



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tlajomulco



TESIS

CON EL TEMA:

“Evaluación del efecto de filtrados de *Trichoderma* sp en plantas de café (*Coffea arabica*) in vitro”

QUE PRESENTA:

MARIA DEL SOL OSORIO CARRILLO

ASESORA:

DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES

REVISORES:

**DRA. VANIA SBAYDE FARIAS CERVANTES
DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI ZAPATA**

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

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. MARZO, 2023.

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

No. DE OFICIO: D.SA/348/2023
ASUNTO: Autorización de impresión definitiva y digitalización

**C. MARIA DEL SOL OSORIO CARRILLO
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN AGRONOMÍA
P R E S E N T E**

Dado que el Comité dictaminó como **APROBADA** su TITULACIÓN INTEGRAL OPCIÓN I (TESIS), con el tema "**Evaluación del efecto de filtrados de *Trichoderma sp* en plantas de café (*Coffea arabica*) in vitro**" y determinó que da cumplimiento con los requisitos establecidos, se le notifica que tiene la autorización para su impresión definitiva y digitalización.

Sin otro particular quedo de usted.

ATENTAMENTE

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

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



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


MIBR/AIBR/ALCC/mjhc

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

No. DE OFICIO: D.SA/DCA/088/2023
ASUNTO: Liberación de proyecto para
la titulación integral.

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

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

NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:	MARIA DEL SOL OSORIO CARRILLO
NO. DE CONTROL:	18940006
PRODUCTO:	OPCIÓN I (TESIS)
CARRERA:	INGENIERÍA EN AGRONOMIA
NOMBRE DEL PROYECTO:	"Evaluación del efecto de filtrados de <i>Trichoderma sp</i> en plantas de café (<i>Coffea arabica</i>) in vitro"

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

ATENTAMENTE

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


ING. MIGUEL HERNANDEZ FLORES
RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



 DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES Nombre y firma del asesor	 DRA. VANJA SBEYDE FARIAS CERVANTES Nombre y firma del revisor	 DR. JOAQUIN ALEJANDRO QUI ZAPATA Nombre y firma del revisor
--	--	--

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



AGRADECIMIENTOS

Por el apoyo Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto “Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC”.

Un agradecimiento Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado en el proyecto; 292474 “Estrategias multidisciplinarias para incrementar el valor agregado de las cadenas productivas del café, frijol, mango, agave mezcalero y productos acuícolas (tilapia) en la región Pacífico Sur a través de la ciencia, la tecnología y la innovación”, que forma parte de un proyecto multidisciplinario e interinstitucional apoyado por el Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECYT).

Agradezco al Instituto Tecnológico de Tlajomulco por haber concluido mi carrera universitaria y gran parte de mi proyecto de tesis en sus instalaciones, así como al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ), por permitirme trabajar en uno de sus proyectos.

Le estoy muy agradecida a mi directora de tesis la Dra. Mayra I. Montero por sus palabras, apoyo, paciencia, y dedicación, que me impulsaron a no rendirme y seguir adelante.

A mi Codirector de tesis al Dr., Joaquín, por haberme considerado para trabajar en uno de sus proyectos.

A mis padres que siempre estuvieron apoyándome ya que sin ellos no habría llegado hasta donde estoy hoy en día, así como a mi hermana que fue un gran apoyo durante toda mi carrera.

RESUMEN

El café pertenece a la familia Rubiácea, tiene alrededor de 500 géneros, la mayoría de ellas autóctonas del África tropical y algunas islas del Océano Índico. Tienen hojas persistentes, opuestas con flores blancas y perfumadas que crecen mejor bajo un poco de sombra. Se cultivan en las regiones tropicales y ecuatoriales pues requiere de un clima más o menos fresco y no muy húmedo; la floración es al comienzo de la temporada de lluvias. Los frutos son bayas rojas o púrpuras, brillantes y carnosas.

Una limitante para la producción de café es la existencia de cultivos seniles, para sustituir estas plantaciones se busca una alternativa que ayude a optimizar la germinación de las semillas y generar un mayor número de plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tratamientos pre-germinativos y la aplicación de diferentes filtrados de *Trichoderma* que se colocaron en condiciones in vitro. Se calculó el porcentaje y la velocidad de germinación por un periodo de 18 días. El mejor porcentaje de germinación (87.5%) se presentó en el T4 (LE47) y R4 (72h) mientras que el índice de velocidad de germinación más alto lo obtuvo el T5 (LE63) con 7.16 SG/Día y el tratamiento R2 con 8.53 SG/Día. Se concluye que el mayor porcentaje de germinación lo obtuvieron las cepas LE47 y LE63, y el R4(72h) con un 83% aunque su índice de velocidad de germinación fue menor.

ABSTRACT

Coffee belongs to the Rubiaceae family, which has about 500 genera, most of them native to tropical Africa and some islands in the Indian Ocean. They have persistent, opposite leaves with white, fragrant flowers that grow best in light shade. They are cultivated in tropical and equatorial regions as they require a more or less cool and not very humid climate; flowering is at the beginning of the rainy season. The fruits are red or purple berries, shiny and fleshy.

One limitation for coffee production is the existence of senile crops. To replace these plantations, an alternative is being sought to help optimize seed germination and generate a greater number of plants. The objective of this work was to evaluate the effect of pre-germination treatments and the application of different *Trichoderma* filtrates that were placed in in vitro conditions. The percentage and speed of germination was calculated for a period of 18 days. The best germination percentage (87.5%) was presented in T4 (LE47) and R4 (72h) while the highest germination speed index was obtained in T5 (LE63) with 7.16 SG/day and R2 treatment with 8.53 SG/day. It is concluded that the highest germination percentage was obtained by strains LE47 and LE63, and R4 (72h) with 83% although its germination speed index was lower.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE CUADROS	9
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes	12
2.1 Importancia económica del cultivo de café.....	12
2.2 Clasificación taxonómica del café	13
2.3 Características de Coffea arábica	13
2.4 Propagación del café.....	15
2.4.1 Propagación convencional.....	15
2.4.2 Micropropagación	16
2.5 Enfermedades relevantes del cultivo de café	17
2.5.1 Mancha de hierro (<i>Cercospora coffeicola</i>).....	17
2.5.2 Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>).....	18
2.5.3 Mal de hilachas (<i>Thanatephorus cucumeris</i>)	19
2.5.4 Ojo de gallo (<i>Mycena citricolor</i>)	20
2.5.5 Roya (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	20
2.6 Microorganismos benéficos.....	21
3. Planteamiento del problema.....	23
4. Justificación.....	24

5. Hipótesis.....	25
6. Objetivos	26
6.1 Objetivo general	26
6.1.1 Objetivos particulares	26
7. Materiales y métodos	27
7.1 Material vegetal.....	27
7.1.1 Establecimiento de protocolos de desinfección	27
7.2 Establecimiento de experimento de pretratamiento de remojo en semillas de café.	29
7.3 Establecimiento de experimento de la aplicación de filtrados de Trichoderma sp. en semillas de café.....	30
7.4 Índice de velocidad de germinación (IVG).....	31
7.5 Diseño experimental y análisis de datos	31
8. Resultados y discusiones	32
9. Trabajo a futuro	37
10. Conclusiones.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fruto maduro del café.	13
Figura 2 Determinación del inicio de la germinación en semillas de café (<i>Coffea arabica</i>),	32
Figura 3 Germinación de semillas de café en condiciones in vitro en el día 18.	34
Figura 4 Germinación de semilla de café en condiciones in vitro en los días 5 y 18.	35
Figura 5 Contaminación se las semillas de café causada por bacterias y fenolización de las mismas.....	36
Figura 6 Comparación del desarrollo de plantas de café de tres diferentes tratamientos en el día 90 desde su establecimiento.....	37

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 CLAVES DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	10
CUADRO 2 DESINFECCIÓN UTILIZADA ANTES DEL ESTABLECIMIENTO DE LAS SEMILLAS IN VITRO	28
CUADRO 3 CONDICION DE REMOJO DE LA SEMILLA DE CAFÉ	29
CUADRO 4 TRATAMIENTOS CON CEPAS DE <i>TRICHODERMAS</i> SILVESTRES.....	30
CUADRO 5 ANÁLISIS DE VARIANZA SOBRE EL EFECTO DE LA APLICACIÓN DEL FILTRADO DE TRICHODERMA SP Y EL REMOJO DE SEMILLAS CIGÓTICAS DE CAFÉ EN LA GERMINACIÓN	33
CUADRO 7 EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE GERMINACIÓN EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS SEGÚN EL FILTRADO DE TRICHODERMA Y HORAS DE REMOJO.	35

Cuadro 1 Claves de símbolos y abreviaturas

ABREVIATURA	TÉRMINO
±	Más menos
ANOVA	Análisis de varianza
CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
°C	Grados Celsius
DMS	Grados, Minutos y Segundos
FORDECYT	Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Filtrado de Cultivo (<i>F. trichoderma</i>)
FSSC	Food Safety System Certification
gL ⁻¹ o g/L	gramo por litro
Ha	Hectárea
IVG	Índice de Velocidad de Germinación
Kin	Cinetina
km, m, cm, mm	Kilómetro, metro, centímetro, milímetro
NH, NR, NN, LR	Número de Hojas, Número de Raíces, Número de Nudos, Longitud de Raíz
mgL ⁻¹ o mg/L.	Miligramo por litro
mM, M	Milimolar, Molar
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
NaOH	Hidróxido de Sodio
NIMF	Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias
p/v	Peso por volumen de solución
PDA	Papa Dextrosa Agar
PDB	Caldo Papa Dextrosa
PGPM	Plant Growth Promoting Microorganism
pH	Potencial hidrogeno
PPO	Polifenol Oxidasa
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
s, min, h.	Segundo, minuto, horas.
SD	Desviación Estándar
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad
SG/Día	Semillas Germinadas por Día
sp. spp.	Especie - especies
Ton	Tonelada
v/v	Volumen por Volumen de solución
ZG	Zygotic germination

1. Introducción

El cafeto (*Coffea arabica*) es uno de los principales cultivos industriales en México. Es un arbusto grande con hojas ovaladas de color verde oscuro. Su fruto es ovalado y tarda en madurar de 7 a 9 meses. Este cultivo se hace predominante con sistema de producción bajo sombra, requiere de un clima cálido con alto nivel de humedad, su altitud debe ser de 1,000 a 1,300 msnm y una temperatura de entre 23 y 26 °C (SAGARPA, 2017). Es uno de los cultivos de mayor importancia en muchos países del mundo como: Colombia, Brasil, El Salvador, Nicaragua, y muchos otros (IICA, PROMECAFE 1997).

México produce café de excelente calidad, ya que su topografía, altura, climas y suelos le permiten cultivar variedades clasificadas dentro de las mejores del mundo, la variedad genérica que se produce en nuestro país es la arábica y su producción se realiza por lo regular en las zonas tropicales. En México hay 15 estados productores de café; al sur del país, Chiapas es el principal estado productor, aporta 41.0% del volumen nacional, seguido por Veracruz (24.0%) y Puebla (15.3%).

Por otra parte, la producción de café reportó su nivel mínimo desde que se tiene registro. Los principales factores que explican la disminución de la producción nacional durante la década reciente son la disminución de la superficie cosechada y la reducción de la productividad de los cafetales, relacionada principalmente con avanzada edad de las plantaciones, afectaciones climatológicas y por la roya del café. (USDA, 2016).

En los últimos años el cultivo in vitro, ha sido una alternativa eficaz para liberarse de un gran número de enfermedades, que ponen en riesgo la producción y la rentabilidad del cultivo. Asimismo se presentan problemas en el cultivo in vitro como es la contaminación por hongos, bacterias (Sharry et al., 2015), y la oxidación de semillas y de tejidos, la cual se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas

a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (*Amiot et al. 1996, Bray et al. 2000*).

Actualmente existe un gran interés por el uso de microorganismos que benefician a la agricultura, y algunos de ellos se están comercializando como formulaciones biopesticidas y biofertilizantes (*Zilli et al., 2019*).

Los hongos del género *Trichoderma* están entre los más estudiados, debido a sus múltiples efectos sobre las plantas, actuando como biocontrol de enfermedades (*Harman, 2011*) sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y, también, por su capacidad de inducir respuestas de defensa contra fitopatógenos, daños por insectos y estrés abiótico (*Vitti et al., 2015*).

2. Antecedentes

2.1 Importancia económica del cultivo de café

El café es uno de los productos primarios más valiosos, segundo en valor durante muchos años únicamente superado por el petróleo como fuente de divisas para los países en desarrollo. (*Figueroa, et al. 2022*) Se produce principalmente en 236 municipios, de 15 entidades de la República. Actualmente, el café representa el 0.66% del PIB agrícola nacional y el 1.3% de la producción de bienes agroindustriales.

En México, el estado de Chiapas es el de mayor producción de café de altura, orgánico o convencional, debido a que la temperatura que registra el estado es la ideal para el crecimiento de esta planta del aromatizante; así también, en la región de los altos de Chiapas se cultiva el cafeto a una altura de un poco más de 900 metros, además de que con los cuidados de los pequeños productores da una calidad de exportación al cultivo del café.

2.2 Clasificación taxonómica del café

Reino: Vegetal

División: Antofita

Subreino: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Subclase: Simpetalas

Orden: Rubiales

Familia: Rubiáceas

Tribu: Cofeales

Género: Coffea

Sección: Eucoffea

Subsección: Erythrocoffea

Especie: Arabica

2.3 Características de Coffea arábica

2.3.1.1 Fruto del café

El fruto del café es el elemento que nos queda para conocer por completo la morfología del café. Para la planta del café, el fruto es su garantía de supervivencia y reproducción. Dentro de estos frutos hay dos semillas unidas por el pergamino: una membrana transparente de composición natural, que es lo que le brinda un sabor dulce. Cada semilla, a su vez, posee un núcleo que es el portador del embrión y el encargado del desarrollo de la planta.



Figura 1 Fruto maduro del café.

2.3.1.2 Semilla

La semilla de café es una nuez oblonga, de tamaño variable (10 - 18 mm de largo y 6,5 – 9,5 mm de ancho) y constituida en su mayor parte por un endospermo córneo en uno de cuyos extremos y muy superficialmente se encuentra un embrión de 3,5 a 4,5 mm de largo, de radícula cónica y cotiledones cordiformes. Este endospermo está recubierto por una capa muy fina de células esclerenquimatosas (película plateada) de cerca de 70 micrómetros de espesor y dispuestas en su mayoría en forma paralela a la superficie.

La semilla está además encerrada en forma suelta dentro de una envoltura cartilaginosa de color blanco amarillento de aproximadamente 100 micrómetros de espesor, que corresponde al endocarpio o pergamino del fruto.

2.3.1.3 Raíz

La planta del café tiene intrincadas raíces en la parte inferior del tallo, a pocos centímetros de profundidad. Entre esta compleja estructura se encuentra la raíz principal: una más larga y gruesa que va de forma vertical desde el final del tallo hasta el final de la raíz. Esta raíz, que hace de sostén para las otras raíces más chicas, puede alcanzar los 50 centímetros si se trata de plantas que tienen más de 5 años.

2.3.1.4 Tallo

El tallo de la planta de café sirve para sostener tanto las ramas como las raíces. El tallo, al igual que las raíces, también puede dividirse en varias partes: nudos, ramas, yema terminal, yema axilar y entrenudos

2.3.1.5 Hojas

Las hojas de la planta de café, al igual que sus frutos, cambian de color según la etapa en la que estén. Al comienzo, son de color verde claro, pero luego ese tono se oscurece con el tiempo

2.3.1.6 Estípulas

Son pequeñas protuberancias verdes que se encuentran en el comienzo de la hoja. Las estípulas son quienes protegen la base de la hoja y, a su vez, señalan el lugar en donde estuvo la yema

2.3.1.7 Pecíolo

El Pecíolo es un tallo fino que conecta a las hojas con las ramas.

2.4 Propagación del café

El arbusto de café puede propagarse por métodos sexuales o asexuales. El primer método incluye el uso de la semilla en grano y el segundo la utilización de material vegetativo de la planta como estacas, esquejes o injertos. También puede propagarse por micro estacas o por cultivo de tejido.

La especie *Coffea arabica* normalmente se propagan por semillas ya que la fecundación de la flor ocurre por autopolinización y se mantienen las características de la variedad sobre el 90%.

2.4.1 Propagación convencional

El método sexual ha sido el tradicionalmente usado para propagar el cafeto, aunque éste tiene sus limitantes en términos de su baja capacidad de multiplicación y el largo período de tiempo que se requiere para la propagación masiva de este cultivo. Además de que las semillas de café son consideradas recalcitrantes, lo que quiere decir que no experimentan deshidratación en la planta madre y, sin detener su desarrollo, pasan directamente a la germinación (*Farrant et al., 1993*). A diferencia de las semillas ortodoxas, las recalcitrantes mantienen un cierto grado de actividad metabólica, por lo que su requerimiento de oxígeno es elevado y mueren al carecer de ventilación adecuada. Ambas características impiden que las semillas puedan sobrevivir a temperaturas bajas y las hacen un sustrato adecuado para el desarrollo de hongos y otros microorganismos que aceleran los daños producidos por el almacenamiento (*Christensen, 1978; Chin et al. 1984*).

Adicionalmente, muchas semillas recalcitrantes de origen tropical son sensibles al frío y no pueden ser almacenadas a temperaturas inferiores a 15°C. La sensibilidad a la deshidratación y a temperaturas bajas prolongadas implica limitaciones graves para el almacenamiento comercial a largo plazo de las semillas recalcitrantes (*Floriano, 2004*). El tiempo de almacenamiento es corto, si bien presenta variación en periodos de días o meses (*Gomes et al., 2006*). Las semillas de este tipo se hidratan y germinan mejor en el suelo que se encuentra protegido por vegetación ya establecida, que modera las fluctuaciones cotidianas de temperatura y humedad; en cambio, en suelos desnudos frecuentemente sufren daños que impiden la germinación o el establecimiento de la plántula.

2.4.2 Micropropagación

Hoy en día se han desarrollado métodos como el cultivo de tejidos que permiten producir una gran cantidad de plantas, en cualquier época del año. El cultivo de tejidos vegetal permite cultivar células, tejidos y órganos vegetales en medios sintéticos bajo condiciones asépticas y controladas de luz, temperatura y humedad. Esta técnica asegura que se tenga una buena disposición de plantas usando cantidades mínimas de espacio y tiempo (*Prakash & Van Staden, 2007*).

El medio de cultivo vegetal contiene todos los nutrientes requeridos para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas. Este está compuesto principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores del crecimiento, y algunos agentes solidificantes, como en el caso del medio de cultivo sólido. El medio *Murashige y Skoog (1962)* es el medio más extensamente usado para la propagación vegetativa in vitro de muchas especies de plantas. El pH del medio de cultivo es muy importante, ya que éste afecta tanto al crecimiento de las plantas como a la actividad de los reguladores del crecimiento, este se debe de ajustar a valores entre 5.4 y 5.8. Para el cultivo del material vegetal se pueden emplear tanto medios líquidos como sólidos. Los componentes del medio de cultivo que tienen mayor efecto en la respuesta inicial del material vegetal son la fuente de nitrógeno y los reguladores del crecimiento (*Hussain et al., 2012*).

Los reguladores del crecimiento (fitohormonas) desempeñan un papel esencial en la determinación de las rutas de desarrollo de las células vegetales durante el cultivo in vitro. Generalmente los reguladores más ampliamente empleados son auxinas, citocininas y giberelinas. El tipo y concentración de fitohormonas a utilizar depende de la especie con la que se esté trabajando, el tejido u órgano a cultivar y los objetivos del experimento. Altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas promueven la regeneración de brotes. Un balance de auxina y citocinina lleva al desarrollo de una masa desdiferenciada de células llamada callo (*Hussain et al., 2012*).

Dos de las técnicas de cultivo de tejidos in vitro más utilizadas son organogénesis y callogénesis. La organogénesis se refiere a la producción de órganos de las plantas (raíz, brote, hojas) ya sea directamente de los meristemas, o indirectamente de masas de células desdiferenciadas (callos), tanto para la propagación masiva de las plantas a estudiar como para el crecimiento de órganos particulares de interés (*Hussain et al., 2012*). La callogénesis por otra parte se produce cuando el explante, en medio con concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento, prolifera a células desdiferenciadas de callo. Las células del callo se consideran como totipotenciales debido a su habilidad para regenerar una planta completa (*Ochoa-Villarreal et al., 2015*).

2.5 Enfermedades relevantes del cultivo de café

Durante la etapa de desarrollo vegetativo y de floración se debe tener más cuidado con las enfermedades que atacan a la planta en desarrollo, ya que si no se tiene un monitoreo continuo pueden agravarse y causar pérdidas grandes en el cultivo. Algunas de las enfermedades más comunes que se presentan en este cultivo son:

2.5.1 Mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*)

Consiste en la presencia de manchas circulares aproximadamente de un centímetro de diámetro, pudiendo alcanzar mayores dimensiones. Se caracteriza por presentar un color pardo-claro o café oscuro, con un centro

blanco ceniciento, exteriormente la lesión está circundada por un anillo de color amarillento; puede afectar a nivel de vivero, planta joven y planta adulta, de igual forma ataca al follaje y al fruto. La necrosis estimula la caída de hojas, resultando en una defoliación general de la planta.

2.5.1.1 Etiología

La Mancha de hierro, es causada por el hongo (*Cercóspora coffeicola*), produciendo en la parte central de la lesión, estructuras de reproducción de color oscuro. La enfermedad es favorecida por la época fría, asociada a la humedad, exposición a la insolación; relacionada también con deficiencias nutricionales, ataque de nematodos, etc.

2.5.1.2 Control Cultural

El problema se puede prevenir mediante las siguientes observaciones:

- a) adecuar la sombra para evitar el exceso de iluminación
- b) fertilización adecuada.
- c) control de nematodos fitoparásitarios.

2.5.2 Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)

Se puede observar en las hojas la presencia de manchas de color café o gris con bordes irregulares, estas manchas pueden aparecer tanto en la parte central de la hoja, como en los extremos, siendo de diferentes tamaños. Un signo característico de la enfermedad, es la presencia de unos puntitos negros distribuidos en toda la lesión, que corresponden a estructuras (acérvulos) del hongo. La enfermedad se presenta también en los frutos verdes y ramas, adquiriendo un color negruzco; el daño principal es la exagerada defoliación, secamiento de ramas del ápice hacia la base y caída de frutos.

2.5.2.1 Etiología

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Colletotrichum sp.* de vida saprófita, (materiales en descomposición) las condiciones climáticas y

fisiológicas apropiadas para el hongo, son indispensables para causar daños de gran importancia económica. Los vientos fríos, abundante lluvia, así como la presencia de suelos con problemas de penetración de raíces y desbalances nutricionales, son factores determinantes para que la enfermedad se establezca.

2.5.2.2 Control Cultural

Un buen programa de fertilización, así como el establecimiento de la plantación en zonas aptas para el cultivo, evitan ataques severos de esta enfermedad. Control Químico Para el control curativo del problema, pueden realizar aspersiones foliares quincenal o mensualmente, dependiendo de la severidad, con los productos químicos siguientes: Producto Dosis Benlate (50%) 1 g/litro de agua Daconil (50%) 2 g/litro de agua Dithane M-45 (80%) 3 g/litro de agua

2.5.3 Mal de hilachas (*Thanatephorus cucumeris*)

La enfermedad se caracteriza por presentar en las hojas, ramas y frutos una película en forma de "telaraña" de color blanco grisáceo. El signo es fácilmente reconocido en el envés de las hojas, llegando el micelio del hongo a cubrir casi totalmente; éstas una vez atacadas, comienzan a secarse a partir de la base, para luego secarse completamente y desprenderse de las ramas, quedando atadas y colgadas de ellas mediante los filamentos del hongo. Los granos de café se secan y caen, seguidamente los tejidos de las ramas quedan expuestos y fácilmente son infectados por otros parásitos.

2.5.3.1 Etiología

Esta enfermedad conocida también como "Koleroga" es causada por el hongo *Corticium koleroga*, adquiriendo caracteres de severidad en cafetos descuidados, llegando a alcanzar importancia económica en zonas muy húmedas y calientes, principalmente cuando la ventilación y la luminosidad es muy escasa.

2.5.3.2 Control Cultural

De manera preventiva, es conveniente eliminar las fuentes de la enfermedad al inicio de las lluvias, podando los cafetos y realizando regulaciones en los árboles de sombra. Un tratamiento curativo consiste en la realización de podas

fitosanitarias o recepas, seguido de dos a tres aplicaciones anuales de Oxiclورو de Cobre 50% a 5 gramos por litro de agua.

2.5.4 Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)

Se manifiesta por manchas circulares en las hojas y frutos, de color pardo oscuro, tornándose a un color gris claro a medida que el hongo se va desarrollando. Los bordes de la lesión son bien definidos notándose por el haz y por el envés; sobre las lesiones pueden observarse a simple vista, varios filamentos provistos de una cabezuela en el ápice de cada uno, que corresponden a las estructuras reproductivas del hongo.

2.5.4.1 Etiología

El "Ojo de gallo", también llamado "gotera", debido al ocasional desprendimiento de la lesión, es producida por el hongo *Mycena citricolor*, el cual se desarrolla en cafetales con excesiva sombra, poca ventilación, y condiciones de mucha lluvia; su avance es lento y generalmente aparece en sitios aislados. La presencia del hongo suele manifestarse durante todo el año, si las condiciones le son favorables. El viento, la lluvia, el hombre, etc., son medios importantes para su diseminación. Lesiones ocasionadas por el ojo de gallo.

2.5.4.2 Control Cultural

La enfermedad podrá ser evitada mediante la realización constante de las prácticas o labores culturales del cultivo, tales como: regulación de sombra, poda sanitaria de los cafetos, control de malezas, fertilizaciones, etc. Estas mismas prácticas reducen la enfermedad una vez establecida.

2.5.5 Roya (*Hemileia vastatrix*)

La enfermedad se manifiesta en las hojas, en un inicio como pequeñas manchas amarillas de aproximadamente 2 mm de diámetro en la cara inferior (envés) de la hoja. Esas manchas aumentan gradualmente mostrándose circulares, de diámetro aproximado de 1 cm., lisas, de color amarillo transparente en la cara superior (haz) mientras que en el envés se observa una masa polvosa saliente sobre la superficie de la hoja, de color anaranjado, correspondiente a la lesión característica de la enfermedad, constituida por numerosas esporas

(uredosporas) del hongo. Puede existir enlace entre varias manchas, llegando a cubrir gran parte del área foliar. En caso de severidad, la enfermedad provoca defoliación y reducción del área activa fotosintética, llegando a ocasionar una reducción progresiva de la producción.

2.5.5.1 Etiología

La Roya del cafeto, es producida por el hongo (*Hemileia vastatrix*); produce esporas en pedicelos reunidos en haces a través de las estomas; este hongo es un parásito obligado, únicamente puede vivir en el tejido de la planta. Cada mancha o lesión, puede contener aproximadamente 150 mil esporas considerándose por ello excelente fuente de inóculo. Condiciones excelentes de humedad, temperatura, precipitación y susceptibilidad de la planta, son factores importantes para el desarrollo de una epidemia.

2.5.5.2 Control

Cuando los niveles de infección aún son inferiores al 20% de hojas con roya, es posible efectuar un eficiente control de la enfermedad mediante el uso de fungicidas cúpricos como: Producto Dosis Oxiclورو de Cobre (50%) a 3.5 Kg/ha, 6 g/litro de agua Óxidos de Cobre (50%) o Hidróxidos de Cobre (50%) a 2.5 Kg/ha 4 g/litro de agua.

Como ya se ha mencionado, la Roya es la enfermedad de mayor importancia en el cultivo de café, presente en las principales regiones de café en el país. El impacto económico de la enfermedad no sólo se debe a la reducción de la cantidad y la calidad de la producción, sino también a la necesidad de implementar costosas medidas de control.

2.6 Microorganismos benéficos

La alternativa actual para optimizar los cultivos es la adición de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, conocidos como PGPM (*Plant Growth-Promoting Microorganism*), aislados de ambientes diversos, con la habilidad potencial de afectar positivamente el crecimiento de las plantas (*Elein et al., 2005; Bashan et al., 2014*).

Entre los PGPR más utilizados está *Pseudomonas fluorescens*, que estimula el crecimiento de la planta mediante producción de antibióticos, con lo que evita enfermedades a la planta por otras bacterias y hongos patógenos. También acelerara la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas por la síntesis de hormonas, como auxinas, giberelinas y citoquininas, y otras sustancias, como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento (*Uribe et al., 1999*).

Diferentes especies de *Trichoderma* se utilizan para el control de hongos patógenos del suelo, es caracterizado por tener un comportamiento saprófito o parásito, entre las más destacadas están los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Pythium* y *Fusarium*, además de tener un efecto promotor de crecimiento por la producción de fitohormonas y solubilización de fosfatos (*Cubillos-Hinojosa, 2009*). El éxito de las cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico se debe a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizosfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción del crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa. Las diferentes especies se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo. (*Martínez et al., 2013*).

3. Planteamiento del problema

La producción de café se ha visto afectada debido a enfermedades que se presentan en este cultivo que son causadas en su gran mayoría por hongos. Algunas de ellas son ojo de gallo, Mancha de hierro, Broca del cafeto y la más importante la roya, ocasionada por *Hemileia vastatrix* (Cisneros, 2017), catalogada como una de las 10 enfermedades más devastadoras en el mundo, afectando los cafetos en México. Prácticamente se tienen problemas fitosanitarios en el cultivo a través de todo el ciclo anual. En algunos casos y cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de estas enfermedades, se llegan a alcanzar pérdidas considerables (Harvey, 2021). Por lo que se han buscado nuevas alternativas, entre ellas la generación de plantas resistentes a la enfermedad, para la obtención de estas plantas y el rápido establecimiento de los nuevos cultivos es necesario optimizar las estrategias de propagación y conservación de plantas de cafeto. Además de las enfermedades otro factor que afecta al cultivo es que la mayoría de los cafetales existentes son seniles, algunos con más de 30 años y con portes muy altos que dificultan la cosecha del café, causando así una disminución en la productividad. El objetivo de propagar material vegetal de forma masiva es el sustituir las plantaciones seniles, incrementar la densidad de árboles resistentes a enfermedades para elevar la productividad de la planta, además el efectuar prácticas culturales adecuadas y podas de fructificación que favorecen al desarrollo de yemas, aumentando la floración y por consiguiente el número de frutos.

4. Justificación

La productividad de un cafeto puede verse influenciada por varios factores, entre ellos, las prácticas de cultivo, las plagas y hongos que afectan al cultivo y la edad de los cafetales. Al seleccionar el fruto del café para la obtención de las semillas se debe tomar en cuenta que los frutos estén en su estado óptimo de madurez, ya sea rojo o amarillo según la variedad seleccionada, de un mayor tamaño y sanos, de preferencia de la parte media, tanto del cafeto como de las ramas. Los frutos que no estén completamente maduros tienen un porcentaje de germinación más bajo. Además de evitar la recolección de frutos en los extremos de las ramas para minimizar el efecto de polinización cruzada y garantizar la pureza genética de la variedad seleccionada.

Otro factor que afecta al cultivo es que la mayoría de los cafetales existentes son seniles, algunos con más de 30 años, causando una disminución en la productividad. Teniendo en cuenta esta problemática se pretende propagar material vegetal con el fin de sustituir las plantaciones seniles existentes de café, para elevar la productividad de la planta y además tener un control más estricto sobre las enfermedades que atacan al cultivo (*Kretzschmar, 2014*).

5. Hipótesis

Los filtrados de Trichoderma tendrán un efecto positivo en el desarrollo y la germinación de las semillas.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de filtrados de *Trichoderma* endémicos de Chiapas en la germinación y desarrollo de plántulas de café in vitro.

6.1.1 Objetivos particulares

- 1.** Establecer y optimizar el protocolo de desinfección de semillas de café en condiciones in vitro.
- 2.** Evaluar diferentes pre-tratamientos germinativos para la propagación de plantas de café (*Coffea arabica*) a partir de semillas.
- 3.** Evaluar el efecto de filtrados de *Trichoderma* endémicos de Chiapas en la germinación y desarrollo in vitro de plantas de cafeto.

7. Materiales y métodos

7.1 Material vegetal

Se recolectaron semillas de café (*C. arabica* var. *Typica*) de huertos de traspatio ubicados con las coordenadas (20°24'44"N 103°23'30"W), municipio de Tlajomulco Zúñiga, perteneciente a la región centro del Estado de Jalisco. Las semillas se trasladaron a las instalaciones del Tecnológico Nacional de México Campus Tlajomulco, en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Planta Piloto para ser procesadas. Las semillas se lavaron con agua corriente, se despulparon manualmente (eliminación de pericarpio, pulpa, capa de pectina y pergamino) y se sometieron a una solución de cloro al 10% con 0.5 ml de tween 80/L de solución durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se secaron en un secador de charolas (marca Polinox modelo TABIM094) a una temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, posteriormente las semillas se conservaron en un frasco de vidrio a temperatura ambiente (aproximadamente a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$) para su posterior uso

7.1.1 Establecimiento de protocolos de desinfección

Para el establecimiento de las semillas en condiciones in vitro, las semillas despulpadas y secas se sometieron a un proceso de desinfección en condiciones asépticas con soluciones estériles. Tanto en la desinfección D1 como en la D2, se utilizaron las mismas soluciones y concentraciones, y para la D2 se adicionó una solución más que fue PPM al 1%. Cuadro 2.

Cuadro 2 Desinfección utilizada antes del establecimiento de las semillas in vitro

DESINFECCIÓN		
D1	A	20 min. 1g/L Benomilo + 1g/L Agrymicin
	B	1 enjuague
	C	20 min, 30% cloro
	D	1 enjuague
	E	2 min, EtOH 70%
	F	1 enjuague
	G	Remojo 0.1g ac. Ascórbico + 0.1g ac. Cítrico
D2	A	20 min. Benomilo (1g/L) + Agrymicin (1g/L)
	B	1 enjuague
	C	20 min. Cloro 30%
	D	1 enjuague
	E	2 min. EtOH 70%
	F	1 enjuague
	G	20 min. PPM 1%
	H	2 enjuague
	I	30 min. Remojo en filtrados de cepas

Además de la desinfección que se le dio a la semilla, se dejaron en remojo en antioxidante con 0.1 g/L de ácido ascorbico y de ácido cítrico durante horas diferentes dependiendo del tratamiento, como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3 Condicion de remojo de la semilla de café

TRATAMIENTO	REMOJO	DESINFECCIÓN
R1	Sin remojo	D1
R2	Con remojo (24h)	D1
R3	Con remojo (48h)	D1
R4	Con remojo (72h)	D1

7.2 Establecimiento de experimento de pretratamiento de remojo en semillas de café.

Para el establecimiento de las semillas en condiciones in vitro, las semillas despulpadas y secas se sometieron a un proceso de desinfección en condiciones asépticas con soluciones estériles. Se colocaron las semillas en una solución desinfectante con fungicida (benomilo) a una concentración de 1.0 g/L y 1.0 g/L de estreptomycin durante 20 min. Posteriormente se colocaron en una solución al 30% de cloro comercial (Cloralex) durante 20 min, después se sumergieron en etanol al 70% por 2 min, después de cada tratamiento de desinfección se realizaron enjuagues con agua destilada. Finalmente, las semillas se dejaron en remojo con una solución antioxidante (0.1mg/L de ac. ascórbico con 0.1mg/L de ac. cítrico) como se menciona a continuación: R1. Semillas sin remojo; R2. Remojo de semilla por 24h; R3. Remojo de semilla por 48h; R4. Remojo de semilla por 72h. Posteriormente se colocó nuevamente en frascos con medio ZG (por sus siglas en ingles zygotic germination medium) para la germinación de la semilla de café [14], suplementado con 3% (p/v) de sacarosa y 8g/L de agar a un pH de 5.8, todos los medios de cultivo preparados fueron autoclaveados a 121°C por 20min a 105kPa. Las semillas se colocaron en condiciones de 25°C de temperatura en fotoperiodo (16h luz) hasta su evaluación.

Para el segundo experimento de las semillas tratadas con filtrados de trichoderma se utilizaron diferentes cepas dependiendo el tratamiento, como se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4 Tratamientos con cepas de *Trichodermas* silvestres

TRATAMIENTOS	CLAVE DE CEPA DE TRICHODERMA SP.
T1
T2	LE21
T3	LE59
T4	LE47
T5	LE63
T6	LE116

7.3 Establecimiento de experimento de la aplicación de filtrados de *Trichoderma sp.* en semillas de café.

Para el establecimiento de las semillas en condiciones in vitro, las semillas despulpadas y secas se sometieron a un proceso de desinfección en condiciones asépticas con soluciones estériles. Se colocaron las semillas en una solución desinfectante con fungicida (benomilo) a una concentración de 1.0 g/L y 1.0 g/L de estreptomycin durante 20 min. Posteriormente se colocaron en una solución al 30% de cloro comercial (Cloralex) durante 20 min, después se sumergieron en etanol al 70% por 2 min, después de cada tratamiento de desinfección se realizaron enjuagues con agua destilada. Finalmente, se transfirieron en los filtrados estériles obtenidos de las cepas de *Trichoderma spp.* durante 30 min y se transfirieron en un frasco de vidrio con capacidad de 125mL con papel filtro humedecido con 5mL de una solución de 0.1 g/L de ácido ascórbico y 0.1 g/L de ácido cítrico durante 20 días, transcurrido ese tiempo se sumergió nuevamente las semillas en el filtrado de *Trichoderma* durante 30 minutos, posteriormente se colocó nuevamente en frascos con papel filtro humedecidos con agua destilada. Las semillas se colocaron en condiciones de 25°C de temperatura en fotoperiodo (16h luz) hasta su evaluación. En el experimento se emplearon filtrados de *Trichoderma* aislados de los suelos cafetaleros de Chiapas, con los cuales se establecieron los siguientes tratamientos: T1. Semillas sin filtrado; T2. Semillas con filtrado de *Trichoderma* (cepa LE21); T3. Semillas con filtrado de *Trichoderma* (cepa LE59); T4. Semillas con filtrado de *Trichoderma* (cepa LE47);

T5. Semillas con filtrado de Trichoderma (cepa LE63); T6. Semillas con filtrado de Trichoderma (cepa LE116).

7.4 Índice de velocidad de germinación (IVG)

Se realizaron conteos cada tercer día del número de semillas germinadas. Como criterio de germinación se consideró la protrusión radicular. El cálculo del IVA se realizó de acuerdo con la propuesta de Maguire (Maguire, 1962).

7.5 Diseño experimental y análisis de datos

Se realizaron evaluaciones a los 18 días después de la imbibición de la semilla el diseño experimental fue de bloques completamente al azar. Los datos presentados corresponden a la media de ocho replicas, cada una con 5 semillas. Para la germinación, se contabilizó las semillas germinadas en el día dieciocho después de la hidratación de la semilla y se calculó el porcentaje de germinación. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias fue de terminada por la prueba de LSD ($P < 0.05$).

8. Resultados y discusiones

La germinación de las semillas se considera el inicio de la primera fase de desarrollo en el ciclo de vida, es un proceso complejo durante el cual la semilla madura reanuda su crecimiento comenzando con la captación de agua y completándose cuando la radícula sobresale de la estructura de cobertura. Inicialmente, hay una rápida imbibición de agua por parte de una semilla seca (fase I) hasta que los tejidos de la semilla están completamente hidratados. A esto le sigue una absorción limitada de agua durante la fase II, mientras que en la fase III, hay un aumento de la captación de agua que está relacionado con la finalización de la germinación (E. Wolny et al., 2018) En la figura 1 se observa que en las semillas A-C aún no emerge la radícula, mientras que en la D y E ya se ha completado el proceso de germinación, mostrándose la protrusión de la radícula en la semilla de café. Figura 2.

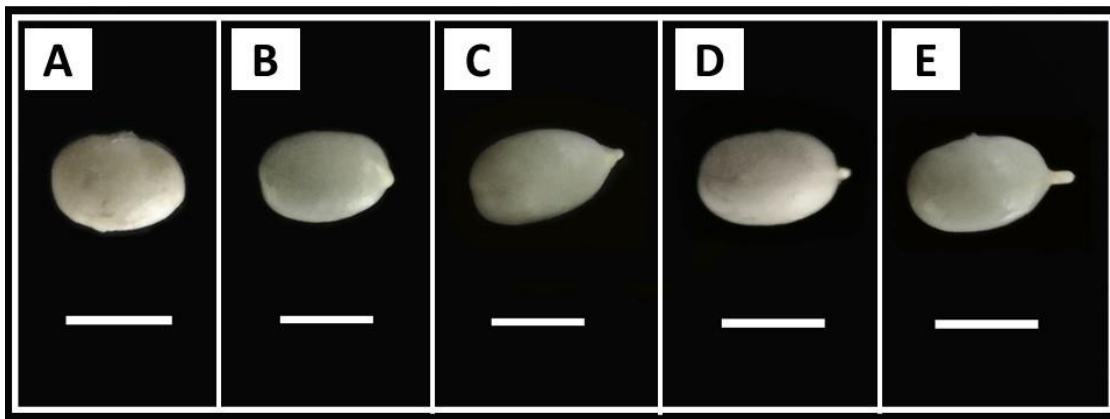


Figura 2 Determinación del inicio de la germinación en semillas de café (*Coffea arabica*),

El ANOVA mostró que la germinación se vio significativamente afectada por la aplicación de filtrados de diferentes cepas de *Trichoderma* ($P=0.000$), así como en el pretratamiento de remojo en la germinación de semilla ($P=0.001$), Tabla 1.

Cuadro 5 Análisis de varianza sobre el efecto de la aplicación del filtrado de *Trichoderma sp* y el remojo de semillas cigóticas de café en la germinación

Factores	GL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor F	Valor p
<i>Trichoderma sp</i>	5	5917.5	983.50	25.21	0.000
Remojo	3	961.3	320.43	8.21	0.001
Error	18	702.3	39.02		

En la Figura 3A se muestra que el tratamiento R2 tuvo un porcentaje de germinación de un 70% y un índice de velocidad en la germinación más acelerado en comparación con el tratamiento R3 el cual tuvo un 70% de germinación con un menor índice de velocidad de germinación (Cuadro 5).

Mientras que los tratamientos R1 y R4 tuvieron valores similares en cuanto al índice de velocidad de germinación con 7.0 y 7.5 respectivamente (Cuadro 5).

Las fases que ocurren durante el proceso de germinación son el resultado de la interacción de varios eventos metabólicos y celulares, coordinados por una compleja red reguladora que incluye la latencia de la semilla, una capacidad intrínseca de bloquear temporalmente la elongación de la radícula para optimizar el momento de la germinación. Algunas semillas pueden tener inhibidores naturales que impiden o retrasan la germinación, hasta que no se presenten condiciones adecuadas estas permanecen en dormancia.

Al tener una capa externa (testa) que las protege del medio ambiente, resisten las temperaturas externas. Sin embargo, al remojar las semillas, el proceso de hidratación y su activación se acelera y de esta manera pueden germinar en menor tiempo (*F. Quiroz et al., 2006*).

Aunque se han reportado diversos tratamientos pre-germinativos para las semillas de café, el remojo en agua sigue siendo el procedimiento más utilizado y con mayor efectividad. (*E. Wolny et al., 2018*)

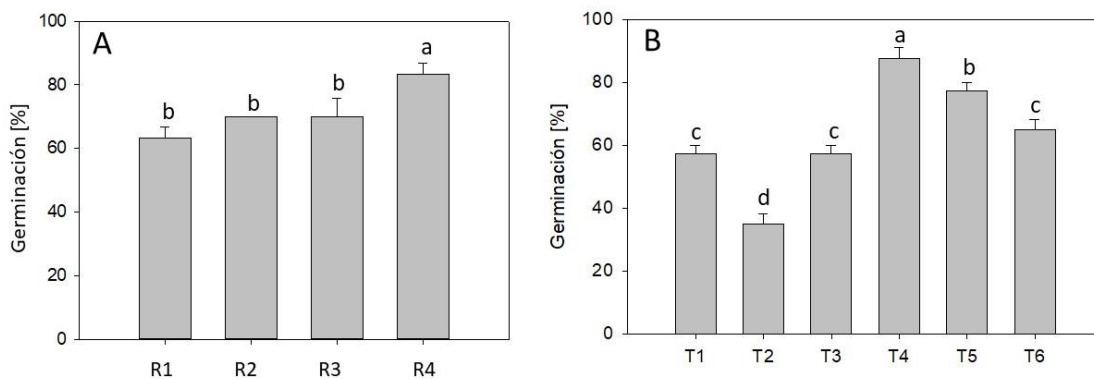


Figura 3 Germinación de semillas de café en condiciones in vitro en el día 18.

A. Pretratamiento de semillas (remojo de semillas). B. Efecto de filtrados de *Trichoderma* sp en la germinación de semillas de café. Las barras representan la media con el error estándar y diferentes letras entre barras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Mientras en la Figura 3B se observan los tratamientos T1, T3 y T6 con aproximadamente un 60% de germinación, los cuales no muestran diferencias significativas entre sí, en comparación con el T2 que obtuvo el menor porcentaje de germinación (35%), mientras que los tratamientos T4 y T5 tuvieron un mayor porcentaje de germinación con 87.5% y 77.5% respectivamente. Respecto al índice de velocidad de germinación, los tratamientos T1, T2 y T3 presentaron los valores más bajos, es decir las semillas germinaron más lento (valores entre 2.3 y 4.8) comparado con los tratamientos T4, T5 y T6 los cuales presentaron una germinación más rápida, con un índice de velocidad de germinación de 6.9, 7.1 y 6.0 respectivamente. En trabajos previos se han inoculado semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con suspensiones de 6×10^8 conidios/mL de *Trichoderma* sp los cuales promovieron la germinación normal de semillas [16]. El efecto estimulador de *Trichoderma* spp. en las plantas probablemente esté relacionado con su participación en la diafonía entre hormonas de crecimiento sintetizado por estos hongos los cuales pueden incrementar la actividad fotosintética, el rendimiento y el crecimiento de la planta, así mismo también se ha observado que aumentan la inmunidad de las plantas contra la invasión de patógenos. (R. Hermosa et al., 2012) (R. Cardoza et al., 2005). Sin embargo, también existen trabajos en los que se ha reportado un efecto negativo en la aplicación de *Trichoderma asperellum* en semillas de pepino (*L. Z. et al., 2012*),

su efecto desfavorable se puede relacionarse principalmente con su capacidad de mico-parasitismo, afectando el desarrollo de la planta (*R. Ty Skiewicz et al., 2022*).

Cuadro 6 Evaluación de la velocidad de germinación en los diferentes tratamientos según el filtrado de *Trichoderma* y horas de remojo.

Semillas hidratadas (remojadas)		Semillas tratadas con filtrado de <i>Trichoderma</i>	
Tratamiento	IVG	Tratamiento	IVG
	*[SG/día]		*[SG/día]
R1	7.000	T1	3.005
R2	8.539	T2	2.378
R3	6.770	T3	4.889
R4	7.566	T4	6.922
		T5	7.161
		T6	6.067

IVG: Índice de velocidad de germinación de semillas de café. **SG:** Semillas germinadas

Se observan las semillas colocadas en sanita estéril, se muestra que del día 5 al día 18 ya existe una diferencia en la germinación de las semillas y en algunos casos existe presencia de fenolización. Figura 4.

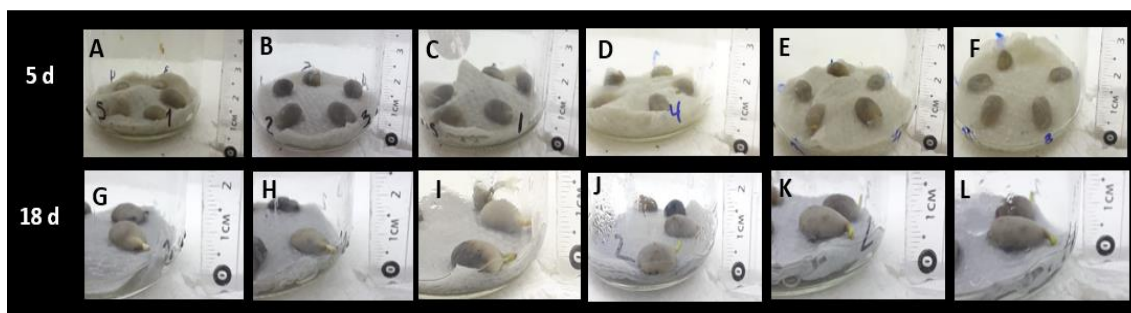


Figura 4 Germinación de semilla de café en condiciones in vitro en los días 5 y 18.

A-G) Control, **B-H)** Cepa de *Trichoderma* LE21, **C-I)** Cepa de *Trichoderma* LE59, **D-J)** Cepa de *Trichoderma* LE47, **E-K)** Cepa de *Trichoderma* LE63, **F-L)** Cepa de *Trichoderma* LE116.

Uno de los principales problemas que afectan al cultivo in vitro es la aparición de hongos y bacterias en el medio, afectando al crecimiento y desarrollo de las semillas y plantas (Sharry et al., 2015). Esta contaminación estuvo presente en el medio de cultivo de algunos tratamientos por lo que se realizó una desinfección con soluciones estériles para eliminar cualquier hongo o bacteria presente en las semillas y cambiando el medio de cultivo en cada proceso de desinfección.

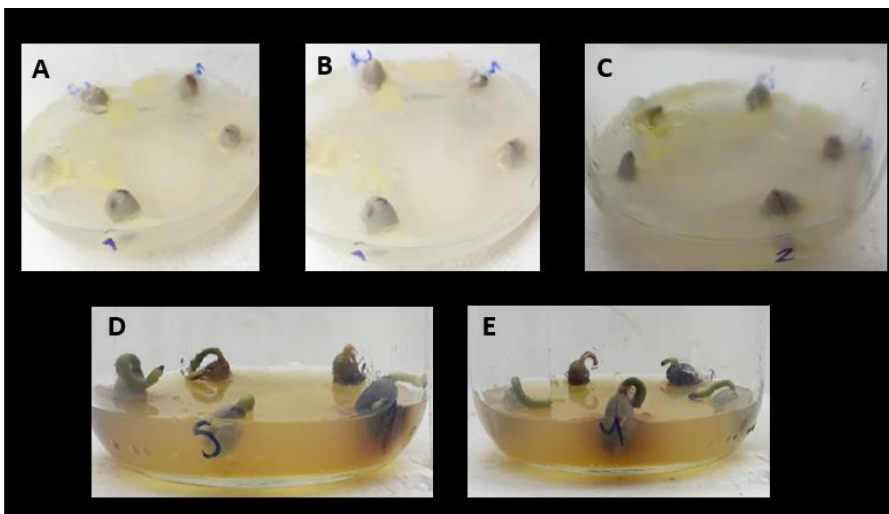


Figura 5 Contaminación de las semillas de café causada por bacterias y fenolización de las mismas.

A-C) Contaminación por bacterias, **D-E)** Fenolización de las semillas y del medio de cultivo.

Este proceso de desinfección se realizó varias veces durante la evaluación de la germinación de las semillas de café, lo que provocó que el desarrollo de estas se viera afectado tanto por el manejo de las semillas como por la presencia de bacterias. Se puede observar en la figura 5, la contaminación por bacterias en el medio y en las semillas de café in vitro, además de la fenolización en algunas semillas

Por lo anterior, para la evaluación del día 90 se perdieron varias semillas y por consecuencia, no se contaban con todos los tratamientos, algunas semillas se contaminaron o fenolizaron por lo que impidió su crecimiento y desarrollo óptimo. En la figura 5, se muestran los tratamientos T1, T5 y T6 los cuales fueron los únicos tratamientos con más repeticiones y semillas en buen estado Figura 6.

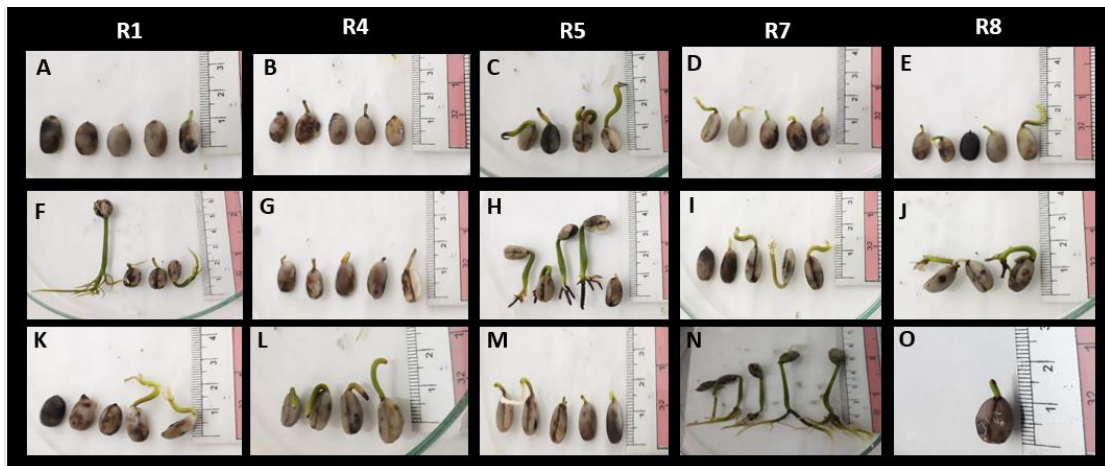


Figura 6 Comparación del desarrollo de plantas de café de tres diferentes tratamientos en el día 90 desde su establecimiento.

A-E) T1 control, F-J) T5 cepa LE63, K-O) T6 cepa LE116.

9. Trabajo a futuro

A partir de la optimización del establecimiento y germinación de las semillas en condiciones in vitro de este trabajo, nos permitirá tener plantas in vitro para empezar con la optimización de la multiplicación de plantas de café probando diferentes estrategias como la embriogénesis somática y microesquejes, así como el escalamiento del proceso con el uso de biorreactores.

10. Conclusiones

De acuerdo con el análisis de varianza, los resultados de las aplicaciones de los filtrados de *Trichoderma* y las diferentes horas de remojo presentaron diferencias significativas. En cuanto a las horas de remojo el tratamiento R4, con remojo de 72h, fue el que presentó un mayor porcentaje de germinación (83%), con una IVG elevada (7.6 semillas germinadas/día). En cuanto a uso de filtrados de *Trichoderma* solo las cepas LE47 (T4) y LE63 (T5) fueron las que promovieron un mayor porcentaje de germinación con 87.5 y 77.5% respectivamente. Por lo resultados obtenidos en la presente investigación se sugiere que para obtener un mayor porcentaje de germinación de semillas de café se remoje por 72h o se utilice el filtrado de *Trichoderma* de las cepas LE47 o LE63.

Amiot, M.; Forget, F.; Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *HerbaPolonica* 42: 237-247.

Azofeifa, Álvaro (2009). PROBLEMAS DE OXIDACIÓN Y OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES CULTIVADOS IN VITRO. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1),153-175.[fecha de Consulta 13 de Agosto de 2022]. ISSN: . Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711514016>

Berjak, P. y N. Pammenter. 2004. Recalcitrant seeds. pp. 305-345. En: Benech-Arnold, R. y R. Sánchez (eds.). *Handbook of seed physiology*. Food Products Press, New York.

Calo M. and T. A. Wise (2005) *Revaluing Peasant Coffee Production: Organic and Fair Trade Markets in Mexico*. Global Development and Environment Institute. Tufts University. 57 p.

C A Cisneros-R, J. M. Franco, M. R. Fernández, J. C. Fuenmayor. "Influencia de microorganismos en la disponibilidad de fósforo en plántulas de café (*Coffea arabica*)". *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, vol 15, no. 1, pp 19-26, June 2017.

C. A. Harvey, A.A. Pritts, M.J. Zwetsloot, K. Jansen. "Transformation of coffee-growing landscapes across Latin America". A review. *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 41, no. 62, pp 41-62, August 2021.

IICA/PROMECAFE.1 997. *Memoria XVIII Simposio Latino americano de Caficultura*. San José. Costa Rica. 542 pp.

Castillo P.G. 1985. Enfermedades del cafeto. En: *Taller de Fitopatología tropical*. Ed. (CEICADES).

CHIN, H. F. y L HOR. y M. B. MOHO LASSIM. 1984. Identification of recalcitrant seeds. *Seed Sci. & Technol.* 12: 429-436.

Cubillos-Hinojosa J., L. Mejía, y N. Valero. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agron. Colomb.* 27: 81-86.

E. Wolny, A. Betekhtin, M. Rojek, A. Braszewska-Zalewska, J. Lusinska, R. Hasterok. "Germination and

the Early Stages of Seedling Development in *Brachypodium distachyon*". *International Journal Molecular*

Sciences 2vol. 19, no. 10, pp 1-14, sep 2018

Farrant, J.M., N.W. Pammenter y P. Berjak. 1993. Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Sci. Res.* 3, 1-13.

Figuroa-Hernández, E., Pérez-Soto, F., & Godínez-Montoya, L. (n.d.). La producción y el consumo del café. Retrieved September 15, 2022, from https://dicea.chapingo.mx/pdf/investigacion/Libro_Chapingo.pdf

Floriano, E. 2004. *Armazenamento de sementes florestais*. ANORGS, Santa Rosa. 10 p.

Gomes, P., I. Marques y F. Martins. 2006. Germination of *Geonoma brevispatha* in laboratory and its relation to the palm spatial distribution in a swamp forest. *Aquat. Bot.* 85,16-20.

Lozano Kretzschmar G. A. (2014). "Propagación in vitro de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas". 2014, de Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras Sitio web: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/68892160-153f-42f9-a105-cc19896a1250/content>.

Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: current status and opportunities. En A. Leva, & L. M. Rinaldi, *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (pp. 1-28). <http://dx.doi.org/10.5772/50568>

L.Z. Ethur, M. Lupatini, E. Blume, M.F.B. Muniz, Z.I. Antonioli, L.H. Lorentz, "Trichoderma asperillumna produção de mudas contra a fusariose do pepineiro". Sci. Agrar. Paran., vol. 11, no. 4, pp 73-84, Aug 2012.

Maguire, J.D. 1962. "Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergences and vigor." Crop Science 2:176-177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>.

Martínez B.; D. Infante; Y. reyes. 2013. Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Protección Vegetal. 28:1.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15, 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Jang, M.O., Kim, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. et al. (2015). Cambial meristematic cells: A platform for the production of plant natural products. New Biotechnology, 32(6), 581-587. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.003>

Plaza, Guido A., & Magnitskiy, Stanislav V. (2007). Fisiología de semillas recalitrantes de árboles tropicales. Agronomía Colombiana, 25(1),96-103.[fecha de Consulta 15 de Septiembre de 2022]. ISSN: 0120-9965. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316240011>

Prakash, S., & Van Staden, J. (2007). Micropropagation of Hoslundia opposita Vahl—a valuable medicinal plant. South African Journal of Botany, 73(1), 60-63. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2006.07.001>

R. Hermosa, A. Viterbo, I. Chet, E. Monte. "Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes". Microbiology, vol.158, pp. 17–25, 2012 jan.

R. Ty'skiewicz, A. Nowak, E. Ozimek, J. Jaroszek-Sciseł. "Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth". *Int. J. Mol. Sci.* vol. 23, no. 4, pp 1-28, Feb 2022.

R.E. Cardoza, M.R. Hermosa, J.A. Vizcaíno, L. Sanz, E. Monte, S. Gutiérrez. "Secondary Metabolites Produced by Trichoderma and Their Importance in the Biocontrol Process", *Microorg. Ind. Enzym. Biocontrol*.vol 1, pp 207–228, January 2005.

Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (sagarpa). 2017.

Uribe D., E. Ortiz, M. Portillo, G. Bautista y J. Cerón. 1999. Diversidad de *Pseudomonas* fluorescentes en cultivos de papa de la region cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre *Rhizoctonia solani*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2: 50-58. [Links]

Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/46738>

Vitti, A., Monaca, E., Sofo, A., Scopa, A., & Cuypers, M. N. (2015). Beneficial effects of *Trichoderma harzianum* T-22 in tomato seedlings infected by Cucumber mosaic virus (CMV). *BioControl*, 60, 135-147. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9626-3>

Zilli, J. E., Hungria, M., Soares, L. H., Mello, S. C. M., Oliveria, C. A., Castro, M. E., ... Klein, C. S. (2019). Recursos Genéticos Microbianos. In S. R. Paiva, M. Albuquerque, D. Dslomão, A. Nassif, S. C. B. Roveri, & J. R. Moreira (Eds.), *Recursos Genéticos: O produtor Pergunta, a Embrapa Responde* (p. 298).

