b>Cerezas maduras</b>	Caen	Quedan
<b>Rendimiento (kg granos/ha)</b>	1.500 - 3.000	2.300 - 4.000
<b>Raíz</b>	profunda	poco profunda
<b>Temperatura óptima (media anual)</b>	15 -24° C	24 - 30° C
<b>Precipitación pluvial óptima</b>	1.500 - 2.000 mm	2.000 - 3.000 mm
<b>Crecimiento óptimo</b>	1.000 - 2.000 m	0 - 700 m
<b>Hemileia vastatrix</b>	susceptible	Resistente
<b>Koleroga</b>	susceptible	Tolerante
<b>Nematodos</b>	susceptible	Resistente
<b>Traqueomicosis</b>	resistente	Susceptible
<b>Enfermedad del fruto del café</b>	susceptible	Resistente
<b>Contenido de cafeína del grano</b>	0,8 - 1,4%	1,7 - 4,0%
<b>Forma del grano</b>	Chato	Alargado
<b>Características típicas del café bebida</b>	Acidez	amargor, pleno
<b>Cuerpo</b>	promedio 1,2%	promedio 2,0%

En México cabe distinguir cinco sistemas de producción según el nivel de manipulación o manejo al cual se expone el ecosistema original.

1. **El sistema rusticano tradicional o de montaña** simplemente sustituye las plantas (tanto arbustivas como herbáceas) que crecen en el suelo del bosque tropical y/o templado por arbustos de café. Este sistema afecta mínimamente el ecosistema forestal original, pues conserva la cubierta vegetal original, bajo la cual se implantan los cafetos.
2. **El sistema de policultura tradicional** constituye la etapa más avanzada de la manipulación del ecosistema forestal nativo. Igual que en el caso anterior, el café se introduce bajo la cubierta del bosque original pero aquí el café se cultiva junto a numerosas especies de plantas beneficiosas nativas o introducidas (por ejemplo, favoreciendo o eliminando el crecimiento de ciertas especies de árbol). De este sistema nace un exuberante "huerto de café" con gran variedad de especies arbóreas, arbustivas y herbáceas naturales y cultivadas.
3. **El sistema de policultura comercial** sustituye los árboles del estrato superior del bosque original por árboles de sombra que agregan nitrógeno al suelo o son útiles para algunos fines comerciales. Además del café, se cultivan cítricos, plátano y otros cultivos comerciales.
4. **El sistema de monocultura bajo sombra.** Este sistema, al igual que el quinto tipo, fue introducido en México hace dos veinticinco años. Se utilizan árboles leguminosos (especies de Inga) para sombra de los cafetos; es una plantación monoespecífica bajo una cubierta de copas igualmente especializada. En este sistema el uso de productos agroquímicos es una práctica obligatoria y la producción va dirigida a la creación de productos orientados exclusivamente hacia el mercado.
5. **El sistema de monocultura sin sombra.** Es un sistema de carácter totalmente agrícola, desprovisto del carácter agroforestal que se evidencia en los sistemas anteriormente citados. No dispone de cubierta arbórea alguna y los arbustos de café se encuentran expuestos al pleno sol. Es una plantación especializada cuyo sistema de producción requiere un alto grado de insumos y fertilizantes químicos y plaguicidas, el

uso de maquinaria y mano de obra intensiva a lo largo del ciclo anual. Bajo este sistema se alcanza el rendimiento más alto por unidad de superficie.

Se estima que en México entre 60 y 70 por ciento del café se produce en agrobosques de policultura tradicional y comercial (Sistemas 1, 2 y 3), entre 20 y 30 por ciento en el sistema de monocultura bajo sombra (Sistema 4) y un 10 por ciento al sol (Sistema 5).

### **2.5.1 Características botánicas y fisiológicas**

El cafeto pertenece a la familia de las rubiáceas. Esta familia tiene características fáciles de reconocer:

- Las hojas salen en pares.
- No tienen divisiones y los bordes son lisos.
- En las flores están los órganos de los dos sexos, son flores hermafroditas.
- Generalmente cada fruto tiene dos semillas.

- **La raíz**

Es un órgano de mucha importancia; a través de ella la planta toma el agua y los nutrientes necesarios para su crecimiento y producción. En la raíz se acumulan sustancias que más tarde van a alimentar las hojas y los frutos, y que hacen que el árbol permanezca anclado y en su sitio.

El cafeto tiene una raíz principal que penetra verticalmente en suelos sin limitaciones físicas, hasta profundidades de 50 centímetros. De esta raíz salen otras raíces gruesas que se extienden horizontalmente y sirven de soporte a las raíces delgadas o absorbentes, llamadas también raicillas. Las raíces absorbentes del cafeto son bastante superficiales y se encargan de tomar el agua y los nutrientes minerales. En los primeros diez centímetros de profundidad del suelo se encuentran un poco más de la mitad de estas raicillas y el 86% en los primeros 30 centímetros (Venegas, 2016).

- **Tallo y ramas**

El tallo o tronco y las ramas primarias forman el esqueleto del cafeto.

Los aspectos más sobresalientes de la morfología aérea de la planta del café tienen que ver con dos tipos de brotes:

- **Ortotrópicos**, que crecen verticalmente y comprenden el tallo principal y los chupones.
- **Plagiotrópicos**, que crecen horizontalmente y comprenden las ramas primarias, secundarias y terciarias.

En los nudos del tallo principal se encuentran varios tipos de yemas:

- Las que dan origen a las ramas primarias.
- Los chupones que son el potencial de brote de la zoca y permanecen mientras se conserve el cogollo del tallo principal.
- Otras yemas que forman flores.

Las ramas primarias no se pueden renovar. Al perderse una rama primaria, el cafeto pierde una zona muy importante para la producción de frutos. En el cafeto la cosecha se produce casi en su totalidad en las ramas nuevas. A mayor número de ramas nuevas, mayor será la cosecha futura.

- **La hoja**

La hoja es un órgano fundamental en la planta porque en ella se realizan los procesos de fotosíntesis, transpiración y respiración.

En las ramas, un par de hojas aparece cada 15 ó 20 días aproximadamente.

Independiente de la densidad de siembra, un cafeto de un año de edad tiene 440 hojas en promedio. A partir del segundo año de edad, la densidad de siembra, al igual que la condición de sol o sombra, influyen notablemente en la cantidad de hojas por planta.

Las hojas duran en un cafetal alrededor de un año. La duración de las hojas se reduce con la sequía, con las altas temperaturas y con una mala nutrición.

- **La flor**

Las flores son los órganos destinados a reproducir las plantas. Las flores dan origen a los frutos; sin flores no hay cosecha.

Las flores del cafeto aparecen en los nudos de las ramas, hacia la base de las hojas, en grupos de 4 o más, sobre un tallito muy corto llamado glomérulo. En la base de cada hoja hay de 3 a 5 glomérulos.

La cantidad de flores presentes en un momento determinado, depende de la cantidad de nudos formados previamente en cada rama.

El proceso de formación de las flores del cafeto puede durar de 4 a 5 meses, donde se presentan las siguientes etapas:

- Iniciación floral y diferenciación.
- Un corto período de latencia.
- Renovación rápida del crecimiento del botón floral.
- Apertura de las yemas.

La fecundación de la flor ocurre cuando un grano de polen se pone en contacto con el óvulo. Si éste recibe el polen de la misma flor, se da la autofecundación. En el cafeto la autofecundación es un poco mayor del 90%. (Venegas, 2016)

- **El fruto**

Del resultado de la unión del grano de polen con el óvulo se forman el fruto y las semillas. En el desarrollo del fruto del café se pueden distinguir cuatro periodos:

- **Primer periodo:**
  - Es una etapa donde hay muy poco crecimiento en tamaño y peso del fruto.
  - Va desde la fecundación hasta la sexta semana.
- **Segundo periodo:**
  - En esta etapa el fruto crece rápidamente en peso y volumen.
  - Se necesita el agua, de lo contrario el grano se queda pequeño, hay secamiento, caída de frutos y se presenta el “grano negro”.
  - También es denominada como la etapa de formación del grano lechoso.
  - Va desde la sexta a la décimasexta semana después de la fecundación.
- **Tercer periodo:**

- El crecimiento exterior del fruto casi no se nota.
- Se da una gran demanda de nutrientes.
- Se endurece la almendra.
- Si falta agua, el fruto no termina de formarse bien y se produce el grano averanado.
- Va de la décima sexta a la vigésima séptima semana después de la fecundación.
- **Cuarto periodo:**
  - Es la época de maduración o cambio de color del fruto.
  - Va de la vigésima- séptima a la trigésima- segunda semanas después de la fecundación.
- **La semilla**

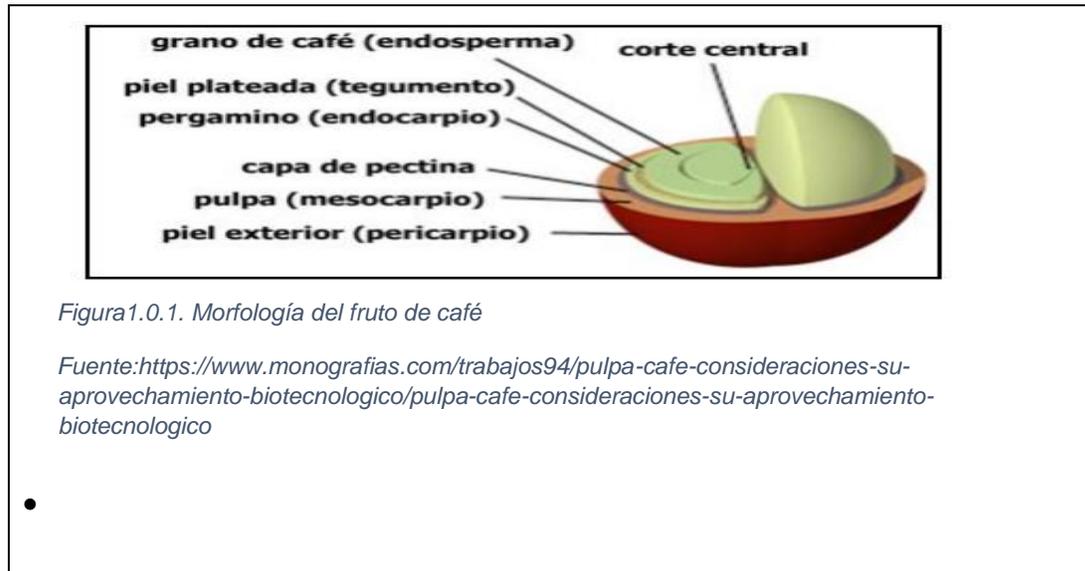
Se compone de dos partes: Almendra y Pergamino.

  - **La Almendra** es dura y de color verdoso, está cubierta de una película plateada cuando está seca, y del embrión que es una planta muy pequeña que está dentro de la almendra y se alimenta de ella en los primeros meses de desarrollo de la planta. La parte roja o amarilla del fruto maduro se conoce con el nombre de pulpa.
  - Protegiendo la semilla, hay una cubierta llamada **pergamino** que está cubierta de una sustancia azucarada que es el “mucílago” o “baba”. Al café seco se le denomina pergamino (Venegas, 2016).

### 2.5.1.1 Morfología del fruto

- **Pericarpio:** Es de color rojo amarillo en su madurez, jugoso y envuelve todas las demás partes del fruto.
- **Mesocarpio:** Es el mucilago o baba de consistencia gelatinosa y color cremoso.
- **Endocarpio:** Es el pergamino o cascarilla de color crema a marrón que envuelve la semilla.
- **Espermoderma:** Piel plateada que envuelve la semilla.
- **Endospermo:** Es la semilla o grano del café propiamente constituido.

- **Embrión (corte central):** Localizada en la superficie convexa de la semilla y representado por un hipocótilo y dos cotiledones.



## 2.5.2 Aspectos taxonómicos

A fines del siglo XIX se descubrieron en los bosques tropicales de África numerosas especies del género *Coffea* (Chevalier, 1947), basado en sus características morfológicas y su distribución geográfica las organizó en cuatro secciones o grupos taxonómicos: *Argocoffea*, *Paracoffea*, *Mascarocoffea* y *Eucoffea*. Esta última sección, que agrupa los verdaderos cafetos, fue a su vez, subdividida en cinco subsecciones a saber: *Pachycoffea*, *Nanocoffea*, *Melanocoffea*, *Mozambicoffea* y *Erythrocoffea*. El criterio de clasificación de estos grupos taxonómicos está dado por la presencia de caracteres como la textura de las hojas, el tamaño de las plantas, el color de los frutos y la distribución geográfica.

Como consecuencia de los avances en los métodos de clasificación, así como el descubrimiento reciente de otras especies de café en las zonas de origen, la clasificación taxonómica del género ha sufrido diversas reestructuraciones (Leroy m, 1980) (Bridson, 1987). Actualmente se considera que la mayoría de las especies de la sección *Argocoffea* (Que agrupa arbustos o plantas trepadoras de África Occidental y Central), hacen parte del género *Argocoffeopsis*, mientras que muchas de las especies de la sección *Paracoffea* (Generalmente arbustos encontrados en India y el sureste de Asia), no se clasifican dentro del género *Coffea*

sino dentro del género *Psilanthus* Hook. Finalmente, de las cuatro secciones inicialmente consideradas por Chevalier, solamente las secciones *Mascarocoffea* y *Eucoffea*, han permanecido como grupos taxonómicos relativamente estables.

De acuerdo con Leroy (1980) los cafetos se clasifican dentro de la tribu *Coffeae*, cuyas características principales son tener ovarios con dos carpelos, cada uno con un sólo óvulo, placentación axilar, endocarpo duro, una semilla cubierta por un parénquima delgado (Que da origen al pergamino), y la presencia de la sutura *coffeanum*. Para este autor, los dos géneros más relacionados son: *Coffea* y *Psilanthus*.

Las diferencias entre *Psilanthus* y *Coffea* están básicamente en la morfología y localización de las flores y en las características del polen. En *Coffea* generalmente la antera y el estilo emergen, el tubo de la corola es de la misma longitud que los lóbulos y el polen predominantemente tricorporado (Tres aperturas laterales), mientras que las flores son inflorescencias axilares (Bridson, 1988; Stoffelen, 1998). En *Psilanthus* por su parte, las anteras no emergen, el estilo es corto, el tubo de la corola es más largo que los lóbulos y el polen tiene cuatro a cinco colpos o aperturas laterales. Las flores son terminales y en algunas especies axilares. Estas diferencias, aunque importantes no son absolutas, haciendo que la separación o fusión de estos dos géneros continúe siendo una cuestión que necesita más investigación.

### **2.5.3 Estructura genética**

Desde el punto de vista genético, los cafés tienen un número cromosómico básico de 11 ( $x=11$ ), y todas las especies son diploides ( $2n = 2x = 22$ ), con excepción de la especie cultivada *C. arabica* la cual es tetraploide ( $2n = 4x = 44$ ). *C. arabica* se formó hace aproximadamente 50.000 años a partir de la hibridación natural entre dos especies relacionadas con *C. eugenoides* y *C. canephora* (Lashermes et al., 1999; Cenci et al., 2012). Su forma de reproducción es preferentemente autógama, al igual que las especies silvestres *C. heterocalyx*, *C. charrierii* y *C. anthonyi*; mientras que las demás especies del género son preferentemente alógamas o de polinización cruzada (Bridson 1988; Davis et al., 2006; Stoffelen et al., 2008). Esta característica se traduce, entre otras cosas, en una amplia diversidad morfológica que se refleja en multitud de formas, colores y texturas en sus frutos, hojas y semillas.

## **2.6 La germinación**

La mayoría de las semillas se dispersan en un estado maduro seco, si estas no son latentes y las condiciones del medio ambiente son favorables, ocurrirá como primer evento la germinación (Weitbrecht et al., 2011) que inicia con la emergencia de la radícula de la cubierta de la semilla. En este proceso el embrión de la planta sale del estado de reposo, se movilizan los nutrientes almacenados y se superan las barreras de los alrededores para la elongación, división y desarrollo celular (Finkeinstein et al., 2008). Por lo tanto, la germinación es la reanudación del crecimiento activo del embrión que se traduce en la aparición de una nueva planta (Kumar et al., 2012).

La transición desde la semilla hasta la germinación es una experiencia drástica (Donohue et al., 2010); sin embargo, contribuye al establecimiento de las plantas en el ecosistema natural y agrícola (Weitbrecht et al., 2011). Además, la germinación es especialmente importante para la adaptación de la planta porque al ser una de las primeras etapas de transición de la vida establece el marco para su posterior desarrollo y la selección natural. Las condiciones ambientales que provocan la germinación son aquellas que el nuevo germinante debe enfrentar (Donohue et al., 2010).

Muchas especies vegetales presentan determinados requisitos para la germinación, como condiciones ambientales específicas o incluso secuencias de factores ambientales para romper la latencia y provocar la germinación. Las condiciones bajo las cuales una semilla germina influirán no solo en la supervivencia de las plántulas, sino también en la expresión fenotípica de los rasgos postgerminación. Por lo tanto, la germinación tiene el potencial de influir en la evolución de los rasgos expresados durante toda la vida de las plantas (Donohue et al., 2010).

### **2.6.1 Proceso de la germinación de semillas**

La germinación de las semillas requiere de la interacción de hormonas, como giberelina (GA), ácido abscísico (ABA) y etileno (Chaudhuri et al., 2013). Además de efectos de especies reactivas del oxígeno que pueden estar relacionadas con el éxito de la germinación, debido a que tienen un papel importante en el debilitamiento del endospermo, protección contra patógenos y la muerte celular programada (Pedrosa y Souza, 2013). Existen dos fuerzas opuestas que proporcionan el mecanismo fisiológico para el control de la germinación de las semillas: el aumento del potencial del crecimiento del embrión y el debilitamiento moderado de

las diversas capas que cubren a las semillas, incluyendo el endospermo (Linkies y Leubner-Metzger, 2012). También es importante el vigor para fomentar la capacidad del embrión incrustado dentro de la semilla y reanudar su actividad metabólica de una manera coordinada (Rajjou et al., 2012). Berndt (2014) señala que las semillas maduras de la mayoría de las angiospermas tienen una capa exterior llamada testa y un endospermo, incluyendo la zona de crecimiento embrionario conocido como eje de hipocótilo radicular inferior. Durante la germinación, la ruptura de la testa y el endospermo permite que emerja la primera raíz (radícula).

La germinación implica tres etapas principales; la primera corresponde a la hidratación o imbibición, cuando las semillas absorben suficiente cantidad de agua antes de que ocurra el metabolismo vigoroso de la germinación. El agua es absorbida por ósmosis, que es accionada por la existencia y alta acumulación de soluto en las células de las semillas, seguido por la activación de la enzima y la movilización de las reservas e hidratos de carbono, grasas y reservas de proteínas en los cotiledones o endospermo, para apoyar el renovado desarrollo del embrión. Sin embargo, para que se produzca con éxito la emergencia de las plántulas, es importante que las cubiertas sean permeables para la captación de agua, además del agua disponible y la duración de la imbibición (Singh et al., 2004). El signo visible de que la germinación se ha dado es, generalmente, la penetración de la radícula en la estructura que rodea al embrión. Los eventos posteriores incluyen la movilización de las reservas asociadas con el crecimiento de la plántula (Ajiboye, 2010).

## 2.7 Fitohormonas

- **Auxinas.** (Taíz & Seieger, 2006) señala que las auxinas se han usado comercialmente en agricultura y horticultura desde hace más de 50 años. Los primeros usos comerciales fueron la prevención de la caída de frutos y hojas, la estimulación de la floración, la inducción de frutos partenocárpicos, el engorde de la fruta y el enraizamiento de esquejes para la propagación de la planta.
- **AIA.** El ácido indol acético (AIA) fue la primera hormona en ser aislada e identificada en el año 1934, fue denominada auxina natural. Esta es sintetizada en los meristemas y en tejidos en crecimientos, su movimiento es lento y basipeto (Gargía ,1991).  
El ácido indol acético (AIA) actúa al ligarse a un receptor de naturaleza proteica, forma un complejo receptor –hormona que es específico, reversible, saturable y de alta

afinidad; este activa un promotor que controla la expresión de los genes que codifica la síntesis de las enzimas catalizadoras de los compuestos de la pared. Durante la elongación celular, el ácido indol acético (AIA) actúa momentáneamente sobre la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, con un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (Marassi, 2004).

En forma natural sus principales acciones son inducción a partenocarpia en los frutos, incrementa la dominancia apical, favorece la elongación celular, incrementa la producción de etileno, retarda la abscisión, entre otras (Marassi, 2004).

El AIA es ampliamente utilizado en la formulación de medios, pero es sensible a la degradación enzimática y a la fotooxidación (Krikorian, 1991) (Gonzales, 2003).

- **Citocininas.** Las citocinas son hormonas vegetales naturales que activan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citoquina. Son elaborados en zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces (Infojardin, 2008).
- **La Kinetina** o 6-furfurilaminopurina es un compuesto que fue obtenido por Miller en 1955 y se ubica dentro del grupo de las citoquininas. Es el descubrimiento más importante en la búsqueda de compuestos que podrían inducir a las células a multiplicarse. La Kinetina no se puede considerar un producto natural de la biosíntesis de la planta ya que se obtiene a partir de la de oxiadenosina que es un producto de la degradación del ADN. Ésta hormona tiene varios efectos en diversos sistemas de crecimiento vegetal, que parece afectar la translocación de compuestos solubles nitrogenados. Entre sus efectos fisiológicos están la habilidad de promover la división y elongación celular, además de romper la dormancia (Ayerbe, 1990).

## 2.8 Cultivo in vitro

El establecimiento de cultivos in vitro mediante la siembra de semillas ofrece grandes ventajas para la propagación:

- Proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para llevar a cabo la micropropagación.
- Es una manera de conservar plántulas con variabilidad genética natural.

- Es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de hacer en condiciones normales (Fay, 1992) (Pierik, 1993).

La germinación in vitro tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales, ya que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogeneizar la germinación (López-Encina y González-Padilla, 1996).

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en emplear una porción de planta denominada explante, y brindarle todas las condiciones ambientales para que exprese su “potencial intrínseco o inducido” (Roca & Mroginski, 1991; citados por Jadán et al., 2010).

Esta técnica es conocida como propagación in vitro porque se lleva a cabo en frascos o recipientes transparentes, se desarrolla en condiciones estériles empleando una dieta balanceada de hormonas y nutrientes, contenida en un medio de cultivo que busca la regeneración de órganos, tejidos e incluso plantas enteras (Abdelnour & Escalant, 1994; citados por Jadán et al., 2010).

Esta técnica constituye herramienta de propagación vegetativa, y al igual que en otros casos, la descendencia presenta las mismas características que la planta madre, es decir, son clones de la planta que la originaron, hecho que no ocurre por la vía sexual donde se originan individuos únicos (Abdelnour & Escalant, 1994; citados por Jadán et al., 2010).

El éxito de esta técnica radica en la capacidad de desdiferenciar a las células del explante y devolverles su capacidad de especializarse y multiplicarse en cualquier tipo de tejido (Cubero, 2003).

El principal beneficio del cultivo in vitro, como vía de propagación, es la producción uniforme de plantas que conservan los mismos caracteres de la planta de origen (López et al., 2001).

Teniendo en cuenta los costos de producción, relativamente altos de las plantas in vitro, es recomendable utilizar esta técnica para propagar plantas que realmente vayan a tener un impacto económico positivo en la producción y calidad del café (Dublin 1991).

Se han documentado procedimientos de micropropagación de café entre ellos se destaca el de Dublin con el que se puede obtener hasta 20,000 plántulas aproximadamente en un año a partir de una yema, esto es un altísimo rendimiento para la propagación in vitro (Ayala 2013). Este método consiste en utilizar las yemas obtenidas de una planta in vitro y de ella propagar

más. Existe otro método desarrollado por Nakamura y Sondahl el cual consiste en establecer yemas ortótropas para la propagación mediante brotes del microesqueje primario, con este método se logra conseguir 7.5 brotes por yema en promedio de seis meses (Ayala 2013).

### **2.8.1 Componentes nutricionales de los medios de cultivos**

En los cultivos in vitro cada planta, y por consiguiente todo órgano o tejido, deben ser considerados como un caso particular. Para los cultivos vegetales se hace necesaria la adición de macro y microelementos, todos deben estar presentes en el medio acuoso en estados de iones.

#### **2.8.1.1 Principales componentes de los medios de cultivos:**

- **Sustancias orgánicas:** como componentes esenciales son: la sacarosa, vitaminas y aminoácidos han sido los más utilizados en los medios de cultivo in vitro como fuente de carbono, aunque para determinadas especies se utilizan más la glucosa.
- **Vitaminas:** favorecen el crecimiento celular; la tiamina es un suplemento vitamínico indispensable para los cultivos in vitro, los cuales, en su ausencia, son difícil de proliferar; también se utilizan el ácido nicotínico, riboflavina biotina y piridoxina, presentando efectos favorables en los cultivos vegetales (Hidalgo, 2014).
- **Aminoácidos:** bajo la forma de un hidrolizado proteico (caseína) favorecen la formación de callos, organogénesis y/o embriogénesis (Hidalgo, 2014).
- **Hormonas vegetales (fitohormonas):** son necesarias para el metabolismo de la planta y se conocen diferentes clases de reguladores de crecimiento:
  - **Auxinas.** Las auxinas influyen en el crecimiento de órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento celular y la mitosis en los meristemos secundarios inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución. Los más importantes son: ácido indolacético (AIA que son auxinas naturales) y ácido indolbutírico (AIB que son auxinas sintéticas). Generalmente son utilizadas en rangos de 0,001 mg/L, donde los mejores resultados se han obtenido entre 0,1 mg/L. (Lucas, 2002).
  - **Citoquininas.** constituyen un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular. mediante procesos citocinínico, las células vegetales son transformadas en otro tipo de células para formar un órgano en particular, ya sean raíces, hojas, flores o frutos, ya que cada uno tiene diferentes tipos de células. estas específicas hormonas son las encargadas de causar el

efecto diferenciación celular, de “dar la orden” y de dirigir el proceso, en el cual intervienen otras sustancias con las que las citocininas realizan esta tarea conjuntamente. Vegetales, las más importantes son: zeatina (natural), kinetina y la bencilaminopurina (BAP o BA, sintética). La más utilizada es el BAP, que es un compuesto muy activo y de fácil conservación, se lo utiliza en concentraciones de 0,03 mg/L. Sin las citocininas, probablemente no habría diferenciación de órganos (Ecured, 2017).

- **Giberelinas.** También conocida como ácido giberélico, estimulan el alargamiento celular de los entrenudos del tallo y pedúnculos florales, rompen la dormancia de gran número de brotes y semillas. Las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicos involucrados en varios procesos de desarrollo en vegetales. A pesar de ser más de 100 el número hallado en plantas, sólo son unas pocas las que demuestran actividad biológica. Su descubrimiento en plantas se remonta a la época de los años 30, cuando científicos japoneses aislaron una sustancia promotora del crecimiento a partir de cultivos de hongos que parasitaban plantas de arroz causando la enfermedad del “bakanoe” o “subida de las plantas”. El compuesto activo se aisló del hongo *Gibberella fujikuroi* por Eichi Kurosawa en 1926 por lo que se denominó “giberelina”. El efecto del hongo sobre las plantas afectadas consistía en un notable incremento en altura, aunque con fuerte merma en la producción de grano. El mayor crecimiento se debió al alto contenido de este factor de crecimiento producido por el ataque fúngico (Malonek et al., 2005).
- **Inhibidores de crecimiento.** El ácido abscísico es un inhibidor de crecimiento y desarrollo, que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras, en el cultivo in vitro, especialmente en las plantas leñosas, inhibe la producción de fenoles, evitando oxidación. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo in vitro para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas (Salisbury & Ross, 1994).

## **2.8.2 Problemas asociados al cultivo in vitro**

### **Contaminación**

Razdan (2003) nos indica que la presencia de microorganismos en los cultivos in vitro reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo. La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora (Razdan, 2003).

Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas, a pesar de esto, el material puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el tratamiento de quimioterapia y uso de antibióticos o de y termoterapia (Razdan, 2003).

Resultados de Paris Moreno (2015) se observó un porcentaje de contaminación de 45 y 50 % en el pre tratamiento B a los 30 días. En la regeneración in vitro el mayor número de brotes fue en el medio MS ½, y con los explantes tratados con 0,5 mg/L<sup>-1</sup> de TDZ se logró el mayor número de brotes. En la parte final se recomienda realizar un seguimiento en la aclimatación de caimito que se sometieron al cultivo in vitro para validar el proceso de micropropagación.

Los principales contaminantes que afectan las plantas in vitro, son los hongos y bacterias, éstos son muy comunes en condiciones in vivo y pueden llegar a tener efectos devastadores en condiciones in vitro (Skirvin et al., 1999). Precisamente, debido al uso de medios de cultivo enriquecidos con sustancias nutritivas y azúcar se aumenta la susceptibilidad de los explantes a estos microorganismos.

Siempre que se haga cultivos in vitro, hay que realizarlos dentro de una cámara de flujo laminar, que no esté expuesta a corrientes de aire. La mesa de trabajo, los vidrios, los recipientes y los instrumentos de trabajo deben ser previamente desinfectados. El operario también debe desinfectar sus manos y antebrazos con alcohol al 70%. Todos estos procesos para evitar la contaminación de los cultivos, aseguran la asepsia de los mismos (Radice, 2004).

## 2.9 Propagación del cultivo de café

La reproducción de cualquier ser vivo es la forma de perpetuar la especie, al formar un nuevo individuo a través de otro preexistente. La planta de café, no es la excepción, sin embargo, tradicionalmente se conoce una sola forma de reproducción: a través de semilla. Antes de entrar en el detalle de este tipo de reproducción, se debe considerar que existen dos formas básicas de reproducción: sexual y asexual (Incafe, 2009).

### 2.9.1 Propagación sexual

La reproducción sexual, es aquella en la cual intervienen células sexuales especializadas. Dichas células o gametos, son de dos tipos: masculino (polen) o femenino (ovario). Estas células son producidas por sus respectivas estructuras y órganos, las cuales facilitan la dispersión y unión. En algunas plantas, la flor, que es la estructura de reproducción sexual, produce ambos gametos, o sólo uno. Otras veces, un individuo produce una flor con sólo un tipo de estructura, siendo esta femenina o masculina. En este caso, la planta es dioica, y cuando la flor presenta ambos tipos de gametos, se dice que son monoicas, siendo un ejemplo el café. (Incafe, 2009)

Sin embargo, de las 104 especies hasta el momento descubiertas del género *Coffea*, *Coffea arabica* es la única especie de importancia económica, que es autógama (auto = por ella misma, gama = unión) o autofértil, es decir, que cada una de dichas plantas, por sí solas, pueden generar un embrión viable, producto de la unión de sus propios gametos masculinos (polen) y femeninos (ovarios).

A diferencia de todas las otras especies como *Coffea canephora*, de la cual se derivan variedades como *Robusta* y *Nemaya*, aunque presentan ambas estructuras de reproducción en la misma flor, no son compatibles entre ellos, y por ello se dice que son alógamas (alo = por diferente, gama = unión) o polinización cruzada, es decir, una sola planta no produce frutos, ya que requiere de otra planta de la misma especie, compatible para reproducirse. Debido a lo anterior, la variedad *Nemaya* que es utilizada como porta injertos, ya que fue desarrollada para la resistencia de nemátodos del suelo; es el producto de la combinación de dos plantas de *Robusta* (T 3751 y T 3561), las cuales producen una semilla “híbrida”, es decir, cruzada, la

cual presenta la mitad de las características de cada una de las plantas progenitoras (padre y madre) (Incafe, 2009).

La reproducción sexual de estas especies de polinización cruzada ha permitido en su forma natural, una amplia diversidad, ya que cada vez que existe una combinación entre éstas, la progenie, es decir, la semilla resultante, va a ser una combinación diferente. Esto a su vez, ha permitido que la selección natural se haya encargado de “filtrar” aquellos individuos con mejores características, y apartando aquellos con menores cualidades.



Figura 1.0.2. Fruto, flor y polinización del café. A. Fruto con semilla en el interior. B. Flor de *coffea racemosa*. C. Polinización artificial.

Fuente: [https://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Coffea\\_arabica.htm](https://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Coffea_arabica.htm)

Un gran ejemplo de lo anterior, ha sido el desarrollo de la especie de *Coffea arabica*, la cual es el resultante de la hibridación de dos especies de *Coffea*, a saber, *Coffea eugenioides* y *Coffea canephora*, que, a través de cientos de años, combinó diversas características y perdió casi por completo la autoincompatibilidad (polinización cruzada). Este origen, generó una amplia diversidad en su centro de origen (Etiopía, África), que a lo largo del tiempo ha sido utilizada en pequeña escala, pero desde hace algunas décadas, retomado su importancia.

### 2.9.2 Propagación asexual

Implica que se produce la multiplicación de un individuo, sin que exista la unión de células sexuales, razón por la cual, son consecuencia de la capacidad del individuo de generar a través de un segmento, sea célula, tejido u órgano, otro individuo idéntico a su progenitor. Esta capacidad es comúnmente llamada “totipotencia”, siendo una característica muy notoria en las plantas (Incafe, 2009).

Se trata de un proceso que implica la separación y el enraizamiento de una parte de la planta. De esta manera, las células, Tejidos u órganos desprendidos se desarrollan directamente en nuevos individuos. Las zonas de abscisión tienen que ser precisas (Vivanco, 2008).

En virtud de su capacidad para formar yemas y raíces adventicias, casi cualquiera de los órganos de la planta tiene relación con su propagación vegetativa al sufrir modificaciones que le permiten desarrollarse en un órgano vegetal completo e independiente, con las mismas características genéticas de la planta progenitora. Con base a la potencialidad presente en la naturaleza en lo que respecta a la propagación vegetativa de las plantas, se han desarrollado métodos de propagación inducida, cuya complejidad va desde las tecnologías más rústicas hasta los métodos más tecnificados (Vivanco, 2008). Entre las técnicas más comunes se pueden citar la injertación, estacas, esquejes y cultivo de tejidos.

### **2.9.2.1 Propagación por injertos**

La injertación es un proceso por el cual se injerta una especie de interés comercial (por lo general arábigos) sobre otra especie. El injerto es una práctica utilizada fundamentalmente con miras a mejorar el crecimiento de ciertas especies y de ciertos híbridos o para reducir la duración de las generaciones. Para el caso del café, la injertación, ha sido una técnica muy útil para combatir plagas del suelo, principalmente nemátodos, al emplear el sistema radical de variedades resistentes como el *Nemaya* y algunas variedades de Robusta. La injertación comúnmente empleada en café para este fin, es de tipo hipocotiledonar, la cual aprovecha el desarrollo juvenil de la plántula luego del semillero.

Las técnicas de injerto utilizadas son muy clásicas: injerto de púa por rajadura e injerto por aproximación (Coste, 1968) estableció la técnica de injerto de embriones de café, cuya importancia radica en la recuperación de material que no se hubiera podido salvar en condiciones normales de germinación. Además, esta técnica permite el desarrollo de híbridos entre especies de café genéticamente apartados (Berthouly, 1997).

### **2.9.2.2 Propagación por estacas**

El desarrollo de estacas es otra forma de obtener plantas de un mismo individuo (Incafe, 2009). La reproducción por estacas es una práctica hortícola muy empleada en *Coffea canephora*, especie alógama, debido a la imposibilidad de reproducción uniforme por vía sexual (Solano, 2001).

En la multiplicación vegetativa del café por estacas, se pueden utilizar solamente tallos ortotrópicos, esto debido al dimorfismo vegetativo (Coste, 1968). El número de estacas ortotrópicas que puede producir una planta de café es limitado y en el caso de una multiplicación a gran escala, esto puede conducir a lapsos de tiempo considerables entre la creación de una variedad y su posterior difusión. Además, la reproducción por estacas exige la instalación de jardines clonales, lo que implica diversos problemas, entre ellos el mantenimiento de las superficies utilizadas (Berthouly, 1997). Razón por la cual, el cultivo de tejidos ha procurado ofrecer diversas alternativas experimentales y comerciales, para facilitar el mantenimiento de una planta o multiplicarla a gran escala.

### **2.9.2.3 Propagación por esquejes.**

El esqueje es un tipo de propagación (no reproducción) asexual, consiste en separar de la planta madre una porción de tallo, raíz u hoja que posteriormente se coloca en determinadas condiciones favorables que inducen a la formación de raíces, obteniéndose una nueva planta independiente que en la mayoría de los casos es idéntica a la planta madre (Mangiarua, 2008).

La multiplicación por esquejes consiste en originar una planta completa a partir de un pequeño trozo de tallo, hoja o una raíz de una planta original, habitualmente son trozos de tallo verde, que se utilizan con más frecuencia para reproducir plantas de interior (Solocannabis, 2007).

### **2.9.2.4 Cultivo de tejidos**

A diferencia de las técnicas de propagación tradicional, las de cultivo de tejidos permiten la micropropagación clonal de un determinado genotipo vegetal en un tiempo relativamente corto, útil en programas de mejoramiento genético convencional o por transformación genética. Estas técnicas también son poderosas herramientas para el estudio fisiológicos, de crecimiento y desarrollo, morfogénesis, criopreservación, producción de semillas artificiales, producción industrial de diferentes compuestos químicos, preservación del germoplasma de genotipos élite o la producción de metabolitos secundarios (Menéndez-Yuffá y García, 1998).

El cultivo in vitro de distintas especies de cafeto está registrado a partir de tejidos aislados de todos los órganos, con excepción de la raíz (Baumann y Neuenschwander, 1990).

La propagación in vitro del café puede ser por organogénesis (microesquejes) o embriogénesis somática (Dublin, 1984; García y Rafael, 1989), siendo la última la principal vía de regeneración, ya que presenta la mayor tasa de multiplicación (Baumann y Neuenschwander,

1990); la cual se estableció a partir de distintos explantes, tales como secciones de tallo, hojas, ovarios y estambres (Dublin, 1981).

#### **2.9.2.4.1 Propagación por organogénesis (microesquejes o microestacas)**

La técnica de microestacas del café fue desarrollada separadamente por Dublin en 1980 y en 1984 y por Custer en 1980, Berthouly, 1997, (H. Etienne, 2002). La propagación in vitro por microestacas, consiste en el cultivo de un nudo o entrenudo proveniente del vástago de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas, idénticas, en principio, a la planta madre (Solano, 2001).

Esta técnica comprende tres fases: **I)** instalación del material vegetal in vitro, seguida de la obtención de micro tallos provenientes de la inducción de yemas axilares; **II)** multiplicación de los micro tallos y **III)** enraizamiento in vitro de los micro tallos y su aclimatación a condiciones de invernadero. La principal ventaja de esta técnica es la garantía de una propagación genéticamente idéntica a la planta madre (Juma C, 1994) (Solano, 2001). Sin embargo, esta técnica sigue siendo una metodología costosa ya que tiene una manipulación muy alta, además, que ofrece una tasa de multiplicación limitada (Etienne H, 1999). La alta contaminación por bacterias y hongos y la oxidación fenólica que se manifiesta mediante la aparición de un color café en el medio de cultivo, en el cual se encuentran sembrados los explantes, representan problemas importantes que se presentan al utilizar la técnica de microestacas como metodología de propagación (Girón, 1998). Por estos motivos desde hace varios años las investigaciones se orientaron básicamente hacia el uso de la embriogénesis somática como herramienta de micropropagación (Berthouly y Etienne, 1999; Solano, 2001).

#### **2.9.2.4.2 Propagación por embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es un proceso biológico por medio del cual se obtienen embriones perfectamente organizados a partir de células somáticas. Estos embriones somáticos se desarrollan al pasar por las fases (globular, torpedo y cotiledonar en plantas dicotiledóneas) idénticas a las del embrión cigótico (Ammirato, 1983). Los embriones somáticos presentan una estructura bipolar, con meristemas apicales y radicales en extremos de un mismo eje, en los cuales las características morfológicas son idénticas a las encontradas en los embriones cigóticos (Denchev et al., 1992; Abdelnour y Escalant, 1994; Solano, 2001). Además, los embriones somáticos se caracterizan por no presentar conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991). De manera general, la embriogénesis somática puede obtenerse por

medio de dos estrategias: una, denominada embriogénesis somática directa o embriogénesis somática de baja frecuencia y la otra, conocida como embriogénesis somática indirecta o embriogénesis somática de alta frecuencia.

El primero en establecer exitosamente la regeneración in vitro del café fue Staritsky (1970), a partir de secciones de tallo de brotes ortotrópicos utilizando el proceso de embriogénesis somática indirecta. El primer señalamiento de regeneración por embriogénesis somática en *C. arábica*, a partir de secciones de hoja, fue presentado por Söndahl y Sharp (1977), encontrándose que, a diferencia de otros explantes, las secciones foliares tenían una mayor frecuencia embriogénica (Sondahl & Monaco, 1981). Las hojas más cercanas al ápice de la rama (último par) son las que poseen el mayor potencial embriogénico, según lo señalan Londoño y Orozco (1986) y Noceda et. al. (1998).

Por medio de la embriogénesis somática directa o de baja frecuencia, se obtienen embriones directamente a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo. En la embriogénesis somática directa, las células embriogénicas están presentes y lo único que se requiere para la formación de los embriones somáticos, es la presencia de una sustancia inductora o la eliminación de una sustancia inhibidora, para que estas células reanuden su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico (Sondahl et al., 1991; Quiroz et al., 2006). La embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia, permite la obtención de embriones a partir de callos, mediante el uso de dos medios de cultivo, uno de inducción de un callo embriogénico y otro para la regeneración de los embriones (Denchev et al., 1992; Berthouly y Etienne, 1999).

En general, la inducción de embriogénesis somática requiere que el medio tenga la combinación de una auxina (ácido 2,4-diclorofenoxiacético: 2,4-D) y una citoquinina (cinetina: KIN; ó Bencilaminopurina: BAP), siendo ésta última la de mayor concentración, incrementándose la frecuencia embriogénica al emplear BAP (García y Menéndez, 1987; Neuenschwander y Baumann, 1992; Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996). Sin embargo, Yasuda, et al., (1985); Hatanaka, et al., (1991, 1995); Fuentes, et, al., (2000); Fernández, et al., (2005) y Giridhar, et. al., (2004) obtuvieron una alta frecuencia de embriogénesis somática empleando como único regulador de crecimiento una citoquinina (KIN, BAP, iso-pentiladenina o Tidiazuron (TDZ).

Los embriones somáticos formados bajo estas condiciones pasan por un proceso directo (sin la formación previa de callo), a partir de las células mesofilares en las zonas de corte del explante foliar (Quiroz Figueroa, et.al., 2006; Gatica, et. al., 2007; Pereira, et. al., 2007; Costa de Rezende et. al., 2008), mientras que al utilizar dos hormonas (auxina 2,4-D y citoquina KIN) se distingue una embriogénesis indirecta (Quiroz - Figueroa, et. al., 2002).

Por otra parte, Lanaud (1981) logró obtener plantas haploides por embriogénesis somática a partir de óvulos de *C. canephora*. Sin embargo, se ha obtenido más éxito en la regeneración de haploides a partir de anteras, sometiendo los callos a bajas temperaturas (5°C) por 24-48 h (Ascanio y Arcia, 1994). También se ha incrementado la eficiencia del proceso suplementando el medio de cultivo con 16% de agua de coco (Neuenschwander y Baumann, 1995) y trabajando con microsporas, al pre-tratarlas por 48 h con colchicina (Herrera, et al., 2002). (Tabla 3).

**Tabla 2. Explantes utilizados para el cultivo in vitro de *Coffea spp***

<b>Explante</b>	<b>Especie</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
<b>Secciones de ramas ortotrópicas</b>	<i>C. canephora</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. liberica</i>	ES, Br, Callo	Staritsky (1970), Buckland (1972); De Voort y Townsley (1974) y Townsley (1974) en Herman y Haas (1975); Custer (1980) en Sondahl y Monaco, 1981), Nassuth et.al.(1980), Berthouly et. al. (1987), García y Rafael (1989)
<b>Secciones foliares</b>	<i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. heterocalys</i>	Callo, ES	Crocomo et. al. (1975) en Sondahl y Monaco, 1981); Dublin (1981) ; Herman y Haas (1975), García y Menéndez (1987) ; Michaux-Ferriere et. al.(1989) ; Marques (1993) ; Samson et. al.(2006
<b>Meristemo</b>	<i>C. arabica</i>	Br	Kartha et. al.(1981), Londoño y Orozco (1986a,b); Zok y Dublin (1991)
<b>Tejido endospérmico</b>	<i>C. arabica</i>	Callo	Keller et. al. (1972) en Herman y Haas, 1975
<b>Tejido perispérmico</b>	<i>C. stenophylla</i> , <i>C. congensis</i>	Callo, ES	Monaco et. al. (1974) en Sondahl y Monaco, 1981; Sreenath et. al.(1995)

<b>Pericarpio</b>	C. canephora; C. arabica	Callo	Keller et. al. (1972) en Herman y Haas, 1975
<b>Fruto verde</b>	C. arabica	Callo	Sharp et. al.(1973), Sondahl y Monaco, 1981
<b>Antera</b>	C. arabica, C. canephora, C. liberica, C. racemosa	Callo	Sharp et. al.(1973), Sondahl y Monaco, 1981
<b>Ovarios</b>	C. canephora	Es	Dublin (1981, 1984)
<b>Óvulos</b>	C. canephora	Es	Lanaud (1981)
<b>Embriones cigóticos</b>	C. arabica; C. congensis; C. canephora; C. liberica; C. racemosa	G, ES	Montes (1982), BertrandDesbrunais et. al. (1991), Naidu y Sreenivasan (2004)
<b>Semillas</b>	C. arabica	Callo	Sharp et. al. (1973)
<b>Callo:</b> sólo se desarrolla el callo; <b>ES:</b> regeneración por embriogénesis somática indirecta; <b>Br:</b> regeneración a través de brotes; <b>G:</b> Desarrollo de plántula.			

## 2.10 Principales plagas y enfermedades relevantes en cultivo de café.

La especie *C. arabica* al ser producida por autogamia posee una base genética estrecha y por ende es susceptible a diferentes plagas y enfermedades tales como la roya (*Hemileia vastatrix*), la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*) y la broca del café (*Hypothenemus hampei Ferrari*), mientras que la especie *C. canephora* es menos susceptible, debido a la gran variabilidad genética que presenta, por ser una especie alógama (Berthouly y Etienne, 1999).

### 2.10.1 Principales plagas del café

El cultivo de cafeto es atacado por plagas que si no se controlan debidamente ocasionan graves daños limitando la producción. Existen un gran número de especies de insectos que atacan al cafeto (INMECAFE 1990). (Tabla 4).

**Tabla 3. Principales plagas que afectan el cultivo de Coffea spp**

<b>Insectos</b>	<b>Síntomas y daños</b>	<b>Control Integrado</b>
<b>Broca del fruto del café (<i>Hypothenemus hampei</i> F.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La broca es originaria del África ecuatorial y fue introducida al continente americano a principios del siglo pasado. Actualmente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Registre las floraciones</li> <li>Determine a partir de las fechas de floración, cuándo hay mayor emergencia de brocas.</li> </ul>

	<p>se encuentra prácticamente en todos los países productores de café</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El daño que ocasiona la broca al fruto de café, consiste en perforaciones a los frutos y caída de estos cuando atacan frutos jóvenes.</li> <li>• Reducción de la producción debido a la caída de frutos infestados, la disminución de peso, la pérdida en la calidad del grano y una baja en el valor comercial.</li> <li>• Podredumbre de semillas en frutos dañados, que determinan la maduración y caída temprana en el suelo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determine los períodos críticos de ataque de la broca, esto es, 120 días después de las floraciones principales.</li> <li>• Realice el monitoreo para evaluar la infestación y posición de la broca.</li> <li>• Tenga en cuenta los registros de lluvias (al inicio de la temporada de lluvia hay mayor emergencia de las brocas de los frutos).</li> <li>• Determine el tipo de control a realizar (Biológico o químico).</li> </ul>
<p><b>Minador de la hoja del café (<i>Leucoptera coffeella</i>)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una mariposa pequeña color plateada con las puntas de las alas negras que ataca el cafeto en todas sus etapas de crecimiento.</li> <li>• Las larvas de este insecto comen del tejido entre las capas de las hojas dejando unas manchas color marrón de forma irregular.</li> <li>• Reducen el área fotosintética de la hoja, causa defoliación y como consecuencia hay un pobre desarrollo del tallo y del sistema radical.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantenga un buen programa de abonamiento de las plantas.</li> <li>• Controle los yerbajos.</li> <li>• Para control químico del minador aplique los insecticidas registrados para este propósito siguiendo todas las instrucciones y precauciones que indica la etiqueta del producto.</li> </ul>

<b>Queresas (Coccus viridis) (Saissetia hemisphaerica)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Son insectos chupadores de las partes tiernas de las plantas.</li> <li>• Succionan la savia de los arbolitos causando debilitamiento general y defoliación.</li> <li>• Segregan una sustancia dulce que atrae a las hormigas y al hongo que causa el moho de hollín.</li> <li>• Esta asociación se conoce como la Fumagina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantenga el riego en épocas de sequía.</li> <li>• Puede obtenerse control con los productos recomendados para el minador de la hoja del café.</li> </ul>
------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2.10.2 Principales enfermedades del café

Las enfermedades del cafeto constituyen uno de los factores que reducen la producción cafetalera y su intensidad está en función de las condiciones ecológicas en que se localizan las plantaciones (INMECAFE 1990). (Tabla 5).

**Tabla 4. Principales enfermedades que afectan el cultivo de Coffea spp**

<b>Enfermedades</b>	<b>Síntomas y daños</b>	<b>Control Integrado</b>
<i>Mancha cercosporica u Ojo de gallo (Cercospora coffeicola)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una o varias manchas redondeadas con un halo amarillo en el borde seguido por anillos concéntricos y terminando con un punto color claro en el centro.</li> <li>• Causa caída de hojas en los arbolitos y su deterioro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantenga un programa adecuado de abonamiento a los arbolitos evitando en lo posible las deficiencias de nitrógeno.</li> <li>• Controle los yerbajos.</li> <li>• Aplicaciones de productos registrados a base de cobre son efectivos contra la enfermedad.</li> <li>• Haga aplicaciones uniformes de los fungicidas por debajo de las hojas y cubriendo el todo el follaje de las plantas.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Siga todas las instrucciones y precauciones de la etiqueta.</li> </ul>
<p><i>Sancocho (Rhizoctonia solani y otros)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sus primeros síntomas se manifiestan con un cancro o lesión color oscura y arrugada que rodea completamente el tallo de las plantas.</li> <li>• La lesión progresa a lo largo del tallo y causa debilitamiento, marchitez, necrosis y muerte.</li> <li>• Es un hongo de suelo y las plantas pueden venir contaminadas del germinador.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantenga un ambiente desfavorable al desarrollo del hongo.</li> <li>• Seleccione bien las plántulas del germinador durante el trasplante.</li> <li>• Evite los excesos de humedad regulando el riego y manteniendo un buen desagüe del predio.</li> <li>• Riegue en las primeras horas de la mañana.</li> <li>• Separe las bolsas en la era para mejor aireación.</li> <li>• No use herramientas contaminadas para la siembra.</li> <li>• Elimine las bolsas con las plantas enfermas.</li> <li>• Aplique fungicidas al medio debidamente registrados que sean efectivos contra los hongos causantes de la enfermedad.</li> </ul>
<p><i>Moho de hollín (Capnodium spp.)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es un tizne color negro sobre las hojas de los arbolitos. Se manifiesta especialmente en épocas de sequía.</li> <li>• Generalmente crece bien sobre las secreciones dulces de las queresas. Interrumpe la función fotosintética de las hojas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Similar al control de la mancha cercosporica.</li> <li>• Controle las queresas y otros insectos asociados como se indica más adelante.</li> <li>• El uso de aceites adecuados pueden ser efectivos en el control de la enfermedad.</li> </ul>
<p><i>Roya del Café (Hemileia vastatrix)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manchas color amarillo pálido en la parte superior de las hojas y que contienen un polvillo de color</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Similar al control de la mancha cercosporica especialmente con productos registrados a base de cobre.</li> </ul>

	<p>anaranjado por debajo de éstas.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Causa defoliación severa de las plantas y su deterioro. Afecta su crecimiento y desarrollo.</li> </ul>	
<p><i>Cancro del Tallo</i> (<i>Myrothecium roridum</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En la base de los tallos se presentan canchros o descortezamiento de éstos.</li> <li>• Se desarrollan raíces adventicias en el área superior del cancro.</li> <li>• Los tallos se debilitan y se parten con facilidad. Las hojas nuevas se tornan cloróticas.</li> <li>• La enfermedad puede causar la muerte de las plantas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Siga las mismas instrucciones ofrecidas para el control del sancocho.</li> </ul>
<p><i>Mancha bacteriana</i> (<i>Pseudomonas syringae</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atacan las hojas de los arbolitos en lugares con humedad excesiva.</li> <li>• Forma manchas de color oscuro.</li> <li>• Provoca la caída prematura de las hojas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inspeccione bien el vivero en épocas de alta humedad para detectarla a tiempo e iniciar el control.</li> <li>• Provoque condiciones desfavorables al organismo.</li> <li>• Aplique productos registrados a base de cobre según indicado anteriormente.</li> </ul>

### 2.10.2.1 Introducción al género de Roya (*Hemileia vastatrix*)

El sector cafetalero está sufriendo actualmente una gran crisis debido a la infestación por el hongo *Hemileia vastatrix* conocido comúnmente como roya del café. La roya del café apareció por primera vez en Centroamérica en 1976, pero nunca había afectado la producción tan gravemente como en el ciclo 2012-2013 (PROMECAFÉ e IICA 2013).

La producción de café de la región también se ha visto profundamente afectada por brotes severos de roya del café (una enfermedad causada por el hongo (*Hemileia vastatrix*) que resulta en grandes pérdidas de rendimiento (Avelino et al. 2015; Avelino y Anzueto 2020). Los brotes de roya de la hoja se han extendido por el norte y los Andes de América Latina, pasando de Colombia (2008 a 2011), América Central y México (2012 en adelante) a Perú y Ecuador en 2013. Solo en América Central, la roya del café redujo los rendimientos en un 10– 55% con respecto a los niveles previos a la oxidación (Amico et al. 2020) correspondiente a un estimado de 515 millones de dólares en pérdidas (ICO 2014), condujo a una inseguridad alimentaria y desnutrición generalizadas de los pequeños caficultores y trabajadores (Avelino y Anzueto 2020), provocó un desempleo masivo y aumentó significativamente la migración a América del Norte (Dupre 2018). Aunque la producción de café comenzó a recuperarse a partir de 2014 debido a la implementación de costosas medidas de manejo (como la renovación de cafetales y el aumento del uso de fungicidas), la enfermedad continúa obstaculizando la producción en la región (Avelino y Anzueto 2020).

Este hongo se presenta en la planta como tejido necrótico en las hojas y en los pedúnculos causando la caída de los granos de café. En los últimos años se han desarrollado variedades resistentes a la roya, pero estas son híbridos de los que aún no se tiene gran cantidad de semillas para su propagación sexual. Al establecer métodos de propagación in vitro de este cultivo, se puede hacer una propagación masiva de estas variedades y se puede seleccionar la planta que cuente con las mejores características ya que con este método se obtienen plantas genéticamente iguales. Al utilizar esta técnica de propagación se podrá en un tiempo más corto aumentar la cantidad de plántulas de variedades élite (Ayala 2013).

#### **2.10.2.2 Clasificación taxonómica**

**Dominio:** *Eukaryota*

**Reino:** *Fungi*

**Phylum:** *Basidiomycota*

**Subphylum:** *Pucciniomycotina*

**Clase:** *Pucciniomycetes*

**Orden:** *Pucciniales*

**Género:** *Hemileia*

**Especie:** *Hemileia vastatrix*

### **2.10.2.3 Impacto económico de la plaga a nivel mundial**

La roya es la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial, debido a que provoca la caída prematura de hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de árboles (APS, 2011). A su vez, el cultivo de café es considerado como el producto agrícola más importante en el comercio internacional, y una mínima reducción en el rendimiento o un ligero aumento en los costos de producción de este cultivo por efecto de *H. vastatrix*, puede tener un gran impacto en los cafecultores y en los países cuyas economías son totalmente dependientes de las exportaciones del café (APS, 2011).

Uno de los casos más severos del ataque de esta enfermedad, se reportó en Ceilán (actualmente Sri Lanka), entre los años 1871 y 1878, donde el área establecida para este cultivo se redujo de 68,787 hectáreas a 14,170 hectáreas, finalmente para 1890 se abandonaron las plantaciones no rentables (CAB International, 2016).

En Brasil la no aplicación de medidas de manejo para el patógeno condujo a una reducción del 30 % en el rendimiento (Monaco, 1977). Sin embargo, la implementación de una calendarización de aplicaciones de fungicidas en las zonas cafetaleras de este país tuvo un costo de 67 US/hectárea, lo cual representa el 9 % del valor de las exportaciones de café de esta nación (CAB International, 2016).

En 1983, se tuvo el primer registro de esta enfermedad en Colombia, con pérdidas de hasta un 30 % en cultivos donde no se realizaron acciones de manejo. Recientemente, en este país, durante el período de 2008 a 2011, en algunas variedades susceptibles cultivadas en las principales zonas cafetaleras del país, se presentó un inusual incremento en la incidencia de esta enfermedad, así como una mayor severidad en hojas infectadas (> 30 %) (Cristancho et al., 2012).

La importancia de *H. vastatrix* en México radica en que existe una superficie sembrada con cultivo de café de 730,011 hectáreas con una producción de 824,082.11 toneladas de café cereza con valor de producción de casi 4,524 millones de pesos (SIAP, 2019 con datos del 2017).

## **2.10.2.4 Aspectos biológicos y ecológicos**

### **2.10.2.4.1 Ciclo de vida**

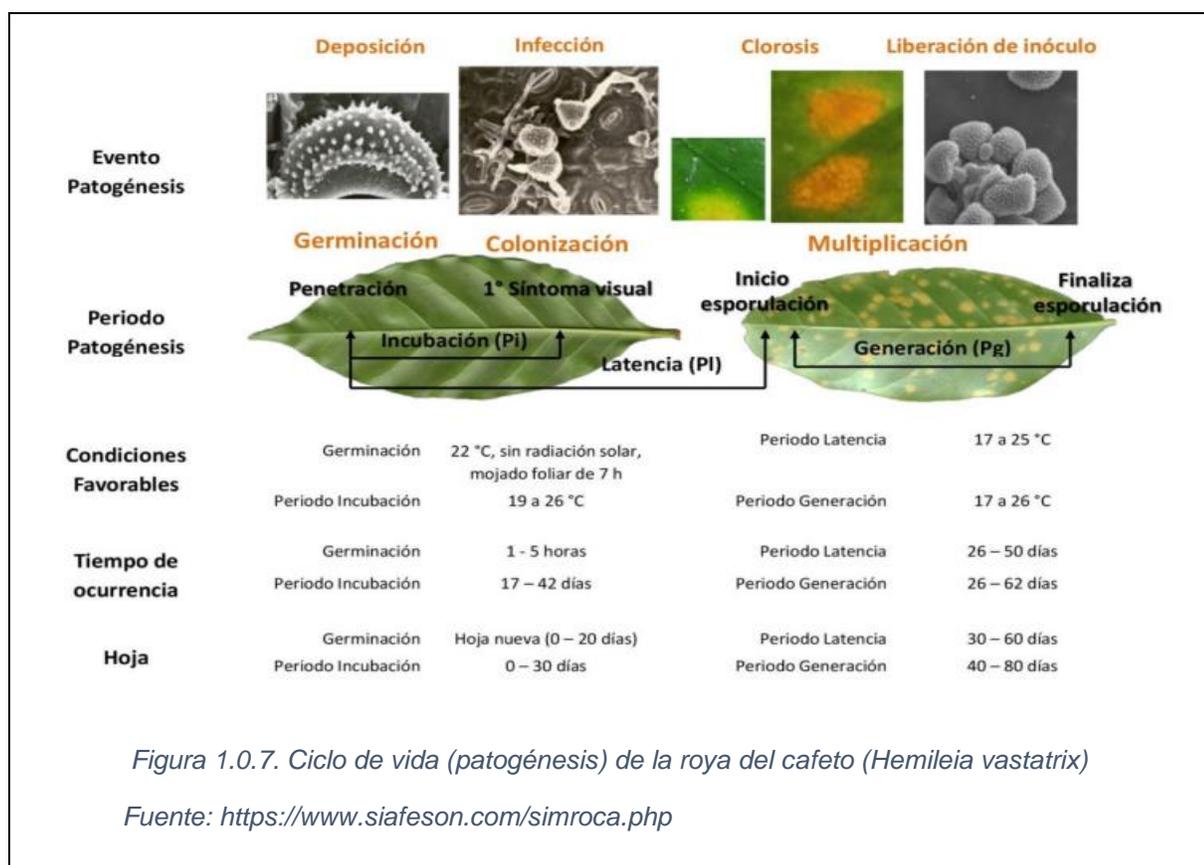
El proceso infectivo de la roya del cafeto comienza cuando los síntomas de la enfermedad aparecen en el envés de las hojas, se observan manchas pálidas que con el tiempo aumentan de tamaño y se unen formando las características manchas amarillas o naranjas, con presencia de polvo fino amarillo, donde se producen las esporas del hongo (Rivillas et al., 2011). La germinación de esporas requiere de la presencia de agua libre por lo menos 6 horas, temperaturas entre los 21-25 °C y condiciones de oscuridad. Bajo estas circunstancias, la formación del apresorio requiere de un período de 5.3-8.5 hr. La germinación se inhibe por la presencia de luz y por la evaporación del agua en las hojas, debido a que estos factores afectan el crecimiento de los tubos germinativos.

Una vez que el hongo ha germinado, penetra las hojas a través de las aberturas naturales (estomas) situadas en el envés de las hojas maduras (Rayner, 1961). Posteriormente, el hongo desarrolla unas estructuras denominadas haustorios, los cuales entran en contacto con las células de la planta y con éstos extraen los nutrientes para el crecimiento. Treinta días, después de la colonización, el hongo está lo suficientemente maduro para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son los encargados de producir nuevas urediniósporas. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de esporas se denomina período de latencia. El período de latencia fluctúa entre 34 y 37 días al sol y entre 31 y 35 días a la sombra (Rivillas et al., 2011). (Figura 1.0.7).

### **2.10.2.4.2 Descripción morfológica**

Las esporas son de tamaño microscópico (30µm de largo x 20µm de ancho) de forma reniforme, lisas en la cara interna y rugosas en la externa, denominadas urediniósporas, y son producidas en grandes cantidades, y corresponden al polvillo amarillo o naranja que se visualiza en el envés de las hojas de café y es característico de esta enfermedad.

Las teliósporas, cuya ocurrencia es muy baja, son de forma redondeada de 20-25µm (Castro et al., 2009).



### 2.10.2.4.3 Daños y síntomas

Los daños severos, mayores al 60 %, causan defoliación. Si la infección ocurre en etapas tempranas se puede presentar una reducción en el rendimiento. Pero si se presenta en etapas tardías el efecto se observará en los niveles de amarre de fruto del siguiente ciclo del cultivo. Los síntomas inician como pequeñas manchas de 1-3 mm, traslucidas y de color amarillo claro. La lesión crece en tamaño y puede coalescer con otras manchas, hasta formar grandes parches con abundante polvo amarillo (esporas), en el envés de las hojas. En el lado opuesto se observan como manchas amarillas. Las lesiones maduras se necrosan, pero la esporulación puede continuar en el margen de la lesión (Castro et al., 2009). (Figura 1.0.8).



Figura 1.0.3 a) Síntomas en el envés de la hoja y b) Síntomas en el haz.

Fuente: [http://www.cesavep.org/descargas/RDC/Ficha\\_Tecnica\\_Roya\\_del\\_cafeto.pdf](http://www.cesavep.org/descargas/RDC/Ficha_Tecnica_Roya_del_cafeto.pdf)

## 2.10.2.5 Aspectos epidemiológicos

### 2.10.2.5.1 Epidemiología de la plaga

*Hemileia vastatrix* necesita condiciones particulares para parasitar las hojas de la planta de café. En general, requiere de la salpicadura del agua de lluvia para iniciar el proceso de dispersión entre hojas y entre plantas, así como de la presencia de una capa de agua en el envés de las hojas para germinar, todo esto acompañado de temperaturas entre 16 y 18 °C y condiciones de baja intensidad luminosa (Kushalapa y Eskes, 1989).

### 2.10.2.5.2 Sobrevivencia

*H. vastatrix* es un parásito obligado, sobrevive únicamente en tejido vivo del hospedante, las urediniósporas pueden sobrevivir hasta por 6 semanas bajo condiciones ambientales secas. No se han reportado hospedantes alternos y no sobrevive en restos del cultivo (APS, 2011).

### 2.10.2.5.3 Dispersión

La dispersión se lleva a cabo mediante las urediniósporas, las cuales son producidas en grandes cantidades y corresponden al polvo amarillo o naranja que se observa en el envés de las hojas. Entre los factores abióticos que favorecen la dispersión del hongo se encuentran el viento y la lluvia. La dispersión local de hoja a hoja o entre plantas, sobre todo en altas densidades de plantación, es favorecida por el salpique de la lluvia. A grandes distancias, el viento juega el papel más importante al dispersar las urediniósporas entre regiones productoras de café (Rivillas et al., 2011; APS, 2011). Adicionalmente, se ha reportado que algunos insectos como trips, moscas y avispas, contribuyen a la dispersión, aunque en

proporciones mínimas. La intervención humana está involucrada en la dispersión a grandes distancias entre continentes y países (APS, 2011).

#### **2.10.2.5.4 Multiplicación**

La multiplicación del hongo ocurre 30 días después de la etapa de infección y colonización del tejido de las hojas, el hongo está lo suficientemente maduro como para diferenciarse en estructuras llamadas soros, que son las encargadas de producir nuevas urediniósporas. Aproximadamente 1600 esporas por milímetro cuadrado (mm<sup>2</sup>) de hoja son producidas, durante un período de 4 a 5 meses, para ser dispersadas e iniciar el nuevo ciclo de infección. El período de latencia puede fluctuar entre 34 y 37 días al sol y entre 31 y 35 días a la sombra (Rivillas et al., 2011).

En investigaciones recientes realizadas por CENICAFE en Colombia, se apreció el efecto de las variaciones climáticas en los últimos años sobre la roya del cafeto, en particular sobre los períodos de incubación y de latencia, los cuales transitoriamente sufren aumentos o disminuciones, dependiendo de las condiciones ambientales, como la temperatura (Rivillas et al., 2011).

Este fenómeno se observa en países como Brasil, Guatemala y México, en este último el comportamiento de la roya del cafeto en la década de 1980 mostró que el mayor incremento de incidencia de la enfermedad ocurrió en los meses de diciembre a marzo, cuando las temperaturas fueron frescas. Sin embargo, los meses más lluviosos, junio a octubre mostraron una correlación negativa, lo cual indica un desfaseamiento con los incrementos de la enfermedad; es decir, aparentemente la lluvia tiene un efecto de lavado sobre las esporas del hongo; que, al término de las lluvias, incrementan exponencialmente la producción de inóculo y severidad de la enfermedad.

Los meses de lluvia coinciden con la época de desarrollo vegetativo de la planta y los picos de incremento de la enfermedad con la época de llenado del fruto y cosecha, mientras que, en los meses de marzo a mayo, presentan temperaturas elevadas y baja precipitación y son restrictivas para el desarrollo de la enfermedad.

El comportamiento con los datos históricos reportados de roya en México muestra que el incremento ocurre durante el invierno (noviembre-febrero). La altitud también influye sobre los niveles de daño, ya que la mayor incidencia ocurre a menos de 800 msnm; mientras que a más de 1000 msnm la incidencia de la enfermedad suele ser menor.

### **2.10.2.6 Control químico de la roya en planta de café**

Los fungicidas a base de cobre fueron, por mucho tiempo, casi los únicos productos utilizados en el control de óxido de café, hasta que a partir de los años 60 surgieron nuevos productos de diferentes composiciones químicas, algunos de amplio espectro, y otros, de uso más específico.

Aunque los fungicidas cúpricos (protectores) presentan eficacia comprobada en el control del óxido, desde que se aplica a intervalos de semanas (Bock, 1962), los fungicidas sistémicos presentan ventajas en relación con los protectores por ejercer un efecto curativo sobre las nuevas lesiones y la inhibición de la esporulación de las lesiones viejas. Los fungicidas sistémicos, entre ellos los del grupo químico de los triazoles, lanzados en el mercado después de 1976, han demostrado una elevada eficiencia en la reducción del inóculo residual, permitiendo el retraso del inicio de las pulverizaciones y la reducción de su número, cuando se aplican por medio de pulverizaciones o a través del sistema radicular (Silva- Acuña, 1990).

### **2.10.2.7 Control biológico de la roya de café**

El control biológico puede definirse como el uso de un organismo para suprimir las actividades y poblaciones de otro organismo y se ha utilizado para manejar insectos plaga, patógenos y malas hierbas y otros tipos de plantas no deseadas.

En el control biológico, se utilizan las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980).

El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente, y no presenta problemas de residuos. Anteriormente el control biológico de enfermedades vegetales consideraba el uso exclusivo de organismos vivos para contrarrestar a los organismos patógenos, sin embargo, esta definición ha sido extendida a derivados de organismos e incluso a compuestos químicos que pueden mimetizar o disparar respuestas en la planta. Aunque la validación de estos productos en su mayoría ha sido bajo condiciones controladas, falta la transferencia a nivel de campo, para diferentes cultivos de importancia. Este conocimiento ha provocado una evolución del concepto del control biológico o manejo orgánico a un término

mucho más adecuado como es un manejo de cultivo de bajo impacto ambiental. El control biológico actual puede clasificarse de acuerdo con su mecanismo de acción en 3 tipos principales (Sid Ahmed et al., 2000; Castro-Rocha, 2012):

- 1.- Microorganismos antagonistas.
- 2.- Fortalecedores o precursores de la actividad antagónica u organismos benéficos.
- 3.-Inductores de mecanismos de defensa vegetal.

El control biológico de organismos tipo roya ha sido evaluado en muchos cultivos con buenos resultados y en el caso del café se han usado microhongos y bacterias de la superficie de las hojas) para control de roya del café (Ganley et al., 2008, Jackson et al., 2012.)

La recurrencia de las epidemias de roya junto con el impacto socio-económico y ambiental que conlleva la prevención, manejo y control de las mismas, principalmente mediante el uso de químicos fungicidas, son motivos significativos para más investigación y desarrollo de alternativas de control.

En el caso del café, se han aislado hongos y bacterias endófitas a partir de hojas, frutas, raíces y semillas en diferentes países de América, África y Asia, con el propósito de caracterizar su diversidad y estudiar su potencial de controlar plagas y patógenos de este cultivo.

En cuanto a búsqueda de controladores biológicos de *H. vastatrix* en el microbioma del café, se han reportado especies de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* con capacidad de inhibir la germinación y reducir la incidencia de (Shiomi et al., 2006).

#### **2.10.2.7.1 Control biológico clásico.**

Uso de un agente de control biológico que proviene del mismo sitio de origen y que ha coevolucionado con el organismo que se quiere controlar.

##### **2.10.2.7.1.1 Control biológico aumentativo**

Detección de enemigos naturales del organismo que se quiere controlar en sitios diferentes a su lugar de origen y el posterior aumento de los niveles del mismo en áreas seleccionadas para que los mismos supriman las actividades o poblaciones del organismo a ser controlado. En el caso particular del café se ha evaluado esta estrategia para control biológico de *H. vastatrix* usando bacterias endofíticas y se han obtenido resultados prometedores en Brasil (Shiomi et al., 2006.)

#### **2.10.2.7.1.2 Control biológico mediante conservación**

Manejo del ambiente para incrementar la sobrevivencia, capacidades fisiológicas y/o efectividad de un agente de control biológico sobre un organismo blanco en un área específica (Barbosa 1998)

#### **2.10.2.7.2 Manejo integrado del cultivo de café (MIP)**

Los métodos de combate, formados por un número variable de tácticas, pueden ser operados en un programa de MIP. Estos incluyen desde la utilización de medidas legales, como la erradicación y las cuarentenas, hasta la manipulación de los cultivos, las plagas y sus enemigos naturales (Andrews, 1989). Además de los métodos legales, en el MIP se incluyen el uso de enemigos naturales (combate biológico), el uso de cultivares de cultivos resistentes o tolerantes a enfermedades e insectos, una serie amplia de prácticas agrícolas, y el uso de los combates mecánicos, físicos, etológicos, autocidas y químicos.

Tipos de plaguicidas, según sus orígenes y propiedades: sintéticos o naturales, insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, rodenticidas, otros.

- Agentes de combate biológicos: microorganismos, parasitoides y depredadores.
- Tácticas de combate con prácticas agrícolas.
- Tipos de cultivares resistentes. (Coronado, 2000)

#### **2.10.2.7.3 Microorganismos antagonistas**

En el control biológico de fitopatógenos, los organismos antagonistas juegan un papel muy importante por presentar características de agresividad, persistencia, rápido crecimiento, desarrollo y capacidad de colonizar el medio donde se encuentra el agente causal de la enfermedad, aun en condiciones de “stress” nutricional.

El antagonismo como mecanismo se basa en la actividad inhibitoria directa que ejerce un microorganismo sobre otro y que presenta acciones opuestas en un mismo sistema (Cotes, 1993). En la micro-biota del suelo existe una gran variedad de microorganismos que ejercen actividad antagónica contra patógenos de plantas, manteniendo de esta manera un equilibrio natural (Trapero, 2000).

##### **2.10.2.7.3.1 Trichoderma Harzianum**

El género *Trichoderma sp.* son unos de los organismos saprofitos naturales del suelo, los cuales le proporciona ventajas, tales como antibiosis, competencia por nutrientes, espacio y micoparasitismo, mecanismos que actúan coordinadamente. Su importancia en el proceso de bio-control depende de la cepa de *Trichoderma* empleada, al hongo que se requiere controlar,

el tipo de planta o cultivo y algunas condiciones ambientales, como pH, disponibilidad de nutrientes, humedad relativa, temperatura y concentración de hierro (Benítez et al., 2004).

En la rizósfera se presenta una competencia continua por espacio y alimento entre los microorganismos que la habitan. Ciertas especies de *Trichoderma sp.* tienen un potencial antagónico debido a su potencial para producir compuestos anti-fúngicos, enzimas extracelulares y sustancias antibióticas (Harman et al., 1996). También a la capacidad de luchar por espacio y nutrientes frente a otros hongos. Fuera de estas características, es un agente promotor del crecimiento de las plantas e inductor de la resistencia sistémica (Hermosa et al., 2000).

*Trichoderma sp.* tiene la capacidad de colonizar y adaptarse a diferentes clases de sustratos en condiciones controladas, generando como resultado una limitación del crecimiento de los organismos (Borrero y Silva, 2005).

#### **2.10.2.7.3.2 Bacillus subtilis**

*Bacillus subtilis* pertenece a la familia bacillaceae, genero *Bacillus* es un bacilo Gram-Positivo catalasa-positivo, aerobico estricto (aunque puede crecer en vía anaeróbica), productor de endosporas, de antibióticos y matriz extracelular (biofilm) que comúnmente se encuentra en el suelo. El potencial de *B. subtilis* se basa en la capacidad de moléculas bioactivas, que muestran fuertes propiedades antifúngicas, junto con la baja toxicidad, alta biodegradabilidad y características amigables con el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos (Chen et al. 2008).

#### **2.11 Fotorreceptores**

La germinación de semillas, es una fase importante en el desarrollo de una planta, cada especie necesita un rango específico de factores ambientales tales como, luz, temperatura, humedad y pH, para que esta ocurra (Baskin y Baskin, 2001). La cantidad de luz (tiempo de exposición a la Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos), así como la calidad (en especial la relación de longitud de onda del rojo-rojo lejano), son factores que intervienen en diversos procesos fisiológicos y se consideran esenciales para el establecimiento y desarrollo de la semilla (Pons, 2000).

La calidad de luz y diferentes reguladores de crecimiento intervienen en el proceso de germinación debido a la gran cantidad de fotorreceptores que poseen (Manrique, 2006). Según Bergareche y Moyseet (1993), tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, los

fitocromos son más abundantes en tejidos jóvenes. Los reguladores de crecimiento son hormonas que intervienen en pequeñas cantidades (Koolman, 2004) y los fotorreceptores moléculas o complejos de molécula, que, al activarse por fotones de determinadas longitudes de onda, traducen señales provocando la capacidad del organismo a responder a estímulos lumínicos (Meisel & Pinto, 2011).

La germinación, así como el desarrollo y la floración de la planta, están regulados por tres fotorreceptores que perciben longitudes de onda diferentes, fitocromo, criptocromo y fotorreceptores en ultravioleta-B (ver figura 1.0.9). El primero, es un fotorreceptor que media los efectos de la luz roja e infrarroja, para esto, absorbe primariamente en el espectro lumínico rojo de 600 a 800 nm (forma Pr), siendo convertido para absorber en la longitud del rojo lejano entre 700-1000 nm (forma Pfr), esta interconversión depende de la proporción de luz roja respecto a la roja lejana (ver figura 1.1.0). Diversos estudios mostraron que la radiación roja promueve la germinación, además de la fotomorfogénesis (replicación de plastidios y síntesis de clorofila y antocianos), formación de primordios foliares y florales y el crecimiento. Existen dos tipos de fitocromos, tipo I: predominante en plantas etioladas y tipo II: más estable a la luz y abundante en todas las plantas verdes (Jorge, 2006; Meisel & Pinto, 2011), esta presencia indica que las longitudes de onda entregan información importante que ayuda a la planta en su adaptación al entorno (Jorge, 2006). El criptocromo absorbe principalmente en la longitud de onda del azul y ultravioleta- A, donde se han identificado dos tipos (CRYI y CRYII). La luz azul se relaciona con la morfogénesis de la planta y diferenciación de órganos, en su presencia se inhibe la elongación del tallo, participa de la síntesis y acumulación de clorofila y regula la apertura de estoma y el crecimiento celular, lo cual permite crecer en función o dirección de la fuente luz (fototropismo) (Meisel & Pinto, 2011). Los fotorreceptores en ultravioleta-B, se relacionan a respuestas fotométricas que modifican la composición química, la competencia fotosintética, morfogénesis y defensa (Jenkins, 2014).

	$\lambda$ (nm)	Acciones y efectos	Tipo de fotorreceptor y otras moléculas que absorben la energía luminosa
UV-C	< 280	Mutaciones, Daño y muerte celular	DNA- RNA
UV-B/UV-A	315 - 400	Acción fotomorfológica; síntesis de pigmentos; daño y muerte celular	Criptocromos ( $\zeta$ ?), Fotorreceptores UV
Violeta - Azul	400 - 510	Acción fotosintética, fotomorfogénesis, ritmo circadiano, tiempo de floración, fototropismo, movimiento de cloroplastos, apertura de estomas, estimulación de la síntesis de clorofila y carotenos	Fotosistemas (clorofilas a y b), Criptocromos, Fototropinas
Verde - Amarillo	510 - 610	Acción reducida sobre la fotosíntesis.	Carotenos
Anaranjado - Rojo / Rojo lejano	610 - 1000	Acción fotosintética, germinación de semillas, tiempo de floración, ritmo circadiano, fotomorfogénesis, elongación celular	Fotosistemas, (clorofilas a y b), Fotocromos
Infrarrojo	> 1000	Efectos mínimos, poco estudiados	$\zeta$ ?

Figura 1.0.4. Acciones y efecto de la luz en diferentes longitudes de onda

Fuente: <https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/634/Lucia%20Marin%20Perez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

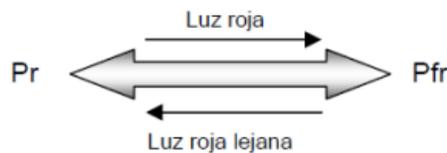


Figura 1.1.0. Espectro luz roja y luz roja lejana

Fuente: <https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/634/Lucia%20Marin%20Perez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

### 2.11.1 Fotometría

Para el estudio del efecto de la luz en la germinación y crecimiento de las plantas es necesario conocer algunos conceptos que explican cómo es esta interacción por lo que a continuación se describen algunos de ellos (Ruíz, 2008).

La energía proveniente del sol se propaga en el espacio en forma de onda electromagnética o radiación electromagnética (unidad Joule), la distancia entre dos crestas sucesivas es llamada de longitud de onda ( $\lambda$ ) y el número de veces que crestas contiguas pasan por un dado punto es la frecuencia ( $\nu$ ). La distribución de la radiación electromagnética en función de las respectivas longitudes de onda (nanómetros) o frecuencias, se denomina espectro

electromagnético, el cual se divide en regiones que van desde radiaciones gama ( $\lambda \sim 10^{-3}\text{nm}$ ), hasta ondas de radio ( $\lambda > 10^9\text{nm}$ ) pasando por el espectro visible. Este último comprende la parte de radiación que el ser humano consigue ver, situado aproximadamente entre las longitudes de onda 380 nm correspondiente al violeta y 770 nm al rojo lejano (Cardoso, 2009). La mayor parte de la radiación ultravioleta (UV) e infrarroja (IR) es absorbida en la atmósfera por sus gases, el UV por el ozono ( $\text{O}_3$ ) en la estratosfera y el IR por el vapor de agua y  $\text{CO}_2$ . De esta forma, la radiación solar que alcanza la biosfera presenta una mayor proporción de radiación visible que en la región superior de la atmósfera (Meisel, 2011).

De todo el espectro visible, las plantas utilizan para la fotosíntesis solo una región comprendida entre 400 hasta 700 nm, la cual es denominada radiación fotosintéticamente activa o de crecimiento (RFA) (Ramos et al., 2010) (ver figura 1.1.1). Esto ocurre debido a que los seres vivos evolucionaron en relación a sistemas fotoquímicos capaces de utilizar estas longitudes de onda (Meisel et al., 2011). El efecto que estas ejercen sobre la planta varía dependiendo de la hora del día y fase de crecimiento, afectando propiedades como el aspecto, momento de floración o valores farmacéuticos y nutricionales (Ramos et al., 2010).

La radiación electromagnética también puede ser descripta en términos de intensidad, así como de calidad, lo cual es útil para diversos estudios científicos principalmente con plantas. La cantidad de radiación electromagnética indica el tiempo de exposición a la densidad de flujo de fotones. Esta densidad medida en unidades fotométricas, describe la radiación tal como es percibida por el ojo humano y se refiere al espectro de luz visible o simplemente luz. La unidad no estándar es conocida como talbot y equivale en el sistema internacional (SI) a la energía de un flujo luminoso de un 1 lumem en un segundo o lumen-segundo. Para realizar esta medida se utiliza un equipo llamado luxímetro que mide la iluminancia, flujo luminoso por unidad de área y su unidad es el lux (lx) (Cardoso, 2009).

$\lambda$ (nm)	0,01	200-280	280-400	400- 510	510 - 610	610 - 700	700 -1000	1000	$10^9$ - $10^{12}$
Radiación	Rayos X	UV-C	UV-B a UV-A	Violeta y Azul visible	Verde a Amarillo	Naranja a Rojo visible	Rojo Lejano	Infrarrojo	Ondas de radio
Energía promedio 1mol de fotón (J)	$120 \times 10^8$	$120 \times 10^5$	$59,5 \times 10^4$	$29,6 \times 10^4$	$23,9 \times 10^4$	$17,5 \times 10^4$	$15,2 \times 10^4$	$14 \times 10^4$	$12 \times 10^{-27}$



Figura 1.1.1. Espectro de luz mostrando la franja de radiación fotosintéticamente activa (PAR), la longitud de onda correspondiente y energía que interviene

Fuente: <https://dspace.unila.edu.br/bitstream/handle/123456789/634/Lucia%20Marin%20Perez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

### 2.11.2 Luz LED

Las lámparas de diodo (LEDs) son la más reciente tecnología en ingresar al campo de la investigación y agricultura en ambientes controlados con bastante aceptación por parte de los investigadores. Este éxito se debe a la elevada eficiencia en comparación con las lámparas incandescentes, consumen mucha menos energía eléctrica y poseen una vida media de uso más larga, disminuyendo costos de producción. Por otro lado, no generan exceso de calor y por lo tanto es posible utilizarlos con plantas térmicamente sensibles sin daños, e incluso, en el caso de las LEDs rojas debido a su propiedad repelente de insectos ayuda a disminuir el uso de agrotóxicos (Bourguet, 2005; Navarro et. al., 2013; Ramos et. al, 2010).

Otras ventajas de estos dispositivos son en relación a la posibilidad de emisión de longitudes de onda mono cromáticas, cada color de luz LED se limita a una longitud de onda de alcance muy estrecho (dominante) dado por el material semiconductor que lo compone y la luz blanca por la mezcla aditiva de todos los colores. En luces comerciales, diversos colores se obtienen por una mezcla de los colores rojo (630-890 nm), verde (525- 555 nm) y azul (450- 480 nm) que emiten en una longitud de onda específica. Esto permite brindar a diversas plantas una fuente de luz ajustada a las necesidades de las mismas, aumentando aún más la eficiencia de todo el proceso productivo (Jao & fong, 2005). Además, debido a su pequeño tamaño y reducido peso, brindan una enorme flexibilidad al momento de diseñar sistemas lumínicos, generando un aumento de la eficiencia en la utilización del espacio en comparación con otras fuentes de luz como los tubos fluorescentes y las lámparas incandescentes (Bourget, 2005).

En este sentido, las LEDs proporcionan un mejor rendimiento en invernaderos tanto industriales como de pequeño tamaño. Según investigaciones de diversos grupos como el de Ostergard et al. (2008), en invernaderos industriales, el uso de LEDs rojas y azules ahorran un total de 80% de consumo eléctrico en relación a la luz incandescente, compensando rápidamente el costo de la instalación que es tres veces mayor. En 2007, la empresa fabricante de LEDs, Nippon Keiki Kagoshima Works Ltd., publicó un informe en que se demostraba en pequeños invernaderos, la disminución del costo de consumo eléctrico en 25 veces por el uso de LEDs rojos en vez de lamparas incandescentes (Ramos, et al. 2010).

### 3. Justificación

El café a lo largo de la historia nos ha acompañado como uno de los principales alimentos dentro de la cultura mexicana estando en nuestras mesas y paladares por más de 200 años, además de su exquisito sabor y los beneficios que obtenemos al consumir cabe resaltar que México se encuentra en la posición número once de los principales países productores de café en el mundo, resaltando el estado de Chiapas como el país que más producción mantiene con un porcentaje del 41% del total del café que se produce en nuestro país.

La importancia económica que tiene el cultivo obliga a buscar la mejora continua en los procesos de producción y en el cuidado del día a día de los cafetales. Una de las mayores amenazas para el cultivo es *Hemileia Vastatrix* mejor conocida como roya del café el cual es un hongo que provoca la caída prematura de las hojas posicionando a la roya como la enfermedad más destructiva para los cafetales. Si bien existen innumerables métodos de control los cuales han ayudado a disminuir los catastróficos porcentajes de merma es necesario enfocar la investigación hacia este hongo destructivo, una de las principales limitantes para la investigación de *Hemileia Vastatrix* es que no permanece todo el año en la planta, solamente en cierta temporada y temperatura.

Lograr aislar las urediniosporas de la roya del café y posteriormente encontrar un método de conservación que permita realizar pruebas cualquier día del año podría en el futuro lograr que el país se posicione como el mejor productor de café encontrando métodos de eliminación y prevención del hongo antes de detectar mermas a causa del patógeno.

## **4. Objetivos**

### **Objetivo general:**

- Establecer, evaluar y comparar diferentes estrategias de conservación e inoculación de roya en plantas de café.

### **Objetivos específicos:**

- Establecer procesos de desinfección y purificación de roya.
- Multiplicación de plantas de café in vitro y ex vitro.
- Establecimiento de métodos de infección de roya de café in vitro y ex vitro.
- Implementación de métodos de conservación para roya mediante la liofilización.
- Fijación de métodos de evaluación de viabilidad de roya.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Ensayo de germinación de semillas y desarrollo de plántulas café (*Coffea arabica*) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible

#### 5.1.1 Localización del experimento

El experimento se estableció en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Planta Piloto en las instalaciones del Tecnológico Nacional de México, Campus Tlajomulco, municipio Tlajomulco De Zúñiga, Jalisco, en un cuarto de germinación a  $25 \pm 2$  °C, con luz constante de diferentes colores.

#### 5.1.2 Material vegetal

Se recolectaron semillas de café (*Coffea arabica* var. *Typica*) de huertos de traspatio ubicados con las coordenadas (20°24'44"N 103°23'30"W), Municipio de Tlajomulco Zúñiga, perteneciente a la región centro del estado de Jalisco. Las semillas se trasladaron a las instalaciones del Tecnológico Nacional de México Campus Tlajomulco en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Planta Piloto para ser procesadas.



Figura 1.1.2 Recolecta de café (*Coffea arabica*) en huertas de traspatio San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

A). Planta de café. B). Semillas de café



Figura 1.1.3 Comparación de semillas de café antes y después de la eliminación del endocarpio.

Las semillas se lavaron con agua corriente, se despulparon manualmente (eliminación de pericarpio, pulpa, capa de pectina y pergamino) y se sometieron a una solución de cloro al 10% con 1mL de tween 80 por litro de solución durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se secaron en un secador de charolas (marca Polinox modelo TABIM094)

a una temperatura de  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, ver figura 1.1.4, posteriormente las semillas se conservaron en un frasco de vidrio a temperatura ambiente (aproximadamente a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para su posterior uso.



*Figura 1.1.4. Proceso de cosecha, lavado, despulpe y secado de semillas de café*

### 5.1.3 Protocolo de desinfección de semillas de café

Para el establecimiento de las semillas en condiciones *in vitro*, las semillas despulpadas y secas (ver sección 12.1.2.) se les eliminó manualmente el endocarpio (pergamino) y se sometieron a un proceso de desinfección en condiciones asépticas con soluciones estériles, se colocaron las semillas en una solución desinfectante con benomilo ( $1\text{g L}^{-1}$ ) y estreptomina ( $0.3\text{ g L}^{-1}$ ) durante 20 minutos, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada, enseguida se colocaron en una solución al 30% de cloro comercial (cloralex) durante 20 minutos y se les dio tres enjuagues con agua destilada, después se sometieron en etanol al 70% por 2 minutos y se realizaron nuevamente 3 enjuagues con agua destilada, finalmente se transfirieron en una solución con  $0.1\text{ g L}^{-1}$  ácido ascórbico y  $0.15\text{ g L}^{-1}$  ácido cítrico durante 1 minuto y se transfirieron en el medio semisólido en condiciones de obscuridad a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 5.1.4 Preparación de Medio de Cultivo para la germinación

Se preparó medio de cultivo ZG para la germinación de la semilla de café (Quiroz et al., 2006) con los elementos necesarios para lograr su óptima germinación, se preparó 1.5 litros de medio utilizando los elementos que se muestran a continuación en la tabla, tomando en cuenta que 1.5 litros fue la cantidad total final preparada por lo que fue aforado durante su preparación. Se ajustó el pH a 5.8 antes de adicional el gelificante (Agar).

**Tabla 5. Materiales y cantidades para preparación de medio de cultivo ZG**

Concentración de solución stock (X)	Solución	Cantidad	Unidad de medida
50	Macronutrientes	30	ml
200	Micronutrientes	7.5	ml
50	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	30	ml
100	Fe*EDTA	15	ml
	Sacarosa	45	G
	ANA [0.1mg/L]	1.5	µl
	Agar	12	G

#### 5.1.4.1 Esterilización de medio de cultivo y herramientas de trabajo de laboratorio

Una vez preparado el medio de cultivo se vertieron aproximadamente 30 ml de esta solución en cada frasco de cristal y se les colocó su tapa para posteriormente pasarlos a la autoclave para esterilizarlos, al mismo tiempo se metieron a la autoclave el demás material necesario que se necesitó para llevar a cabo la siembra ( pinzas de acero, placa de vidrio, agua destilada) con las cuales realizamos la manipulación de las semillas durante la siembra en la campana de flujo laminar, la esterilización fue realizada a 120°C a 117 kPa, durante 20 minutos.



*Figura 1.1.5. Autoclave utilizada para la esterilización de medio de cultivo y herramientas de trabajo*

### 5.1.5 Siembra de las semillas en medio de cultivo

Una vez con el medio de cultivo esterilizado y solidificado y desinfectadas las semillas se procedió a realizar la siembra en los frascos con el medio de cultivo colocando 5 semillas por frasco, se trabajó con 5 tratamientos diferentes y cada tratamiento con 8 repeticiones, ver figura 1.1.6.



Figura 1.1.6 Siembra de semillas de café en medio de cultivo para germinación

### 5.1.6 Establecimiento del experimento

Una vez terminada la siembra, las semillas fueron transferidas a los siguientes tratamientos con diferentes longitudes de onda dentro de la luz visible: TG0 (Control) Luz blanca. TG1. Oscuridad. TG2. Luz azul (450nm); TG3. Luz roja (700nm) y TG4. Luz morada (500nm). Los 5 tratamientos; TG0, TG1, TG2, TG3 y TG4 se mantuvieron en un sistema cerrado (sin intercambio gaseoso), además todos los tratamientos se mantuvieron en las siguientes condiciones  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperiodo 16 h durante 42 días. A la semana 8, después del inicio del experimento las semillas fueron colocadas en sustrato esteril (proporción 8:2 peat moss y vermiculita) con macronutrientes y micronutrientes

debido a una contaminación por *Trichoderma*. Cabe resaltar que se establecieron dos experimentos con las mismas condiciones y características, pero en diferentes fechas, esto debido a que el experimento No. 1 se contaminó con *Trichoderma*, y no se pudo controlar, es por esto que se tuvo que montar un segundo experimento ya que consideramos que el



Figura 1.1.7. Fotografía de los tratamientos por color, el tratamiento 1 no está dentro de la fotografía ya que ese tratamiento se trabajó en una caja de cartón para lograr conservarlos bajo la oscuridad.

Trichoderma alteraría algunos resultados esperados.

**Tabla 6. Color de luz por tratamiento**

Número de tratamiento	Tipo de luz
<b>T0</b>	Luz blanca
<b>T1</b>	Bajo la oscuridad
<b>T2</b>	Luz azul
<b>T3</b>	Luz roja
<b>T4</b>	Luz morada

### **5.1.7 Evaluación de la germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas de café**

Después de establecidos los tratamientos se evaluaron los siguientes parámetros G (Germinación), F (Fenolización), C (Contaminación) y M (Mortandad) de cada uno de los tratamientos. La evaluación de la germinación y los demás parámetros se realizó cada 7 días, se consideró que la semilla germinó cuando la radícula rompe la testa (ver figura 1.1.7). En el caso del experimento No.1 el cual a la semana 8 las semillas se colocaron en Sustrato estéril, se avaluó al tercer mes los siguientes parámetros de desarrollo de las plántulas: Longitud de la planta (LP), Numero de cotiledones desarrollados (C), Numero de hojas verdaderas (HV). Cabe aclarar que el parámetro de L-P se consideró la longitud a partir de la base del tallo hasta el ápice de la plántula.

### **5.1.8 Diseño experimental**

Para el experimento de germinación de semillas el diseño experimental fue de bloques completamente al azar, los datos presentados corresponden a la media de 8 réplicas, cada una con 5 semillas. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias fue determinada por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 7. Datos correspondientes al experimento de germinación**

Tratamiento	Luz Blanca	Oscuridad	Luz Azul	Luz Roja	Luz Morada
Repeticiones	8	8	8	8	8
Semillas por repetición	5	5	5	5	5
Total de semillas por tratamiento	40	40	40	40	40

## 5.2 Ensayo: Aislamiento, Viabilidad y Métodos de conservación (Liofilización) de la roya del café

### 5.2.1 Material vegetal

Se realizó la colecta de hojas de plantas de café infestadas de roya para aislarla y poderla manipular fácilmente. La colecta fue realizada en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga con las siguientes coordenadas 20°24'44"N 103°23'30"W.

### 5.2.2 Raspado de hojas para extracción de roya

Con ayuda de un bisturí se realizó el raspado de las hojas de café para extraer las urediniosporas de roya para comenzar a trabajar con ella.



*Figura 1.1.8 Obtención de la roya por medio del raspado de hojas*

### 5.2.3 Desinfección de las Urediniosporas

Los tubos falcón en donde se contenían las Urediniosporas se centrifugaron a 1000 rpm por 15 min, en seguida se decantó y se lavó con agua destilada, después se suspendió en 4 mL de Cloranfenicol (0.02%) más Ampicilina (0.02%), y estos se dividieron en 4 tubos Empendor, con 1 mL cada tubo y se centrifugo a 100 rpm durante 15 min. Se decantó y añadió agua destilada para continuar con los lavados, se agregó Cloramina 1 mL (2%), nuevamente se centrifugo a la misma velocidad y finalmente se decantó y se resuspendieron en agua destilada.

## 5.2.4 Suspensión de roya en agua destilada

Una vez realizado el proceso de desinfección de roya, esta fue suspendida en agua destilada para facilitar su manejo para los procesos posteriores.

## 5.2.5 Lectura de urediniosporas de roya mediante cámara de Neubauer

Para realizar el conteo de urediniosporas viables suspendidas en agua destilada se utilizó un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) cuya función es facilitar el conteo de las esporas de roya en medio líquido.

## 5.2.6 Pruebas de liofilización de crioprotectores

Se realizaron pruebas de liofilización con crioprotectores los cuales fueron Leche descremada, Glicerol y Trehalosa para evaluar sus aspectos físicos y así determinar cuál es la mejor opción a utilizar para la liofilización de roya.

**Tabla 8. Concentración de las soluciones utilizadas (crioprotectores)**

<b>Soluciones</b>		
Leche 10%	Glicerol 10%	Leche 20% trehalosa 1%
Leche 20%	Leche10% trehalosa 1%	Leche 20% trehalosa 10%
Trehalosa 1%	Leche10% trehalosa 10%	Leche 20% glicerol 1%
Trehalosa 10%	Leche 10% glicerol 1%	Leche 20% glicerol 10%
Glicerol 1%	Leche 10% glicerol 10%	

### Para realizar la prueba de liofilización:

1. Se prepararon las soluciones basadas en sus cálculos correspondientes.
2. Se colocaron 500 microlitros en tubos eppendorf.
3. Se autoclaveo.
4. Se congelaron a - 80° por 24 horas.
5. Se conectan a la liofilizadora por 24 horas.

### 5.2.6.1 Disolución de crioprotectores

Se agregaron 3 mililitros de agua destilada a cada tubo eppendorf para evaluar la disolución de las pastillas que se crearon después de la liofilización.

## 5.2.7 Liofilización de roya en crioprotectores

Se utilizaron *urediniosporas* de Roya de arándano como inóculo con la finalidad de prolongar la viabilidad (6-12 meses) mediante diferentes métodos de conservación. Se colectaron las hojas con (uredosporas) pústulas visibles, posteriormente se realizó el raspado colectándose en un tubo falcón, previo a esto, se llevó a cabo la preparación de lioprotectores (evaluados con anterioridad) a diferentes concentraciones como se mostró en la tabla 9. Entre los lioprotectores y concentraciones utilizadas durante los diferentes métodos de conservación se muestran en la tabla 10.

**Tabla 9. Agentes lioprotectores con sus respectivas concentraciones utilizados en los procesos de conservación**

<b>LIOFILIZACIÓN</b>		
<b>Lioprotector / crioprotector</b>	<b>Concentración [%]</b>	<b>Temperatura de conservación</b>
Leche descremada	10%	
Trehalosa	10%	4°C
Glicerol	10%	-20°C
Leche descremada + Trehalosa	10%+1%	-80°C
Leche descremada + Glicerol	10%+1%	
<b>CRIOCONSERVACIÓN</b>		
<b>Crioprotector</b>	<b>Concentración [%]</b>	<b>Temperatura de conservación</b>
Glicerol	10%	-20°C
Trehalosa	10%	-80°C
Glicerol + Trehalosa	10%+1%	
Glicerol	35%	

La concentración de inóculo utilizada para la conservación fue de  $1 \times 10^4$ , para lo cual se llevó a cabo el conteo de células con ayuda de una cámara de Neubauer en un microscopio con un aumento de 10X.

Los métodos de conservación utilizados fueron por crioconservación y liofilización, el proceso de liofilización se llevó a cabo en un liofilizador en el laboratorio de Bioquímica Vegetal del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Con una rampa de congelación de  $-3^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar los  $-50^\circ\text{C}$ , para luego iniciar la sublimación con una rampa de calentamiento de  $0,5$  o  $\text{C}/\text{min}$  sin exceder los  $-20^\circ\text{C}$  a una presión de 1200 mTorr aproximadamente. La rampa de congelación de  $-3^\circ\text{C}/\text{min}$  es la que reporta mejores resultados.

### 5.2.7.1 Determinación de células viables

Antes de llevarse a cabo los procesos de conservación, se realizó la evaluación de viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las urediniosporas, bajo las siguientes metodologías:

Se realizaron 4 tratamientos en tubos eppendorf con capacidad de 2 mL con diferentes metodologías, para determinar la viabilidad de las uridenosporas, en el tubo 1 y 2, se agregaron 150  $\mu$ L de la solución de esporas, se centrifugo a 10 000 rpm por 3 min y se eliminó el sobrenadante (agua) de cada tubo, se volvió agregar 150  $\mu$ L agua destilada estéril y 0.8  $\mu$ L de tetrazolio al 1% (TTC). De ambos tubos se tomaron 50  $\mu$ L agregándose en cajas Petri de 90 mm y se dispersó la solución con una espátula de drygalsky, se incubaron a temperatura ambiente por tres horas. Mientras que el tubo 1 se guardó a 37°C por tres horas y el tubo 2 se centrifugo y se le agrego 120  $\mu$ L de TTC y se incubo por tres horas a 37°C. Se etiquetaron tubos 3 y 4 agregándose 100  $\mu$ L de solución de esporas a cada uno, en el tubo 3 se mantuvo a temperatura ambiente por 3 horas, 20 minutos antes de completarse las tres horas se agregó 100  $\mu$ L de TTC, mientras que el tubo 4 se eliminó el sobrenadante por centrifugación y se agregó 100  $\mu$ L de TTC, se mantuvo a temperatura ambiente por 3 horas.

Posteriormente se colocó 20  $\mu$ L de solución de cada uno de los tratamientos en la cámara de neubauer y se realizó el conteo de uridenosporas viables basado en la siguiente ecuación:

$$\Sigma C1+C2+C3+C4+C5$$
$$\% = \frac{x}{1 \times 10^6} \frac{100\%}{x} = :$$

Al término de la incubación de cada uno de las pruebas se procedió a evaluar la viabilidad por microscopio a 100 campos.



Figura 1.1.9 Perfil de preparación de muestras para evaluar la viabilidad. A) Dispersión de inoculo en distintos tubos, B) separación de fases de tubos con la solución, C) siembra de esporas en agar agua

## **5.3 Ensayo de la infección de la roya en hojas y plantas de café en condiciones in vitro**

### **5.3.1 Material vegetal**

Se utilizaron hojas y plantas de café *Coffea arabica*. Las hojas son provenientes de plantas que su germinación se llevó a cabo in-vitro, que posteriormente fueron aclimatadas en invernadero de seis meses de edad en las instalaciones del Tecnológico Nacional de México, Campus Tlajomulco. Estas plantas fueron colocadas en macetas bajo condiciones de invernadero, en sustrato estéril a una proporción de 6:2:1 peatmoss, arena y vermiculita respectivamente para su posterior evaluación. Y las plantas que se inocularon con la roya son provenientes de la germinación de semillas in-vitro, estas aún se encuentran en condiciones in-vitro.

### **5.3.2 Material biológico**

Se utilizó la cepa patogénica *Hemileia vastatrix* aislada de plantas con síntomas de enfermedad de la roya de café. Las plantas con síntomas de la enfermedad se obtuvieron zonas cafetaleras de la localidad La Becerrera, en Comala, Colima. Este aislamiento fue conservado en plantas vivas al ser un hongo que se conserva en tejido vivo y fueron colocadas en condiciones controladas a una temperatura constante de 25°C y un fotoperiodo de 16H luz/ 8H oscuridad hasta su uso.

### **5.3.3 Preparación del inóculo**

Para la obtención del inóculo para la evaluación de condiciones de infección de la roya de café se ubicaron los síntomas por el envés de las hojas enfermas y se les dio cuidadosamente un barrido con un bisturí a las pústulas, regiones donde están aglomeradas las estructuras reproductivas de la roya (uredinosporas) recolectando el inóculo sobre una caja Petri para que sea más fácil la recuperación de la mayor cantidad de inóculo. Una vez recolectado el inóculo se colocaron en tubos falcón en una solución de tween 80 más agua destilada estéril a una concentración de 1mL L<sup>-1</sup> y se cuantificó en la cámara Neubauer ajustando a 1x10<sup>4</sup> Uredinosporas/mL<sup>-1</sup>, posteriormente se efectuó el proceso de desinfección de las uredinosporas, preparando las soluciones antibióticas cloramina al 2% y cloranfenicol al 0.02% más Ampicilina al 0.01%.

#### **5.3.3.1 Desinfección de las Uredinosporas**

Los tubos falcón en donde se contenían las Uredinosporas se centrifugaron a 1000 rpm por 15 min, en seguida se decantó y se lavó con agua destilada, después se suspendió en 4 mL de Cloranfenicol (0.02%) más Ampicilina (0.02%), y estos se dividieron en 4 tubos Empendor, con 1 mL cada tubo y se centrifugo a 100 rpm durante 15 min. Se decantó y añadió agua destilada

para continuar con los lavados, se agregó Cloramina 1 mL (2%), nuevamente se centrifugo a la misma velocidad y finalmente se decantó y se resuspendieron en agua destilada.

#### 5.3.3.2 Desinfección de material base y material vegetal

Se metieron a esterilizar en la autoclave las cajas Petri con las sanitas ya colocadas, agua destilada y las pinzas. Las hojas recolectadas se lavaron con agua y jabón y después se procedió a enjuagarlas con agua destilada estéril. En la campana de flujo laminar, se sumergieron las hojas en una solución de etanol al 70%.



*Figura 1.2.0. Desinfección de hojas de café en campana de flujo laminar*

#### 5.3.4 Inoculación de roya (*Hemileia vastatrix*) en hojas y plantas de café

Se utilizaron hojas enteras maduras desinfectadas y plantas en condiciones in-vitro, de acuerdo a las características descritas en la sección de material vegetal, las hojas se colocaron con el envés hacia arriba en una cámara húmeda (caja Petri con una toalla de papel (sanita) humedecida con 100 microlitros de agua destilada estéril) y se inocularon con 50 microlitros de una solución a distintas concentraciones ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ) Uridinosporas mL<sup>-1</sup>, previamente desinfectada, en las mismas condiciones. Por otro lado, también se inocularon plantas de café, estas se encontraban en condiciones in-vitro (medio solido), de igual manera estas se inocularon con 50 microlitros de una solución a distintas concentraciones ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ) Uridinosporas mL<sup>-1</sup>, la suspensión se agregó directamente en el envés hoja de la parte central de la planta.



Figura 1.2.1. Inoculación de roya (*Hemileia vastatrix*) en hojas de café

### 5.3.5 Establecimiento del experimento

En la inoculación de hojas de café (cámara húmeda) se colocaron 4 tratamientos, el tratamiento Control (C) fue el único que no se inoculó, en el caso de los tratamientos T1, T2 y T3 se inocularon con una concentración diferente de (uridenosporas/mL). Al día 10 y al día 14 se le agregaron 5 ml de agua destilada estéril a todos los tratamientos para humedecer la cámara. Todos los tratamientos se colocaron en las mismas condiciones ambientales como se muestra en la tabla 11.

Tabla 10. Establecimiento del experimento (Inoculación hojas de café)

Tratamiento	Inoculación de roya (uridenosporas/mL)	Condiciones ambientales	
		Luz/Oscuridad	Temperatura (°C)
<b>Control (C)</b>	S/I	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T1</b>	1x10 <sup>2</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T2</b>	1x10 <sup>3</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T3</b>	1x10 <sup>4</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C

T. tratamiento; C. Control; S/I. Sin inóculo

En la inoculación de las plantas de café In-vitro (Medio M+M+A) se colocaron 4 tratamientos, el tratamiento Control (C) fue el único que no se inoculó, en el caso de los tratamientos T1A, T2A y T3A se inocularon con una concentración diferente de (uridenosporas/mL). Todos los tratamientos se colocaron en las mismas condiciones ambientales como se muestra en la tabla 12.

**Tabla 11. Establecimiento del experimento (inoculación plantas de café) (Medio M+M+A)**

Tratamiento	Medio solido	Inoculación de roya (uridenosporas/mL)	Condiciones ambientales	
			Luz/Oscuridad	Temperatura (°C)
<b>Control (C)</b>	M+M+A	S/I	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T1A</b>	M+M+A	1x10 <sup>2</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T2A</b>	M+M+A	1x10 <sup>3</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T3A</b>	M+M+A	1x10 <sup>4</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T.</b> tratamiento; <b>C.</b> Control; <b>S/I.</b> Sin inóculo; <b>M+M+A.</b> Macronutrientes+Micronutrientes+Agar				

En la inoculación de las plantas de café In-vitro (Medio MS-S) se colocaron 4 tratamientos, el tratamiento Control (C) fue el único que no se inoculo, en el caso de los tratamientos T1MS, T2MS y T3MS se inocularon con una concentración diferente de (uridenosporas/mL). Todos los tratamientos se colocaron en las mismas condiciones ambientales como se muestra en la tabla 13.

**Tabla 12. Establecimiento del experimento (Inoculación plantas de café) (Medio MS-S)**

Tratamiento	Medio solido	Inoculación de roya (uridenosporas/mL)	Condiciones ambientales	
			Luz/Oscuridad	Temperatura (°C)
<b>Control (C)</b>	MS-S	S/I	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T1MS</b>	MS-S	1x10 <sup>2</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T2MS</b>	MS-S	1x10 <sup>3</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T3MS</b>	MS-S	1x10 <sup>4</sup>	16h luz / 8h oscuridad	25 ± 2 °C
<b>T.</b> tratamiento; <b>C.</b> Control; <b>S/I.</b> Sin inóculo; <b>MS-S.</b> Medio MS-(Sacarosa)				

### 5.3.6 Evaluación de infección de hojas y plantas de café en condiciones in vitro

La evaluación de la infección en las hojas (cámara húmeda) como en las plantas en condiciones in-vitro se realizó al día 7, 10 y 14, la variable a evaluar fue la severidad de la infección de la roya, de acuerdo a las manchas cloróticas (amarillamiento) y necrosis observadas.

## 6. Resultados y discusiones

### 6.1 Ensayo No. 1, evaluación de la germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible

Durante la evaluación de la germinación de semillas de café (*Coffea arábica*), se consideró que la semilla germinó, cuando se observaba la protusión de la radícula, figura 1.1.7, D-E, mientras que en la figura 1.1.7, A-C, se muestran las semillas sin germinar, es decir que la radícula aún no ha logrado romper las cubiertas seminales de la semilla. Una vez establecido el criterio de germinación se observó que en los 5 tratamientos TG0 (Control) Luz blanca. TG1. Oscuridad. TG2. Luz azul; TG3. Luz roja y TG4. Luz morada, no se presentó germinación de semilla hasta el día 14 con un porcentaje de germinación de semillas diferente, esto pudo deberse a las diferentes longitudes de onda que ejerce cada una de las luces sobre la germinación de las semillas. El tratamiento TG3. Luz roja, fue el tratamiento que presentó mayor porcentaje de germinación hasta el día 42, se puede decir que tardó menos tiempo en germinar en su totalidad ya que presentó desde el día 14 un 47.5 % de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 87.5%, 92.5%, 92.5% y 95% respectivamente. El tratamiento TG0 (control) luz blanca, el día 14 presentó un 62.5% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 72.5%, 85%, 85% y 87.5% respectivamente. En el caso del tratamiento TG1. Oscuridad, el día 14 presentó un 77.5% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 87.5%, 87.5%, 87.5% y 90% respectivamente. El tratamiento TG2. Luz azul, el día 14 presentó un 55% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 77.5%, 90%, 90% y 92.5 respectivamente. En el caso de la germinación del tratamiento TG4. Luz morada, fue el tratamiento que presentó menor porcentaje de germinación hasta el día 42, se puede decir que tardó más tiempo en germinar en su totalidad ya que presentó el día 14 un 45% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 67.5%, 75%, 75% y 80% respectivamente.

El tratamiento que presentó mayor porcentaje de germinación al inicio de esta (día 14) fue el tratamiento TG1. Oscuridad, presentando un 77.5% el día 14 de germinación.

**Tabla 13. Porcentaje de germinación por tratamiento de acuerdo a cada uno de los días de evaluación**

Tratamiento	No. De semillas por tratamiento	Día	No. De semillas Germinadas	% de semillas germinadas
TG0 Luz blanca	40	7	0	0%
		14	25	62.5%
		21	29	72.5%
		28	34	85%
		35	34	85%
		42	35	87.5%
TG1 Oscuridad	40	7	0	0%
		14	31	77.5%
		21	35	87.5%
		28	35	87.5%
		35	35	87.5%
		42	36	90%
TG2 Luz azul	40	7	0	0%
		14	22	55%
		21	31	77.5%
		28	36	90%
		35	36	90%
		42	37	92.5%
TG3 Luz Roja	40	7	0	0%
		14	19	47.5 %
		21	35	87.5%
		28	37	92.5%
		35	37	92.5%
		42	38	95%
TG4 Luz morada	40	7	0	0%
		14	18	45%
		21	27	67.5%
		28	30	75%
		35	30	75%
		42	32	80%

**Tabla 14. Cantidad de semillas germinadas el día 7 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	0	0	0	0	0	0	0	0
TG1. Oscuridad	0	0	0	0	0	0	0	0
TG2. Luz Azul	0	0	0	0	0	0	0	0
TG3. Luz Roja	0	0	0	0	0	0	0	0
TG4. Luz Morada	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 15. Cantidad de semillas germinadas el día 14 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	3	3	3	4	3	4	5	0
TG1. Oscuridad	4	3	4	4	4	4	4	4
TG2. Luz Azul	4	4	3	3	4	1	2	1
TG3. Luz Roja	3	2	2	3	2	2	2	3
TG4. Luz Morada	3	2	3	1	2	3	2	2

**Tabla 16. Cantidad de semillas germinadas el día 21 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	3	5	4	4	3	5	5	0
TG1. Oscuridad	4	4	4	5	4	5	4	5
TG2. Luz Azul	4	5	4	5	4	2	4	3
TG3. Luz Roja	5	5	4	4	3	4	5	5
TG4. Luz Morada	3	4	3	3	4	4	3	3

**Tabla 17. Cantidad de semillas germinadas el día 28 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	4	5	4	5	3	5	5	3
TG1. Oscuridad	4	4	4	5	4	5	4	5
TG2. Luz Azul	5	5	5	5	4	2	5	5
TG3. Luz Roja	5	5	5	4	4	4	5	5
TG4. Luz Morada	4	4	4	3	4	4	3	4

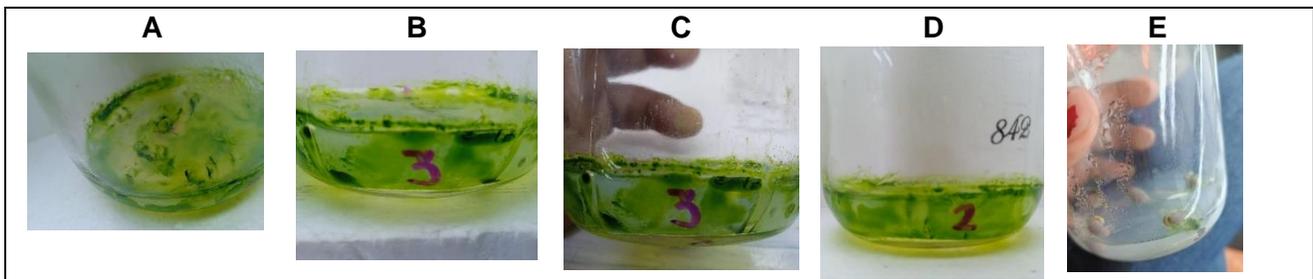
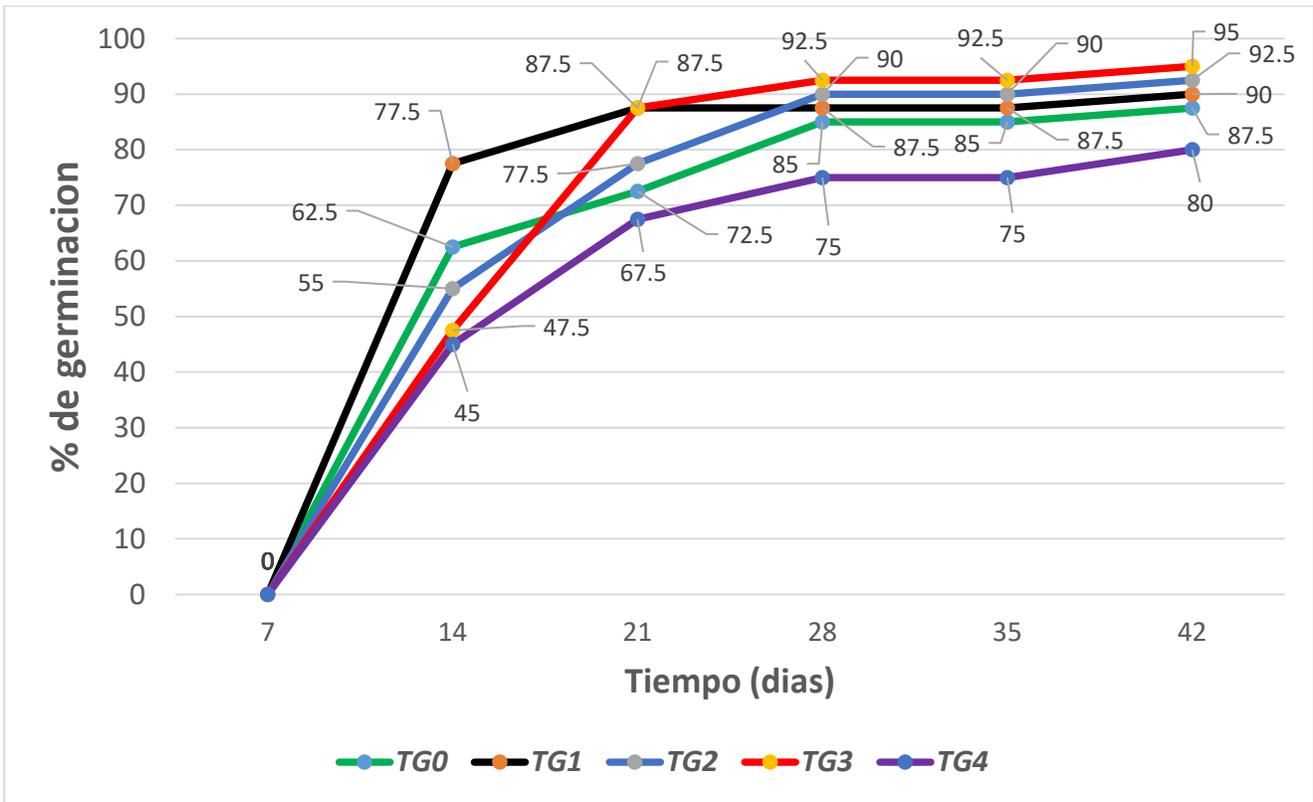
**Tabla 18. Cantidad de semillas germinadas el día 35 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	4	5	4	5	3	5	5	3
TG1. Oscuridad	4	4	4	5	4	5	4	5
TG2. Luz Azul	5	5	5	5	4	2	5	5
TG3. Luz Roja	5	5	5	4	4	4	5	5
TG4. Luz Morada	4	4	4	3	4	4	3	4

**Tabla 19. Cantidad de semillas germinadas el día 42 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	4	5	4	5	4	5	5	3
TG1. Oscuridad	4	4	4	5	4	5	5	5
TG2. Luz Azul	5	5	5	5	4	3	5	5
TG3. Luz Roja	5	5	5	4	4	5	5	5
TG4. Luz Morada	4	4	4	3	4	4	4	5

**Tabla 20. Porcentaje de germinación de semillas de café (Coffea arabica) evaluados a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días**



**Figura 1.2.2. A-E Contaminación por Trichoderma**

### 6.1.1 Ensayo No. 1, evaluación del desarrollo de plántulas de café (*Coffea arabica*) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible

**Tabla 21. T0. Desarrollo de plántulas**

T0	Cotiledones desarrollados	Hojas verdaderas	Longitud de la plántula más grande (Cm)
R1	0	0	0
R2	0	0	0
R3	0	0	7.5
R4	2	0	10
R5	0	0	7.5
R6	4	0	9
R7	2	0	9
R8	0	0	7.5

**Tabla 22. T1. Desarrollo de plántulas**

T1	Cotiledones desarrollados	Hojas verdaderas	Longitud de la plántula más grande (Cm)
R1	4	0	13
R2	6	0	12
R3	0	0	0
R4	2	0	10.5
R5	0	0	0
R6	0	0	0
R7	0	0	12
R8	0	0	0

**Tabla 23. T2. Desarrollo de plántulas**

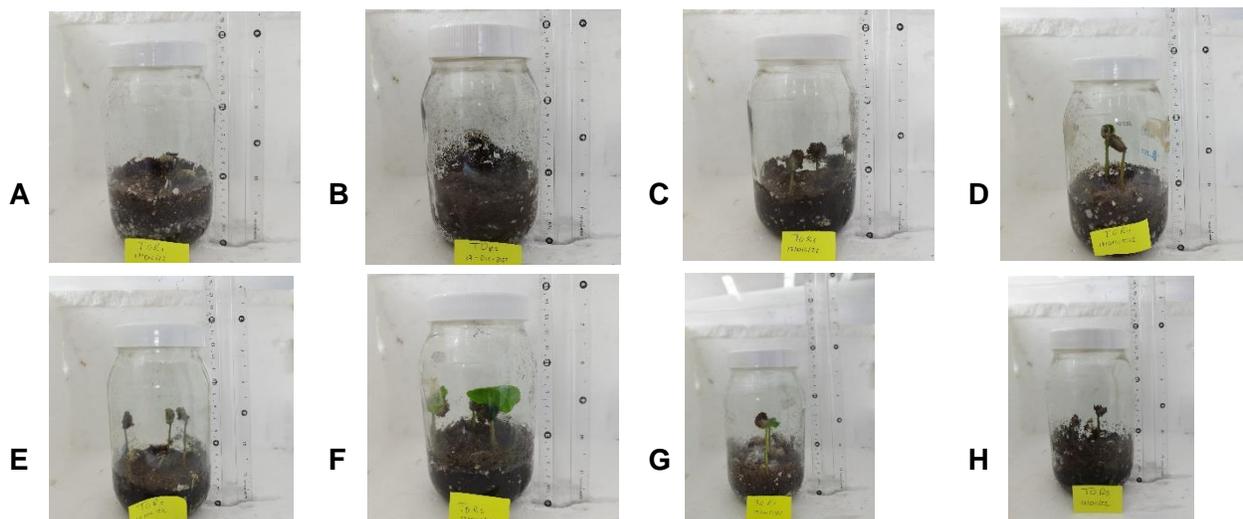
T2	Cotiledones desarrollados	Hojas verdaderas	Longitud de la plántula más grande (Cm)
R1	6	0	8.5
R2	0	0	0
R3	0	0	0
R4	12	0	11.5
R5	4	0	9.5
R6	2	0	10
R7	4	0	9
R8	0	0	7.5

**Tabla 24. T3. Desarrollo de plántulas**

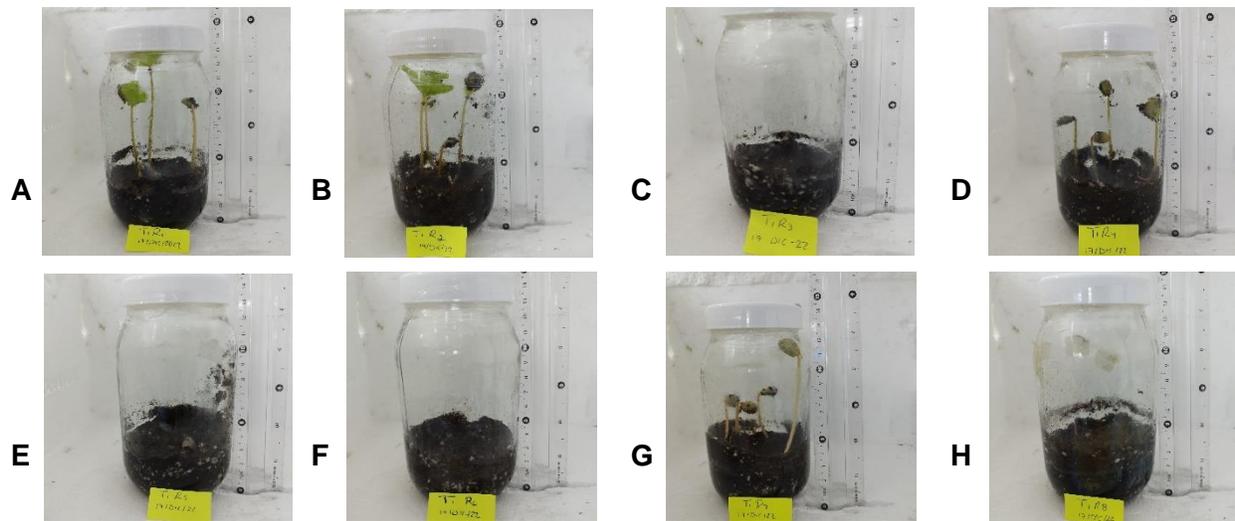
<b>T3</b>	Cotiledones desarrollados	Hojas verdaderas	Longitud de la plántula más grande (Cm)
R1	0	0	0
R2	4	0	10.5
R3	6	0	9.5
R4	0	0	0
R5	4	0	10.5
R6	0	0	0
R7	6	0	10
R8	6	0	10.5

**Tabla 25. T4. Desarrollo de plántulas**

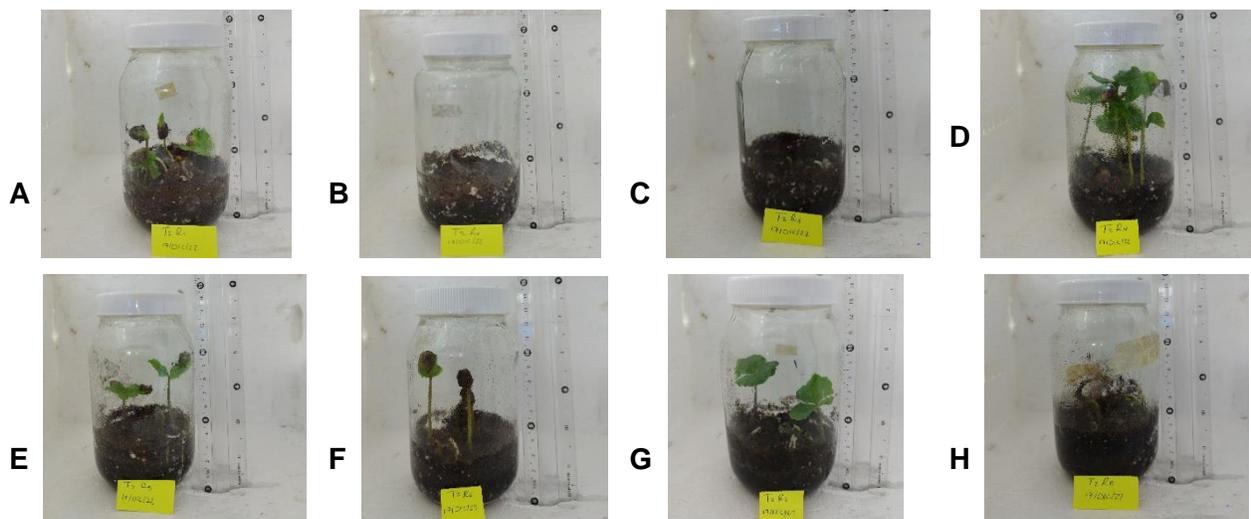
<b>T4</b>	Cotiledones desarrollados	Hojas verdaderas	Longitud de la plántula más grande (Cm)
R1	2	0	11
R2	4	0	10.5
R3	0	0	0
R4	0	0	0
R5	0	0	0
R6	4	1	9.5
R7	6	4	11
R8	4	0	11.5



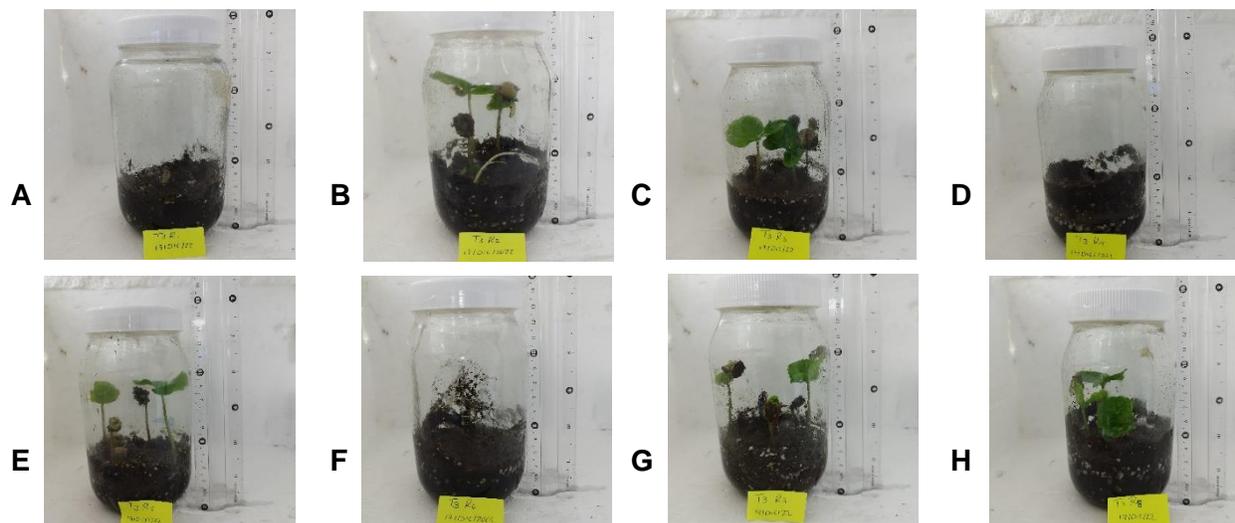
**Figura 1.2.3. T0. A-R1, B-R2, C-R3, D-R4, E-R5, F-R6, G-R7, H-R8**



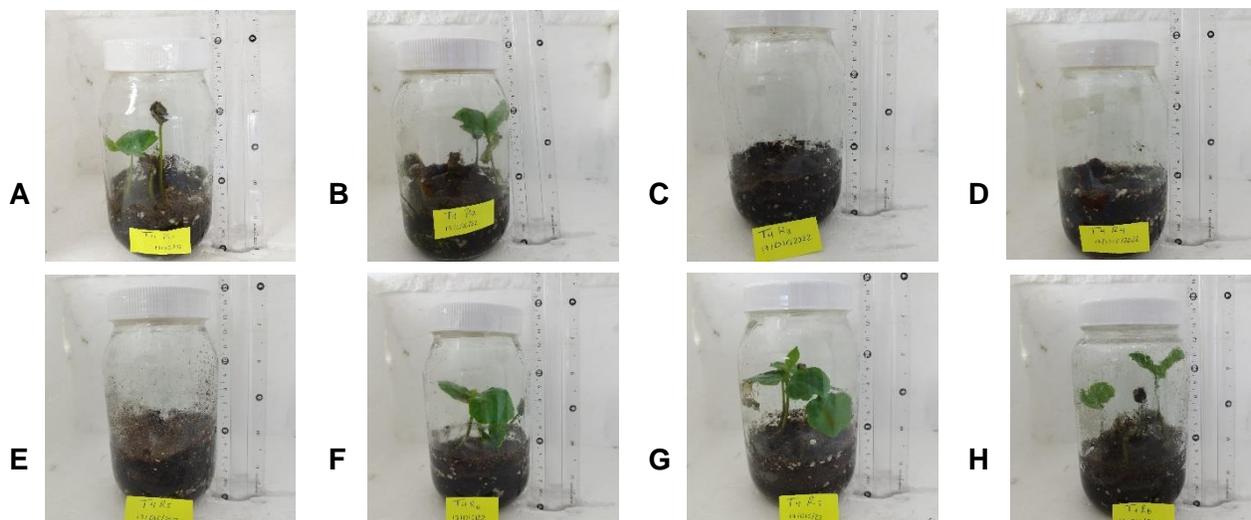
**Figura 1.2.4. T1. A-R1, B-R2, C-R3, D-R4, E-R5, F-R6, G-R7, H-R8**



**Figura 1.2.5. T2. A-R1, B-R2, C-R3, D-R4, E-R5, F-R6, G-R7, H-R8**



**Figura 1.2.6. T3. A-R1, B-R2, C-R3, D-R4, E-R5, F-R6, G-R7, H-R8**



**Figura 1.2.7. T4. A-R1, B-R2, C-R3, D-R4, E-R5, F-R6, G-R7, H-R8**

### **6.1.2 Ensayo No. 2, evaluación de la germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible**

Durante la evaluación de la germinación de semillas de café (*Coffea arábica*), se consideró que la semilla germinó, cuando se observaba la protusión de la radícula, figura 1.1.7, D-E, mientras que en la figura 1.1.7, A-C, se muestran las semillas sin germinar, es decir que la radícula aún no ha logrado romper las cubiertas seminales de la semilla. Una vez establecido el criterio de germinación se observó que en los 5 tratamientos TG0 (Control) Luz blanca. TG1. Oscuridad. TG2. Luz azul; TG3. Luz roja y TG4. Luz morada, no se presentó germinación de semilla hasta el día 14 con un porcentaje de germinación de semillas diferente, esto pudo deberse a las diferentes longitudes de onda que ejerce cada una de las luces sobre la germinación de las semillas. El tratamiento TG1. Oscuridad y TG3. Luz roja fueron los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de germinación hasta el día 42, se puede decir que tardaron menos tiempo en germinar en su totalidad, ya que el tratamiento TG1. Oscuridad presentó desde el día 14 un 10% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 77.5%, 95%, 95% y 100% y El tratamiento TG3. Luz roja, el día 14 presentó un 37.5% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 62.5%, 72.5%, 85% y 100% respectivamente. En el caso del tratamiento TG0 (control) luz blanca, el día 14 presentó un 67.5% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 90%, 92.5%, 92.5% y 92.5% respectivamente. El tratamiento TG2. Luz azul, el día 14 presentó un 45% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 70%, 85%, 90% y 95% respectivamente. En el caso de la germinación del tratamiento TG4. Luz morada, fue el

tratamiento que presento menor porcentaje de germinación hasta el día 42, se puede decir que tardo más tiempo en germinar en su totalidad ya que presento el día 14 presento un 10% de germinación incrementándose el día 21, 28, 35 y 42 con un 35%, 52.5%, 55% y 85% respectivamente.

El tratamiento que presento mayor porcentaje de germinación al inicio de esta (día 14) fue el tratamiento TG0 (Control) Luz blanca, presentando un 67.5% el día 14 de germinación.

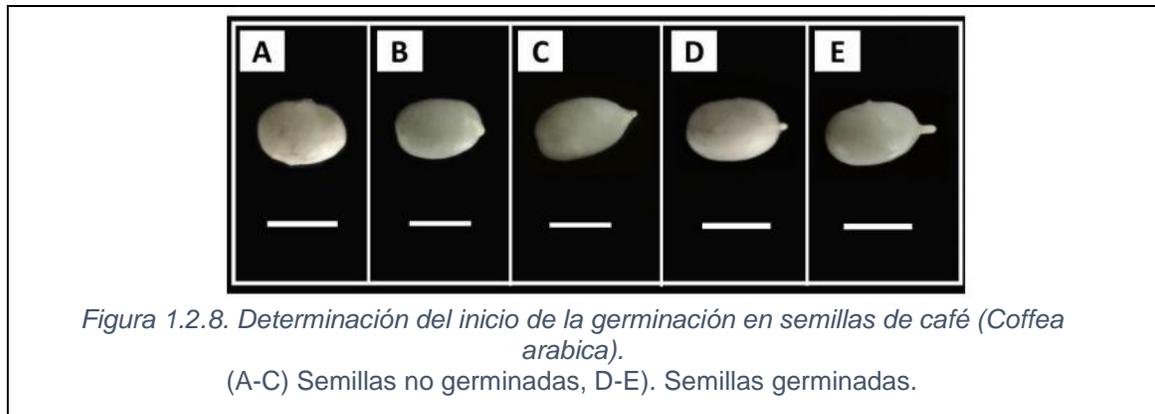
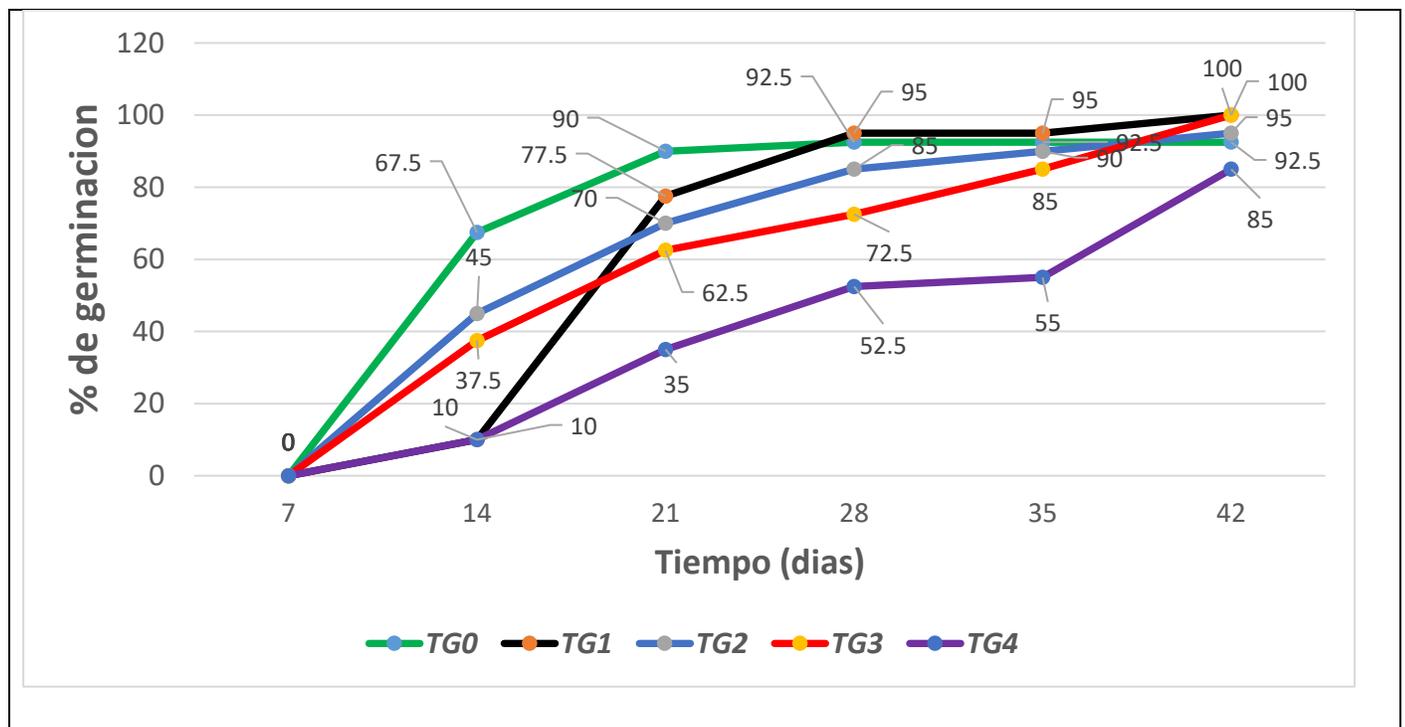


Tabla 26. Porcentaje de germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) evaluados a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días

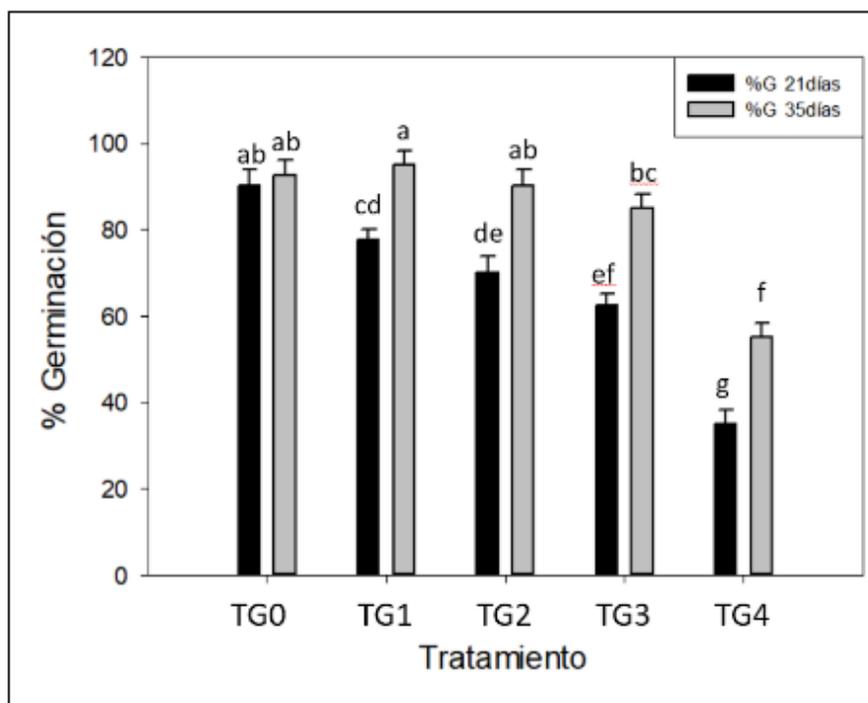


La semilla cigótica, contiene una planta embrionaria en su condición inactiva y la germinación es la reanudación de su crecimiento. La planta joven, protegida por diferentes capas de tejidos, tiene reservas para el metabolismo. La germinación inicia con la imbibición de agua, posteriormente con el alargamiento celular y finalmente con el aumento en el número de células, finalizando con la protrusión de la radícula (Toole et al., 1956).

En el caso de medio de cultivo líquido, semisólido y sólido, este último empleado en este experimento, contiene macronutrientes, micronutrientes, sacarosa, vitaminas y reguladores de crecimiento (ANA y cinetina), estos componentes son un aporte adicional para la semilla de café, los cuales favorecen la germinación acortando los tiempos e incrementando el número de semillas que logran la germinación. Antes de la imbibición, la mayoría de las células en tejidos meristemáticos de embriones de semillas (las únicas poblaciones celulares que proliferan) tienen un contenido de ADN G1 y metabólicamente se encuentran en un estado similar a G0, caracterizado por la ausencia de señales que favorezcan la proliferación celular. Sin embargo, la imbibición no provoca una entrada inmediata en el ciclo. En cambio, hay un retraso de hasta varias horas antes de que la fase S se vuelva evidente (Vázquez y Sánchez, 2003).

En investigaciones previas se ha demostrado que la adición de reguladores de crecimiento como auxinas (ANA) y citocininas (cinetina) tiene un efecto positivo durante la activación de ciclo celular (transición de la fase G1 a la fase S) durante la germinación, acortando los tiempos de la protrusión de raíz y el porcentaje de germinación (Baíza et al., 1989; Reyes et al., 1991; Nikolić et al., 2006). Esto se puede observar en los resultados obtenidos en los 5 tratamientos evaluados, de los cuales el medio de cultivo tiene adicionado (ANA), esto se observó principalmente en los tratamientos TG0, TG1 y TG2, en los que se aceleró el porcentaje de germinación obteniéndose un 90% de germinación para TG0, 77.5% de germinación para TG1 y un 70% de germinación para TG2 desde el día 21, Tabla 28, además cabe resaltar que dentro de las vitaminas que incluye el medio de cultivo, se encuentra la biotina que es necesaria para la germinación de semillas ya que tiene un papel fundamental en bloquear enzimas que inhiben la germinación de semillas, 7-ceto-8-aminopelargónico, KAPA (Kucera et al., 2005), además de las vitaminas también contiene reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) que promueven la división celular, acelerando el proceso de germinación (Mok y Mok, 2001; Chiwocha et al., 2005; Kucera et al., 2005; Belin et al., 2009; Subbiah y Reddy, 2010), haciendo más eficiente el proceso de germinación de semillas.

**Tabla 27. Germinación de semillas cigóticas de café (*Coffea arábica*) en los días 21 y 35 después de la imbibición. TG0. Luz blanca; TG1. Oscuridad; TG2. Luz azul; TG3. Luz roja; TG4. Luz morada**



**Tabla 28. Porcentaje de germinación por tratamiento de acuerdo a cada uno de los días de evaluación**

Tratamiento	No. De semillas por tratamiento	Día	No. De semillas Germinadas	% de semillas germinadas
TG0 Luz blanca	40	7	0	0%
		14	27	67.5%
		21	36	90%
		28	37	92.5%
		35	37	92.5%
		42	37	92.5%
TG1 Oscuridad	40	7	0	0%
		14	4	10%
		21	31	77.5%
		28	38	95%
		35	38	95%
		42	40	100%
TG2 Luz azul	40	7	0	0%
		14	18	45%
		21	28	70%
		28	34	85%
		35	36	90%

		42	38	95%
TG3 Luz Roja	40	7	0	0%
		14	15	37.5%
		21	25	62.5%
		28	29	72.5%
		35	34	85%
		42	40	100%
TG4 Luz morada	40	7	0	0%
		14	4	10%
		21	14	35%
		28	21	52.5%
		35	22	55%
		42	34	85%

**Tabla 29. Cantidad de semillas germinadas el día 7 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	0	0	0	0	0	0	0	0
TG1. Oscuridad	0	0	0	0	0	0	0	0
TG2. Luz Azul	0	0	0	0	0	0	0	0
TG3. Luz Roja	0	0	0	0	0	0	0	0
TG4. Luz Morada	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 30. Cantidad de semillas germinadas el día 14 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	4	2	3	4	4	3	4	3
TG1. Oscuridad	1	0	0	0	1	0	0	2
TG2. Luz Azul	2	1	1	1	4	5	2	2
TG3. Luz Roja	1	2	3	2	0	2	3	2
TG4. Luz Morada	1	2	0	0	0	1	0	0

**Tabla 31. Cantidad de semillas germinadas el día 21 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	5	4	4	5	5	4	5	4
TG1. Oscuridad	5	3	4	3	4	4	4	4

TG2. Luz Azul	4	2	3	3	4	5	2	5
TG3. Luz Roja	2	4	4	3	1	3	3	5
TG4. Luz Morada	2	3	2	1	0	4	0	2

**Tabla 32. Cantidad de semillas germinadas el día 28 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

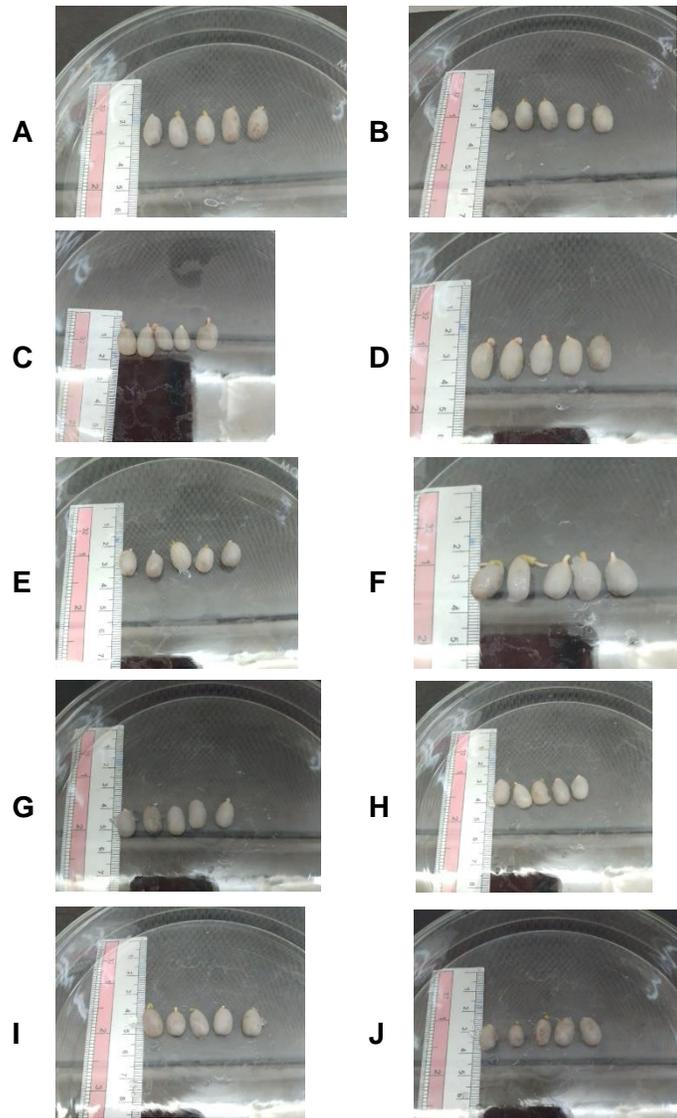
Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	5	5	4	5	5	4	5	4
TG1. Oscuridad	5	5	4	5	4	5	5	5
TG2. Luz Azul	5	2	4	4	5	5	4	5
TG3. Luz Roja	2	5	5	3	1	4	4	5
TG4. Luz Morada	2	5	3	1	0	5	2	3

**Tabla 33. Cantidad de semillas germinadas el día 35 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	5	5	4	5	5	4	5	4
TG1. Oscuridad	5	5	4	5	4	5	5	5
TG2. Luz Azul	5	2	4	5	5	5	5	5
TG3. Luz Roja	4	5	5	3	4	4	4	5
TG4. Luz Morada	2	5	3	1	0	5	2	4

**Tabla 34. Cantidad de semillas germinadas el día 42 de evaluación por cada uno de los tratamientos con sus respectivas replicas**

Tratamiento/replicas	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
TG0. Luz Blanca	5	5	4	5	5	4	5	4
TG1. Oscuridad	5	5	5	5	5	5	5	5
TG2. Luz Azul	5	4	4	5	5	5	5	5
TG3. Luz Roja	5	5	5	5	5	5	5	5
TG4. Luz Morada	4	5	4	2	5	5	4	5



*Figura 1.2.9. Cambio de medio y evaluación de germinación.  
A-T0R1, B-T0R8, C-T1R2, D-T1R4, E-T2R4, F-T2R7, G-T3R1, H-T3R5, I-T4R2, J-T4R8*

## 6.2 Ensayo: Aislamiento, Viabilidad y Métodos de conservación (Liofilización) de la roya del café

### 6.2.1 Evaluaciones (Pruebas de liofilización de crioprotectores.)

Tabla 35. Evaluación de las soluciones sin liofilizar (No estéril)

Soluciones (No estéril)	Aspectos físicos		Autoclaveado	
	Color	Consistencia	No	Si
L10	Blanco	Liquido	*	
L20	Blanco	Liquido	*	
T1	Transparente	Liquido	*	
T10	Transparente	Liquido	*	
G1	Transparente	Liquido	*	
G10	Transparente	Liquido	*	
L10T1	Blanco	Liquido	*	
L10T10	Blanco	Liquido	*	
L10G1	Blanco	Liquido	*	
L10G10	Blanco	Liquido	*	
L20T1	Blanco	Liquido	*	
L20T10	Blanco	Liquido	*	
L20G1	Blanco	Liquido	*	
L20G10	Blanco	Liquido	*	

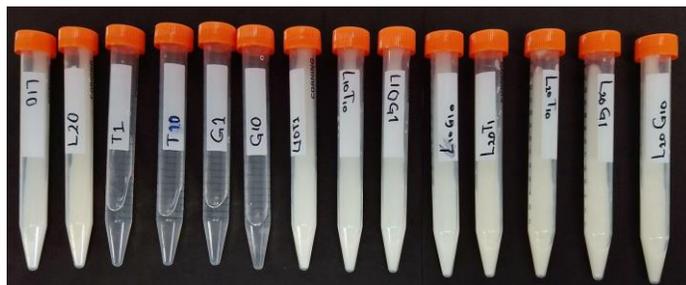


Figura 1.3.0. Soluciones sin liofilizar (No estéril)

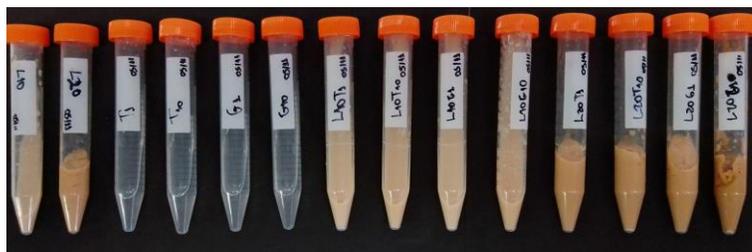
**Tabla 36. Evaluación de soluciones liofilizadas (No estéril)**

Solución (No estéril)	Color	Estructura	Pastilla	Características	Salpicaduras
L10	Blanco	Solida	Si	Deforme	Si
L20	Transparente	Solida	No	No se formo	Si
T1	Transparente	Solida	No	No se formo	Si
T10	Transparente	Solida	No	No se formo	Si
G1	Sin solución				
G10	Transparente	Solida	No	No se formo	Si
L10T1	Blanco	Solida	No	Burbujeante	Si
L10T10	Blanco	Solida	Si	Porosa	Si
L10G1					
L10G10					
L20T1					
L20T10					
L20G1					
L20G10					



**Tabla 37. Evaluación de las soluciones sin liofilizar (Estéril)**

Soluciones (Estéril)	Aspectos físicos		Autoclaveado	
	Color	Consistencia	No	Si
L10	Beige	Líquido		*
L20	Caqui	Gelatinoso		*
T1	Transparente	Líquido		*
T10	Transparente	Líquido		*
G1	Transparente	Líquido		*
G10	Transparente	Líquido		*
L10T1	Beige	Líquido		*
L10T10	Beige	Líquido		*
L10G1	Beige	Líquido		*
L10G10	Beige	Líquido-Granulado		*
L20T1	Caqui	Gelatinoso		*
L20T10	Caqui	Gelatinoso		*
L20G1	Caqui	Gelatinoso		*
L20G10	Caqui	Gelatinoso		*



*Figura 1.3.2. Soluciones sin liofilizar (Estéril)*

**Tabla 38. Evaluación de soluciones liofilizadas (Estéril)**

Solución (Estéril)	Color	Estructura	Pastilla	Características	Salpicaduras
L10	Beige	Solida	Si	Completamente formada	No
L20	Caqui	Solida	Si	Quebradiza	No
T1	Transparente	Solida	No	No se formo	No
T10	Transparente	Solida	No	No se formo	No
G1	Transparente	Solida	No	No se formo	No
G10	Transparente	Gelatinoso	No	No se formo	Si
L10T1	Beige	Solida	Si	Completamente formada	Si
L10T10	Caqui	Burbujeante	No	Deforme	Si
L10G1	Beige	Solida	Si	Porosa	No
L10G10	Caqui	Viscosa	No	No se formo	Si
L20T1	Café	Solida	Si	Desproporción	Si
L20T10	Café	Solida	Si	Desproporción	No
L20G1	Beige	Solida	Si	Quebradiza	Si
L20G10	Café	Viscosa	No	No se formo	Si

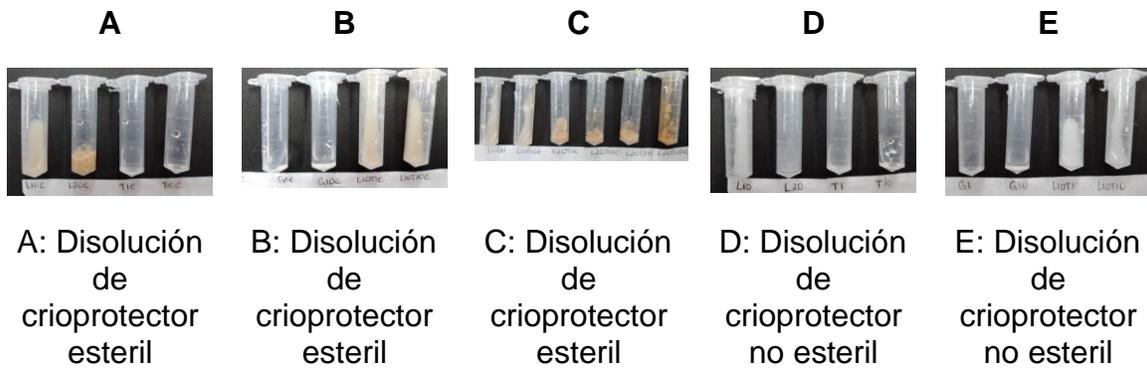


*Figura 1.3.3. Soluciones liofilizadas (Estéril)*

## 6.2.2 Evaluación (Disolución de crioprotectores)

Tabla 39. Características de las soluciones después de agregar 3 ml de agua destilada

Solución estéril	Características	Solución no estéril	Características
L10	Disuelto	L10	Disuelto
L20	Gelatinoso – Grumoso	L20	Disuelto
T1	Disuelto	T1	Disuelto
T10	Disuelto	T10	Disuelto
G1	Disuelto	G1	Disuelto
G10	Disuelto	G10	Disuelto
L10T1	Disuelto	L10T1	Disuelto
L10T10	Disuelto	L10T10	Disuelto
L10G1	Disuelto	L10G1	
L10G10	Disuelto	L10G10	
L20T1	Gelatinoso – Grumoso	L20T1	
L20T10	Gelatinoso – Grumoso	L20T10	
L20G1	Gelatinoso – Grumoso	L20G1	
L20G10	Gelatinoso – Grumoso	L20G10	



*Figura 1.3.4. Disolución de crioprotectores*

### 6.2.3 Determinación de células viables

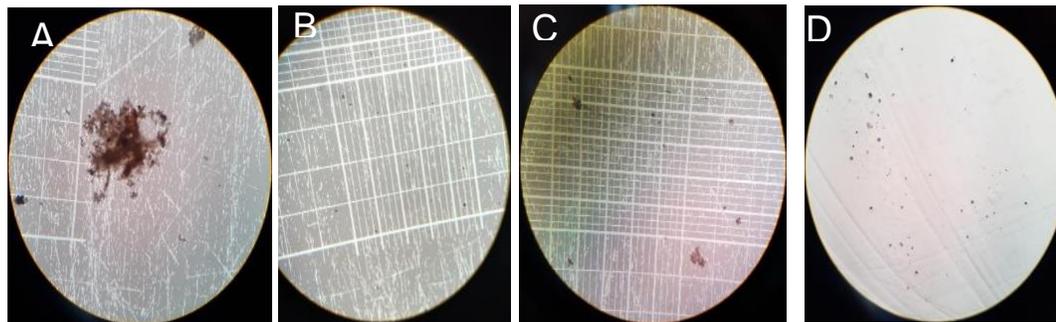
Los procesos de conservación de microorganismos nos permiten conservarlos viables por tiempo prolongados, como el caso de liofilización que es un método ampliamente utilizado para la conservación debido a que permite que estos mantengan su viabilidad a temperatura ambiente por largos períodos de tiempo con una buena estabilidad genética. Dado que es un proceso físico de deshidratación, donde el agua pasa por diferentes fases, las células pueden verse afectadas estructuralmente disminuyendo su viabilidad. Es por esto por lo que es muy importante el uso de agentes lioprotectores los cuales protegen a las células de los daños causados durante la liofilización, los cuales ayudan a evitar que las células sufran daños intra y extracelulares y mueran durante la deshidratación. Algunos productos utilizados en este proceso (trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa) (Leslie et al., 1995), la leche descremada y diversos polialcoholes, han mostrado gran eficacia como agentes lioprotectores (Berny y Hennebert, 1991; MacKenzie, 1977). Así como la conservación de muestras biológicas almacenados en refrigeración (-20 y -80°C). Por lo que en este estudio se emplearon como lioprotector la leche descremada combinada con crioprotectores como es el glicerol y la trehalosa

En este proceso se llevó a cabo la reducción de las células vivas que toman el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas y forma una sustancia roja, estable y no difusible, el trifenil-formazan. Como indicador referenciado, las semillas viables, se tornan completamente, y las que no se colorean se consideran semillas muertas. La viabilidad expresa el potencial de una semilla para germinar (ISTA, 1999).

Como resultados finales de la evaluación obtenida en solución de TTC y agar agua fue la siguiente;

Del tubo 1 se pudo observar una tinción tenue (rojo bajo) en la mayoría de células, no se observó células germinadas, mientras que en el tubo 2 se observaron células germinadas con una tinción baja, por los campos cuantificados se pudo cuantificar un 65% de células germinadas.

En el tubo 3 se pudo observar urediosporas germinadas con poca tinción, como se muestran en la figura 1.3.5. Respecto al tubo 4 se observó poca colorimetría y en la caja Petri se pudo observar todas las células teñidas. para las pruebas de viabilidad.



*Figura 1.3.5. Viabilidad obtenida de la solución. La mayoría de las células se tiñeron y no se observó tubos germinativos, las uredinisporas se aglomeraron durante la incubación A-D), en el tubo 2 se alcanzó a observar pocas células con una tinción tenue B), vista a 10x se alcanzó a observar uredos germinadas y poca tinción C).*

### 6.3 Ensayo de la infección de la roya en hojas y plantas de café en condiciones in vitro

La germinación de las uredinosporas de la roya se ve altamente afectadas por las condiciones de temperatura, luz y humedad. Estudios realizados para entender la infección causada por la roya muestran que las temperaturas óptimas para que este proceso se lleve a cabo interaccionan con una alta humedad, temperaturas que van de los 18°C a los 27°C y periodos cortos de luz (Santacreo R., et. al. 1983). En el caso de la roya el proceso de infección se da de la siguiente manera, figura 1.3.6, infección de roya escala Sinavef. Como se puede ver en los resultados de este estudio solamente se lograron observar amarillamiento y necrosis de sitios puntuales en el envez de las hojas como síntomas de inicio de la enfermedad causada por la roya. En otros estudios se hace mención que en algunas evaluaciones la roya puede tardar ente 40 y 60 días para que inicie la fase reproductiva del hongo produciendo estructuras amarillas y polvorosas para continuar el ciclo de infección de este hogo (Moreno de Alas. G 1985).

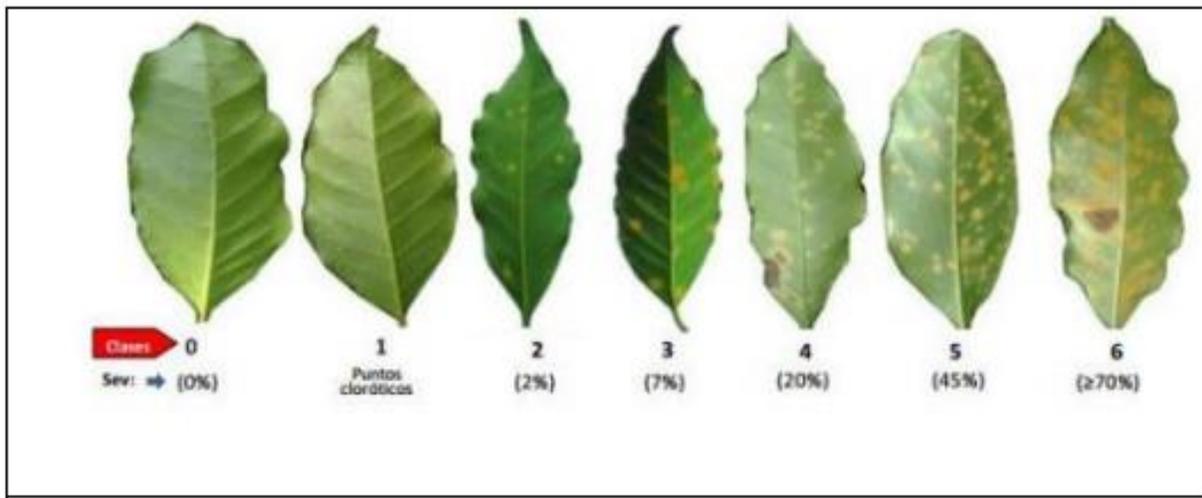


Figura 1.3.6. Escala de severidad de roya en hojas de café DGSV-Sinavef-Lanref

Fuente: <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/EscalaSeveridadDefoliacionPlantayHoja.pdf>

En este estudio evaluando solo 14 días y no se pudieron observar síntomas relacionados con la infección de la roya, solo se pudieron observar algunos síntomas de defensa contra el hongo, fenolización, manchas cloróticas y necrosis. En algunos estudios se hace mención que en algunas evaluaciones la roya puede tardar entre 40 y 60 días para que inicie la fase reproductiva del hongo produciendo estructuras amarillas y polvorosas para continuar el ciclo de infección de este hongo. Es importante continuar con las evaluaciones de este experimento para así obtener los resultados esperados y poder evaluar el experimento como se debe, ya que debido al periodo tan corto de evaluación que tuvimos no se pudieron observar síntomas de germinación de la roya.

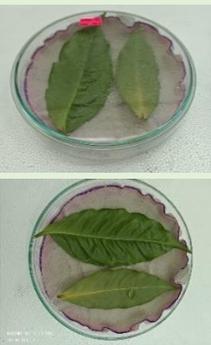
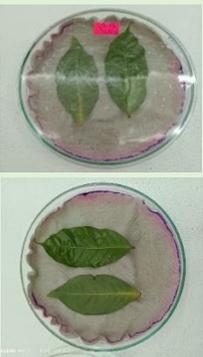
Temperaturas frescas entre 13°C y 16°C son favorables a esta formación. La alternancia de altas temperaturas (22-28°C, lo que favorece la germinación de las esporas) y bajas temperaturas (13- 16°C, favoreciendo la formación del apresorio) permite que la infección tenga lugar en menos de 6 horas por lo que la presencia tanto en invernadero como en temperaturas controladas se logra apreciar los daños causados por el hongo, en condiciones de invernadero se generan menor número de lesiones con mayor área de daño, mientras que en condiciones controladas (25°C en incubadora) se presentaban mayor número de manchas con menor área de daño, esto puede deberse porque ocurre una mayor germinación de esporas, las cuales generan mayor número de apresorios, causando mayor número de lesiones. En condiciones de invernadero con temperaturas variables (entre 13°C y 30°C) las temperaturas mínimas favorecen el desarrollo del hongo, sin embargo, las temperaturas elevadas inhiben el crecimiento de la roya, como consecuencia se tiene una menor penetración de apresorios y una menor germinación de esporas.

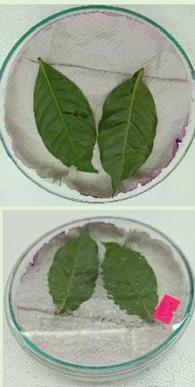
En condiciones de baja humedad la enfermedad no se desarrolla, debido a que las uredinosporas de roya no logran completar su ciclo de germinación y colonización, efecto que se ha observado por algunos autores, en el que la dispersión de la roya en tiempo de lluvias la enfermedad incrementa y en tiempo de seca disminuye drásticamente los síntomas de la infección (Avelino et al., 1991, Galvez et al., 1980, Holguin, F., 1985, Santacreo et al., 1983.), el factor luz también es de suma importancia ya que algunos autores asocian que la baja intensidad de luz beneficia la germinación de las uredinosporas de roya y a su vez la luz permite

la colonización y formación de austorios de esta manera explican por qué la roya incrementa su propagación en días más cortos del año (Salgado et al., 2007, Soto-Pinto et al., 2002, Staver et al., 2001).

Los estudios previos realizados en esta evaluación son una alternativa para trabajar con este tipo de hongos que al comportarse como biotrofos o parasitos obligados se pueda conservar esta enfermedad con suficiente viabilidad en tejido vivo y así seguir generando nuevas modelos de investigación que nos ayude a mitigar su desarrollo y control de esta enfermedad devastadora para los cultivos de café en campo.

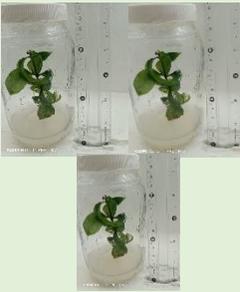
**Tabla 40. Evaluación de la infección en hojas de café (cámara húmeda) día 7, 10 y 14**

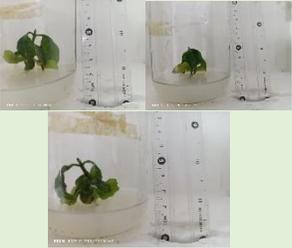
Tratamiento	Día 7	Día 10	Día 14
<b>Control (C)</b>			
<b>Descripción</b>	Una hoja no presento daño aparente y la otra empezo a presentar clorosis en la nervadura principal, ambas sin contaminacion y sin marchitez	Una de las hojas presento necrosis en la punta y la otra continuo con la clorosis en la nervadura principal, las dos sin contaminacion y sin marchitez	Una de las hojas continuo con la necrosis en la punta y la otra hoja presento necrosis en la nervadura central seguido de la clorosis, las dos sin contaminacion y sin marchitez
<b>T1</b>			

<p><b>Descripción</b></p>	<p>Una hoja no presento daño aparente y la otra empezo a presentar clorosis en la nervadura principal y una pequeña fisura en un costado, ambas sin contaminación y sin marchitez</p>	<p>Una de las hojas continuo sin daño aparente y en la otra la clorosis en la nervadura principal aumento, la fisura sigue en las mismas condiciones, las dos sin contaminación y sin marchitez</p>	<p>Una de las hojas presneto amarillamiento muy leve en la nervadura principal y en la otra la clorosis en la nervadura principal siguio aumentando, la fisura sigue igual, ambas hojas sin contaminación y sin marchitez</p>
<p><b>T2</b></p>			
<p><b>Descripción</b></p>	<p>Una hoja no presento daño aparente y la otra presento una mancha necrotica en la parte central, ambas sin contaminación y sin marchitez</p>	<p>Una de las hojas continuo sin daño aparente y en la otra la mancha necrotica siguio en las mismas condiciones, ambas sin contaminación y sin marchitez</p>	<p>Las condiciones de las dos hojas continuaron igual, Una sin daño aparente y la otra con la mancha necrotica, ambas sin contaminación y sin marchitez</p>
<p><b>T3</b></p>			

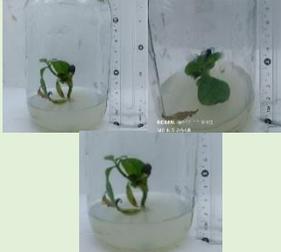
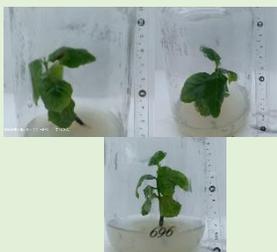
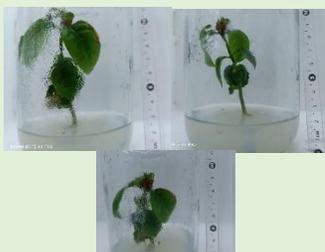
<b>Descripción</b>	Una hoja no presenta daño aparente y la otra presenta 4 manchas necróticas distribuidas en toda la hoja y una pequeña fisura en la parte superior de la hoja, ambas sin contaminación y sin marchitez	Una hoja presenta daño en la parte central junto a la nervadura (clorosis) y la otra sigue con las 4 manchas necróticas, estas no sufrieron ningún cambio, ambas hojas sin contaminación y sin marchitez	Una de las hojas presenta una mancha necrótica por la nervadura central seguida de clorosis y la otra sigue con las 4 manchas necróticas, estas no sufrieron ningún cambio, ambas hojas sin contaminación y sin marchitez
--------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

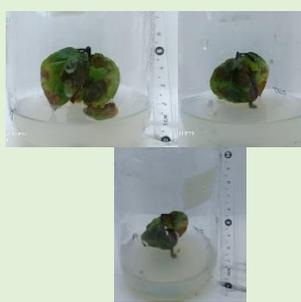
**Tabla 41. Evaluación de la infección en plantas de café (in-vitro, Medio MS-S) día 7, 10 y 14**

Tratamiento	Día 7	Día 10	Día 14
<b>Control (C)</b>			
<b>Descripción</b>	Se observa una planta con buena estructura y tonalidad	Las hojas presentan enroscamiento, el limbo de las hojas comienza a mostrar marchitez	La marchitez de las hojas se extiende del limbo hacia el haz y los nervios de estas
<b>T1MS</b>			
<b>Descripción</b>	Planta en aparente estado sano a excepción de un par de hojas con defecto; una presenta daño mecánico y otra muestra signos de marchitez	No se detecta avance en la marchitez de la hoja detectada	Se observa desprendimiento de una de las hojas pequeñas de la planta, se detecta marchitez en el ápice de dos hojas

<p><b>T2MS</b></p>			
<p><b>Descripción</b></p>	<p>Se observan manchas en el haz de las hojas las cuales otorgan apariencia de inicios de marchitez</p>	<p>La planta muestra síntomas de decadencia presentando mayor flexibilidad de los peciolo y el tallo, no se detecta el avance de las manchas con síntomas de marchitez</p>	<p>Síntomas de decadencia presentando mayor flexibilidad de los peciolo y el tallo, no se detecta el avance de las manchas con síntomas de marchitez</p>
<p><b>T3MS</b></p>			
<p><b>Descripción</b></p>	<p>Se cuenta con planta aparentemente sana con buena estructura y tonalidad</p>	<p>No se observan daños en las hojas ni tallo, se cuenta con planta aparentemente sana</p>	<p>Se observa crecimiento de la planta, no se detectan daños en las hojas ni tallo</p>

**Tabla 42. Evaluación de la infección en plantas de café (in-vitro, Medio M+M+A) día 7, 10 y 14**

Tratamiento	Día 7	Día 10	Día 14
<b>Control (C)</b>			
<b>Descripción</b>	Se observa marchitez en un par de hojas	Se observa la pérdida de las 2 hojas detectadas con marchitez en la última revisión	Se observa crecimiento en la planta, se observa marchitez en las hojas mas pequeñas
<b>T1A</b>			
<b>Descripción</b>	No se observan daños aparentes, se observa un poco de fenolizacion en el medio de cultivo	Se observa aumento de la fenolizacion del medio de cultivo, no se observan daños en la planta	Se observa crecimiento de la planta, no se observa avance de la fenolizacion en el medio de cultivo, no se observa daño en planta
<b>T2A</b>			
<b>Descripción</b>	Se observa marchitez en el limbo de una de las hojas de la planta	Se muestra avance en la marchitez de la hoja extendiendose del limbo hacia el peciolo de la hoja	Se observa crecimiento de la planta, la marchitez se muestra en nuevas hojas

<p><b>T3A</b></p>			
<p><b>Descripción</b></p>	<p>Se observan pequeñas manchas en las hojas, la planta presenta síntomas de marchitez</p>	<p>Se observa el avance de la marchitez de las hojas, los peciolo muestran flexibilidad excesiva derivada de la marchitez</p>	<p>Las hojas muestran oxidación por manchones y la planta presenta síntomas de decadencia disminuyendo su longitud por la flexibilidad que presenta</p>

## 7. Conclusiones

Tras la búsqueda de métodos de conservación de roya y los diferentes experimentos que fueron realizados a lo largo de los meses que se trabajó en este proyecto, analizamos la importancia de tener en stock uredinosporas de roya viables disponibles en cualquier época del año siendo el café uno de los cultivos con mayor importancia económica en el mundo y nuestro país existe la necesidad de búsqueda de métodos para erradicar uno de los principales patógenos que merman el rendimiento de los huertos productores de café como lo es *Hemileia vastatrix*, si bien en este proyecto solo se consiguieron los primeros datos necesarios para lograr conservar de manera óptima las uredinosporas de roya de café como resultado de los experimentos que se realizaron es necesario continuar con la investigación hasta conseguir el método más efectivo.

Dentro de los resultados obtenidos en el primer ensayo (Evaluación de la germinación de semillas de café, *Coffea arabica*) bajo diferentes longitudes de onda de la luz visible el mejor tratamiento fue el TG3 que pertenece a la luz roja arrojando un porcentaje del 95% en un lapso de 42 días y el que tuvo menor porcentaje de germinación fue el TG4 correspondiente a la luz morada obteniendo únicamente el 80% de germinación en los mismos 42 días.

Posteriormente en el ensayo número dos (Aislamiento, viabilidad y métodos de conservación [ Liofilización] de la roya del café) después de realizar pruebas con diferentes soluciones crioprotectoras se obtuvo como resultado que la mejor opción para liofilizar es la solución L20e la cuál corresponde a la mezcla de agua destilada estéril más leche descremada al 20% pasando por un proceso de esterilización por medio del uso de autoclave, la solución crioprotectora menos factible fue la L10T10 que corresponde a la mezcla de agua destilada estéril más leche descremada al 10% más Trehalosa al 10% sin pasar por el autoclave.

En el tercer ensayo ( Infección de la roya en hojas y plantas de café en condiciones in vitro ) se obtuvo que después de realizar la inoculación de roya en las hojas de café y tras 14 días de evaluación se llegó a la conclusión que el tratamiento que mostró más cambios como clorosis, necrosis y pequeñas fisuras en la hoja fue el tratamiento T3 al cual corresponde la solución de  $1 \times 10^4$  y el tratamiento que menos mostró cambios tras los mismos días de evaluación fue el control al cual no se le agregó nada.

En el caso de las plantas el tratamiento que presenta más daño es el T2MS dónde la planta muestra síntomas de decadencia presentando mayor flexibilidad de los peciolo y el tallo, se detectan pequeñas manchas con apariencia de marchitez y el tratamiento que menos mostró cambios fue el control el cual solo presento enroscamiento en las hojas y leves síntomas de marchitez.

Si alguien fuera a repetir los experimentos o continuar con los avances como sugerencia sería contemplar con anticipación el desarrollo de plantas para al momento de iniciar con los experimentos contar con plantas en diferentes etapas fenológicas ya que son el elemento principal necesario para evaluar los métodos de conservación de *Hemileia Vastatrix* .

## 8. Bibliografía

- Abdelnour, A.; Escalant, J. (1994) citados por Jadán et al., (2010) Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Turrialba: CATIE, CR. 5-6 p.
- Ajiboye A. A. (2010) Dormancy and seed germination in *Tamarindus indica* (L.). *The Pacific Journal of Science and Technology* 11(2): 463 – 470.
- Amico AM, Ituarte-Lima C, Elmqvist T. Learning from social–ecological crisis for legal resilience building: multi-scale dynamics in the coffee rust epidemic. *Sustain Sci.* 2020;15:485–450. doi: 10.1007/s11625-019-00703-x.
- APS. 2011. The American Phytopathological Society. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>
- Ascanio, C. E. y Arcia, M. A., (1994). Efecto de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. Var Garnica. *Agron Trop*, 2: 165-177
- Avelino J, Anzueto F (2020) Coffee Leaf Rust epidemics in Central America: chronicle of a resistance breakdown following the great epidemics of 2012 and 2013. In: *Emerging Plant Diseases and Global Food Security*. The American Phytopathological Society, pp. 185–198. 10.1094/9780890546383.009
- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P, Anzueto F, Hruska AJ, Morales C. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Secur.* 2015;7:303–321. doi: 10.1007/s12571-015-0446-9
- Ayala, P. 2013. Cultivo in vitro (micropropagación) de yemas de café (*Coffea arabica*) (en línea). Tesis Ing. en Biotecnología, Cultivo de Tejidos Vegetales. Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí, Ecuador. 2 p. Disponible en: [http://es.slideshare.net/pahola\\_estefy/yemas-de-caf](http://es.slideshare.net/pahola_estefy/yemas-de-caf)
- Ayerbe, L (1990) Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, ES. Pp.: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
- Baíza, A.M., Vázquez-Ramos, J.M. and Sánchez de Jiménez, E., 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* 135; 416–421. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80097-5)

- BASKIN, C. y Baskin, J. (2001). Environmental factors causing changes in dormancy states. *Seeds. Ecology, Biogeography and evolution of dormancy and germination.* Academic Press. California -USA. 666 p. pp. 73-76.
- Baumann, T y Neuenschwander, B (1990). Tissue culture in coffee biotechnology. *Café Cacao Thé*, 24(2): 159-164
- Belin C, Megies C, Hauserova E, Lopez-Molina L. 2009. Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell*, 21(8): 2253–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067702>
- Berndt J. D. (2014) DOG1 control seed germination. *Science Signaling* 7: 238.
- Berthouly, M. (1997). Biotecnologías y técnicas de reproducción de. *Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura.* Heredia, Costa Rica, 25-49.
- Berthouly, M y Michaux-Ferriere, N M (1996). High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 44: 169-176
- Bock. (1962). Dispersal of uredospores of *Hemileia Vastatrix* under field conditions. *Trans. Brit. Mycol* , 45; 63-74.
- BOURGET, C. M. (2005) An Introduction to Light-emitting Diodes, *HortScience*, 43 (7): 1944-1946.
- BRIDSON, D., VERDCOURT, B. *Coffea*. In *Flora of Tropical East Africa - Rubiaceae (Part 2)*. ed. RM Polhill, 703-727. A.A. Balkema, Rotterdam. 1988.
- BRIDSON, D.M. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). *Kew Bulletin*: 42:453-460. 1987.
- CABI (2018) El estado actual de la rentabilidad del café en Centroamérica. *PROMECAFÉ*. Guatemala. <https://promecafe.net/?p=5405>
- CABI. 2016. *Crop Protection Compendium*. En línea: <http://www.cabi.org/cpc/>.
- Canet Brenes G, Soto Viquez C, Ocampo Thomason P, Rivera Ramírez J, Navarro Hurtado A, Guatemala Morales G, Villanueva Rodríguez S (2016) La situación y tendencias de la producción de café en América Latina y El Caribe. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. San José, Costa Rica. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/2792>
- CARDOSO, V. J. M. (2009). Fotometria para biólogos. *Oecologia Brasiliensis*, 545-553.

- CEDRSSA. (Julio de 2019). Investigación Interna: Comercio internacional del café, el caso de México. Obtenido de <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/94Caf%C3%A9%20-Producci%C3%B3n%20y%20Consumo.pdf>
- CENCI, A., COMBES, M.C., LASHERMES, P. Genome evolution in diploid and tetraploid *Coffea* species as revealed by comparative analysis of orthologous genome segments. *Plant Mol Biol* 78:135-145 2012.
- CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet* 261, 259-266 1999
- Chaudhuri A., K. L. Singh and R. K. Kar (2013) Interaction of hormones with reactive oxygen species in regulating seed germination of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *J. Plant Biochemistry & Physiology* 1 (1): 1 – 5.
- CHEVALIER, A. Les caféiers du globe Systématique des caféiers et faux-caféiers et faux- caféiers maladies et insect nuisibles. *Encyclopédie Biologique XXVIII*. Paris. 356. 1947.
- Coronado, J. A. (2000). Coronado, James, Análisis de las investigaciones en Fito protección publicadas en la Revista MIP (Manejo Integrado de Plagas). Editorial Limusa. Mex.
- Costa de Rezende, J., Ferreira, E., Pasqual, M., Villa, F., Bothelo, C. y Pereira, S.(2008). Development of *C. arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffee Science*, 3(1): 30-37
- Coste, R. (1968). Le caféier. G.P. Maisonneuve et Larose. Pris: 310 p.
- Cristancho, M. A., Rozo Y., Escobar, Rivillas C, C. A, and Gaitán, A. L. 2012. Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia. *New Disease Reports* 25, 19.
- Crozier, A., Ashihara, H., & Tomas-Barberan, F. (2011). Teas, cocoa and coffee: plant secondary metabolites and health. Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- DAVIS, A.P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D.M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot Jour Linnean Society* 152: 465-512. 2006.
- Diccionario de etimología. (25 de abril de 2021). Obtenido de Diccionario de etimología en línea Coffee.: <https://www.etymonline.com/search?q=coffee>

- Donohue K., R. Rubio C., L. Burghardt, K. Kovach and C. G. Willis (2010) Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Evolution and Systematics* 41: 293 – 319.
- Dublin, P (1981). Embryogenése somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. *Café Cacao Thé*, 25 (4): 237-242
- Dublin, P (1984). Techniques de reproduction végétative in vitro et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*, 28 (4): 231-244
- Dublin, P. 1991. Multiplicación Vegetativa de café, hevea y cacao, capítulo 26. In: Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 577-596 p.
- Dupre SI (2018) Coffee leaf rust and smallholder farmers in Guatemala: livelihood impacts, migration and other coping strategies. Doctoral Dissertation, University of Maryland Baltimore County, USA
- Ecured, (2017) Las citoquininas, Revista, Artículo científico n° (168 616) mayo del 2017, disponible en: <https://www.ecured.cu/Citoquinina>
- Etienne H, B. E. (1999). Aportes de la. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA.. San José, Costa Rica, 457- 495
- Fay, M.F., 1992. "Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods". *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*,, 28: 1-4.
- Fernández, R; Hermoso, L y Menéndez, A (2005). Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. *Interciencia*, 30(11): 694-698
- Finkelstein R., W. Reeves, T. Ariizumi and C. Steber (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review Plant Biology* 59: 387 – 415.
- Folmer, B. (2016). *The craft and science of coffee*. Londres, Reino unido: Academic Press.
- Fuentes, S; Calheiros, M; Maneti-Filho, J y Vieira, L (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 60: 5-13
- García, E de y Menéndez-Yuffá, A (1987). Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor". *Café Cacao Thé*, 31: 15- 22

- García, E y Rafael, M (1989). Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* L. Catimor) cultivados in vitro. *Agron Trop*, 40 (4-6): 281-290
- Gargia, J.1991.Fitohormonas: Tratamientos hormonales en frutas. *Fruticultura profesional*, N°37.España 18-29p.
- Gatica, A ;Arrieta, G y Espinoza, A M (2007). Comparison of three in vitro protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra ana Catuai. *Agronomía Costarricense*, 31(1):85-94
- Giridhar, P; Kumar, V; Indu, E; Ravishankar, G y Chandrasekar, A (2004). Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex. Fr. *Acta Bot Croat*, 63(1):25-33
- Girón, I. (1998). Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal. *Magíster Scientiae*. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical, 92.
- González, S. 2003. Tema 5: Medios de cultivo (en línea). Departamento de Biología vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Consultado el 10 oct. 2006. Disponible en: <http://fbio.uh.cu/webfv/docencia/tema5.doc>.
- Hatanaka, J; Arakawa, O; Yasuda, T; Ushida, N y Yamaguchi, I (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep*, 10: 179-182
- Hatanaka, T; Sawabe, E; Azuma, T; Uchida, N y Yasauda, T (1995). The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Sci*, 107: 199-204
- Herrera, J.; Moreno, L; Acuña, J.; De Peña, M y Osorio, D (2002). Colchicine-induced microspora embryogenesis in coffee. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 71:89-92.
- Hidalgo, Cecibel, (2014) Estudio preliminar para la obtención de explantes de cacao (*Theobroma cacao* L.) A través de embriogénesis somática”, Tesis de Grado, Ingeniería Agronómica, Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Agrarias, pág (20),
- Hirons, M., Mehrabi, Z., Gonfa, T., Morel, A., Gole, T., McDermott, C., & Norris, K. (2018). En busca de un café resiliente al clima en Etiopía: una revisión crítica. *Geoforo*, 108-116.
- ICO (2014) World coffee trade (1963 – 2013): a review of the markets, challenges and opportunities facing the sector. International Coffee Organization, London, UK. <http://www.ico.org/news/icc-111-5-r1e-world-coffee-outlook.pdf> Accessed 22 Sep 2020

- Infojardin. 2008. Giberelinas. Consultado el 8 de mayo del 2014. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/5512655/Giberelina>
- INMECAFE, Instituto Mexicano del Café, Nestlé. 1990. El Cultivo de Café. Xalapa Veracruz, México.
- ITC (Centro de Comercio Internacional) (2011) Guía del exportador de café: tercera edición. CCI, Ginebra, Suiza. 247 págs. <https://www.intracen.org/the-coffee-exporters-guide-third-edition/>
- JAO, R. C.; Fang, W. (2005). Effects on Frequency and Duty Ratio on the Growth of Potato Plantlets In Vitro Using Light-emitting Diodes, HortScience, 39 (2): 375-379.
- JENKINS, G. I. (2014,). The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology. The Plant Cell, vol. 26, no 1, p. 21-37.
- JORGE H. R. (2006). Fisiología de la Producción de los Cultivos Tropicales. 1ª Ed. Editorial Universidad de Costa Rica (San Jose). pp: 62 – 65.
- Juma C, M. J. (1994). Tissue Culture for Coffee: The case of Uganda. Biotechnology and Development Monitor, 19-20.
- KOOLMAN. R. (2004). Bioquímica. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana (Madrid). pp: 370.
- Krikorian, A (1991) Propagacion clonal in vitro, in Cultivo de tejidos en la agricultura. Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 95-126p.
- Kucera B., Cohn M.A., Leubner-Metzger G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Sci. Res., 15(4);281–307. <https://doi.org/10.1079/SSR2005218>
- Kumar R., K. K. Misra, D. S. Misra and M. Brijwal (2012) Seed germination of fruits crops: a review. HortFlora Research Spectrum 1 (3): 199 – 207.
- Kushalapa, A. C. and Eskes, A. R. 1989. Advances in coffee rust research. Annual Review of Phytopathology. 27: 503-531.
- Lanaud, C (1981). Production de plantules de C. Canephora par embryognése somatique réalisée á partir de culture in vitro d'ovules. Café Cacao Thé, 25 (4): 231-236
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; LEROY, J.F. Les grandes lignées de caféiers. In IX Colloque Scientifique International sur le Café, 473-477. ASIC, Londres, UK. 1980.

- Linkies A. and G. Leubner – Metzger (2012) Beyond gibberellins and abscísic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31: 253 – 270.
- Londoño, L y Orozco, F (1986a). Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo in vitro. *Cenicafé*, 37 (4): 119-133
- López, O.; Moreno, J. y Pacheco, S. (2001). Avances en propagación de cacao - *Theobroma cacao*- por embriogénesis somática en México. In *ingenic: Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding*. Kota Kinabalu, MY. MX.
- López-Encina, C., e I. González-Padilla, 1996. "A propósito de semillas". *Enc. en la Biol.*, 33: 3.
- Lucas, E (2002) Auxinas, documento en línea, pag (1) disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos10/auxinas/auxinas2.shtml>
- Malonek, S; C Bomke; E Bornberg-Bauer; MC Rojas; P Hedden; P Hopkins & B Tudzynski. (2005) Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry* 66: 1296-1311.
- Mangiarua (2008). Como hacer un esqueje. (en línea). Consultado 28 feb. 2013. Disponible en: <http://bonsai-baires-esquejes.blogspot.com/>
- MANRIQUE, J. P. (2006). Efecto del medio básico, carbón activado, ácido giberélico y calidad de luz en la germinación in vitro de *Masdevallia auropurpurea* Reich. *Revista Científica*, (9), 117-141.
- Marassi, M (2004) Hormonas vegetales. Universidad Nacional del Noroeste. Facultad de Agroindustria y Facultad de Ciencias Agrarias. República Argentina Consultado el 04 de febrero 2007. Disponible en: <http://fai.unne.edu.ar/biología/plantas/hormona.htm>
- MEISEL, L., Urbina, D., & Pinto, M. (2011). Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. *Fisiología vegetal*. FA Squeo Cardemil (eds), Ediciones Universidad de La Serena, Chile. Cap, 18, 1-10.
- Menéndez-Yuffá, A y García, E de (1998). La biotecnología aplicada al café. *Mem IBE*, 1: 165-168
- Monaco, L. C. 1977. Consequences of the introduction of coffee rust into Brazil. In: PR Day, Ed. *The Genetic Basis of Epidemics in Agriculture*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 287: 57- 71.

- NAVARRO PAZ, V. (2013). Análisis de la utilización de luz emitida por lámparas de diodo LEDs en la producción in vitro para la obtención de semillas prebásicas de *Solanum tuberosum*. Trabajo final de ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Neuenschwander, B y Baumann, T (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep*, 10: 608-612.
- Neuenschwander, B. y Baumann, T (1995). Increased frequency of dividing microspores and improved maintenance of multicellular microspores of *Coffea arabica* in medium with coconut milk. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 40:49-54
- Noceda, C; Jiménez, E; Barbón, R; Capote, A; Quiala, E; Chávez, M; Pérez, N y Pérez, J (1998). Estudio del potencial embriogénico en diferentes explantes foliares de *Coffea canephora* Cv. Robusta (Resumen). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba. p. 515
- Paris Moreno, L (2015) Obtención de plantas de caimito *Chrysophyllum caimito* L. utilizando diferentes condiciones para su desarrollo in vitro. Tesis de Maestría. ESPOL. 106 p.
- Pedrosa G. M. and Q. Souza G. (2013) Reactive oxygen species and seed germination. *Biología* 68 (3): 351 – 357.
- Pendergrast, M. (2010). *Uncommon Grounds: The History of Coffee and How It Transformed our World*. New York: Basic Books .
- Pereira, A; de Carvalho, S; Pasqual, M y Santos, F (2007). Embriogenese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Acaia Cerrado: Efeito de cinetina e ácido giberelico. *Cienc Agrotec Lavras*, 31(2):332-336
- Peter, H. (2006). *Species Plantarum*. En C. v. Linne, Missouri Botanical Garden (págs. 1 - 560).
- Pierik, R.L.M., 1993. "Micropropagation: Technology and Opportunities". En: *Plant biotechnology commercial prospects and problems* (Prakash, J.; Pierik R.L.M., Eds.), Science Publishers, Inc., Lebanon, pp. 9-22.
- PONS, T. 2000. Seed responses to light. En: Fenner, M (Ed). *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CAB International, New York, NY

- PROMECAFE e IICA. Junio 2013. La crisis del café en Mesoamérica, causas y respuesta apropiada (en línea). Disponible en: <http://www.iica.int/Esp/prensa/BoletinRoya/2013/N01/Roya-MA.pdf>
- Quiroz-Figueroa, F; Fuentes-Cerda, C; Rojas-Herrera, R y Loyola-Vargas, V (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep*, 20 (12): 1141-1149
- Quiroz-Figueroa. (2006). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. *Methods in Molecular Biology* (pág. 318).
- Radice, S., (2004) *Morfogénesis In Vitro*. Ed. Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Luis Mroginski. INTA-DDIB, Buenos Aires., 446pp.
- Rajjou L., M. Duval, K. Gallardo, J. Catusse, J. Bally, C. Job and D. Job (2012) Seed germination and vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 507 – 533.
- RAMOS, P., Navas Gracia, L. M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Martin Gil, J., Martin Bravo, E., ... & Duran Altisent, J. M. (2010). Diodos emisores de luz para irradiación de plantas. *Scribd*.
- Rayner, R. W. 1961. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.) *Annals of Applied Biology* 49, 497-505.
- Razdan (2003), M.K. *Introduction to plant tissue culture*. 2ª ed. Enfield. New Hampshire, U.S.A... 375 pp.
- Reyes, J., Jiménez-García, L.F., González, M.A. and Vázquez-Ramos, J.M. (1991) Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research* 1, 113–117. <https://doi.org/10.1017/S096025850000074X>
- Rhiney, K., Guido, Z., Knudson, C., Avelino, J., Bacon, C., Leclerc, G., & Bebbber, D. (2021). Epidemics and the future of coffee production. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias*, 118 (27) e2023212118.
- Rivillas, O.C., Serna, G. C., Cristancho, A. M., y Gaitán, B. A. 2011. *La roya del Cafeto en Colombia (Impacto manejos y costos del control, resultados de investigación)*. Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafe) chinina, Cladas, Colombia. 53 pp.
- Roca, W.& Mroginski, L. (1991) citados por Jadán et al., (2010).. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali: CO. 970 p.

- RUIZ, B. C., Laguna, C. A., Iglesias, A. L. G., Damon, A., Marín, H. T. N. J., Azpíroz, R. H. S., & Moreno, M. J. L. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *Phyton* (Buenos Aires), 77, 203-215.
- Salisbury F.B., Ross, (1994) C.W. "Fisiología Vegetal". Grupo Editorial Iberoamericana S.A. México
- SIAP-SADER. 2019. Anuarios Estadísticos de la Producción Agrícola en México (2017). Secretaría de Agricultura, y Desarrollo Rural. En línea: <http://www.siap.gob.mx>. Fecha de consulta: mayo, 2019
- Silva- Acuña. (1990). Control Químico de la Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) con el uso de fungicida sistémico y uno protector. *Fitopatología Venezolana* 3, 2: 22-27.
- Singh P. M., R. G. S. Rao and M. Rai (2004) Relationship between seed imbibition and seedling emergence in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Veg. Sci.* 31 (1): 89 – 91
- Skirvin RM; Motoike S; Norton MA; Ozgur M; AL-Juboory (1999). Workshop on micropropagation establishment of contaminant free perennial plants in vitro *Cell. Dev. Biol.-Plant*. Vol. 35:4. 278-280.
- Solano, W. (2001). Efecto de las Características de Cultivo en Suspensión. Universidad de Costa Rica, 50-87.
- Solocannabis (2007). "Propagación por esquejes" Disponible en: <http://www.solocannabis.com/modules.pp?name=Content&pa=showpage&pid=58%20>. Consultado: 2010-06-21 Central de Venezuela. 1985. 110 p
- Söndahl, M; Salisbury, J y Sharp, W (1979). SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Z Pflanzenphysiol*, 94: 185-188
- Söndhal, M y Mónaco, L (1981). In vitro methods applied to coffee. En: Thorpe, T.A. *Plant tissue culture methods and applications in agriculture*, Academic Press, USA. Pp: 325-347
- Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19 (4): 509-514
- STOFFELEN, P. *Coffea and Psilanthus in Tropical Africa: A systematic and palynological study, including a revision of the west and Central African species*. PhD diss., Katholieke Universiteit Leuven, 187-209. 1998.

- STOFFELEN, P., NOIROT, M., COUTURON E, et al. A new caffeine free species from Cameroon. Bot. J. Linn. Soc., 158: 67-72. 2008.
- Subbiah V., Reddy K.J., 2010. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in Arabidopsis. J. Biosci. 35:451–458. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0050-2>
- Taíz, L. Seiger, E. (2006). Fisiología Vegetal, Volumen II. Colección ciencias experimentales. Ed, III. Publicado, Universidad Jaume. P 864. Consultado el 6 de mayo del 2014.
- Teketay, D. (1998). History, botany and ecological requirements of coffee. Walia, p. 28-50.
- Toole, E. H., Hendricks, S. B., Borthwick, H. A., & Toole, V. K., 1956. Physiology of Seed Germination, Annual Review of Plant Physiology, 7(1): 299–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.07.060156.001503>
- Vázquez-Ramos, J. M. and de la Paz Sánchez, M., 2003. The cell cycle and seed germination. Seed Science Research 13:113-130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>
- Venegas, F. (31 de Agosto de 2016). Coffee media . Obtenido de Taxonomia del cafe : <https://www.yoamoelcafedecolombia.com/2016/08/31/taxonomia-del-cafe/>
- Vivanco (2008). Evaluación de la eficacia del Bioplus, Hormonagro y Enraizador Universal en la propagación asexual de Hypericum (hipericumssp). (en línea). Tesis Ing. Agr. Riobamba, EC. Escuela Politécnica de Chimborazo. 135p. Consultado 23 dic. 2012. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/361/1/13T0656%20VIVANCO%20JULIO.pdf>
- Weitbrecht K., K. Müller and G. Leubner-Metzger (2011) First off the mark: early seed germination. Journal of Experimental Botany 62 (10): 3289 – 3309.
- Yasuda, T; Fujii, Y y Yamaguchi, T (1985). Embryogenic callus induction from Coffea arabica leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol, 26: 595-597
- Yılmaz, B., Acar-Tek, N., & Sözlü, S. (2017). Herencia cultural turca: una taza de café. Revista de comidas étnicas, 213-220.