

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

TEMA:

**“OBTENCION DE VITROPLANTAS DE *Coffea* sp. A PARTIR DE EMBRIONES
SOMÁTICOS”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Línea de investigación: Biotecnología, energía y recursos naturales renovables

AUTORA:

Gabriela Estefania Valenzuela Cuasapaz

DIRECTORA:

Ing. Tania Salomé Sulca Villamarín PhD.

Ibarra – Ecuador
2025



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401981527		
APELLIDOS Y NOMBRES:	VALENZUELA CUASAPAZ GABRIELA ESTEFANIA		
DIRECCIÓN:	Bolívar-Carchi		
EMAIL:	gevalenzuelac@utn.edu.ec estefaniivalenzuela90@gmail.com		
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0981559979

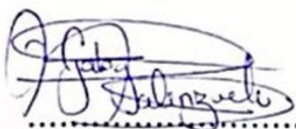
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Obtención de vitroplantas de <i>Coffea</i> sp. a partir de embriones somáticos.
AUTORA:	VALENZUELA CUASAPAZ GABRIELA ESTEFANIA
FECHA: DD/MM/AAAA	24/07/2025
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	☒ PREGRADO ☐ POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
DIRECTORA:	Ing. Tania Salomé Sulca Villamarín PhD.

CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 24 días del mes de julio del 2025

EL AUTOR:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Gabriela Valenzuela', is written over a horizontal dotted line.

Gabriela Estefania Valenzuela Cuasapaz

C.C.: 0401981527

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 24 de julio de 2025.

Ing. Tania Salomé Sulca Villamarín PhD.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) 

Ing. Sulca Villamarín Tania Salomé PhD.

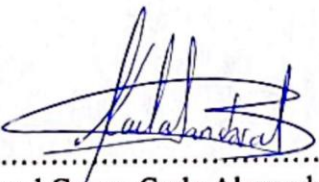
C.C.: 1719083717 .

APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo Integración Curricular “OBTENCIÓN DE VITROPLANTAS DE *Coffea* sp. A PARTIR DE EMBRIONES SOMÁTICOS” elaborado por Valenzuela Cuasapaz Gabriela Estefania, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f): 
Ing. Sulca Villamarín Tania Salome PhD.

C.C.: 1719083717.

(f): 
Ing. Sandoval Guano Carla Alexandra MSc.

C.C.: 1718017294.

PRESENTACIÓN

Yo, Valenzuela Cuasapaz Gabriela Estefania como autor de la Tesis Titulada **“Obtención de vitroplantas de *Coffea* sp. a partir de embriones somáticos”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

AGRADECIMIENTO

En infinito agradecimiento a mis padres Manuel Valenzuela y Lidia Cuasapaz, quienes se encargaron de forjar mis sueños, ser mi apoyo y mi principal motivación. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, los amo con todo el corazón.

A mis hermanos Vale y Jhon por acompañarme con risas y bromas durante cada etapa de lo que hoy ha sido mi vida y a mi hermanito Jampi mi pequeño cómplice y confidente que, aun siendo muy pequeño trato de comprender y de darle un riguroso seguimiento a esta investigación, sin duda es mi motivo a ser mejor cada día.

A las docentes que guiaron este proyecto, la Msc. Carla Sandoval por su sabio conocimiento y a quien dirigió esta investigación la PhD. Tania Sulca, por su constante apoyo, interés y comprensión en todo momento.

A mis amigas Melany López y Rubí Molina por ser de lo más bonito que encontré en la carrera, gracias por su presencia en mi vida, sus sabios consejos, las risas durante clases y principalmente por su apoyo incondicional.

A mis mascotas Elefante y Lucy por recibirme con tanta alegría cada fin de semana y a Micifuz mi gatito en el cielo, por haberme acompañado y abrigado en tantas noches de desvelo.

LISTA DE SIGLAS

ANECAFÉ. Asociación Nacional Ecuatoriana de Café.

ANOVA. Análisis de Varianza.

DCA. Diseño completamente al azar.

EET-P. Estación Experimental Tropical Pichilingue.

ES. Embriogénesis somática.

INIAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

MS. Murashige y Skoog.

MAGAP. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

PF. Peso fresco.

SCIA. Servicio Cooperativo Interamericano de Agricultura.

SC. Suspensiones celulares.

UICN. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

2,4-D. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

6-BAP. 6-Bencilaminopurina.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	7
LISTA DE SIGLAS	8
ÍNDICE DE CONTENIDO	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE ANEXOS	14
RESUMEN	15
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO I	17
INTRODUCCIÓN	17
1.1 Planteamiento del problema	17
1.2 Justificación.....	19
1.3 Objetivos	20
1.3.1 Objetivo general.....	20
1.3.2 Objetivos específicos	20
1.4 Pregunta de investigación.....	20
CAPÍTULO II	21
MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Importancia económica del café en Ecuador.....	21
2.2 Distribución y origen de Coffea sp. en Ecuador.	22

2.3 Importancia de la diversidad genética para la conservación del café.	23
2.4 Conservación ex situ: bancos de germoplasma y su papel en la conservación.	24
2.4.1 La embriogénesis somática y su aplicación en la conservación del café	25
CAPÍTULO III.....	28
METODOLOGÍA	28
3.1 Descripción del área de estudio	28
3.2 Inducción de indiferenciación celular.....	28
3.3 Ejecución del primer objetivo.....	28
3.3.1 Proliferación celular de callos de café	28
3.4 Ejecución del segundo objetivo.....	30
3.4.1 Obtención de embriones somáticos de café.....	30
3.4.1.1 Germinación de embriones somáticos de Coffea sp.....	31
3.5 Ejecución del tercer objetivo	32
3.5.1 Establecimiento de suspensiones celulares de café	32
3.6 Análisis estadístico	33
3.6.1 Proliferación celular de callos	33
3.6.2 Cuantificación de embriones somáticos	33
3.6.3 Biomasa en suspensiones celulares	34
CAPÍTULO IV.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Proliferación celular de callos de Café	35

4.2	Obtención de Embriones somáticos	39
4.2.1	Germinación de Embriones somáticos.....	43
4.3	Establecimiento de suspensiones celulares de café	45
CAPÍTULO V		49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		49
5.1	Conclusiones	49
5.2	Recomendaciones.....	50
REFERENCIAS.....		51
ANEXOS		60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tipo de callos de café. (a) explante con callo mixto: friable (1) y compacto (2). Callo compacto (b) y callo friable (c).	29
Figura 2 Embriones somáticos obtenidos de <i>Coffea</i> sp. en diferentes fases de maduración.	31
Figura 3 Peso fresco (g) de callos compactos y friables en diferentes concentraciones de 2.4-D a 60 días de evaluación.....	35
Figura 4 Cinéticas de crecimiento de callos compactos y friables en los tratamientos evaluados, los puntos representan a los datos experimentales.....	37
Figura 5 Cinéticas de productividad de callos compactos y friables en los tratamientos evaluados.	37
Figura 6 Embriones somáticos formados en diferentes tratamientos de regeneración celular; (a) Embriones en el tratamiento R1A1I a los 120 días de cultivo, (b) Tratamiento R1A2I, 150 días, (c) Tratamiento R1A1O, 180 días.	39
Figura 7 Embriones somáticos formados en diferentes tratamientos de regeneración celular. .	40
Figura 8 Germinación parcial de embriones somáticos en G2: a) Inicio de germinación, b) Elongación de cotiledones c) Formación de meristema caulinar, d) Presencia de cloroplastos, e) Plántula de <i>Coffea</i> sp.....	43
Figura 9 Germinación completa de embriones somáticos en G2: a) Eje cotiledonar, b) Eje radicular.	44
Figura 10 Peso fresco de suspensiones celulares en diferentes concentraciones de 2.4-D.	45
Figura 11 Cinética de crecimiento en suspensiones celulares del tratamiento S1.	47
Figura 12 Productividad volumétrica en suspensiones celulares del tratamiento S1.	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Tratamientos utilizados en la proliferación celular de callos.</i>	29
Tabla 2 <i>Medios para regeneración celular en Coffea sp.</i>	30
Tabla 3 <i>Tratamientos utilizados en la diferenciación de embriones somáticos a partir de callos de café.</i>	31
Tabla 4 <i>Tratamientos utilizados en la germinación de embriones somáticos.</i>	32
Tabla 5 <i>Tratamientos utilizados en el establecimiento de suspensiones celulares.</i>	32
Tabla 6 <i>Velocidad específica (μ) y tiempo de duplicación de callos de Coffea sp.</i>	38

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1</i> Análisis de la varianza para la proliferación de callos.	60
<i>Anexo 2</i> Análisis de la varianza para la productividad superficial en la proliferación de callos.	60
<i>Anexo 3</i> Análisis de la varianza para el establecimiento de suspensiones celulares.	60
<i>Anexo 4</i> Análisis de la varianza para la obtención de embriones somáticos.	61
<i>Anexo 5</i> Análisis Chi cuadrado de Pearson en la germinación de embriones.	61

RESUMEN

Según la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el género *Coffea* se enfrenta a un alto riesgo de extinción con 75 de 124 especies amenazadas (Moat et al., 2020). Ante las limitaciones de los métodos tradicionales de conservación y la inviabilidad a la crioconservación convencional debido a la naturaleza intermedia de sus semillas cigóticas, se requieren urgentemente alternativas biotecnológicas que permitan su preservación. Bajo esta perspectiva, la presente investigación busca contribuir a la conservación de *Coffea* sp. mediante la obtención de embriones somáticos funcionales. Este estudio evaluó la proliferación de callos compactos y friables bajo la influencia de diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Para obtener vitroplantas, se generaron embriones somáticos a partir de callos compactos y se determinó su porcentaje de germinación. Finalmente se realizó el establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea* sp. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento en proliferación de callo fue T1C (1mg/L 2,4-D y callo compacto) con una producción superficial máxima de 7.5g/m²*d. En la obtención de embriones somáticos se observó que el tratamiento R1A1I (Medio R1, 2.2g/L de Gelzan y 3.98 µmol/m² * s) fue el que generó un mayor número de embriones con 66 embriones*g⁻¹ en peso fresco (PF) de callo compacto. A partir de estos embriones se logró una tasa máxima de germinación del 66.7%, la misma que dio origen a vitroplantas de *Coffea* sp. Finalmente, en el establecimiento de suspensiones celulares, la aplicación de 1mg/L de 2,4-D (S1), represento la mejor producción de biomasa con 161.7 mg/mL PF a los 30 días de cultivo. Estos resultados sugieren que en la multiplicación de células indiferenciadas es necesaria la incorporación de auxina y su relación proporcional con la citoquinina 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (2:1).

Palabras clave: *Coffea* sp., conservación, embriogénesis somática, cultivo *in vitro*, callogénesis.

ABSTRACT

According to the Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN), the *Coffea* genus is at high risk of extinction, with 75 out of 124 species threatened (Moat et al., 2020). Due to the limitations of traditional conservation methods and the impracticability of conventional cryopreservation because of the intermediate nature of its zygotic seeds, there is an urgent need for biotechnological alternatives that allow for their preservation. In this regard, the present study seeks to contribute to the conservation of *Coffea* species by producing functional somatic embryos. This study evaluated the proliferation of compact and friable callus under the influence of different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). To obtain vitroplants, somatic embryos were generated from compact callus, and the percentage of germination was determined. Finally, *Coffea* sp. cell suspensions were established. The results showed that T1C (1 mg/L 2,4-D and compact callus) was the best treatment for callus proliferation, with a maximum surface production of 7.5g/m²*d. When obtaining somatic embryos, the R1A1I treatment (R1 medium, 2.2 g/L Gelzan, and 3.98 µmol/m²*s) was observed to generate the highest number of embryos, at 66 embryos*g⁻¹ in fresh weight (FW) of compact callus. A maximum germination rate of 66.7% was achieved from these embryos, giving rise to *Coffea* sp. in vitro plants. In establishing cell suspensions, applying 1 mg/L of 2,4-D (S1) produced the most biomass with 161.7 mg/mL FW after 30 days of culture. These results demonstrate the necessity of incorporating auxin and maintaining a proportional relationship with the auxin 6-benzylaminopurine (6-BAP) (2:1) for the multiplication of undifferentiated cells.

Keywords: *Coffea* sp., conservation, somatic embryogenesis, *in vitro* culture, callogenesis.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La conservación de los recursos fitogenéticos de *Coffea* sp. se enfrenta a desafíos significativos debido a la creciente presión sobre los hábitats naturales (Bramel et al., 2017; ICO, 2020, 2022). La aplicación de las Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN ha revelado que aproximadamente el 60% de las especies de *Coffea* se encuentran amenazadas de extinción, donde el 10.48% se clasifican como en peligro crítico, el 32.26% en peligro y el 17.74% como vulnerables. El estado crítico de conservación de *Coffea* sp. pone en riesgo no solo a la biodiversidad, sino también a la producción de café, que es vital para millones de agricultores y economías en países en desarrollo como Ecuador (Bramel et al., 2017; Castilla-Valdés et al., 2020; Moat et al., 2020).

Debido al estado crítico de preservación de *Coffea* sp., los países productores han implementado estrategias para su conservación como los bancos *ex situ* de germoplasma en campo, que han demostrado ser una estrategia efectiva para la conservación, pero presentan diversas limitaciones (Bramel et al., 2017; Panis et al., 2020). Aunque se han establecido colecciones en varios países, solo alrededor del 55% de las especies de café se encuentran representadas y muchas de ellas no abarcan adecuadamente la diversidad genética necesaria para la mejora y adaptación de las especies a condiciones cambiantes (Bramel et al., 2017; Panis et al., 2020). Además, la conservación *ex situ* en campo, es vulnerable a factores ambientales y biológicos que amenazan la viabilidad de las colecciones (INIAP, 2018).

En Ecuador la conservación de germoplasma en campo de *Coffea* sp. se enfrenta a riesgos que amenazan su viabilidad a largo plazo (Plaza, Avellan et al., 2015). En el banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EET-P) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), se ha logrado evidenciar la vulnerabilidad de estas colecciones con la presencia documentada de plagas como el minador de la hoja (*Leucopptera coffeella*) y el taladrador del fruto (*Hipothenemus hampei*), lo que demuestra la vulnerabilidad de estas colecciones incluso bajo manejo institucional (Plaza, Avellan et al., 2015).

Además, al analizar la situación fitosanitaria del cultivo del café en el territorio nacional, en 2013 el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) mediante resolución No. 391-2013 decreto estado de emergencia para el sector cafetalero debido a que de las 200 mil hectáreas de plantaciones de la república, el 55% se encontraban afectadas por la roya (*Hamileia vastatrix*), sugiriendo que los bancos de germoplasma en campo con recursos limitados están más expuestos a pérdidas genéticas (MAGAP, 2013).

Por otra parte, el INIAP emplea la crioconservación de semillas cigóticas como método de preservación de germoplasma para diversas especies, sin embargo, no es aplicable para el café debido a la naturaleza intermedia de sus semillas, por lo cual únicamente pueden tolerar una pérdida de humedad de entre 7% y 12% de agua (Bramel et al., 2017; Mishra, 2020; Riviello-Cogco et al., 2021a). Mientras que para evitar el daño celular por la formación de cristales durante el congelamiento, se requiere de una desecación de al menos el 5% cuya característica únicamente se presenta en semillas ortodoxas, siendo necesaria la investigación para encontrar mejores alternativas en la conservación de *Coffea* sp. (Castilla-Valdés et al., 2020; Krishnan et al., 2021; Mishra, 2020; Riviello-Cogco et al., 2021a).

1.2 Justificación

El cultivo de café es uno de los más importantes a nivel mundial, no solo por su valor económico, sino también por su impacto social y cultural (Bramel et al., 2017). Se estima que más de 125 millones de personas dependen del café para su sustento, y su producción representa una fuente significativa de ingresos en muchos países en desarrollo como Ecuador (ICO, 2020). La combinación de estrategias para la conservación del café es fundamental para garantizar la sostenibilidad del cultivo y la protección de su diversidad genética (Bramel et al., 2017).

En este contexto, la embriogénesis somática se presenta como una herramienta biotecnológica prometedora para la conservación *ex situ* de *Coffea* sp. (Bramel et al., 2017). Esta técnica permite la producción de embriones a partir de células somáticas, lo que facilita la selección y multiplicación de variedades con características deseables, como resistencia a enfermedades y adaptación a condiciones ambientales adversas (Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023; Mishra, 2020; Valdés et al., 2021).

Además, los embriones somáticos son especialmente viables para su aplicación en técnicas de preservación, como la crioconservación. Está última facilitada por la capacidad de los embriones somáticos para resistir a la desecación, lo que permite el almacenamiento a temperaturas extremadamente bajas sin perder su viabilidad (Mishra, 2020; Valdés et al., 2021). Bajo esta perspectiva, la presente investigación busca contribuir a la conservación de las especies del género *Coffea* sp. mediante la obtención de embriones somáticos funcionales, esenciales para la aplicación de estrategias de preservación a largo plazo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general.

- Obtener vitroplantas de *Coffea* sp. a partir de embriones somáticos.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la proliferación de callos de *Coffea* sp.
- Obtener embriones somáticos a partir de callo de *Coffea* sp.
- Estandarizar un protocolo para el establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea* sp.

1.4 Pregunta de investigación

¿Es posible obtener vitroplantas de *Coffea* sp. a partir de embriones somáticos?

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia económica del café en Ecuador

El café es un producto de exportación clave, que contribuye a la balanza comercial de muchos países en desarrollo como Ecuador (ICO, 2020). Según los datos de la Asociación Nacional Ecuatoriana de Café (Anecafé) para el 2024 se exportaron 34462.8 toneladas de café (arábigo y robusta) por un valor de USD 136 millones de dólares, donde el café y sus elaborados representó el 1.02% de exportaciones no petroleras, de lo cual el 90.2% corresponde a productos industrializados y el restante a materia prima (Anecafé, 2024; Arreaga et al., 2021; Banco Central del Ecuador, 2024)

La producción de café genera ingresos significativos para los agricultores, muchos de los cuales dependen de este cultivo como su principal fuente de sustento (FAO, 2018). Para Ecuador representa una importante fuente de empleo directo, ya que genera plazas de trabajo para 67500 familias de productores. De forma indirecta constituye una fuente de trabajo para varios miles de familias adicionales, vinculadas a las actividades de comercio, agroindustria artesanal, industria de soluble, transporte y exportación (MAGAP, 2011). Además este producto encaja idealmente en el sistema de economía circular generando más empleo, sostenibilidad y valor en cada etapa de producción (ICO, 2020, 2022).

2.2 Distribución y origen de *Coffea* sp. en Ecuador.

El género *Coffea*, perteneciente a la familia *Rubiaceae*, comprende aproximadamente 124 especies, de las cuales las más relevantes para la producción comercial de café son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* (Bramel et al., 2017; Legesse, 2020).

Ecuador es un país de producción mixta, en él se cultivan las dos variedades comerciales *C. arabica* y *C. canephora*. La superficie aproximada que ocupa este cultivo en el territorio nacional es de 230 mil hectáreas en diferentes ecosistemas agrícolas de las regiones Litoral, Interandina, Oriental e Insular (Delgado et al., 2020; INIAP, 2018; MAGAP, 2011).

La aparición de los primeros cultivos de *C. arabica* en Ecuador datan de 1830, cuando se registraron plantaciones de este cultivo en el cantón Jipijapa de la provincia de Manabí (Arreaga et al., 2021). Las zonas cafetaleras para *C. arabica* se encuentran desde zonas costeras hasta altitudes que alcanzan los 2500 msnm. Por otra parte, la mejor producción de esta especie se encuentra a 1000 msnm. con climas templados, precipitaciones moderadas y suelos ricos en nutrientes. Ubicándose en provincias como Manabí, Loja, Zamora Chinchipe, Galápagos, El Oro, Chimborazo, Imbabura, Pichincha y Carchi (Delgado et al., 2020; Enríquez et al., 2014; MAGAP, 2011; SIPA, 2023).

Por otro lado, *C. canephora*, fue introducida en 1973 al cantón Quevedo, provincia de los Ríos en forma de semillas a la EET-P del INIAP. Esta especie se encuentra en zonas menores a los 1000 msnm. con precipitaciones frecuentes y climas calientes y húmedos, encontrándose en provincias como Sucumbíos, Orellana, Napo, Cotopaxi, Los Ríos, Bolívar, Guayas, Santo Domingo de los Tsáchilas y Santa Elena (Arreaga et al., 2021; Delgado et al., 2020; Enríquez et al., 2014; SIPA, 2023).

2.3 Importancia de la diversidad genética para la conservación del café.

La diversidad genética de las especies de *Coffea*, especialmente de *Coffea arabica*, es notablemente baja debido a su origen poliploide y a la historia de su cultivo. *C. arabica* es un alotetraploide ($2n = 4x = 44$) que se deriva de dos ancestros silvestres diploides, *C. canephora* y *C. eugenioides*, lo que ha contribuido a su escasa variabilidad genética (Arreaga et al., 2021; Geneti, 2019; Krishnan et al., 2021; Legesse, 2020). Esta baja diversidad se ve impulsada por la práctica de la autofecundación, que se presenta en un 83-95% en las poblaciones cultivadas en América latina (Alemayehu, 2017; Etienne, 2005; Geneti, 2019).

Los estudios han demostrado que un único evento de hibridación fue responsable de la formación de *C. arabica*, lo que resalta aún más la falta de diversidad genética en esta especie (Bellachew et al., 2008; Geneti, 2019). En contraste, otras especies de *Coffea*, como *C. canephora*, presentan una distribución más amplia y, por lo tanto, una mayor diversidad genética, lo que podría ser crucial para la mejora de la resistencia a enfermedades y la adaptación al cambio climático en el futuro. (Krishnan et al., 2021; Razafinarivo et al., 2013).

Desde su introducción en Yemen en el siglo XIV, *C. arabica* ha experimentado dos eventos significativos de dispersión que dieron lugar a las variedades '*Typica*' y '*Bourbon*', las cuales dominan el cultivo mundial por lo que han llevado a un estrechamiento del genoma cultivado, además estas son el origen de las variedades tradicionales de *C. arábica* que se cultivan en Ecuador como Caturra Roja, Caturra Amarilla, Catucaí Rojo, Mundo Novo, Villa Sarchí, Sarchimor, Cavimor, Pacas, Catimor CIFC, Costa Rica 95 y Colombia (Amores et al., 2004; Krishnan et al., 2021; Telenchana, 2022).

En Ecuador desde 1973 que se introdujo de germoplasma de café a la EET-P poco se sabe sobre la diversidad genética y su verdadero origen geográfico, cuya información es relevante tanto para su multiplicación como para su conservación (Loor Solórzano et al., 2017)

2.4 Conservación *ex situ*: bancos de germoplasma y su papel en la conservación.

En 50 países del planeta se preservan aproximadamente 445 accesiones de cafeto, que provienen de 26 especies y algunos híbridos en bancos de germoplasma en campo. Las especies *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* constituyen el 81% de estas accesiones, lo que resalta la baja representatividad de los jardines botánicos como reservorios de la diversidad genética del café (Bramel et al., 2017; Castilla-Valdés et al., 2020; Valdés et al., 2021).

Los bancos de germoplasma en campo desempeñan un papel crucial en la conservación de la biodiversidad agrícola del Ecuador, especialmente en el cultivo del café. Desde la creación del subprograma de café en 1951 por el Servicio Cooperativo Interamericano de Agricultura (SCIA) y su continuación por el INIAP en 1963, se ha introducido germoplasma de café, se han seleccionado variedades y estas han sido distribuidas a los agricultores del territorio nacional para su producción (Chamorro, 2021; INIAP, 2019).

El INIAP ha implementado un enfoque integral para la conservación del germoplasma de café, centrado en la investigación y mejora genética. Su metodología incluye la recolección y caracterización de accesiones de café arábigo y robusta, así como también, evalúa su comportamiento agronómico en diversas condiciones. En las estaciones experimentales del INIAP como en la de Portoviejo y Pichilingue, se cultivan variedades y líneas genéticas, permitiendo observar su adaptación y rendimiento. Se han realizado ensayos en híbridos como Catimor, Cavimor, Sarchimor, Catuaí, Mundo Novo, Caturra rojo, Caturra amarillo, Paca, Bourbon y

Villalobos en los cuales se ha evaluado su resistencia a enfermedades y productividad (INIAP, 2018, 2019).

Estos esfuerzos han sido fundamentales para desarrollar y mantener una variedad de cultivares prometedores en fincas cafetaleras que han sido seleccionadas no solo por su calidad de grano, sino también por su resistencia a enfermedades y adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas (INIAP, 2018, 2019).

2.4.1 La embriogénesis somática y su aplicación en la conservación del café

Los primeros estudios sobre embriogénesis somática (ES) en *Coffea* sp. se remontan a la década de 1970, con investigaciones iniciales de Staritsky en 1970 y de Söndahl y Sharp en 1977, que se centraron en *C. canephora* y *C. arabica*, respectivamente, su estudio se enfocó en el tipo de explante a emplear para obtener embriones somáticos (Loyola-Vargas et al., 2016; Mishra, 2020).

Mientras que las primeras aplicaciones de embriones somáticos en la conservación del café fueron realizadas por Hatanaka et al. en 1994 y Florin et al. en 1995 quienes lograron desarrollar métodos efectivos para preservar recursos genéticos del café, combinando a la ES con la crioconservación (Mishra, 2020). Por otra parte, al permitir la formación de embriones a partir de células somáticas en lugar de células sexuales, se presenta la posibilidad de obtener plantas genéticamente idénticas a partir de un solo individuo, lo que es útil para la conservación de variedades raras o en peligro de extinción (Arias-Pérez et al., 2021; Nic-Can et al., 2016).

La habilidad de modificar el destino celular y formar embriones somáticos no se presenta en todas las células (Nic-Can et al., 2016). Esta habilidad puede estar influenciada por factores como el genotipo, el origen del explante, la composición del medio de cultivo, el estado fisiológico

de la planta madre y las condiciones ambientales a las que se someten las células (Nic-Can et al., 2016).

El callo es un tejido fundamental en la embriogénesis somática, actuando como un intermediario crucial en la regeneración de plantas a partir de células somáticas (Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023). Este tejido se forma a partir de la dediferenciación de células en respuesta a condiciones específicas del medio de cultivo, que incluyen la composición de nutrientes y los reguladores de crecimiento utilizados. Existen dos tipos principales de callo: el callo friable, que es suave y de fácil descomposición, y el callo compacto, que es más denso y resistente (Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023).

La calidad y el tipo de callo influyen directamente en la capacidad de formación de embriones somáticos; los callos compactos tienden a producir un mayor número de embriones en comparación con los friables (Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023). Además, el crecimiento del callo está relacionado con la proliferación celular y la producción de metabolitos esenciales que promueven la diferenciación celular (Aguilar et al., 2018; Campos et al., 2017).

Por otra parte, el uso de suspensiones celulares (SC) permiten la multiplicación a gran escala de embriones somáticos de café, facilitando la propagación masiva de genotipos, además se ha determinado que mediante el cultivo de SC la ES es más eficiente con mayores tasas de regeneración celular que las que se obtienen en masas de callos embriogénicos (Aragón, 2020; Campos et al., 2017). Sin embargo, los estudios recomiendan que en variedades donde se producen grandes cantidades de callos es innecesario el establecimiento de SC, ya que es considerada una fuente de variabilidad genética, debido al tiempo adicional que el cultivo pasa en suspensión (Aguilar et al., 2018).

En la germinación de embriones somáticos de *Coffea* sp. el embrión maduro inicia su desarrollo hacia una planta autótrofa. La diferencia entre germinación y conversión embrionaria radica en que en la germinación ocurre la protrusión radicular y emergencia de los cotiledones mientras que en la conversión se refiere a la supervivencia y el desarrollo de hojas y raíces para formar plantas (Riviello-Cogco et al., 2021b). El proceso de germinación implica la activación de mecanismos fisiológicos y morfogenéticos, como la elongación del eje embrionario, emergencia de la radícula y desarrollo del meristema caulinar, que dependen de la movilización eficiente de las reservas energéticas (almidón, lípidos), acumuladas durante la maduración, no obstante, la eficiencia varía entre genotipos, debido a las diferencias en la sensibilidad hormonal o a la calidad embriogénica (Aguilar et al., 2018, 2022).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Descripción del área de estudio

En el laboratorio de Biotecnología Vegetal, se realizó la presente investigación. El mismo que se encuentra situado en las coordenadas UTM (0.346749;-78.113972), dentro de las instalaciones de la Universidad Técnica del Norte, en el campus San Vicente de Paúl, en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura.

3.2 Inducción de indiferenciación celular

En la introducción *in vitro* de explante de café se utilizó fragmentos de hojas de aproximadamente 2 x 1 (cm²), que fueron colocados en tubos de 2cm de ancho por 15cm de largo en medio de inducción de indiferenciación celular establecido por Tituaña, (2025). Los explantes fueron cultivados en el cuarto de crecimiento a 26 ± 2 °C, 28% de humedad relativa y oscuridad por 60 días (Tituaña, 2025).

3.3 Ejecución del primer objetivo

3.3.1 Proliferación celular de callos de café

Los explantes que formaron callo (**Figura 1a**), fueron clasificados en friables (**Figura 1c**) y compactos (**Figura 1b**) según características físicas como textura y apariencia. Para la proliferación de callos compactos y friables se tomaron 250 mg de peso fresco (PF) y se colocaron en cajas de Petri de 90×15 mm, con 20 mL de medio de proliferación que contenía medio Murashige y Skoog (MS) con vitaminas, modificado con 0.5 mg/L de 6-BAP, 30 mg/L de cisteína, 30 g/L de sacarosa, 800 mg/L de extracto de malta, 200 mg/L de caseína hidrolizada, 2.2 g/L de Gelzan y un pH de 5,6 (MC1) (Samson et al., 2006; Tituaña, 2025).

La proliferación celular se evaluó en peso fresco (PF) a los 60 días de cultivo. La cinética de crecimiento se realizó en los tratamientos establecidos cada 15 días por 60 días mediante evaluación de PF. Los tratamientos que se probaron están descritos en la **Tabla 1**.

Figura 1

Tipo de callos de café. (a) explante con callo mixto: friable (1) y compacto (2). Callo compacto (b) y callo friable (c).



Tabla 1

Tratamientos utilizados en la proliferación celular de callos.

Tratamiento	Codificación	Concentración 2,4-D y tipo de callo
Control -	T0C	0 mg/L 2.4-D - Callo compacto
Control -	T0F	0 mg/L 2.4-D - Callo friable
1	T1C	1 mg/L de 2.4-D - Callo compacto
2	T1F	1 mg/L de 2.4-D - Callo friable
3	T2C	2 mg/L de 2.4-D - Callo compacto
4	T2F	2 mg/L de 2.4-D - Callo friable
5	T3C	3 mg/L de 2.4-D - Callo compacto
6	T3F	2 mg/L de 2.4-D - Callo friable

3.4 Ejecución del segundo objetivo

3.4.1 Obtención de embriones somáticos de café

Los callos compactos primarios generados en medio de indiferenciación celular por 60 días, se colocaron (0.25 g PF) en placas de Petri de 90×15 mm con 20 mL de medio de regeneración celular que se describen en la **Tabla 2**. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 26±2 °C, evaluándose dos condiciones de crecimiento en oscuridad y luz indirecta a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 3.98 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, y tras cuatro meses de cultivo se inició el registro de embriones por gramo de callo, los tratamientos establecidos se describen en la **Tabla 3** (Aguilar et al., 2018; Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023).

Tabla 2

Medios para regeneración celular en Coffea sp.

Componentes	Medio de cultivo	
	R1	R2
	%	
MS macroelementos	50	25
MS microelementos	50	50
MS FE-EDTA	50	50
	mg/L	
KH ₂ PO ₄		42.5
Tiamina.HCl	10	10
Glicina	2	
Ácido nicotínico	1	1
Piridoxina.HCl	1	1
Mio-inositol	200	100
Caseína hidrolizada	400	
Extracto de malta	400	
Sulfato de adenina	40	
6-BAP	2	1
	g/L	
Sacarosa	40	30

Nota: Medios de germinación tomado de Aguilar et al. (2018) & Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al. (2023).

Tabla 3

Tratamientos utilizados en la formación de embriones somáticos de *Coffea* sp.

Tratamiento	Codificación	Significado
1	R1A1O	Medio R1, 2.3 g/L Gelzan y oscuridad
2	R1A2O	Medio R1, 5 g/L Gelzan y oscuridad
3	R1A1I	Medio R1, 2.3 g/L Gelzan y luz indirecta
4	R1A2I	Medio R1, 5 g/L Gelzan y luz indirecta
5	R2A1O	Medio R2, 2.3 g/L Gelzan y oscuridad
6	R2A2O	Medio R2, 5 g/L Gelzan y oscuridad
7	R2A1I	Medio R2, 2.3 g/L Gelzan y luz indirecta
8	R2A2I	Medio R2, 5 g/L Gelzan y luz indirecta

3.4.1.1 Germinación de embriones somáticos de *Coffea* sp.

Los embriones maduros que se encontraban en etapa torpedo y cotiledonar (**Figura 2**) fueron inducidos a germinación. Para lo cual se cultivaron en 30 mL de medio de cultivo que contenía sales MS, vitaminas de Morel & Weltsmore, 0.3 mg/L de 6-BAP, 40 g/L de sacarosa, pH de 5.6 y tras 30 días de cultivo se registró el porcentaje de germinación de los embriones somáticos (Aguilar et al., 2018). Los tratamientos se describen en la **Tabla 4**.

Figura 2

Embriones somáticos obtenidos de *Coffea* sp. en diferentes fases de maduración.

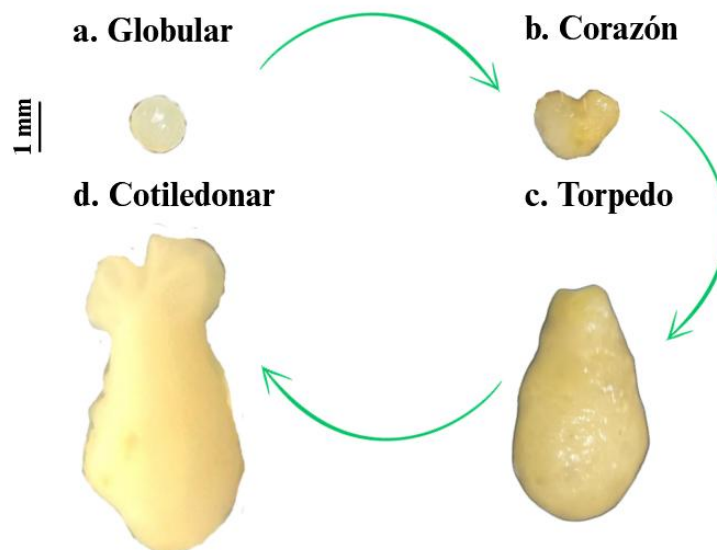


Tabla 4

Tratamientos utilizados en la germinación de embriones somáticos.

Tratamiento	Codificación	Condiciones
1	G1	Temperatura: 26 ± 2°C
		Fotoperiodo: 16 h luz y 8 h oscuridad
		Agar: 2.2 g/L
2	G2	Temperatura: 27°C
		Fotoperiodo: 0 h luz y 24 h oscuridad
		Agitación: 100 RPM

1.5 Ejecución del tercer objetivo

1.5.1 Establecimiento de suspensiones celulares de café

En el establecimiento de suspensiones celulares, se colocaron 500 mg PF de callo friable en matraces de 150 mL con 50 mL de medio MC1 líquido, con los tratamientos de la **Tabla 5**. Los matraces se agitaron en Shaking Incubator (Virtue Benchtop) a 110 rpm y 27°C en oscuridad. A los 30 días de incubación las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos a 14°C, tras lo cual se descartó el sobrenadante, las células fueron pesadas y se evaluó el crecimiento celular (Aragón, 2020).

Tabla 5

Tratamientos utilizados en el establecimiento de suspensiones celulares.

Tratamiento	Codificación	Concentración
Control	S0	0 mg/L 2.4-D
1	S1	1 mg/L de 2.4-D
2	S2	2 mg/L de 2.4-D
3	S3	3 mg/L de 2.4-D

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Proliferación celular de callos

La proliferación celular de callos friables y compactos fue cuantificada mediante PF a los 60 días de cultivo. En el análisis estadístico se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) y factorial con cuatro replicas por tratamiento. Los factores de estudio evaluados fueron dos: el tipo de callo (friable y compacto) y la concentración de la auxina. Los datos obtenidos se transformaron con raíz cuadrada con el fin de reducir los coeficientes de variación y que los datos se ajusten a los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los datos se analizaron mediante un ANOVA ($\alpha=0.05$) y una comparación de medias (Tukey), utilizando el software InfoStat versión 2018.

3.6.2 Cuantificación de embriones somáticos

Inicialmente, en este ensayo se examinó los Embriones. g⁻¹ en PF de callo compacto inducido. Se utilizó un DCA con ocho tratamientos, cada uno con cuatro replicas. Sin embargo, no sé registraron resultados en cinco tratamientos por lo que finalmente se realizó un DCA con tres tratamientos. Los datos se analizaron mediante el paquete de datos estadísticos InfoStat versión 2018, en el que se aplicó un ANOVA ($\alpha=0.05$) y una comparación de medias (Tukey). Los datos se ajustaron a los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Las variables dependientes fueron el medio de regeneración (R1 y R2), la luz y la concentración de gelificante, mientras que la independiente fue Embriones. g⁻¹ en PF de callo compacto inducido.

En la germinación de los embriones somáticos se evaluaron dos tratamientos (G1 y G2) cada uno con cuatro repeticiones, siendo una repetición un frasco con 3 embriones a germinar y mediante la prueba de Chi cuadrado con un $\alpha=0.05$ y se evaluó si existe significancia entre los tratamientos evaluados.

3.6.3 Biomasa en suspensiones celulares

Se utilizó un DCA con cuatro tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones. Se aplicó un ANOVA ($\alpha=0.05$) para el PF de las suspensiones celulares, y se realizó una prueba de Tukey para identificar diferencias entre medias. Las variables independientes fueron la concentración de 2.4-D, mientras que las dependientes fueron el PF de las suspensiones.

CAPÍTULO IV

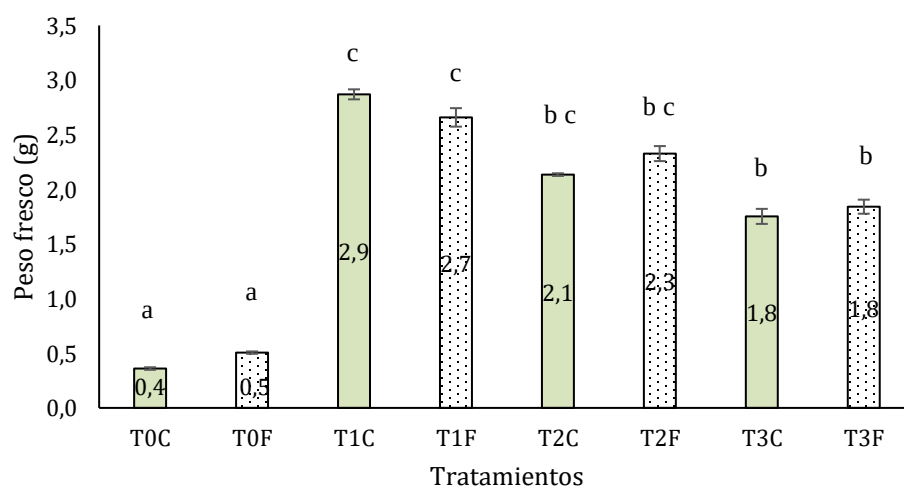
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Proliferación celular de callos de Café

La prueba estadística ANOVA (**Anexo 1**) mostró diferencias significativas entre la interacción de los tratamientos (gl: 7; F: 37.03; p: <0.0001) indicando que el tipo de callo y la concentración de la auxina influyeron en la proliferación de callos, medido en peso fresco. La prueba de Tukey mostró que T0C y T0F (0 mg/L 2.4-D) son significativamente diferentes de los tratamientos que contenían la auxina y que T1C y T1F (1 mg/L 2.4-D) son diferentes de T3C y T3F (3 mg/L 2.4-D). Estos resultados muestran la necesidad de incorporar la auxina 2.4-D en la proliferación de callos, así como el cambio de su efecto en concentraciones bajas (1 mg/L) y altas (3 mg/L) de 2.4-D (**Figura 3**).

Figura 3

Peso fresco (g) de callos compactos y friables en diferentes concentraciones de 2,4-D a 60 días de evaluación.



En concordancia con las investigaciones de Arimarsetiowati et al., (2023), Putri Damayanti et al., (2021) y Thacker et al., (2018) la proliferación de callos en *Coffea* sp. ha tenido mejor respuesta en concentraciones de 1 y 2 mg/L de 2.4-D, resaltando un estrecho rango para la

concentración efectiva de la fitohormona en la multiplicación de callos del género. La efectividad en proliferación de callos según Di Bonaventura et al., (2024), Putri Damayanti et al (2021) y Ikeuchi et al., (2013) no es únicamente en respuesta a la concentración de la auxina, si no de la relación auxina:citoquinina empleada. Mostrando mejores resultados cuando esta relación fue más cercana a una proporción de 1:1 o se duplico en favor de la auxina (2:1). Lo cual explica lo registrado en el presente estudio donde se obtuvo 1.6 veces más biomasa en los tratamientos T1C y T1F, en comparación con T3C y T3F donde la proporción auxina: citoquinina fue de 6:1, mientras que en T1C y T1F fue de dos veces más la auxina que la citoquinina (2:1) generando así una mayor productividad.

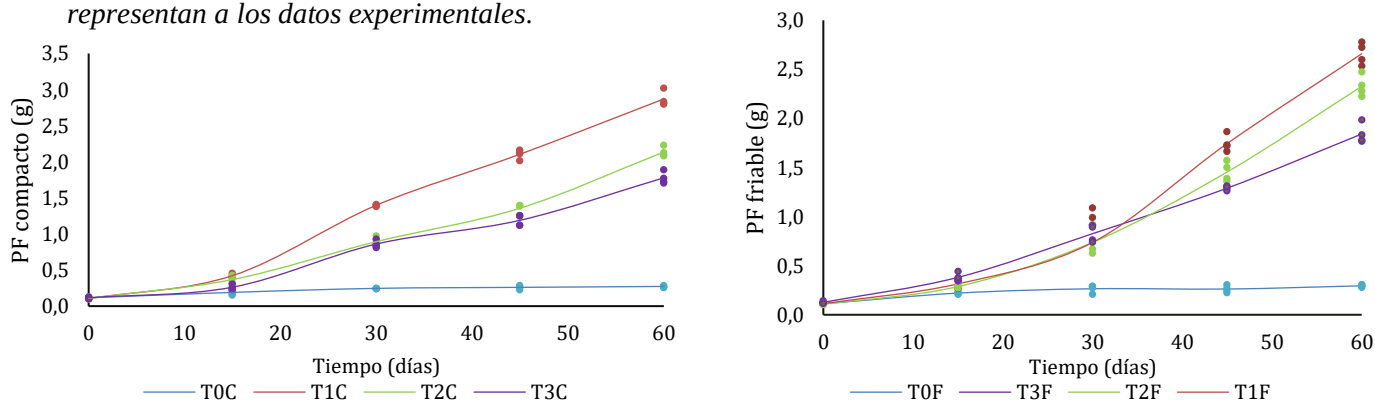
Las cinéticas de crecimiento para los tratamientos de callos evaluados se observan en la **Figura 4**, donde los datos experimentales permitieron distinguir dos fases de crecimiento, la adaptativa y exponencial. La fase de adaptación fue superada a los 15 días de cultivo por todos los tratamientos, a excepción de los controles negativos que permanecieron en esta fase durante todo el ensayo. La fase exponencial en los tratamientos T1C, T2C, T3C, T1F, T2F y T3F fue desde los 15 días y continuo hasta los 60 días. Sin embargo, en el tiempo evaluado (60 días), no fue posible visualizar el fin de la fase exponencial e inicio de la estacionaria.

En la investigación realizada por Wankiku Mwaniki (2021) quien evaluó la proliferación de callos de *C. arábica* cultivar Ruiru 11, utilizando 2,4-D (0.11 mg/L) y 6-BAP (0.02 mg/L), reportó que la fase adaptativa de 14 días y una fase exponencial que terminó a los 42 días, alcanzando una producción de 0.175 g de PF, lo cual es 17.89 veces menor que la producción alcanzada en T1C de la presente investigación. Las diferencias en relación con el tiempo de duración de la fase exponencial y una menor productividad en la investigación de Wankiku Mwaniki (2021), estarían de igual manera vinculadas a la relación desproporcional (5,5:1) entre

auxina:citoquinina que se empleó en esta investigación y/o al cultivar de la especie que se empleó en cada estudio (Di Bonaventura et al., 2024).

Figura 4

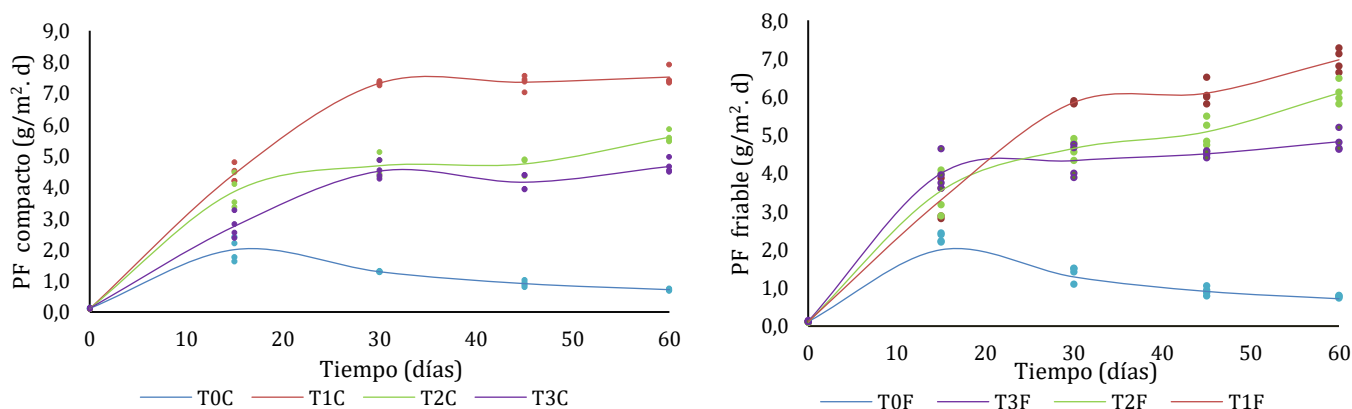
Cinéticas de crecimiento de callos compactos y friables en los tratamientos evaluados, los puntos representan a los datos experimentales.



Los datos de productividad superficial ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{d}$) mostraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los tratamientos suplementados con 2.4-D y los controles (T0C y T0F) a los 60 días. El tratamiento T1C (1mg/L 2.4-D) alcanzó una productividad superficial máxima de $7.5 \text{ g}/\text{m}^2 \cdot \text{d}$, con una estabilización notable a partir del día 30 presentando una variación menor al 2.5% en 30 días. Los controles negativos decayeron después del día 15 confirmando la necesidad hormonal (**Figura 5**).

Figura 5

Cinéticas de productividad de callos compactos y friables en los tratamientos evaluados.



Por otra parte, mediante las cinéticas de crecimiento (**Figura 4**) se determinó las velocidades específicas de cada tratamiento, los mismos que seguían una tendencia de crecimiento exponencial (Tabla 6). Observándose que el tratamiento más rápido es T1C con una velocidad específica de 0.055d⁻¹ y un tiempo de duplicación de 12.69 días. T1C crece 4 veces más rápido que T0C (50.9 días) y 1.25 veces más que T3F (15.82 días), confirmando lo mencionado anteriormente con la influencia de la proporción entre auxinas y citoquininas.

En la investigación desarrollada por Di Buenaventura et al. (2024) en *C. arábica* cvs. Bourbon Rojo, se obtuvo una velocidad específica de 0.28d⁻¹ en la proliferación de suspensiones celulares, siendo cinco veces más rápido que el crecimiento registrado en T1C de la presente investigación, lo cual indicaría que en condiciones líquidas la multiplicación de callos es más efectiva, debido a una mayor disposición de nutrientes y de oxigenación.

Tabla 6

Velocidad específica (μ) y tiempo de duplicación de callos de Coffea sp.

Tratamientos	μ (1/d)	Duplicación (d)
T0C	0.014	50.90
T0F	0.014	49.29
T1C	0.055	12.69
T1F	0.053	13.09
T2C	0.049	14.18
T2F	0.051	13.98
T3C	0.047	14.84
T3F	0.042	15.82

4.2 Obtención de Embriones somáticos

Únicamente en tres de los ocho tratamientos establecidos hasta los 180 días de evaluación permitieron la formación de embriones y no hubo registro embrionario en ninguno de los tratamientos con medio de regeneración R2. Los tratamientos efectivos en regeneración celular (**Figura 6**), mostraron según el estadístico ANOVA (**Anexo 3**) diferencias significativas entre los tratamientos (gl: 2; F: 340.11; p: <0.0001) indicando que la concentración de gelificante y el tipo de luz influyen en la formación de embriones somáticos.

Figura 6

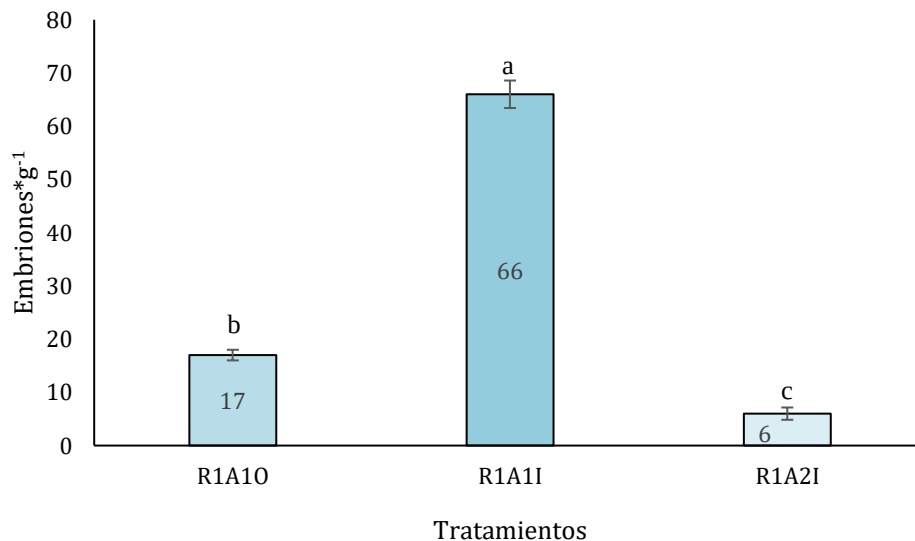
Embriones somáticos formados en diferentes tratamientos de regeneración celular; (a) Embriones en el tratamiento R1A1I a los 120 días de cultivo, (b) Tratamiento R1A2I, 150 días, (c) Tratamiento R1A1O, 180 días.



El tratamiento más efectivo en la regeneración celular fue R1A1I, compuesto por medio R1, 2.3 g/L de gelificante y expuestos a luz indirecta ($3.98 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$). Este tratamiento generó un promedio de 61 embriones por g PF de callo compacto inducido (**Figura 7**).

Figura 7

Embriones somáticos formados en diferentes tratamientos de regeneración celular.



En investigaciones realizadas por Avila et al., (2023) se aplicó una composición relativamente similar al medio de cultivo R2 (sin 2.4-D), para regenerar callos compactos de *C. arábica* var. Colombia, en condiciones de oscuridad a 136 días de inducción, 0.5 mg/L de 2.4-D y dos concentraciones de gelificante 2,3 y 5 g/L donde obtuvo una producción de embriones por gramo de callo de 21.38 y 94.92 respectivamente.

Estas variaciones en la ES podrían estar asociadas con la variante en la composición del medio de Avila et al. (2023), dentro de las variables que se evaluaron en esta investigación está la incorporación exógena de 2.4-D en diferentes proporciones, cuya función se propone es la de un agente que induce estrés, ya que tiene la capacidad de alterar el metabolismo interno del ácido indolacético, afectando su interacción con las proteínas que se unen a la auxina, además, se indica que este regulador provoca hipermetilación del ADN, lo que mantiene a las células en un estado de alta actividad mitótica y en una fase proembriogénica lo cual sería beneficioso para la

regeneración celular (Avila-Victor, Ordaz-Chaparro, et al., 2023; Fehér, 2015). Sin embargo, otros autores proponen que en el caso del café para inducir la ES, es necesaria la reducción total de auxinas del medio o que a su vez se requiere de una concentración inicial de auxinas y posterior a ello deben ser degradadas para que la ES pueda continuar (Halperin, 1964; Loyola-Vargas et al., 2016).

En el análisis de los componentes del medio de regeneración R1 con resultados positivos y R2 éxito La caseína hidrolizada de R1 es un componente esencial para la regeneración celular, cuya función en la ES se ha descrito en la bibliografía es la de proporcionar una fuente de nitrógeno en forma de amonio y se ha encontrado que en ausencia de amonio en el medio de cultivo, no es posible la inducción de la ES siendo incorporado en la mayoría de protocolos de regeneración celular (Aguilar et al., 2018; Awada et al., 2019; Bartos et al., 2018; Etienne, 2005; Loyola-Vargas et al., 2016).

En cuanto a la variable luz los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por De-La-Peña et al. (2008), donde se evidencia que la inducción de la embriogénesis somática en *C. canephora* se realiza de manera más eficiente bajo condiciones de luz ($50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$), mientras que en ausencia de luz la respuesta se demoró más de 20 días y se produjo un menor número de embriones, 15 veces menos embriones que los obtenidos en condiciones de luz.

Así mismo, en la presente investigación en los tratamientos R1A1 con única variación en la luz indirecta ($3,98 \mu\text{mol}/\text{m}^2 * \text{s}$) y oscuridad, la ES fue mejor en presencia de luz con una producción de 3,88 veces más que en oscuridad, con lo cual se demostraría que la presencia de luz aumenta la capacidad para que ocurra la ES y se podría afirmar que una mayor intensidad de luz aumentaría la eficiencia del proceso (De-La-Peña et al., 2008). La función de luz en la ES estaría vinculada con la fotomorfogénesis, un proceso que afecta el crecimiento y desarrollo celular.

Durante este proceso, la luz activa receptores específicos que inician cascadas de señalización celular, lo que puede incluir la síntesis de poliaminas alifáticas que juegan un papel crucial en la formación, desarrollo y conversión somática en la planta, aunque su método de acción siga siendo un tema que genera controversia (De-La-Peña et al., 2008; Walden et al., 1997).

Finalmente, para la variable concentración de gelificante, se observaron mejores resultados utilizando una baja concentración, R1A1I (2,3g/L) con 66 embriones en comparación a R1A2I (5 g/L) con 6 embriones por gramo de callo. Estos resultados discrepan de los obtenidos por Avila et al. (2023), quienes lograron mejores resultados a 5 g/L que a 2.3 g/L de gelificante y lo atribuyeron a la generación de estrés extremo hídrico, lo cual en respuesta adaptativa a las condiciones adversas las células inician una respuesta de reprogramación celular y/o metabólica y cuyo proceso se menciona es necesario para la inducción de la ES.

Las diferencias encontradas por el gelificante podrían atribuirse al tipo que se utilizó, Phytigel como agente gelificante en Avila et al. (2023), mientras que en esta investigación se utilizó gelificante Gelzan. Se ha observado que los gelificantes pueden variar en características fisicoquímicas como la difusión de nutrientes y fuerza del gel, esta última propiedad influye con el control del potencial hídrico. El Phytigel presenta mayor fuerza de gel por lo que podría asumirse que no se aplicó el estrés deseado o la distribución de nutrientes a esta concentración no fue la adecuada utilizando Gelzan (Mohamed et al., 2021).

Sin embargo, en la investigación de Mohamed et al. (2021) donde se comparó la influencia de diferentes tipos de gelificante a base de gellan gum como Gelzan y Phytigel, para la inducción de callos, regeneración radicular y enraizamiento, y no se logró encontrar diferencias significativas entre ellos. Por lo que las diferencias encontradas en esta investigación se atribuirían a que las metodologías para inducir ES y su posterior desarrollo estarían influenciadas por el genotipo

empleado, resultando en la necesidad de crear protocolos específicos para cada cultivar o clona (Avila-Victor, Ordaz-Chaparro, et al., 2023; Campos et al., 2017).

4.2.1 Germinación de Embriones somáticos

Según el estadístico Chi-cuadrado (gl: 1; p: 0.04) existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados G1 y G2. En G2 se alcanzó una tasa de germinación del 66.6 % utilizando medio líquido, agitación (100 rpm) y oscuridad por 15 días, donde en el 75% de los embriones, la germinación fue parcial con la formación única de cotiledones o de radícula (**Figura 8**), y en el 25% fue de forma completa con el desarrollo tanto de cotiledones como de radícula (**Figura 9**). En G1 con medio sólido, fotoperiodo y 60 días se observó una tasa de germinación del 25%, donde en el 100% de los embriones, la germinación fue parcial con la formación única de cotiledones abiertos.

Figura 8

Germinación parcial de embriones somáticos en G2: a) Inicio de germinación, b) Elongación de cotiledones c) Formación de meristema caulinar, d) Presencia de cloroplastos, e) Plántula de Coffea sp.

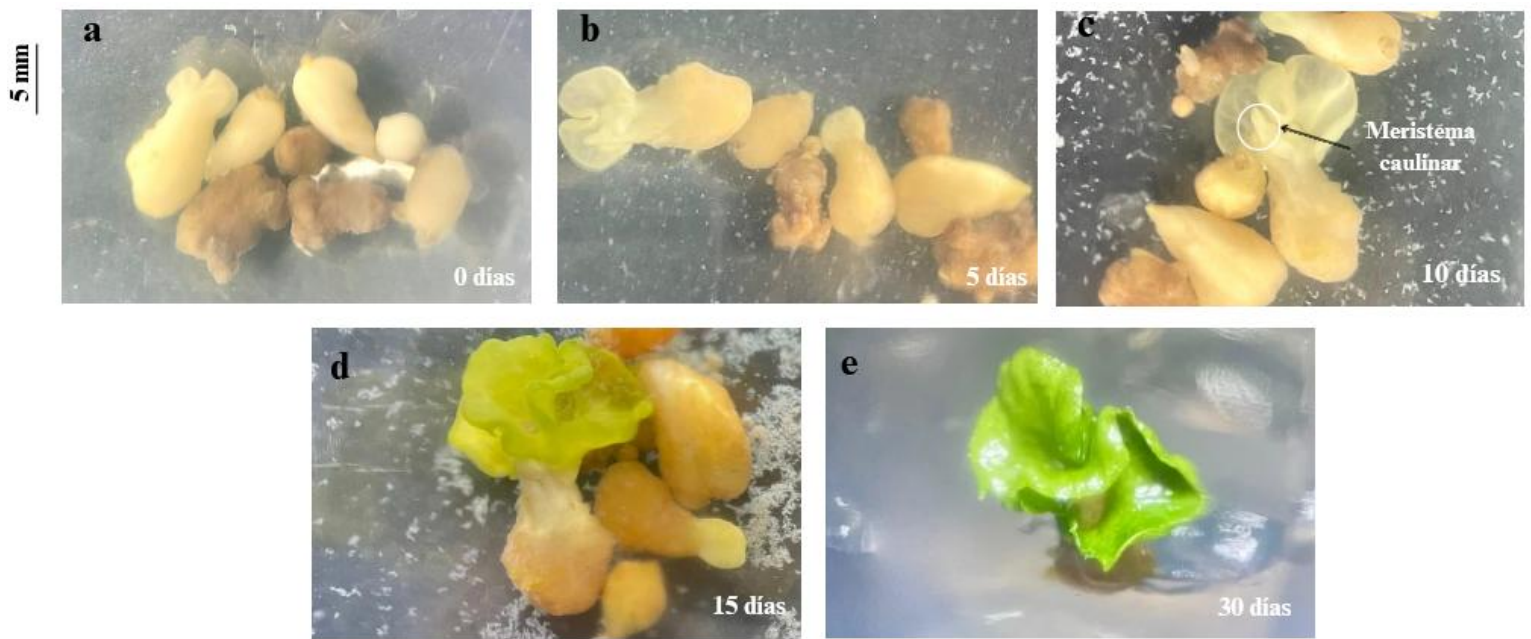


Figura 9

Germinación completa de embriones somáticos en G2: a) Eje cotiledonar, b) Eje radicular.



Los resultados obtenidos en G2 son relativamente similares a los obtenidos por Arimarsetiowati (2017), quien alcanzó una tasa de germinación del 59.2% en embriones somáticos de *C. arábica* L. que fueron cultivados en medio líquido con agitación continua (100 rpm) y oscuridad por 24 días. Así mismo, en *C. arábica* var. Colombia, Riviello (2019) reportó una tasa de germinación similar del 68.9%, utilizando medios líquidos con agitación orbital (100 rpm). Por otra parte, Ahmed et al. (2013) utilizó medio semisólido en la germinación de embriones somáticos de *C. arábica* L. y reportó una tasa máxima del 14% a los 70 días de cultivo.

Además, utilizando medio líquido en G2 se registró que el tiempo de germinación se reduce a 15 días, siendo 4 veces menos que el tiempo requerido por G1 con medio sólido, así mismo se ha observado que el tiempo de germinación en medios líquidos en recipientes RITA se reduce en 30 días, en comparación a cultivos en medios semisólidos en recipientes Magenta (Ahmed et al., 2016). Las diferencias registradas en las tasas y el tiempo de germinación en los tratamientos evaluados podrían estar vinculadas a la influencia del gelificante. La ausencia de este en G2 beneficiaría a la germinación aumentando la disponibilidad de agua y nutrientes disueltos necesarios para el desarrollo embrionario (Ahmed et al., 2016; Arimarsetiowati, 2017).

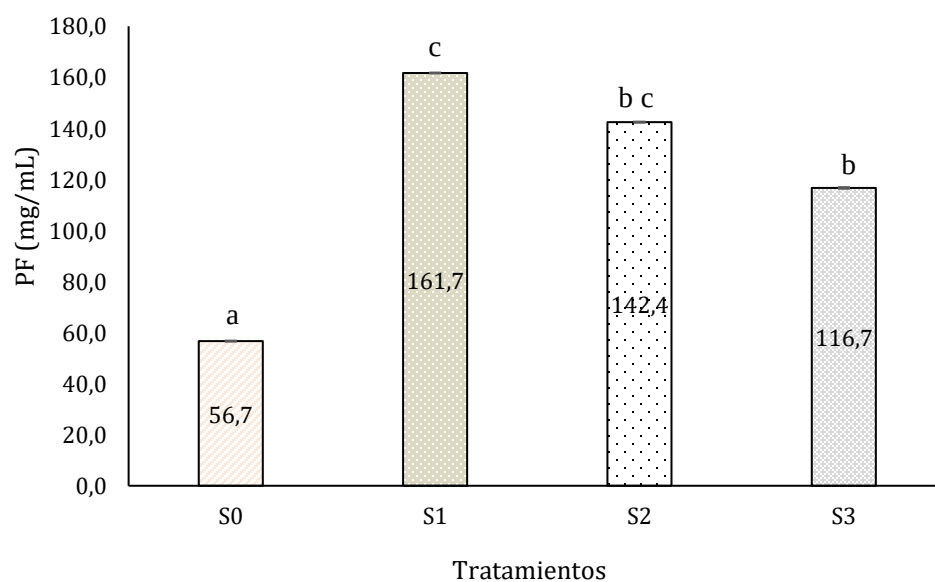
Por otra parte, la germinación parcial registrada tanto en G1 como en G2, podría estar vinculada a la insuficiente acumulación de reservas de metabolitos primarios (lípidos, proteínas y carbohidratos) que son necesarios para una germinación completa, los mismos que se acumulan durante la etapa de maduración de los embriones, la misma que en la presente investigación no fue incorporada y que por lo tanto la tasa de germinación incompleta fue superior a la de germinación completa en los tratamientos evaluados (Riviello, 2019).

4.3 Establecimiento de suspensiones celulares de café

En el establecimiento de suspensiones celulares, la prueba estadística ANOVA mostro diferencias significativas entre tratamientos ($gl = 3$; $F = 3.80$; $p = 0.04$) (**Anexo 2**). La prueba de Tukey reveló que el control negativo (S0) fue significativamente diferente de S1, S2 y S3. S1 alcanzo una producción de 161.7 mg/mL PF, lo cual sugiere que en el establecimiento de suspensiones celulares las concentraciones evaluadas de 2.4-D tienen efectos diferentes (**Figura 10**).

Figura 10

Peso fresco de suspensiones celulares en diferentes concentraciones de 2.4-D.



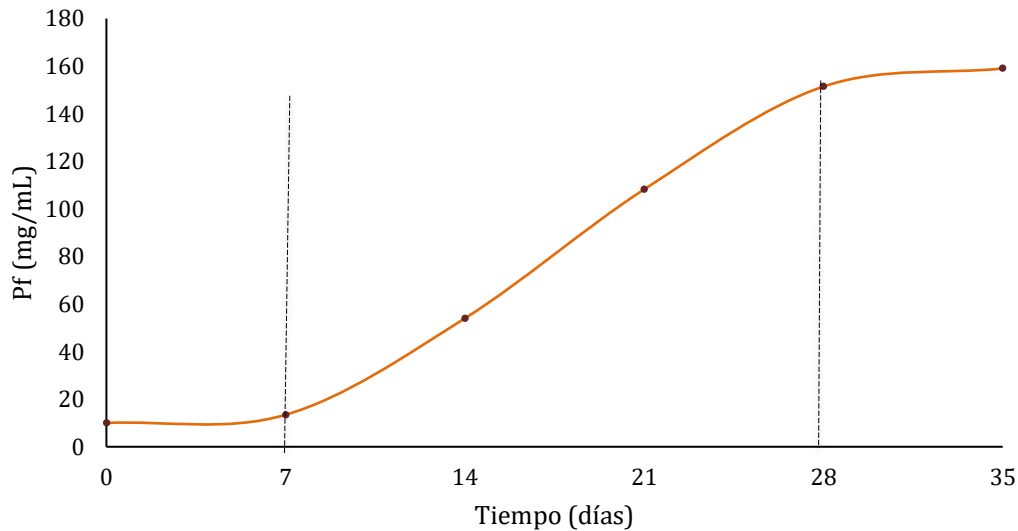
La mayor producción de biomasa en suspensiones celulares se alcanzó a concentraciones de 1 y 2 mg de 2.4-D (S1 y S2), lo cual confirma los datos obtenidos en el ensayo de proliferación de callos del presente estudio y su relación con la proporción auxina: citoquinina. Los resultados en productividad de suspensiones celulares de S1 concuerdan con los datos por Di Bonaventura et al. (2024), donde a los 30 días de cultivo, a una concentración de 1mg/L de 2.4-D en el cultivar Castillo, obtuvieron una productividad de 169.46 mg/mL. Por otra parte, Rodríguez (2020), obtuvo una productividad en *C. arábica* L. de 80 mg/mL en el mismo periodo, utilizando únicamente la fitohormona 2.4-D (2,54 mg/L). Aun cuando se ha relacionado el descenso de la productividad de células indiferenciadas con la proporción auxina: citoquinina los resultados registrados tanto en la literatura como en esta investigación, dan inferencias de que en concentraciones mayores o iguales a 3 mg/L de 2.4-D reducen las tasas de multiplicación de células indiferenciadas (Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023; de Moraes Oliveira et al., 2023).

El 2.4-D en un estrecho rango de concentración tiene la capacidad de estimular la división celular, permitiendo a las células pasar a un estado más pluripotente y como resultado más propensas a formar callos y suspensiones celulares. Por otro lado, el 2.4-D en altas concentraciones (4 mg/L) genera efectos genotóxicos y fitotóxicos sobre la proliferación y regeneración celular en *C. arábica* y *C. canephora*. Con lo expuesto, en el presente estudio la razón del descenso de 1.38 veces la productividad en S3 fue posiblemente por el efecto negativo al utilizar concentraciones altas de 2,4-D (3 mg/L) (Avila-Victor, Arjona-Suárez, et al., 2023; de Moraes Oliveira et al., 2023).

En el análisis de la cinética de crecimiento de S1 (**Figura 11**) fue posible observar tres etapas de crecimiento: la fase adaptativa que se superó a los 7 días, la fase exponencial duró desde los 7 hasta los 28 días, donde se alcanzó una productividad de 151 mg/mL y la fase estacionaria inicio después de 28 días de cultivo.

Figura 11

Cinética de crecimiento en suspensiones celulares del tratamiento S1.

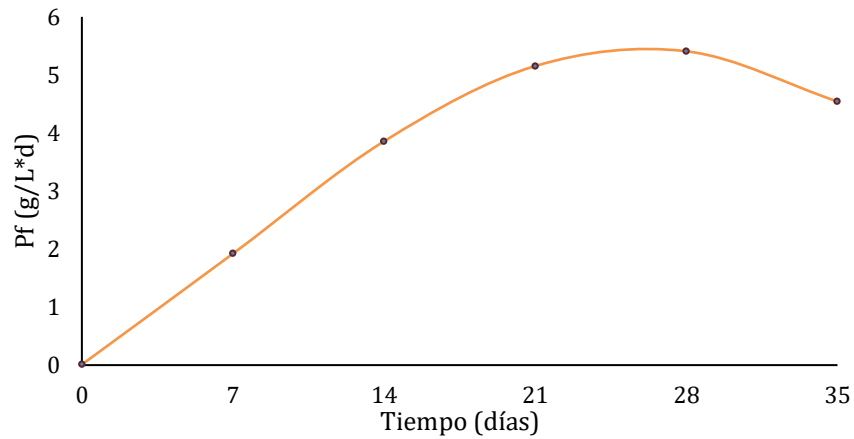


Los resultados obtenidos en S1 concuerdan con los obtenidos por Di Buenaventura et al. (2024) en *C. arábica* cvs. Castillo, donde la fase adaptativa se superó a los 10 días, la exponencial duró hasta los 27 días, alcanzando una producción de 169.46 mg/mL la misma que se alcanzó utilizando una proporción entre auxina: citoquinina de 1:1 lo cual explicaría su mayor productividad (1.12 veces) en comparación a lo registrado en S1 de la presente investigación.

El tratamiento S1 alcanzó una productividad volumétrica máxima de 5.4 g/L*d a los 28 días de cultivo, además se observó una tendencia de crecimiento hasta los 21 días, seguido de una estabilización notable hasta el día 28 con una variación menor al 4 % en 7 días. Finalmente, un declive de la productividad volumétrica de 1 g/L*d al día 35 (**Figura 12**).

Figura 12

Productividad volumétrica en suspensiones celulares del tratamiento S1.



Por otra parte, mediante la cinética se determinó que la velocidad específica de S1 es de 0.089d^{-1} con un tiempo de duplicación de 11.24 días, siguiendo una tendencia de crecimiento exponencial. Al comparar con el tratamiento más eficiente en proliferación de callo (T1C) de la presente investigación, se observó que en suspensiones celulares el crecimiento es 1.62 veces más rápido, indicando que en condiciones líquidas la multiplicación de callos es más efectiva debido a una mayor disposición de nutrientes y oxígeno (Aragón, 2020).

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El tratamiento T1C con 1 mg/L de 2.4-D fue el más efectivo en la proliferación de callos de *Coffea* sp., alcanzando una producción superficial máxima de 7.5 g/m²*día en 60 días de cultivo. T1C inicio la fase exponencial a los 15 días, registrando una velocidad específica de crecimiento de 0.055d⁻¹ con un tiempo de duplicación de 12.69 días, creciendo 4 veces más rápido que el control negativo T0F (50.9 días). Esto demostró que la proliferación de callos depende significativamente de la concentración de 2.4-D y su relación con la citoquinina 6-BAP.

En la obtención de embriones somáticos de *Coffea* sp., se identificó que el medio de regeneración R1, con 2.3 g/L de gelificante y luz indirecta (3.98 µmol/m²*s), fue el tratamiento más efectivo (R1A1I), produciendo 66 embriones*g⁻¹ en PF de callo compacto, resaltando la importancia de la luz, la concentración de gelificante y la composición del medio en la regeneración celular. En la germinación de embriones somáticos el tratamiento G2 con medio de germinación líquido, agitación continua y oscuridad fue el más efectivo, alcanzando una tasa de germinación del 66.6%, donde el 25% de la germinación fue completa y el 75% fue parcial, la misma que dio origen a vitroplantas *Coffea* sp.

En el establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea* sp., el tratamiento S1 con medio MC1 líquido, 1 mg/L de 2.4-D, agitación continua, 27°C y oscuridad, fue el tratamiento con la producción más alta, alcanzando los 161.7 mg/mL en 30 días, siendo 2.85 veces superior al incremento de S0 (56,7 mg/mL) y 1.38 veces más que S3, demostrando la importancia de la auxina 2.4-D y su equilibrio con la citoquinina 6-BAP en la multiplicación de células indiferenciadas.

5.2 Recomendaciones

- Para el desarrollo de cinéticas en proliferación de callos se recomienda realizar puntos de muestreo más frecuentes con el objetivo de mejorar la captura de las dinámicas de crecimiento y aumentar la precisión de parámetros cinéticos.
- Un paso fundamental previo a la ES es determinar que los callos a emplear sean de carácter embriogénico, pues no todas las células indiferenciadas tienen la capacidad de ser regeneradas.
- Realizar la maduración de embriones somáticos podría evitar la germinación incompleta y mejorar las tasas de germinación.

6. REFERENCIAS

- Aguilar, M. E., Ortiz, J. L., Mesén, F., Jiménez, L. D., & Altmann, F. (2018). *Cafe Arabica Coffea arabica L.* En S. Jain & P. Gupta (Eds.). Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants (pp. 39–62). Springer International Publishing.
- Aguilar, M. E., Wang, X. Yar., Escalona, M., Yan, L., & Huang, L. F. (2022). Somatic embryogenesis of *Arabica coffee* in temporary immersion culture: Advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994578>
- Ahmed, W., Feyissa, T., & Disasa, T. (2016). *Somatic embryogenesis of a coffee (Coffea arabica L.) hybrid using leaf explants*. The journal of horticultural science & biotechnology, 88(4), 469–475. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512993>
- Alemayehu, D. (2017). Review on Genetic Diversity of Coffee (*Coffea Arabica L.*) in Ethiopia. *International Journal of Forestry and Horticulture*, 3(2), 18–27. <https://doi.org/10.20431/2454-9487.0302003>
- Amores, F., Duicela, L., Corral, R., Guerrero, H., Vasco, S., Motato, N., Solórzano, G., Zambrano, L., Aveiga, T., & Guedes, R. (2004). Variedades mejoradas de café arábigo una contribución para el desarrollo de la caficultura en el Ecuador. In *INIAP Boletín Técnico N° 113* (Vol. 113). <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1582>
- Anecafé. (2024). Estadísticas – Anecafé. Asociación nacional ecuatoriana de café. <https://anecafe-ecuador.com/estadisticas/>
- Aragón, C. (2020). *Establecimiento de suspensiones celulares de Coffea arabica L. y Persea*

- americana* Mill. cv. Hass [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán].
<https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1828>
- Arias-Pérez, E., Lecona-Guzmán, C. A., Gutiérrez-Miceli, F. A., Montes-Molina, J. A., & Ruiz-Lau, N. (2021). Encapsulation of immature somatic embryos of *Coffea arabica* L. For in vitro preservation. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 90(6), 1741–1748.
<https://doi.org/10.32604/PHYTON.2021.016004>
- Arimarsetiowati, R. (2017). Embryo Germination Development of *Coffea arabica* L. at Various Media Composition, Subcultures Stages and Embryo Size. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 33(3), 156–167.
<https://doi.org/10.22302/iccricri.jur.pelitaperkebunan.v33i3.290>
- Arreaga, E., Quezada, J., Barrezueta, S., Cervantes, A., & Prado, E. (2021). Economic impact generated by coffee production in Ecuador in the period 2016-2019. *Digital Publisher*, 6(6), 83–91. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8149610>
- Avila-Victor, C. M., Arjona-Suárez, E. de J., Iracheta-Donjuan, L., Valdez-Carrasco, J. M., Gómez-Merino, F. C., & Robledo-Paz, A. (2023). Callus Type, Growth Regulators, and Phytigel on Indirect Somatic Embryogenesis of Coffee (*Coffea arabica* L. var. Colombia). *Plants*, 12(20), 3570. <https://doi.org/10.3390/plants12203570>
- Avila-Victor, C. M., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. de J., Iracheta-Donjuan, L., Gómez-Merino, F. C., & Robledo-Paz, A. (2023). In Vitro Mass Propagation of Coffee Plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through Indirect Somatic Embryogenesis. *Plants*, 12(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants12061237>
- Awada, R., Campa, C., Gibault, E., Déchamp, E., Georget, F., Lepelley, M., Abdallah, C., Erban,

- A., Martinez-Seidel, F., Kopka, J., Legendre, L., L  ran, S., Con  j  ro, G., Verdeil, J. L., Crouzillat, D., Breton, D., Bertrand, B., & Etienne, H. (2019). Unravelling the metabolic and hormonal machinery during key steps of somatic embryogenesis: A case study in coffee. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4665. <https://doi.org/10.3390/ijms20194665>
- Banco Central del Ecuador. (2024). *Informe de evolución de la economía ecuatoriana en 2023 y perspectivas* 2024. https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Administracion/EvolEconEcu_2023pers2024.pdf
- Bartos, P. M. C., Gomes, H. T., do Amaral, L. I. V., Teixeira, J. B., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2018). Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. 3 *Biotech*, 8(4), 209. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1238-7>
- Bellachew, B., Atero, B., Tefera, F., Ayano, A., & Benti, T. (2008). *Genetic diversity and heterosis in arabica coffee. Coffee Diversity and Knowledge*. In Adugna, G., Bellachew, B., Taye, E., Kufa, T. (Eds.). *Ethiopian institute for agricultural research*.
- Bramel, P., Krishnan, S., Horna, D., Lainoff, B., & Montagnon, C. (2017). Global Conservation Strategy for COFFEE GENETIC RESOURCES. *Crop Trust and World Coffee Research*. <https://worldcoffeeresearch.org/es/resources/global-coffee-conservation-strategy>
- Campos, N. A., Panis, B., & Carpentier, S. C. (2017). Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1460. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>
- Castilla-Valdés, Y., Esther González-Vega, M., & Espinosa-Torres, L. (2020). *In vitro* conservation of coffee-tree (*Coffea arabica* L.) by decreasing mineral salts in the culture

- medium. *INCA*, 41(1), 12. <https://www.redalyc.org/journal/1932/193263199004/>
- Chamorro, A. (2021). El INIAP y la modernización de la hacienda serrana en Ecuador (1963-1973). *Historia Agraria de América Latina*, 2(02), 129–150. <https://haal.cl/index.php/haal/article/view/35>
- De-La-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2008). Possible role of light and polyamines in the onset of somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Molecular Biotechnology*, 39(3), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9037-8>
- de Moraes Oliveira, J. P., Silva, A. J. da, Catrinck, M. N., & Clarindo, W. R. (2023). Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in *Coffea*. *Scientific Reports*, 13(1), 9689. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36879-7>
- Delgado, P., Larco, A., García, C., Alcívar, R., Patiño, M., & Chilán, W. (2020). Café en Ecuador: Manejo de la Broca del Fruto. *Organización Internacional Del Café*, 77. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1593>
- Di Bonaventura, A., Marchetti, S., Petrusa, E., Braidot, E., Colombari, S., Navarini, L., & Zancani, M. (2024). A protocol for the development and maintenance of *Coffea arabica* (L.) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 158(3). <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02848-9>
- Enríquez, G., Duicela, L., Muñoz, R., Vera, P., Corral, G., Reyes, C., Verduga, C., Guamán, J., Farfán, D., & Morocho, F. (2014). *GUIA TECNICA PARA PRODUCCION Y POSCOSECHA CAFÉ ROBUSTA*. En G. Enríquez & L. Duicela (Eds.). Consejo Cafetalero Nacional (COFENAC) y Solubles Instantáneos (SICA). <https://reducafe.com/wp->

content/uploads/2022/08/Libro-GUIA-TECNICA-PARA-PRODUCCION-Y-
POSCOSECHA-CAFE-ROBUSTA.pdf

- Etienne, H. (2005). Somatic Embryogenesis PROTOCOL: COFFEE (*Coffea arabica* L. AND *C. canephora* P.). In P. K. Jain, S.M and P.K. Gupta (Eds.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (pp. 167–179). Springer Netherlands.
- FAO. (2018). *The state of agricultural commodity markets 2018. Agricultural trade, climate change and food security*. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i9542en>
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.07.005>
- Geneti, D. (2019). Progress of Coffee (*Coffea arabica* L.) Hybridization Development Study in Ethiopia: A Review. *Food Science and Quality Management*, 92(1956), 22–28. <https://doi.org/10.7176/fsqm/92-03>
- Halperin, W. (1964). Morphogenetic Studies with Partially Synchronized Cultures of Carrot Embryos. *Science*, 146:408–409. <https://doi.org/10.31857/s0555292322040064>
- ICO. (2020). The Value of Coffee: Sustainability, Inclusiveness and Resilience of the Coffee Global Value Chain. *International Coffee Organization*. <https://www.internationalcoffeecouncil.com/cdr2020>
- ICO. (2022). Towards a Circular Coffee Economy. *International Coffee Organization*. <https://ico.org/coffee-development-report-2/>
- INIAP. (2018). *PROGRAMA CACAO Y CAFÉ-INFORME ANUAL 2018*.

<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5670>

INIAP. (2019). *INIAP ESTACIÓN EXPERIMENTAL PORTOVIEJO: Programa de cacao y café.*

Informe Técnico Anual 2019. <https://repositorio.iniap.gob.ec/>

Krishnan, S., Matsumoto, T., Nagai, C., Falconer, J., Shriner, S., Long, J., Medrano, J. F., & Vega,

F. E. (2021). Vulnerability of coffee (*Coffea spp.*) genetic resources in the United States.

Genetic Resources and Crop Evolution, 68(7), 2691–2710. [https://doi.org/10.1007/s10722-](https://doi.org/10.1007/s10722-021-01217-1)

021-01217-1

Legesse, A. (2020). Assessment of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic erosion and genetic

resources management in Ethiopia. *International Journal of Agricultural Extension*, 7(3),

223–229. <https://doi.org/10.33687/ijae.007.03.2972>

Loor Solórzano, R. G., De Bellis, F., Leroy, T., Plaza, L., Guerrero, H., Subia, C., Calderón, D.,

Fernández, F., Garzón, I., Lopez, D., & Vera, D. (2017). Revealing the Diversity of

Introduced *Coffea canephora* Germplasm in Ecuador: Towards a National Strategy to

Improve Robusta. *Scientific World Journal*, 2017, 1248954.

<https://doi.org/10.1155/2017/1248954>

Loyola-Vargas, V. M., Avilez-Montalvo, J. R., Avilés-Montalvo, R. N., Márquez-López, R. E.,

Galaz-Ávalos, R. M., & Mellado-Mojica, E. (2016). Somatic Embryogenesis in *Coffea*

spp. In Victor M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.). *Somatic Embryogenesis:*

Fundamental Aspects and Applications (1a ed., p. 27). Springer International Publishing.

MAGAP. (2011). MAGAP ejecuta “Proyecto de Reactivación de la Cacultura Ecuatoriana.”

Noticias. <https://www.agricultura.gob.ec/magap-ejecuta-proyecto-de-reactivacion-de-la->

- MAGAP. (2013). *MAGAP declaro estado de emergencia para controlar la Roya del café*.
<https://www.agricultura.gob.ec/magap-decreto-estado-de-emergencia-para-controlar-la-roya-del-cafe/>
- Mishra, M. K. (2020). Genetic Resources and Breeding of Coffee (*Coffea* spp.). In D. Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson (Eds.). *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops* (Vol. 4, pp. 475–515). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23112-5_6
- Moat, J., O’Sullivan, R. J., Gole, T., & Davis, A. P. (2020). *Coffea arabica* (amended version of 2018 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species*.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T18289789A174149937.en>
- Mohamed, G. M., Amer, A. M., Osman, N. H., Sedikc, M. Z., & Hussein, M. H. (2021). Effects of different gelling agents on the different stages of rice regeneration in two rice cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5738–5744.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.003>
- Monteros, A., Tacán, M., Peña Monserrate, G. R., Tapia B., C., Paredes Andrade, N., & Lima, L. (2018). *GUÍA PARA EL MANEJO Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS EN ECUADOR*. En INIAP (Eds.). Mejía, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos, 2018.
<https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4889>
- Nic-Can, G. I., Aviles-Montalvo, J. R., Aviles-Montalvo, R. N., Márquez-López, R. E., Mellado-Mojica, E., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2016). The Relationship Between Stress and Somatic Embryogenesis. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo

(Eds.). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (1a ed., p. 21).

Springer International Publishing.

Panis, B., Nagel, M., & den Houwe, I. Van. (2020). Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*, 9(12), 1634. <https://doi.org/10.3390/plants9121634>

Plaza, Avellan, L., Fernando, Gaston, R., Solórzano, L., Castillo, G., Alberto, L., & Guambi, D. (2015). *Coffea canephora* Pierre Base para su mejoramiento en Ecuador / PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Coffea canephora* Pierre GERMOPLASM FOR YIELD IMPROVEMENT IN ECUADOR. *REVISTA ESPAMCIENCIA*, 7 (1), 23–35. http://revistasespam.espam.edu.ec/index.php/Revista_ESPAMCIENCIA/article/view/90/73

Razafinarivo, N. J., Guyot, R., Davis, A. P., Couturon, E., Hamon, S., Crouzillat, D., Rigoreau, M., Dubreuil-Tranchant, C., Poncet, V., De Kochko, A., Rakotomalala, J. J., & Hamon, P. (2013). Genetic structure and diversity of coffee (*Coffea*) across Africa and the Indian Ocean islands revealed using microsatellites. *Annals of Botany*, 111(2), 229–248. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs283>

Riviello-Cogco, E., Robledo-Paz, A., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Suárez-Espinosa, J., & Mascorro-Gallardo, J. O. (2021). Maturation and Germination of Somatic Embryos of *Coffea Arabica* CV. Colombia. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 44(2), 161–172. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.161>

Riviello, E. (2019). *"Reguladores de crecimiento y osmóticos en la maduración, germinación y conversión de embriones somáticos de café (Coffea arabica var. Colombia) [Tesis de maestría, COLEGIO DE POSTGRADUADOS]*.

<http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/3807>

- Samson, N. P., Campa, C., Gal, L. Le, Noirot, M., Thomas, G., Lokeswari, T. S., & De Kochko, A. (2006). Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(1), 37–45. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9094-2>
- SIPA. (2023). *RENDIMIENTOS OBEJETIVOS DE CAFÉ*. El Nuevo Ecuador. <https://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/rendimientos-de-cafe-2023-cp>
- Telenchana, S. (2022). “CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE VARIEDADES DE CAFÉ PRESENTES EN EL SUR DE ECUADOR MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES” [Tesis de pregrado, UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK FACULTAD]. <https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4915>
- Tituaña, E. J. (2025). “ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE VARIEDADES DE *Coffea* spp. DE LA PARROQUIA DE APUELA, VALLE DE INTAG” [Tesis de pregrado, UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE]. <https://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/16858>
- Valdés, Y. C., Shukla, M. R., Vega, M. E. G., & Saxena, P. K. (2021). Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation. *Agronomy*. *Agronomy* (Basel, Switzerland), 11(9), 1861. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091861>
- Walden, R., Cordeiro, A., & Tiburcio, A. F. (1997). Polyamines: Small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiology*, 113(4), 1009–1013. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1009>

7. ANEXOS

Anexo 1

Análisis de la varianza para la proliferación de callos.

FdV	SC	gl	CM	F	p
Total	26.31	31			
Tratamiento	24.08	7	3.44	37.03	<0.0001
Error	2.23	24	0.09		

Anexo 2

Análisis de la varianza para la productividad superficial en la proliferación de callos.

FdV	SC	gl	CM	F	p
Total	189.61	31			
Tratamiento	188.44	7	26.92	553.88	<0.0001
Error	1.17	24	0.05		

Anexo 3

Análisis de la varianza para el establecimiento de suspensiones celulares.

FdV	SC	gl	CM	F	p
Total	0.17	15			
Tratamientos	0.08	3	0.03	3.80	0.0400
Error	0.09	12	0.01		

Anexo 4*Análisis de la varianza para la obtención de embriones somáticos.*

FdV	SC	gl	CM	F	p
Total	12891.5	31			
Medio	3444.5	1	3444.5	213.76	<0.0001
Gelificante	2520.5	1	2520.5	144.05	<0.0001
Luz	1300.5	1	1300.5	213.76	<0.0001
Medio * Gelificante * Luz	760.5	1	760.5	144.05	<0.0001
Error	284	24	0.66		

Anexo 5*Análisis Chi cuadrado de Pearson en la germinación de embriones.*

Estadístico	Valor	gl	p
Chi cuadrado Pearson	4.20	1	0.0405
Chi cuadrado MV-G2	4.33	1	0.0374
Coef.Conting Cramer	0.30		2520.5
Coef.Conting Pearson	0.39		1300.5