

Centro de Investigación Científica de Yucatán

“INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA DE CALLO A PARTIR DE HOJA DE *Coffea arabica*”

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

EGRESADO:

Pedro Francisco de la cruz Cervantes Ic

DIRECTORES DE TESIS:

Director Interno

Dra Rosa Yazmín Us Camas

Directores Externos

Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas

Dra. Ana Odette Quintana Escobar

Calkiní, Campeche, México 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD TESIS

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento, proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Lugar y fecha: Mérida, Yucatán, 12 marzo de 2025

Pedro Francisco de la Cruz Cervantes Ic

Nombre y firma del estudiante

Dedicatoria

Le agradezco a Dios por haberme permitido llegar a este punto y dándome salud para lograr mis metas.

A mis padres que me dieron vida juntos con mis abuelos que han estado conmigo en todo momento, a pesar de las situaciones difíciles siempre me han estado apoyando, Mamá, Papá, Abuelita y Abuelito gracias por todo, este esfuerzo es gracias a ustedes. Los quiero de corazón.

Agradecimiento

A la Dra. Rosa María Galaz Avalos por su gran apoyo, paciencia y enseñarme los protocolos y los métodos para hacer el medio de cultivo e inducción de la línea de callos.

Al Dr. Loyola por aceptarme en su laboratorio e invitarme a sus clases para aprender más sobre el tema de la embriogénesis somática. Su compromiso con el seguimiento de la tesis e incluso enseñando el valor de la lectura para motivarnos ser excelentes profesionales.



Educación
Secretaría de Educación Pública



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche 45723
P/03/25/746
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. PEDRO FRANCISCO DE LA CRUZ CERVANTES IC 6446
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DR. VICTOR MANUEL LOYOLA VARGAS, y el co-director DRA. ROSA YAZMÍN US CAMAS, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: "**INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LINEA DE CALLO A PARTIR DE HOJA DE COFFEA ARÁBICA**".

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINÍ

"DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES"

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MEXICO.



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



Índice

Contenido

Introducción	18
Capítulo 1	20
1.1 Marco Teórico	20
1.1.1 Origen de Coffea arabia.....	20
1.1.2 Biotecnología verde.....	22
1.1.3 Cultivo de tejido vegetal.....	22
1.1.4 Cultivo <i>in vitro</i>	24
1.1.5 Explante	25
1.1.6 Inducción de callo	25
1.1.7 Micropropagación	26
1.1.8 Medio de cultivo	26
1.1.9 Componentes del medio	27
1.1.9.1 Agua	27
1.1.9.2 Destilación	27
1.1.9.3 Minerales	27
1.1.10 Compuesto orgánicos	28
1.1.11 Embriogénesis somática.....	30
Justificación	32
Alcance y limitaciones	32
<i>Alcance del proyecto.....</i>	32
<i>Limitaciones.</i>	32
Objetivo generales y específicos	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos.....	32
Capítulo 2	34
2.1 Materiales y métodos.....	34
2.1.1 Material biológico	34
2.1.2 Preparación de Medio de cultivo para inducción de callo.	34
2.1.3 Inducción de callo	35
2.2.4 Mantenimiento de los callos de Coffea arabica	35
2.2.5 Preparación del medio para mantenimiento de callo	35

2.2.6 <i>Trasferencia de los callos de Coffea arabica al medio de mantenimiento.</i>	36
Capítulo 3	38
3.1 <i>Resultados y discusiones</i>	38
3.1.1 <i>Resultados</i>	38
3.1.2 <i>Inducción de callo en explantes de hoja</i>	38
3.1.3. <i>Mantenimiento de los callos obtenidos</i>	39
3.2. <i>Caracterización mediante la determinación de los pesos seco y fresco de un ciclo de cultivo de los callos de C. arabica.</i>	39
Discusión.....	45
Conclusión	48
Referencias Bibliográficas.....	50

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de inducción de callo en explantes foliares de Coffea arabica. **A)** Planta de C. arabica, sus hojas fueron cortadas para la inducción del callo. **B)** Explante de hoja C. arabica en el día 0. **C)** Explante después de 15 días en inducción en el que las orillas de la hoja comenzaba a generar callo. **D)** Explante con callo después de 30 días de inducción. **E)** Explante de 45 días con tejido calloso después de la inducción y **D)** Cultivo de callo en medio de mantenimiento. 39

Índice de Tablas

Tabla 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la inducción de callo (S1).	34
Tabla 2. Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog para el mantenimiento de callo (S2).....	36
Tabla 3. Pesos fresco y seco de los callos de Coffea arabica a través de un ciclo de cultivo de 60 días.	40
Tabla 4. Datos de las características visuales y morfológicas de los callos a través de 60 días de cultivo. Cantidad de callos formados: (+): formación ligera. (++) : formación media. (+++) : formación abundante. (-): No nodular. (-): No friable. (-): No compacto. (*): Compacto. (*) : Nodular. (*) : Friable.	43

Índice de Gráficas

Grafica 1. Dinámica del crecimiento bajo el parámetro de peso fresco de la línea de callos de <i>Coffea arabica</i>	42
Grafica 2. Dinámica del crecimiento bajo el parámetro de peso seco de la línea de callos de <i>Coffea arabica</i>	43.

Resumen

Cafeto es el nombre común que se le da a la planta de café perteneciente a un género de árboles de la familia de las Rubiáceas. De las especies que comprende el género *Coffea* destacan tres por su importancia en el cultivo: *Coffea arabica*, *C. canephora* y *C. liberica*. Económicamente hablando *C. arabica* representa el 58% de la producción mundial.

En el presente trabajo se desarrolló un protocolo de inducción de callo a partir de explantes de hoja de *C. arabica*, así como su mantenimiento y caracterización. El medio de inducción fueron las sales de Murashige y Skoog suplementado con tiamina-HCl, mioinositol, L-cisteína, sacarosa y como reguladores del crecimiento el ácido 2,4-dicloroacético y kinetina. El callo fue friable y adecuado para establecimiento de suspensiones celulares.

El crecimiento se caracterizó con base en los pesos seco y fresco. También se caracterizó el aspecto morfológico. El índice de crecimiento fue de 5.6 y el cultivo tuvo un tiempo de duplicación de 13.9 días, en tanto que su velocidad de crecimiento fue de 0.0497 al día 14. Los resultados obtenidos servirán de base a otros estudios permitiendo evaluar y desarrollar estrategias de conservación, dando cumplimiento al objetivo referente a estudiar el crecimiento, caracterización y formación de callos potencialmente embriogénicos.

Introducción

De acuerdo con la información documentada en lo referente a *Coffea arabica*, es la especie que más se cultiva en el aspecto comercial, desempeña un papel importante en la economía de más de 60 países, principalmente en América Latina, África y Asia (Cardona, 2020). La planta es originaria de Etiopía y su cultivo se inició en las regiones de Arabia (Yemen) hasta extenderse por el mundo, esto debido a su alta producción del cultivo de café que ofrece, generado una gran demanda gastronómica y comercial.

El comercio del café desempeña un papel importante para producción y exportación a numerosos países. Es uno de los productos primarios más valiosos a nivel de cultivo, procesamiento, comercialización, además proporciona una mejora en las condiciones sociales y económicas a los agricultores. Las exportaciones de café generan un ingreso significativo en las economías locales y contribuye en el comercio internacional, promoviendo esta iniciativa la equidad y la sostenibilidad en la cadena de suministro del café brindando un impacto positivo y mejor calidad de vida para los productores.

La biotecnología contemporánea ha sido capaz de seguir desarrollándose en los últimos años, ofreciendo alternativas para reducir el número de problemas relacionados en cualquier aspecto, entre ellos la producción de las plantas de café *C. arabica*. En síntesis, el café de la especie arabica tiene una calidad excelente por su bebida suave y en bajos índice de cafeína, pero las plantas son delicadas a causa de que son vulnerables a plagas y a cambios bruscos del clima afectado la producción, así mismo Venkatai (2016, citado, por Cardona 2010) afirma que “existen variedades mejoradas de café que presentan características con altos rendimientos, mejor organoléptica, y resistencia a plagas y enfermedades; estas características pueden ser propagadas utilizando técnicas biotecnológicas.”

La biotecnología vegetal en su conjunto de técnicas que es utilizada para los tejidos células u órganos vegetales. Estas permiten la proliferación de las células a partir de un explante (fragmento vegetal que puede ser meristemo, yemas auxiliares, hojas, raíces, anteras e incluso microsporas) en un medio de cultivo provisto de nutrientes, vitaminas y en algunos casos también de reguladores del crecimiento.

En las técnicas del cultivo *in vitro* siempre se ha realizado una búsqueda de propagaciones alternativas permitiendo la aplicación de nuevos métodos que permita obtener plantas libre de patógenos con un gran valor agronómico. La regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro* está relacionada con el genotipo del cual provienen los explantes al existir diferencias porcentuales en la formación de callo embriogénicos.

El cultivo *in vitro* de las células, tejido y órganos vegetales permite estudiar los factores que influye en el metabolismo y crecimiento de los tejidos vegetales, ya que se pueden controlar y variar las condiciones de cultivo dependiendo del objetivo. Esto permite que esta técnica presente un campo bastante amplio en la investigación científica.

Dependiendo de la especie, la cicatrización de heridas toma diferentes caminos, generalmente se forma primero un callo que consiste en parénquima sin diferenciación. El callo se forma de las heridas superficiales; sin embargo, si la herida es muy profunda, la cicatrización se lleva a cabo por tejido calloso que empieza a formar en los bordes, y crece hacia el centro, hasta fusionarse, La cicatrización por callo es de importancia en el prendimiento de injertos,

Por lo tanto, en la presente investigación se planteó inducir y caracterizar el callo a partir de explantes de hojas de plantas de *C. arabica* cultivadas *in vitro*, como apoyo a proyectos de innovación que faciliten la investigación en laboratorios del sector productivo.

Capítulo 1

1.1 Marco Teórico

1.1.1 Origen de *Coffea arabica*

Coffea arabica es originaria de Etiopía. Su cultivo se inició en las regiones de Arabia, fue uno de los cultivos que se extendió por el mundo gracias a su elevada producción. Esta especie desempeña un papel importante en los aspectos económico y gastronómico.

Existen decenas de especie de café, de las cuales se han identificado aproximadamente 124. Las dos que dominan la producción comercial y las ventas son *C. arabica* y *C. canephora*. El sabor exacto de un café depende en gran medida de su origen, método de procesamiento y otros factores (Kanniah, 2021).

Su hábitat óptimo se encuentra en las regiones tropicales de Asia, África y América: estas regiones de hecho tiene suelos ricos en humus, nitrógeno y potasio, con una temperatura de entre 17 °C y 30 °C, con precipitaciones anuales de entre 1,200 y 2000 mm (Bissanti, 2023).

El café es el segundo producto de importancia comercial en el ámbito internacional, sólo superado por el petróleo. En México la producción de café está fuertemente arraigada en la estructura social y cultural. Actualmente se estima que hay aproximadamente medio millón de caficultores en México, el 90% de los cuales son titulares de pequeñas explotaciones familiares con áreas de 2 a 5 hectáreas de cafetales. (Hernández, 2021).

El mayor productor y exportador de café del mundo es Brasil representando aproximadamente el 70% de las exportaciones mundiales. El rendimiento medio en las fincas mexicanas es de 5.28 sacos de 60 Kg/hectárea, lo que fija la producción cafetalera del país en unos 3.7 a 4 millones de sacos de 60 kg. Entre el 30% y el 50% de la producción es para autoconsumo, mientras que el resto se destina básicamente a los Estados Unidos. (Hernández, 2021).

El café tiene una importancia económica, cultural y social a nivel mundial; lo cultivan en más de 60 países, unos 25 millones de agricultores, a menudo pequeños productores y sustenta 120 millones de personas (Bracken, *et. al*, 2023). Sin embargo, la producción en estas regiones es muy vulnerable al cambio climático, lo que probablemente afecta los rendimientos, la calidad de los cultivos y, en última instancia, los medios de vida de los agricultores y sus familias. Goody (2019) menciona otros factores que también afectan la producción de café como son las fluctuaciones del precio en el mercado internacional; políticas económicas nacionales y reducción de áreas de cultivo. Todo esto ha provocado que la productividad y el volumen de las exportaciones hayan experimentado disminuciones considerables. Teniendo este cultivo un alto costo. Cabe mencionar que esta planta presenta una tendencia decreciente provocada por la enfermedad conocida como roya del café,

La roya es una enfermedad del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. Ataca principalmente a las variedades derivadas de Typica y Bourbon, entre ellas Caturra, Catuaí y Pache. Suele afectar a las hojas maduras, y en el caso de ataques severos, puede también infectar hojas jóvenes, provocando su caída y pérdidas en la producción (Garzón, 2021). El daño en las hojas ocasiona que la planta no pueda realizar la fotosíntesis, lo que provoca que sea incapaz de completar la producción del grano. Además, estas plantas son vulnerables a cambios bruscos en el clima.

Por ende, para enfrentar el problema de la baja productividad, una alternativa económica es el uso de variedades resistentes a plagas o enfermedades, la variedad del cafeto también juega un papel importante en cualquier sistema de producción, pues el genotipo y su adaptación depende de la calidad de frutos a cosecha (Hein y Gatzweiler, 2006; Kathurima et al, 2009). En otras palabras, para que el café se beneficie de una mejora en el rendimiento, en los aspectos organolépticos, en la resistencia a plagas y enfermedades se requiere utilizar técnicas biotecnológicas.

1.1.2 Biotecnología verde

Actualmente, la biotecnología ha sido capaz de resolver problemas en el aspecto biológico y tecnológico, esto con el objetivo de mejorar y obtener alternativas para mejorar la calidad de los cultivos utilizando técnicas como el cultivo de tejidos para mejorar una planta o el desarrollo de un microorganismo.

La biotecnología tiene numerosas aplicaciones de gran potencial, en este caso el proyecto a presentar aplica la biotecnología vegetal, la cuál es un conjunto de técnicas que utilizan plantas o sus partes para obtener productos con características deseables para mejorar sus propiedades. Se encarga de desarrollar diversas variedades de rasgo en los cultivos y en las plantas y estudios que conforman a una planta y las características que les proporcionan (Benítez, 2020).

Sandoval, et al (2021) señalan que la biotecnología también ha sido de gran utilidad para el medio ambiente, ya que se utilizan microorganismo en procesos de biorremediación de residuos y líquidos, para la recuperación e identificación de diferentes compuestos químicos.

Este tipo de biotecnología tiene como objetivo buscar soluciones sostenibles en los procesos agrícolas para abordar los problemas actuales y desarrollar soluciones sostenibles y respetuosas con el medio ambiente y así garantizar el bienestar no solo del ser humano, sino también de todos los seres vivos y el planeta.

1.1.3 Cultivo de tejido vegetal

El cultivo vegetal se presenta como una herramienta biotecnológica que permite la propagación masiva de distintas especies de importancia económica (Venkataiah et al., 2016; Georget et al., 2017). Así mismo en la agricultura se ha centrado en la identificación de enfermedades, mejoramiento de cultivo, producción de material vegetal a gran escala, conservación de germoplasma, modificación genética y análisis de diversas poblaciones de plantas de interés (Sandoval et al., 2021).

El cultivo de tejidos vegetales representa una herramienta de gran impacto en la biología vegetal para la solución de problemas básicos y aplicados, ya que permite contar con modelos ideales para las investigaciones en el área fisiológica,

bioquímica, genética y estructural (Araiza, 2020), logrando que esta técnica biotecnológica permita clonar, conservar y manipular *in vitro* prácticamente cualquier vegetal, logrando que nuevas generación en plantas estén libres de patógenos en un tiempo corto, lo que es una diferencia importante ya que cuando se utilizan plantas el proceso es largo.

En 2006 De los Santos- Briones y Hernández, aseguraron que el cultivo de tejido vegetales ha permitido mejorar la capacidad de multiplicación de plantas agrícolas con rasgos de interés agronómico, además de ser una herramienta importante para la investigación básica y practica en la agricultura.

Su aplicación permite la propagación masiva de plantas en especial para especies de una propagación que resulte difícil para otros métodos. El éxito de todo cultivo *in vitro* puede fundamentarse en la elección correcta del explante inicial que se usará, el tipo de medio de cultivo y la constitución de este, y sobre todo garantizar la asepsia del cultivo. Si se logra estas condiciones, es posible lograr regenerar plantas completas a partir de pequeños fragmentos del tejido vegetal en condiciones artificiales, axénicas y controladas (Ariza, 2020).

Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido u órgano de origen y del tiempo de su duración distinguimos diferentes tipos de cultivos: cultivo de órgano, cultivo de segmento de órgano, cultivo de tejido calloso, suspensiones celulares y cultivo de plantas completas.

- Cultivo de órgano: en este tipo de cultivo el órgano se mantienen en un medio líquido y se conservan todas o algunas de las características del tejido.
- Cultivo de segmento de órgano: constituido por fragmentos pequeños de tejidos u órganos que se adhiere a una superficie en la que generalmente crecen las células más periféricas del explante.
- Cultivo de tejido calloso: este se refiere al mantenimiento *in vitro* de masa celular no diferenciadas, llamados callos, o tejido de callos.
- Suspensiones celulares: este tipo de cultivos está formado por células dispersas disgregadas de un tejido vivo, es el más utilizado debido a su

capacidad de programación. En este caso se utiliza células aisladas no diferenciadas, en un medio líquido bajo condiciones de agitación continua.

- Cultivo de plantas completas: en este caso se trabaja con individuos completos, aunque cultivados bajo condiciones artificiales a fin de ser utilizadas como fuente de tejido axénico para el establecimiento de otros tipos de cultivo o para transformación genética.

López, Foster & Jankuloski (2021) mencionan que las células vegetales tiene tanto plasticidad como totipotencia, por lo tanto, son adecuadas para el cultivo *in vitro*. Dado que cada parte de la planta tiene el mismo origen, cualquier parte de la planta puede emplearse para fines de cultivo.

1.1.4 Cultivo *in vitro*

El método *in vitro* ha sido una parte importante de la biología vegetal y del mejoramiento de cultivo desde los años sesenta (López et al, 2021). Así mismo el cultivo *in vitro* es una técnica que se basa en el aislamiento de órganos o tejidos de células vegetales en condiciones asépticas en un medio de composición química determinando e incubados en condiciones controladas (Roca y Mroginski, 1991, citado por Fernández *et al.* (2019).

Araiza (2021) menciona que el cultivo de tejido *in vitro* es uno de los avances más desarrollados por la biotecnología vegetal, siendo un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de una planta, pudiendo iniciar en una célula hasta el organismo completo, su característica de este cultivo técnico es mantener las condiciones de cultivo artificiales controladas.

Por lo tanto, esta técnica tiene múltiples ventajas:

- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos y termoterapia.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.

- Facilita la elaboración de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo, en cualquier época del año. El costo de la conservación *in vitro* es mucho menor que la conservación en campo.
- Evita el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) y disminuye el riesgo de pérdidas debido a factores bióticos.
- Permite realizar un tamizado para estrés biótico y abiótico a un alto número de muestras bajo condiciones controladas.
- Admite la distribución segura de germoplasma libre de patógenos cuarentenarios.

Además, el cultivo de tejido vegetales *in vitro* ofrece la posibilidad de almacenar un elevado número y variedad de muestras en un área reducida, facilitando su acceso a la evaluación y el estudio (Raó, 2004 citado por Fernández, *et al.*, 2019).

1.1.5 Explante

El explante es la porción de material vegetal usado para iniciar el *cultivo in vitro* de la especie seleccionada. En principio, podemos decir que cualquier parte de la planta, pueden ser un explante apropiado debido a su totipotencialidad, o su capacidad para regenerar una planta completa (Ruscitti et al, 2011).

1.1.6 Inducción de callo

Este método es utilizado para diferentes propósitos dentro del mejoramiento vegetal, como la micropropagación y la obtención de suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos (Larson et al., 2006 citado por Amasifuen & Pillasca, 2019).

Los callos embriogénicos son células vegetales en un proceso de indiferenciación en constante división celular dependiendo principalmente del genotipo de donde proviene el explante. Además de la concentración y combinación de reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo (Amasifuen & Pillasca, 2019).

El potencial de los callos como vía para la organogénesis y embriogénesis indirecta es una alternativa para programas de mejoramiento genético. Debido a que estos

métodos en algunas especies o genotipos al ser introducidos en medios de cultivo *in vitro* con diferentes concentraciones de fitohormonas o combinaciones de estas pueden inducir a variación somaclonal permitiendo obtener nuevas características o la eliminación de alguna indeseada (Sala y Labra, 2003; Rodríguez et al., 2014 citado por Amasifuen, et al, 2020).

1.1.7 Micropropagación

La micropropagación es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro* a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtienen una descendencia uniforme con plantas elite a gran escala y en un corto periodo de tiempo, garantizado, además, la sanidad del material reproducido (Goody, 2019).

Sigcho (2019) señala que, a diferencia de la propagación tradicional, el cultivo de tejidos permite la micropropagación clonal de un determinado genotipo vegetal en un tiempo relativamente corto, útil, en programas de mejoramiento genético convencional o por transformación genética.

A partir de la micropropagación de explantes (tallos, hojas, raíces y/o yemas auxiliares) de una planta, se puede conseguir un gran número de plántulas debido al principio de totipotencia, capacidad que tiene una célula de regenerar una planta completa. (Muñoz, 2006, citado por Fernández, et al, 2019).

Costa (2015, citado por Patricia, 2020) menciona que la micropropagación se inicia con la extracción de pequeños fragmentos de tejido, tomadas de diversas partes de la planta como por ejemplo las hojas. Una vez limpio y desinfectados, los explantes son transferidos en condiciones asépticas a un medio de cultivo adecuado.

1.1.8 Medio de cultivo

El desarrollo de formulaciones que proporcionan el medio ideal para el cultivo en condiciones *in vitro* fue un tema de gran actividad a partir de la segunda mitad del siglo XX (Padrón, 2020).

Entre los medios de cultivos más utilizados para la inducción y desarrollo de la ES se encuentra el propuesto por Murashige y Skoog (MS) o modificaciones de este (Sandoval et al, 2021). El medio de cultivo MS está compuesto por macroelementos,

microelementos, y vitaminas. Como suplemento, se pueden añadir reguladores de crecimiento como la 6 benciladenina (6BA), el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Lozano, 2014, citado por Patricia, 2020).

Actualmente, los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas, que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos los cuales proporcionan al cultivo *in vitro* una dieta balanceada de nutrientes y reguladores del crecimiento, para mantener su viabilidad, estimular su diferenciación y regular su crecimiento (Landaverde, 2002, citado por Sigcho, 2019).

A pesar de que a nivel macro, las necesidades nutricionales de la planta han sido extensamente estudiadas para conocer qué tipo de compuesto es utilizado por la mayoría de cada uno de los órganos de una planta completa (Padrón, 2020).

1.1.9 Componentes del medio

Los componentes de un medio de cultivo generalmente están constituidos por minerales, compuestos orgánicos y materiales de soporte.

1.1.9.1 Agua

El agua constituye más del 95% de cualquier medio de cultivo y es el solvente de todos los solutos que componen en el medio. Teniendo en cuenta que el agua potable corriente contiene elementos varios disueltos como compuestos orgánicos e inorgánicos, partículas sólidas de diversa naturaleza y microorganismos que pueden afectar la calidad del medio, es necesario aplicar mecanismos que permitan alcanzar un alto grado de pureza del agua corriente antes de ser utilizada.

1.1.9.2 Destilación

La destilación es el más común y utilizado de los métodos de purificación de agua se requiere un equipo relativamente económico (destilador) y fácil de manejar.

1.1.9.3 Minerales

Los compuestos minerales presentes en el medio de cultivo constituyen todos aquellos elementos inorgánicos que son importantes para el desarrollo de la planta (macroelementos y microelementos). A continuación, se enuncian los elementos utilizados en los medios de cultivo y la forma en que estos son utilizados:

Potasio (K): promueve el crecimiento del tejido meristemático, actúa como osmorregulador y regula el pH. Se agrega al medio de cultivo en forma de fosfato de potasio (KH_2PO_4) o cloruro de potasio (KCl).

Calcio (Ca): es un componente de la pared celular y promotor de la formación de raíces; el cultivo de tejidos su deficiencia puede causar muerte de meristemas. El Ca se agrega al medio de cultivo en forma de cloruro de calcio o como nitrato de calcio.

Manganeso (Mn): este elemento es un componente de la membrana de los cloroplastos y su deficiencia se observa en plantas adultas en forma de moteados foliares. Es suministrado al medio en forma de sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Zinc (Zn): tiene diversas funciones, entre ellas la de actuar como activador enzimático de la clorofila. Se suministra al medio en forma de sulfato de zinc.

Cobre: este microelemento interviene en la síntesis de clorofila y en la transferencia electrónica. Se adiciona al medio en forma de sulfato de cobre.

Molibdeno (Mo): interviene en la conversión del N y en la fijación del mismo. Es agregado al medio como en molibdato de amonio y sodio.

Cobalto (Co): es un elemento componente de la vitamina B12 y de las enzimas de la síntesis de ácidos nucleicos. Es agregado al medio de cultivo en forma de cloruro de cobalto.

Hierro (Fe): está involucrado entre otros procesos en la síntesis de clorofila y en las reacciones de óxido/reducción que se suceden en los cloroplastos y mitocondrias. Su deficiencia se expresa en hojas con apariencia clorótica. El hierro es adicionado al medio mezclando sulfato ferroso o con la sal disódica del ácido etilendiaminatetracético (EDTA) formando el quelato de hierro.

1.1.10 Compuesto orgánicos

Son aquellos compuestos que están conformados por moléculas con átomos de carbono enlazados covalentemente con otro átomo de carbono o hidrogeno. Dentro de los compuestos orgánicos que se utilizan en el medio de cultivo están los

carbohidratos o fuentes energéticas, las vitaminas, los reguladores de crecimiento y algunos suplementos.

Carbohidratos o fuentes energéticas: las plantas en su estado natural producen sus propias fuentes de energía (autótrofos); sin embargo, en condiciones de cultivo *in vitro*, por la ausencia total o parcial de fotosíntesis, los organismos vegetales necesitan de una fuente externa de carbohidratos para poder crecer y desarrollarse (heterótrofos), por lo que la mayoría de los medios deben ser suplementados con compuestos que actúen como fuentes de energía.

Dentro de las fuentes más comunes de carbohidratos usados en cultivos *in vitro* están:

- **Sacarosa:** es un disacárido compuesto por fructosa y glucosa, usado comúnmente en las preparaciones de medios de cultivo. Normalmente, se adiciona al medio en forma de azúcar común y casi siempre en una concentración del 2 al 4%.
- **D-Manitol:** es un azúcar que se utiliza para regular el potencial osmótico del medio. Se utiliza frecuentemente cuando se aíslan y cultivan protoplastos.
- **D-Sorbitol:** No es usado frecuentemente como fuente de energía; sin embargo, tiene la particularidad de ser transportada a través del floema. Al igual que el manitol se agrega al medio de cultivo para regular el potencial osmótico cuando se aíslan y cultivan protoplastos.

Vitaminas: las plantas en su estado natural suplen sus propias necesidades vitamínicas; sin embargo, los tejidos y células vegetales cultivados *in vitro* requieren de suplementos externos de estos compuestos para llevar a cabo sus procesos de crecimiento y desarrollo.

En la actualidad estos compuestos son adicionados en forma individual, siendo las vitaminas más comunes las siguientes:

- **Tiamina (vitamina B1):** es un cofactor para enzimas que actúa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) y es un componente regular de la mayoría de los medios de cultivo.

- **Acido nicotínico (niacina o vitamina B3):** es un componente de las enzimas que actúan en las reacciones activadas por luz. Su uso es menos común que el de la tiamina.
- **Mio-inositol:** es un componente regular de todos los medios de cultivo. Aunque no es estrictamente necesario para los procesos de crecimiento y desarrollo, los cultivos tienen un mejor comportamiento en presencia de éste.
- **Ácido ascórbico (vitamina C):** es usado más frecuentemente como un antioxidante en cultivos de tejidos de especies que producen grandes cantidades de fenoles cuando se les cultiva *in vitro*.

Una tercera alternativa a la formulación del medio de cultivo es el de doble fase. En este medio, se coloca una fase sólida y sobre esta una fase líquida; la sólida brinda la estabilidad para mantener en su sitio a los explantes, y la líquida le permite renovar el suministro de nutrientes sin realizar subcultivos del material vegetal permitiendo el crecimiento de los tejidos en el mismo recipiente. (Padrón, 2020)

1.1.11 Embriogénesis somática

La ES es una herramienta biotecnológica utilizada para la regeneración rápida y a gran escala de plantas. Consiste en la producción de embriones sin fecundación a partir de células somática (de Feria et al., 2003; Pádua et al., 2014, citado por Ávila, 2019).

Los embriones se pueden formar a partir de células del explante, o previa formación de callo, estas dos vías diferentes, se denominan embriogénesis somática directa e indirecta (Campos et al., 2017, citado por Jhong, et al., 2019),

En el proceso indirecto, además de obtener embriones somáticos a partir de callo, también se pueden obtener a partir de suspensiones celulares (Sandoval et al, 2020). La embriogénesis somática indirecta es una valiosa herramienta para la propagación clonal de especies de *Coffea* (Campos et al., 2017, citado por Cardona, 2020).

Actualmente, la embriogénesis somática indirecta empleada en café incluye la introducción de un segmento de hoja en condiciones *in vitro* asépticas y controladas

para la inducción de callo. De este callo se obtendrán masas celulares que serían multiplicadas en medios líquidos durante un tiempo determinado, hasta alcanzar una mayor cantidad material (Van Boxtel y Berthouly, 1995; Etienne et al., 1999, citado por Cardona, 2020).

Justificación

Alcance y limitaciones

Alcance del proyecto

El alcance que se presenta en esta investigación pretende:

- La preparación de medios de cultivo para *C. arabica*.
- Caracterizar el crecimiento de una línea de callo a partir de explantes de hoja de plantas *in vitro* de *C. arabica*.

Limitaciones.

Entre los limitantes podemos mencionar:

- Es un modelo vegetal con diferentes medios de cultivo.
- Se generan diferentes tipos de tejido de callo .

Objetivo generales y específicos

Objetivo general

Inducir y caracterizar una línea de callo generada a partir de explantes de hoja de plantas de *Coffea arabica in vitro*.

Objetivos específicos.

- Inducir la formación de callo a partir de explantes de hoja de *C. arabica*.
- Caracterizar el crecimiento de la línea de callo generada bajo los parámetros de pesos fresco y seco.
- Evaluar cualitativamente a los callos obtenidos en cuanto a color (crema, blanco y amarillo) y consistencia (compacto, friable y esponjoso).

Capítulo 2

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Material biológico

El trabajo fue realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. perteneciente a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti).

Para la obtención de la línea de callos, se prepararon medios de cultivo. Los callos se indujeron a partir de explantes de hojas de *C. arabica*.

Se utilizó el medio de Murashinge y Skoog (S1), el cual se enlista a continuación (Tabla1):

Componentes	Nombre común	Concentración (1 L)
Macro y microelementos	Sales MS	4.33 g
Vitaminas	Tiamina- HCl	29.6 mM
	Mio-inositol	550 mM
Aminoácidos	L-Cisteína	210 mM
Fuente de carbono	Sacarosa	87.7 mM
Reguladores de crecimiento	2,4-Diclorofenoxiacético	4.5 µM
	Kinetina	9.2 µM
Agente gelificante	Gel-rite	0.28%

Tabla 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog para la inducción de callo (S1).

2.1.2 Preparación de Medio de cultivo para inducción de callo.

Para la preparación del medio de cultivo, en un vaso de precipitados de 1 L se adicionaron agua, sales MS, tiamina-HCl, mio-inositol, L-cisteína, sacarosa, 2,4-D y kinetina. A continuación se ajustó el pH a 5.8, se aforó a un litro y se agregó el

agente gelificante bajo condiciones de agitación. El vaso de precipitados que contiene los componentes del medio se calienta en un horno de microondas durante ocho minutos. Una vez fundido el agente gelificante, el medio se dosificó en frascos Gerber (30 mL de medio). Los frascos se taparon con papel aluminio y se esterilizaron al mismo tiempo que cajas Petri de cristal, 2 frasco con agua y 2 pinzas. Todo el material fue colocado en una autoclave y la presión se llevó a 1 kg. cm⁻² (121 °C de temperatura) durante 20 minutos. Al finalizar, los medios de cultivo y los materiales esterilizados fueron llevados a la campana de flujo laminar para su uso.

2.1.3 Inducción de callo

Los materiales y frascos que fueron esterilizados, junto con las cajas que contenía plantas de *Coffea arabica* fueron llevadas a una campana de flujo laminar. Todo el material se limpió con una solución de etanol al 70%. Las hojas de la planta fueron cortadas con ayuda de una tijera y se sembraron en los frascos con el medio de cultivo después de habérseles eliminado los bordes. Después, cada frasco fue sellado y trasladado al cuarto oscuro y la temperatura se fijó en 24 ± 2 °C.

2.2.4 Mantenimiento de los callos de *Coffea arabica*

Una vez que los callos fueron inducidos se pasó a una segunda fase, en el cual solamente el callo formado sigue su crecimiento para su mantenimiento (medio S2). En esta segunda fase se hace la multiplicación de los callos y se realiza la caracterización de su crecimiento, así como una evaluación cualitativa en cuanto a color (crema, blanco y amarillo) y consistencia (compacto, friable y esponjoso)

2.2.5 Preparación del medio para mantenimiento de callo

Para la preparación de los medios de mantenimiento se utilizó un vaso de precipitados de 1 L con 600 mL de agua destilada y un agitador magnético; en él se adicionaron las sales MS y se ajustó el pH a 5.8. A continuación se agregó el gelrite al 0.28%. El medio se calentó en un horno de microondas durante 8 minutos (cada 4 minutos fue sacado del horno para ser agitado). Se vertieron 25 mL del medio en los frascos tipo Gerber y se taparon con tapas de plástico.

Los frascos tipo Gerber, 2 cajas Petri, 2 frascos de agua y 2 pinzas fueron esterilizados en una autoclave a 1 kg cm⁻² durante 20 minutos.

Los componentes para la preparación del medio de mantenimiento (S2) se enlistan a continuación en la **tabla 2**.

Componentes	Nombre común	Concentración (1 L)
Macro y microelementos	Sales MS	2.185 g
Vitaminas	Tiamina- HCl	29.6 mM
	Mio-inositol	550 mM
Aminoácidos	L-cisteína	210 µM
Fuente de carbono	Sacarosa	87.7 µM
Reguladores del crecimiento	2,4-diclorofenoxiacético	4.5 µM
	Kinetina	9.2 µM
Agente gelificante	Gelrite	0.28%

Tabla 2. Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog para el mantenimiento de callo (S2).

2.2.6 Trasferencia de los callos de *Coffea arabica* al medio de mantenimiento.

Los frascos con callos ubicados en el cuarto oscuro y los frascos con medio de mantenimiento fueron llevados a la campana de flujo laminar junto con el material esterilizado (cajas Petri, frasco con agua y pinzas), después de que la campana fuera limpiada con un algodón impregnado con alcohol al 70%, al igual que los materiales, se inició la transferencia de los callos al medio de mantenimiento con la ayuda de unas pinzas metálicas estériles.

2.2.7 Dinámica de crecimiento de los callos.

Para la caracterización del crecimiento de los callos se sembraron 90 frascos tipo Gerber con 1.0 g de peso fresco cada uno. Una vez inoculados, los frascos fueron tapados y sellados y se colocaron en un cuarto oscuro a 27 ± 2 °C en la oscuridad.

El peso fresco se determinó colectando biomasa de los callos durante la cinética de crecimiento. Cada cuarto día se tomaron 3 frascos para que con la ayuda de una balanza analítica se tomara el dato de peso fresco de cada frasco durante toda la caracterización. Los callos se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

La biomasa de los callos previamente obtenida se liofilizó durante 2 días en una liofilizadora marca LABCONCO a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.02 mbar de vacío, hasta peso seco constante.

La evaluación cualitativa de los callos en cuanto a color (crema, blanco y amarillo) y consistencia (compacto, friable y esponjoso), fueron realizados en cada día del muestreo a cada uno de los frascos.

Datos cinéticos. Con los datos obtenidos de biomasa en peso seco se calculó la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de las células mediante las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{t_f - t_0},$$

En donde: μ , es la velocidad específica de crecimiento; X_0 , la biomasa inicial; X_f ,

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu},$$

biomasa final; t_f , el tiempo final; t_0 , el tiempo inicial; T_d , el tiempo de duplicación.

Capítulo 3

3.1 Resultados y discusiones

3.1.1 Resultados

Durante la fase experimental de este proyecto de tesis, se llevó a cabo una serie de experimentos que condujeron al establecimiento de las condiciones adecuadas para la inducción y mantenimiento de callos de *Coffea arabica*.

3.1.2 Inducción de callo en explantes de hoja

Para la inducción de los callos se utilizaron explantes de hojas jóvenes de *C. arabica* cultivadas bajo condiciones estériles en medio MS.

La inducción de los callos se realizó en el medio S1 (ver materiales y métodos) durante los primeros 45 días de cultivo (primera etapa). Lo primero que se hizo fue retirar las hojas de las plantas empleadas (**Fig. 1A**). A continuación, para provocar una herida en las hojas, con unas tijeras se cortaron los bordes de las hojas empleadas retirando la orilla (**Fig. 1B**), todo esto se llevó a cabo al interior de una campana de flujo laminar. Como se puede observar en la **Figura 1C**, se empieza a apreciar la aparición de callo en los bordes de la hoja que fueron cortadas (**Fig. 1C**). Después de 30 días (**Fig. 1D**) de cultivo se logra apreciar el aumento en el volumen del callo que se ha formado sobre la herida provocada en los explantes. Para el día 45 se logró visualizar un gran aumento en la cantidad de callo formado alrededor de los explantes (**Fig. 1E**). Al final del experimento se colectó el callo formado y se colocó en el medio de mantenimiento para su proliferación (Fig. 1F).

En la **Figura 1**. se muestra de forma completa todo el proceso de la inducción de los callos obtenidos. La documentación del proceso se llevó a cabo con la ayuda de una cámara digital acoplada a un estereoscopio. Las fotografías se tomaron cada 15 días, durante 45 días después de la inducción.

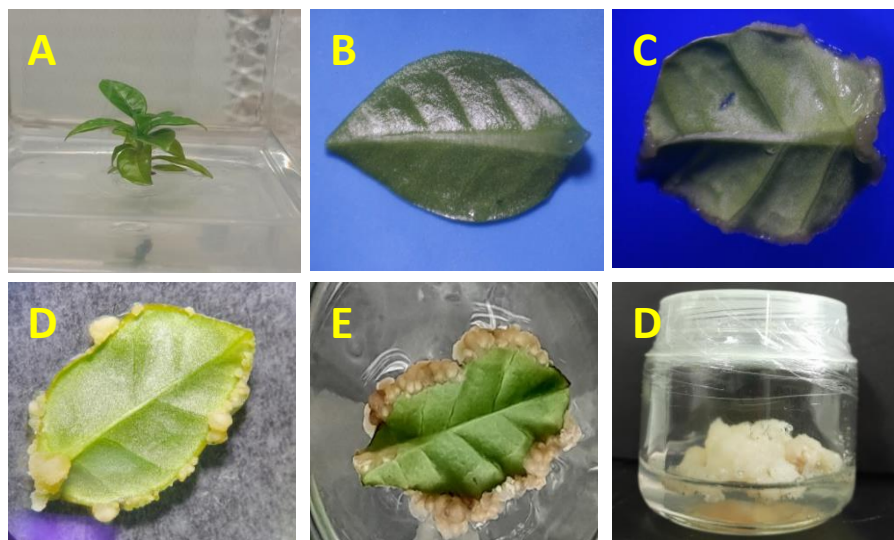


Figura 1. Proceso de inducción de callo en explantes foliares de *Coffea arabica*. **A)** Planta de *C. arabica*, sus hojas fueron cortadas para la inducción del callo. **B)** Explante de hoja *C. arabica* en el día 0. **C)** Explante después de 15 días en inducción en el que las orillas de la hoja comenzaba a generar callo. **D)** Explante con callo después de 30 días de inducción. **E)** Explante de 45 días con tejido calloso después de la inducción y **F)** Cultivo de callo en medio de mantenimiento.

3.1.3. Mantenimiento de los callos obtenidos

Para el mantenimiento de los callos se utilizó el medio MS (S2), el cual está compuesto de las sales basales del medio MS suplementando con tiamina-HCl 29.6 μM , mio-inositol 550 μM , cisteína 210 μM , 2,4-D 4.5 μM y kinetina 9.2 μM . Shiram et al. (2008) señalan que concentraciones elevadas de auxinas o de citocininas estimulan la producción de callo y que su aspecto está relacionado al tipo de regulador utilizado durante la inducción, por eso usamos una concentración elevada de 2,4-D, combinada con una concentración baja de una citocinina. En nuestro caso los callos tenían una apariencia blanco-amarillenta. Los callos colocados en el medio de mantenimiento crecieron bien hasta formar una masa importante que nos permitió realizar un ciclo de cultivo completo y mantener una cantidad importante de material para estudios posteriores.

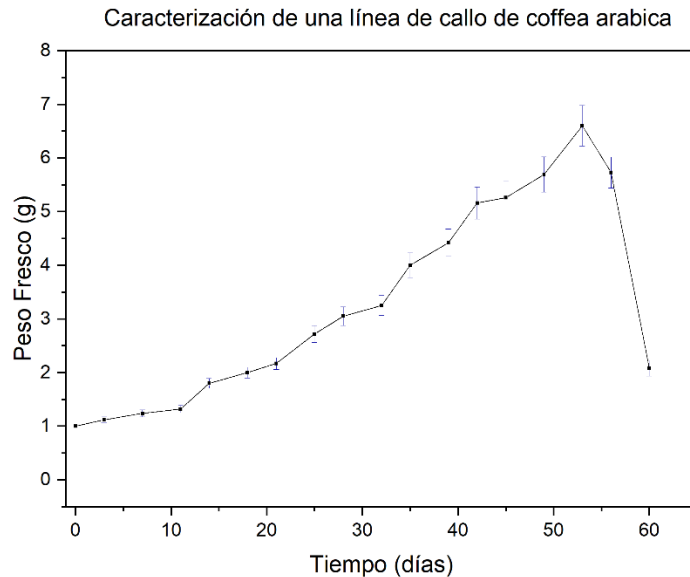
3.2. Caracterización mediante la determinación de los pesos seco y fresco de un ciclo de cultivo de los callos de *C. arabica*.

3.2.1 Pesos fresco y seco

Después de que los callos obtenidos se multiplicaron por dos ciclos de cultivo en el medio de mantenimiento (S2), se inició su caracterización. Para ello se determinaron los pesos fresco y seco cada 3-4 días durante 60 días. Las muestras para seguir el crecimiento se realizaron por triplicado y se tomaron aleatoriamente cada día de muestreo. Al finalizar cada día la determinación del peso fresco (**Tabla 3**), los callos fueron guardados en el ultracongelador. Al completar todas las determinaciones de peso fresco, los callos congelados se liofilizaron durante dos días. Una vez que los callos fueron liofilizados, se pesaron en una balanza analítica para obtener su peso seco (**Tabla 3**).

Días de cultivo	Pesos fresco (g) (Promedio)	Error estandar	Pesos seco (mg) (Promedio)	Error estandar
0	1.00	0.5	56.70	4.9
3	1.12	0.57	65.10	8.2
7	1.24	0.63	65.80	3.5
11	1.32	0.67	81.60	15.0
14	1.80	0.93	89.70	5.1
18	2.00	1.01	117.60	18.3
21	2.17	1.09	120.20	3.3
25	2.72	1.58	164.00	16.0
28	3.05	1.76	166.00	26.2
32	3.25	1.89	194.40	19.2
35	4.00	2.32	197.50	23.5
39	4.10	2.57	240.50	1.8
49	5.19	3.29	320.70	10.1
53	6.60	3.81	364.00	3.3
56	5.73	4.05	290.40	0.1
60	2.08	1.47	150.70	0.4

Tabla 3. Peso fresco y seco de los callos de *Coffea arabica* a través de un ciclo de cultivo de 60 días



Grafica 1.- Dinámica del crecimiento bajo el parámetro de peso fresco de la línea de callos de *Coffea arabica*.

En la Grafica 1 se muestra la dinámica del crecimiento de los callos, desde el momento en que se realiza la siembra de 1.0 g (inoculo) en los medios de cultivo, hasta los 60 días en los que termina el ciclo evaluado.

De acuerdo con los resultados de la gráfica de peso fresco (**Gráfica 1**) se muestra la curva de crecimiento ajustada por tener referencia del comportamiento del peso fresco de los callos según la aplicación de un modelo matemático que permite valorar y correlacionar el crecimiento de estos en correspondencia con su comportamiento biológico. A partir del día 11 se inició la fase de crecimiento exponencial hasta aproximadamente los 21 días, donde se produjo un aumento acelerado en la masa fresca y el volumen de los callos. Entre los 21 hasta los 42 días se presentó una fase de crecimiento lineal y una fase de desaceleración entre los 42 y 53 días. Después del día 53, el crecimiento de la masa callosa cesó y comenzó el necrosado y la senescencia del callo, y se produjo una disminución brusca en el peso fresco, lo cual pudo ser causado por el agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo.

En este sentido, se destaca que la curva obtenida se ajusta en gran medida a la curva sigmoidea característica del crecimiento, mediante la cual puede ser evaluado matemáticamente el crecimiento. Por otra parte, los estudios de los callos como material vegetal permiten conocer, a partir de las especies estudiadas, la información que las mismas ofrecen de su composición celular específica, crecimiento, morfología, características y actividad, lo cual puede ser empleado en futuros estudios ofreciendo posibles vías y soluciones que permitan la protección, conservación y estudio de la biodiversidad.

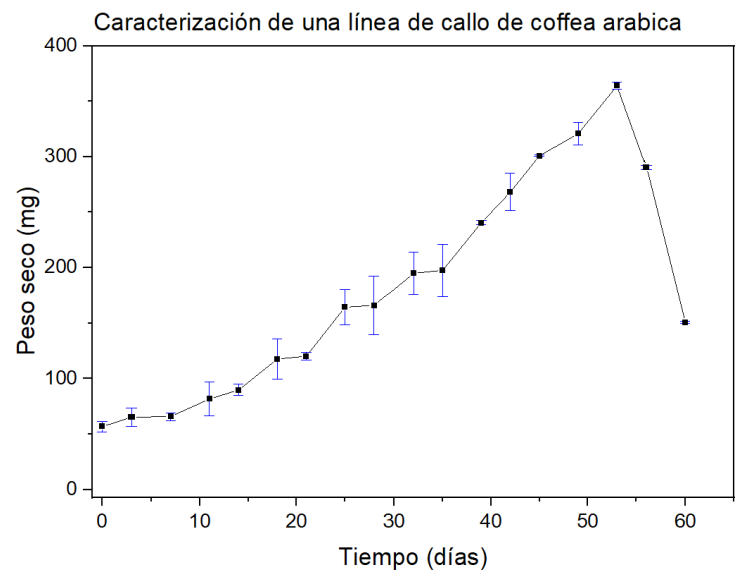
Con los datos obtenidos se obtuvo una curva con la que se muestra el crecimiento de los callos y en la que se distinguen cinco fases:

1. La fase de retardamiento (lag), en la que las células se preparan para dividirse tuvo una duración de 7 días, caracterizándose por un crecimiento lento dado que los callos se encuentran en un proceso de adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro*.
2. Después se observa la fase exponencial (entre los días 7 y 18 días), en esta fase las células se dividen activamente.
3. La fase lineal (días 21 hasta 44 días), en esta fase la división celular es máxima.
4. La fase progresiva de desaceleración, en esta fase la división se hace lenta y baja (entre los días 44 y 53 días).
5. La fase estacionaria (entre los días 53 y 60 días), el crecimiento se detiene completamente e incluso decae.

En la curva de crecimiento mostrada en la **Gráfica 2** se ilustra la caracterización del crecimiento de los callos bajo el parámetro de peso seco. Se observó la misma tendencia en su comportamiento que al evaluar el peso fresco. Con una primera etapa de once días en el que el crecimiento fue lento. A partir de la etapa de crecimiento lineal del día 21 y hasta el día 42 se observó un aumento constante de la masa de callo, Esto se debe a que en esta fase es joven y activa biológicamente alcanzando su máxima tasa de división. Al día 53 de cultivo llega al punto de aumento máximo con un peso de 354 mg de peso seco. La fase estacionaria del

peso seco fue corta, ya que a partir del día 56 inició la etapa de decaimiento, esto se debe en las células se produce una rápida lisis y la muerte de las células a consecuencia de la disminución de los nutrientes en el medio de cultivo.

Grafica 2. Dinámica del crecimiento bajo el parámetro de peso seco de la línea de callos de Coffea arabica.



3.2.2 Evaluación cualitativa del color (crema, blanco y amarillo) y la consistencia (compacto, friable y nodular) de los callos

Cuando los callos fueron pesados, también se evaluaron sus características visuales y morfológicas, observándose que del día 0 y hasta el día 18 de cultivo su coloración era blanca. A partir del día 21 y hasta el día 45 su coloración cambió a cremosa. Después del día 49 presentaban un color amarillo cremoso con características nodulares y friables como se reporta en la **Tabla 4**.

Días de cultivo	Características de los callos durante su crecimiento
-----------------	--

	Callos formados	Color	Nodular	Friable	Compacto
0	+	Blanco	-	*	-
3	+	Blanco	-	*	-
7	+	Blanco	-	*	-
11	++	Blanco	-	*	-
14	++	Blanco	-	*	-
16	++	Blanco	-	*	-
18	++	Blanco	-	*	-
21	++	Crema	-	-	-
25	+	Crema	-	*	-
28	++	Crema	-	*	-
32	++	Crema	-	*	-
35	++	Crema	-	*	-
39	++	Crema	-	*	-
42	++	Crema	-	*	-
45	++	Crema	-	*	-
49	+++	Crema/Amarillo	-	-	*
53	+++	Crema/Amarillo	-	-	*
56	+++	Crema/Amarillo	-	*	-
60	+++	Crema /Amarillo	-	*	-

Tabla 4. Datos de las características visuales y morfológicas de los callos a través de 60 días de cultivo. Cantidad de callos formados: (+): formación ligera. (++): formación media. (+++): formación abundante. (-): No nodular. (-): No friable. (-): No compacto. (*): Compacto. (*): Nodular. (*): Friable.

El análisis de los datos obtenidos se ha utilizado para evaluar el comportamiento de los callos. Se explica la acción del empleo de los reguladores del crecimiento lo que abre nuevas vías para el establecimiento *in vitro* de estos procesos. Al respecto, la edad del callo constituye un aspecto de gran importancia en el proceso de su inducción y define el posterior comportamiento. Es evidente la influencia que ejerce la composición de los reguladores del crecimiento endógena del explante empleado y la cantidad de los reguladores del crecimiento empleados en el medio de cultivo durante el crecimiento de la masa callosa, y se refleja en el crecimiento y en sus diferentes características morfológicas.

Los resultados obtenidos señalan que, en las condiciones experimentales descritas, el momento adecuado para el subcultivo de los callos queda comprendido entre los días 21 y 30. En estos días, los callos presentaron color crema. Durante la realización de este trabajo el subcultivo se realizó rutinariamente a los 30 días.

3.2.3 Parámetros de crecimiento de los callos de *Coffea arabica*.

Anteriormente se detalló el comportamiento de los callos al crecer y como pasan por diferentes fases con el pasar del tiempo. Esta caracterización permite evaluar de forma cuantitativa el crecimiento de los callos. Para ello se utilizan los datos de la fase exponencial de crecimiento entre los días 7 y 18. Empleando las fórmulas descritas en la metodología se calculó un índice de crecimiento de 5.6 días y un tiempo de duplicación de 13.9 días, en tanto que su velocidad de crecimiento fue de 0.0497 días.

Discusión

Se estableció una línea de callos de *C. arabica* la cual puede ser utilizada para diferentes propósitos, tales como la regeneración de plantas para la micropropagación y el mejoramiento vegetal o la formación de embriones somáticos. También puede ser utilizada para generar suspensiones celulares que se pueden usar para estudios bioquímicos y moleculares.

Esta investigación sirve de base para evaluar el comportamiento del material vegetal en condiciones *in vitro*, en este sentido, la callogenesis tiene un papel importante porque permite conocer la composición celular y el comportamientos morfológico de los materiales estudiados. Según *Gonzalo et al.* (2011) con el empleo de la callogenesis se abren nuevas áreas para la investigación científica y el estudio de la biodiversidad vegetal, representando una herramienta de utilidad para el estudio y multiplicación de espacios de interés, siendo un aspecto de gran importancia a la agricultura moderna.

Se caracterizó la línea generada y se pudieron observar las 5 fases de una curva típica de crecimiento, los datos observados coinciden con lo reportado en la literatura, y aunque las células se encuentran en un proceso de adaptación a las nuevas condiciones nutricionales del medio, luego incrementan la velocidad de división celular durante la fase exponencial (Shigeta et al., 1996) a partir de la fase exponencial entre los días 11 y 21, en el cual el peso fresco del callo se pudo observar el inicio de la división celular, es hasta la fase lineal (entre 21 y 49 días) donde el crecimiento se aceleró al máximo tanto del peso fresco como el peso seco, por lo cual el callo mostró el máximo incremento con los componentes nutricionales y las condiciones físicas proporcionadas, el día 53 empieza la desaceleración del crecimiento de los callos y algunas de las células mueren.

La caracterización del crecimiento del cultivo es fundamental para la obtención de resultados confiables en la realización de estos estudios que permiten el mantenimiento adecuado del cultivo.

Conclusión

Finalmente, con base en la metodología empleada en este estudio, fue posible visualizar el crecimiento de callos *in vitro* en explantes de hoja con el empleo del medio de cultivo MS y de establecer líneas celulares que obtenían reproducibilidad de los caracteres fisiológicos de crecimiento y de los caracteres bioquímicos. En ella se estableció una línea de callo, un método de trabajo que brinda la posibilidad de diferenciar entre las líneas con alto o bajo potencial embriogénico conocidos, este sistema que puede ser usado de manera eficiente en estudios bioquímicos y moleculares.

Se preparó medio MS de inducción para el crecimiento de los callos, el tiempo de crecimiento fue de 45 días. Así mismo el uso del medio MS a media fuerza iónica permitirá el mantenimiento de los callos a largo plazo en lo que se podrá estudiar para el desarrollo de la línea de callo y su caracterización embriogénica.

El ciclo de caracterización de los callos de *C. arábica* tuvo una duración de 60 días. Se logró identificar la fase de crecimiento retardado, fase exponencial, fase lineal, la fase de desaceleración progresiva y la fase estacionaria. Presentaron un índice de crecimiento de 5.6 días y un tiempo de duplicación de 13.9 días. La caracterización del crecimiento del cultivo es fundamental para la obtención de resultados confiables en la realización de estos estudios que permiten el mantenimiento adecuado del cultivo.

Como parte de este trabajo el uso del medio de cultivo MS permitió el mantenimiento a largo plazo y generación de los callos como una fuente de material biológico para las siguientes investigaciones

Referencias Bibliográficas

- Angel David Hernández- Amasifuen, A. A.-C.-L.-P. (17 de Noviembre de 2020). INDUCCIÓN IN VITRO DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES EN ROCOTO (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *La Granja: Revista de Cinecia de la Vida*. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de file:///D:/Downloads/3475-Texto%20del%20art%C3%ADculo-35696-1-10-20210827.pdf
- Araiza, M. J. (29 de Octubre de 2020). *INTRODUCCION AL CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES*. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de FPS: Fundacion Produce Sinaloa: <https://www.fps.org.mx/portal/index.php/agrobiotecnologia/2067-introduccion-al-cultivo-in-vitro-de-tejidos-vegetales>
- Benítez, M. L. (3 de Agosto de 2020). *Biotecnologia de plantas*. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de Universidad Simón Bolívar: <https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7983/Gu%c3%ada%20de%20Biotecnolog%c3%ada%20de%20plantas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bissanti, G. (2 de Febrero de 2023). Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de Un mundo ecosostenible dentro i codici della Natura: <https://antropocene.it/es/2023/02/02/coffea-arabica-3/>
- Cardona, R. Y. (Julio de 2020). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA. *Embriogénesis somática con explantes foliares de Coffea arabica cv. Centroamericano y Coffea canephora cv. Conilón*. Managua, Nicaragua. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de <https://repositorio.una.edu.ni/4395/1/tnf62c957.pdf>
- Elizabeth Fernandez, C. Z. (2019). *Conservacion In vitro en el banco de Germoplasma del INIA*. Lima , Perú: Intrituto Nacional de Innovacion Agraria -INIA . Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de https://www.inia.gob.pe/wp-content/uploads/2019/12/conservacion_in_vitro_compressed.pdf
- Encino, J. L. (Marzo de 2023). Colegio de Postgraduados, Intitucion de enseñanza e investigacion en ciencias agricolas. *Funcion de Produccion: studio de caso de la produccion de café(Coffea Arabica L.) En el municipio de la Concordia, Chiapas*. Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mexico. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/5113/Gomez_Encino_JL_MC_ISEI_Economia_2023.pdf?sequence=1
- Garzón, D. F. (13 de Enero de 2021). *Roya del café: por qué es nociva y cómo controlar su propagación*. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de PERFECT DAILY GRIND: <https://perfectdailygrind.com/es/2021/01/13/roya-del-cafe-por-que-es-nociva-y-como-controlar-su-propagacion/>
- Godoy, M. E.-d. (Abril de 2019). *Micropropagacio y resistente a roya (Hemlia vastatrix)*. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de inca Intituto Nacional de Ciencias Agrícolas: <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v40n2/1819-4087-ctr-40-02-e04.pdf>

- K. Sanchez Jhong, R. C. (26 de Junio de 2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 259-264. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v10n2/a12v10n2.pdf>
- Kanniah, J. (10 de Agosto de 2020). "Cafe 100% Árábica": ¿Que Significa? Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de PERFECT DAILY GRIND: <https://perfectdailygrind.com/es/2020/08/19/cafe-100-arabica-que-significa/>
- Luis Miguel Borrás Sandoval, L. Y. (2021). *Biotecnología enfocada al Sector Agropecuario y Minero con Guías de Laboratorio*. Colombia: UTPC. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de https://www.google.com.mx/books/edition/Biotecnolog%C3%AD_a_enfocada_al_sector_agrope/gatGEAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=induccin+de+callo&pg=PT39&printsec=frontcover
- Padrón, I. E. (2020). *CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES*. Montería, Colombia: Fondo Editorial Universidad de Córdoba. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de <https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/2553/Libro%20Cultivo%20de%20Tejidos%20Vegetales%20Edici%C3%B3n%2003-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Patricia, M. E. (7 de Febrero de 2020). *Micropropagación in vitro del cultivo de Café Conilon (Coffea canephora) A partir de hojas, Mediante Embriogénesis Somática*. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR, FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/MACIAS%20ESPINOZA%20BIANCA%20PATRICIA.pdf>
- Pillasca, A. D. (20 de Febrero de 2019). *Inducción in vitro de callo embriogénico a partir de lcultivo de anteras en "papa amarilla" Solanum goniocayx Ju. & Bukasov (Solanaceae)*. Recuperado el 2 de Octubre de 2023, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v26n1/a11v26n1.pdf>
- Portillo, S. R. (18 de agosto de 2023). *Biotecnología verde; qué es y aplicaciones*. Recuperado el 2 de agosto de 2023, de Ecología Verde: <https://www.ecologiaverde.com/biotecnologia-verde-que-es-y-aplicaciones-4551.html>
- Sigcho, T. d. (19 de enero de 2019). *Procesos Biotecnológicos in vitro para la formación de callos a partir de teidos foliares de cafeto (Coffea arabica L.)*. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA, Facultad agropecuaria y de recursos naturales renovables: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21596/1/Tania%20del%20Pilar%20D%c3%adaz%20Sigcho..pdf>
- Victor, C. M. (23 de Julio de 2019). ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE PRODUCCION Y MULTIPLICACION IN VITRO DE PLANTAS DE CAFÉ (Coffea arabica L. var. Colombia). *COLEGO DE POSTGRADOS, Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, CAMPUS MONTECILLO Postgrado de recursos genéticos y productividad fisiología vegetal*. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Recuperado el 1 de Octubre de 2023, de

http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/4444/Avila_Victor_CM_DC_RGP_Fisiologia_Vegetal_2019.pdf?sequence=1