

VARIACIÓN EN LA TOLERANCIA A DESINFECTANTES DE GENOTIPOS ÉLITE DE *Coffea* spp. CULTIVADOS *in vitro**

VARIATION IN TOLERANCE TO DISINFECTANTS OF ELITE GENOTYPES OF *Coffea* spp. CULTIVATED *in vitro*

Pablo López-Gómez^{1§}, Leobardo Iracheta-Donjuan¹, Marbella Castellanos-Juárez¹, Ismael Méndez-López¹, Juan Francisco Aguirre-Medina¹, Adriana Gutiérrez-Díez², Ma. del Carmen Ojeda-Zacarías² y Bernardito Ribai Pérez-Pérez¹

¹Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP. Carretera Tapachula-Cacahoatan, km 18. Tuxtla Chico, Chiapas. C. P. 30870. Tel. 01 919 6738137. (iracheta.leobardo@inifap.gob.mx), (castellanos.marbella@inifap.gob.mx), (mendez.ismael@inifap.gob.mx), (aguirre.medina@inifap.gob.mx), (perez.bernardito@gmail.com). ²Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Carretera Zuazua-Marín, km 17.5. Marín, N. L. C. P. 66700. Tel. 01 811 3404399. (adima.gutierrezdz@uanl.edu.mx), (maria.ojedazc@uanl.edu.mx). § Autor para correspondencia: lopez.pablo@inifap.gob.mx.

RESUMEN

La embriogénesis somática puede ser afectada por la oxidación de los explantes al aplicar un método común de desinfección. En el Campo Experimental Rosario Izapa en 2006, se determinó la tolerancia a desinfectantes de explantes foliares de genotipos de café, mediante la dosis letal media (DL₅₀) y con base en la tolerancia, se definió el desinfectante óptimo para el establecimiento aséptico. La DL₅₀ de hipoclorito de sodio (NaClO), de hipoclorito de calcio (Ca[ClO]₂) y la combinación de ambos, en explantes foliares de genotipos de *Coffea canephora* P. (INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-12, 97-15, 97-18, 97-19, 97-20, 00-24 y 00-28) y genotipos de *C. arabica* L. (INIFAP 2000-1018, 2000-1128 y 2000-692), se determinó mediante la aplicación de ocho concentraciones de NaClO (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5%), ocho concentraciones de Ca(ClO)₂ (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10%) y la combinación. Con base en la tolerancia se aplicaron tratamientos de desinfección: 1, 3 y 6% de NaClO, 3.5, 7 y 10.5% de Ca(ClO)₂ y la combinación testigo de 3 y 7% de NaClO y Ca(ClO)₂, respectivamente. Existió variabilidad en la tolerancia, puesto que la DL₅₀ varió dependiendo del genotipo y el agente desinfectante. La mayoría de los genotipos fueron menos tolerantes al NaClO (DL₅₀ de 2 a 4%); no obstante, el NaClO controló la contaminación y

ABSTRACT

The somatic embryogenesis can be affected by explants' oxidation when a common method of disinfection is. In the Experimental Field Rosario Izapa in 2006, the tolerance to disinfectants of leaf explants of coffee genotypes was determined by the median lethal dose (LD₅₀) and based on its tolerance the optimal disinfectant for aseptic establishment was defined. The LD₅₀ of sodium hypochlorite (NaClO), calcium hypochlorite (Ca[ClO]₂) and the combination of both in leaf explants of *Coffea canephora* P. genotypes (INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-12, 97-15, 97-18, 97-19, 97-20, 00-24 and 00-28) and genotypes of *C. arabica* L. (INIFAP 2000-1018, 2000-1128 and 2000-692), was determined by applying eight concentrations of NaClO (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5%), eight concentrations of Ca(ClO)₂ (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10%) and the combination. Based on the tolerance, disinfection treatments were applied: 1, 3 and 6% of NaClO, 3.5, 7 and 10.5% of Ca (ClO)₂ and control's combination of 3 and 7% NaClO and Ca(ClO)₂, respectively. There was variability in the tolerance, since LD₅₀ varied depending on genotype and disinfecting agent. Most genotypes were less tolerant to NaClO (LD₅₀ from 2 to 4%); however, NaClO controlled pollution and

* Recibido: marzo de 2011
Aceptado: octubre de 2011

oxidación en dosis bajas (1 y 3%). El NaClO y el Ca(ClO)₂ en bajas concentraciones de hasta 2 y 3.5% respectivamente, son una opción para la desinfección de explantes de café que pueden garantizar un estado fisiológico adecuado para dar inicio a la embriogénesis.

Palabras clave: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* P., embriogénesis.

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea* spp.) genera empleos para más de tres millones de mexicanos durante el cultivo, la cosecha, el beneficio y la comercialización (Escamilla *et al.*, 2005). Sin embargo, las plantaciones establecidas son de edad avanzada, poco rendidoras, susceptibles a plagas y enfermedades y la renovación de las mismas, con los recursos genéticos mejorados mediante los métodos tradicionales de siembra por semilla, requieren de mucho tiempo para incorporar los nuevos recursos a los campos de los productores. Una alternativa para disponer de mayor número de plantas con características agronómicas deseables, a bajo costo, libres de plagas y enfermedades y en menor tiempo y costo, son las técnicas de cultivos de tejidos (Echeverría, 2000).

Las dos especies de cafeto más cultivadas, *Coffea arabica* L. y *C. canephora* P., poseen diferentes esquemas de propagación y mejoramiento genético. El *C. arabica* L. es autógama y da lugar a variedades comerciales propagadas por semilla, mientras que *C. canephora* P., es alógama y su propagación por la vía sexual genera individuos diferentes a los progenitores (Etienne *et al.*, 1999). En ambos casos, la embriogénesis somática es un método fiable de multiplicación vegetativa. Sin embargo, los antecedentes registrados por Staritsky (1970), a partir de entrenudos de *C. canephora* P., o bien, los estudios de Afreen *et al.* (2002), en *Coffea* spp., consignan la respuesta diferencial de los genotipos para tolerar los desinfectantes durante el establecimiento aséptico, debido a problemas de oxidación que limitan la respuesta morfogénica.

En la fase inicial del proceso, es fundamental definir el agente desinfectante y su concentración para cada genotipo, mediante el cual se logren generar explantes sanos para inducir la embriogénesis; puesto que el éxito de la embriogénesis somática y el tipo de callo que se va a generar, dependerá del estado fisiológico del explante y de la

oxidation at low doses (1 and 3%). NaCl and Ca(ClO)₂ at low concentrations up to 2 and 3.5% respectively, these are an option for coffee explants disinfection that can ensure proper physiological state to initiate the embryogenesis.

Key words: *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* P., embryogenesis.

INTRODUCTION

Coffee (*Coffea* spp.), generates employment for more than three million Mexicans during cultivation, harvesting, processing and marketing (Escamilla *et al.*, 2005). However, the established plantations are old, low yielding, susceptible to pests and diseases and the renewal of those with genetic resources enhanced by the traditional methods of planting by seed; take a long time to incorporate new features into the farmer's fields. An alternative for having the largest number of plants with desirable agronomic characteristics, a low cost, free of pests and diseases in less time and cost, are the tissue culture techniques (Echeverría, 2000).

The two most commonly grown species of coffee plant, *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P., have different patterns of propagation and breeding. *C. arabica* L. is autogamous and leads to commercial varieties propagated by seeds, while *C. canephora* P., is allogamous and spread through sexual ways generates individuals different from its parents (Etienne *et al.*, 1999). In both cases, somatic embryogenesis is a reliable method of vegetative propagation. However, antecedents registered by Staritsky (1970), from internodes of *C. canephora* P., or studies of Afreen *et al.* (2002) in *Coffea* spp., establish the differential response of genotypes to tolerate disinfectants during the aseptic settlement, due to rust problems that limit the morphogenic response.

In the initial phase of the process is essential to define the disinfectant and its concentration for each genotype, in order to generate healthy explants and induce embryogenesis; since the success of the somatic embryogenesis and the callus type that will be generated, will depend on the physiological state of the explant and the interaction with the disinfecting agents, which could lead to epigenetic changes that affect the induction of morphogenesis (Scott, 1995).

interacción con los agentes desinfectantes, los cuales podrían generar cambios epigenéticos que afectan la inducción de la morfogénesis (Scott, 1995).

Con estos antecedentes se desarrolló la presente investigación, con el objetivo de indagar la respuesta de los explantes foliares de 13 genotipos élite de café a dos desinfectantes, mediante la determinación de la LD_{50} y con base en la tolerancia definir para cada genotipo, el agente desinfectante y la concentración óptima del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó durante 2006 en el Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales del Campo Experimental Rosario Izapa, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Tuxtla Chico, Chiapas, México.

Material biológico

Se usaron hojas jóvenes de cinco meses de edad de diez genotipos élite de *C. canephora* P., variedad Robusta (INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-12, 97-15, 97-18, 97-19, 97-20, 00-24 e INIFAP 00-28), y tres líneas avanzadas F7 de *C. arabica* L. (INIFAP 2000-692, 2000-1018 e INIFAP 2000-1128). Los genotipos de *C. arabica* L., se caracterizan por tener alto rendimiento y resistencia a la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.), mientras que los genotipos de *C. canephora* P. presentan alto rendimiento y calidad industrial. Todos ellos provenientes del programa de mejoramiento genético del INIFAP en Rosario Izapa, Chiapas, México.

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo usado en los experimentos consistió en las sales inorgánicas de Yasuda *et al.* (1985), con vitaminas de Gamborg (2002), 30 g L⁻¹ de sacarosa; 1.125 mg L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), 5 g L⁻¹ de phytigel Sigma®, y pH ajustado a 5.8 con KOH o HCl 1 N. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² de presión durante 20 min.

Las cajas Petri con los materiales sembrados y herméticamente sellados con parafilm, se incubaron en condiciones de oscuridad total a 26 °C ±1 y 50% de humedad relativa.

With this background the present paper was developed with the aim to investigating the response of leaf explants of 13 coffee elite genotypes to two disinfectants, by determining LD_{50} and to define based on tolerance the disinfectant for each genotype and its optimal concentration.

MATERIALS AND METHODS

This research was conducted during 2006 at the Laboratory of Tropical Crop Biotechnology of the Experimental Field Rosario Izapa, of the National Research Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) in Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico.

Biological material

Young leaves were used of about five months from ten elite genotypes of *C. canephora* P., Robusta variety (INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-12, 97-15, 97-18, 97-19, 97-20, 00-24 and INIFAP 00-28), and three F₇ advanced lines of *C. arabica* L. (INIFAP 2000-692, 2000-1018 and 2000-1128 INIFAP). The genotypes of *C. arabica* L., are characterized by high yield and resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.), while genotypes of *C. canephora* P., have a high yield and industrial quality. They all come from the breeding program of INIFAP in Rosario Izapa, Chiapas, Mexico.

Culture medium and incubation conditions

The culture medium used in the experiments, consisted of inorganic salts of Yasuda *et al.* (1985), with Gamborg's vitamins (2002), 30 g L⁻¹ of sucrose; 1.125 mg L⁻¹ of Benzylaminopurine (BAP), 5 g L⁻¹ of phytigel Sigma® and pH adjusted to 5.8 with KOH or HCl 1 N. The medium was sterilized in an autoclave at 121 °C and 1.1 kg cm⁻² pressure for 20 min.

The Petri dishes seeded with materials and hermetically sealed with parafilm were incubated in conditions of total darkness at 26 °C ±1 and 50% relative humidity.

Pre-disinfection of leaves

Mother plants were sprayed with fungicide solution [1 g L⁻¹ Amistar® (Azoxystrobin 50%)], three days before the establishment *in vitro*. The leaves collected in field were

Predesinfección de hojas

Las plantas madres fueron asperjadas con solución fungicida [1 g L^{-1} de Amistar® (Azoxystrobin al 50%)], tres días antes del establecimiento *in vitro*. Las hojas recolectadas del campo se lavaron con detergente comercial y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente se colocaron en solución antioxidante-fungicida esterilizada (30 g L^{-1} de sacarosa, 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 150 mg L^{-1} de ácido cítrico y 1 g L^{-1} de Amistar®). Las hojas en estas condiciones fueron sometidas a vacío parcial, mediante una bomba de vacío (Welch Duo Seal® 1 400) por 3 min, con el fin de evitar que las burbujas de aire atrapadas en los estomas y los tricomas de los tejidos impidan el contacto con la solución. Las hojas permanecieron en la solución antioxidante-fungicida por 10 min y posteriormente fueron desinfectadas de acuerdo a cada experimento.

Determinación de la DL_{50}

Se llevó a cabo la determinación de la DL_{50} de desinfectantes en los explantes de hojas jóvenes de los 13 genotipos, mediante la aplicación de ocho concentraciones de hipoclorito de sodio (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 3.5%), ocho de hipoclorito de calcio (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10%) y la combinación de ambas concentraciones (0.1-3, 0.5-4, 1-5, 1.5-6, 2-7, 2.5-8, 3-9, 3.5-10%); en estas últimas se incluyó la combinación testigo de 2 y 7% de hipoclorito de sodio y de calcio, respectivamente.

Las hojas se introdujeron en las soluciones durante 15 min y después de este tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. De las hojas desinfectadas, se extrajeron explantes de 1 cm^2 a partir de la lámina central sin tomar la nervadura central y se colocaron en condiciones asépticas, en cajas de Petri de $100 \times 12 \text{ mm}$ con 20 ml del medio de cultivo.

Se evaluó el porcentaje de oxidación para cada genotipo al sexto día del establecimiento *in vitro*, para determinar el daño causado por el desinfectante. Para verificar el grado de tolerancia de cada uno de los genotipos, se determinó la DL_{50} con base al dato de oxidación y de acuerdo al siguiente criterio: 0% para explantes completamente verdes; 25% para una cuarta parte del explante oxidado, 50% a la mitad del explante oxidado; 75% para las tres cuartas partes oxidadas y 100% a todo el explante oxidado. Se tuvieron diez repeticiones por tratamiento y los datos se analizaron estadísticamente, por cada genotipo y tipo de desinfectante, con regresiones lineales o de tipo polinomial de segundo y tercer orden, con el apoyo del programa SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1997).

washed with commercial detergent and rinsed with tap water. Then, they were placed in sterile antioxidant- fungal solution (30 g L^{-1} sucrose, 100 mg L^{-1} of ascorbic acid, 150 mg L^{-1} of citric acid and 1 g L^{-1} Amistar®). The leaves in these conditions were subjected to partial vacuum using a vacuum pump (Welch Duo Seal® 1 400) for three minutes, in order to avoid that air bubbles trapped in stomata and trichomes of the tissues prevented the contact with the solution. The leaves remained in the antioxidant-fungicide solution for 10 min and subsequently were disinfected according to each experiment.

Determination of the LD_{50}

The determination of LD_{50} of disinfectants in young leaf explants of 13 genotypes was conducted, through the application of eight concentrations of sodium hypochlorite (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5%), eight of calcium hypochlorite (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10%) and the combination of both concentrations (0.1-3, 0.5-4, 1-5, 1.5-6, 2-7, 2.5-8, 3-9, 3.5-10%) the latest included the control combination of 2 and 7% sodium and calcium hypochlorite, respectively.

The leaves were placed in solutions for 15 min and after this time they were rinsed three times with sterile distilled water. From disinfected leaves, explants of 1 cm^2 were removed from the central sheet without taking the midrib and were placed under sterile conditions in Petri dishes of $100 \times 12 \text{ mm}$ with 20 ml of culture medium.

The oxidation rate was assessed for each genotype on the sixth day of establishment *in vitro*, in order to determine the damage caused by the disinfectant. For the purpose of verifying the tolerance degree of each genotype, LD_{50} was determined based on oxidation data following the next criteria: 0% for completely green explants, 25% for a quarter of explant oxidized, 50% half of the explant oxidized, 75% for three quarters oxidized and 100% of all the oxidized explant. There were ten replicates per treatment and data were statistically analyzed for each genotype and type of disinfectant, with linear regression or polynomial type of second and third order, with the support of SAS version 6.12 (SAS Institute, 1997).

Determining the optimal concentration of disinfectant

Explants from young leaves of each genotype were established and according to the tolerance observed in the previous experiment, three concentrations of sodium

Determinación de la concentración óptima de desinfectantes

Se establecieron explantes provenientes de hojas jóvenes de cada genotipo y de acuerdo a su tolerancia observada en el experimento anterior, se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (1, 3 y 6%), tres de hipoclorito de calcio (3.5, 7 y 10.5%) y la combinación de 3% de NaClO y 7% de Ca(ClO)₂. Las hojas se mantuvieron durante 15 min en las diferentes concentraciones y agentes desinfectantes, posteriormente fueron lavadas tres veces con agua destilada esterilizada; en el caso de la combinación de desinfectantes, las hojas primeramente fueron sometidas a la solución de NaClO por 15 min y posteriormente en la solución de Ca(ClO)₂ por otros 15 min y al final se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada.

De las hojas desinfectadas se extrajeron explantes de 1 cm², a partir de la lámina central sin tomar la nervadura central y se colocaron en cajas petri de 100*12 mm con 20 ml con el medio de cultivo esterilizado.

Las variables de respuesta fueron el porcentaje de oxidación de acuerdo al grado de tejido dañado y con el mismo criterio del experimento anterior; así como el porcentaje de contaminación de acuerdo a presencia o ausencia de contaminación por hongos, bacterias o por ambos microorganismos. Ambas variables se evaluaron cinco días después del establecimiento *in vitro* y se contó con seis repeticiones por cada tratamiento.

Los datos colectados se transformaron con la raíz cuadrada de X+1 y se analizaron con un diseño completamente al azar de acuerdo a la variable analizada. El análisis de varianza igual que en el caso anterior se hizo con la ayuda del paquete estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1997) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de LSD con un nivel de 5% de significancia estadística.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tolerancia de explantes (DL₅₀)

Con los resultados obtenidos para la determinación de la DL₅₀ de NaClO, fue posible identificar tres grupos de genotipos por su grado de tolerancia a este desinfectante, un grupo sensible constituido por los genotipos INIFAP 97-15, 97-18, 97-19 y 2000-1018, cuyas DL₅₀ no alcanzaron 2%

hipochlorite were evaluated (1, 3 and 6%), three of calcium hypochlorite (3.5, 7 and 10.5 %) and the combination of 3% of NaClO and 7% of Ca(ClO)₂. The leaves were maintained for 15 min at different concentrations and disinfectants, subsequently they were washed three times with sterile distilled water; in the case of disinfectants combination, first the leaves were subjected to NaClO solution for 15 min and subsequently in the solution of Ca(ClO)₂ by other 15 min and finally they were washed three times with sterile distilled water.

From the disinfected leaves, explants of 1 cm² were extracted from the central sheet without taking the midrib and then placed in petri dishes of 100*12 mm with 20 ml of sterile culture medium.

Response variables were the oxidation percentage according to tissue damage degree and the same criteria from the previous experiment; as well as the contamination percentage according to the presence or absence of contamination by fungi, bacteria or both organisms. Both variables were assessed five days after its establishment *in vitro* and there were six replicates per treatment.

The collected data were transformed with the square root of X+1 and were analyzed using a completely randomized design according to the analyzed variable. The analysis of variance, as in the previous case, was done using the statistical package SAS version 6.12 (SAS Institute, 1997) and for the mean comparison, LSD test was used with a 5% level of statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Explants' tolerance (LD₅₀)

With the results obtained for the determination of LD₅₀ of NaClO it was possible to identify three groups of genotypes by their tolerance to this disinfectant. A sensitive group formed by the genotypes INIFAP 97-15, 97-18, 97-19 and 2000-1018, which LD₅₀ did not reach 2% of NaClO. The second group was moderately sensitive, where the genotypes INIFAP 95-8, 97-12, 00-24, 2000-1128 and 00-28, did not reach the LD₅₀ of 4% of NaClO. On the other hand, the genotypes INIFAP 95-9, 97-10, 97-20 and 2000-692 were the third group that was tolerant with LD₅₀ between 4 and 9.6% of NaClO (Table 1).

de NaClO. El segundo grupo fue moderadamente sensible, donde los genotipos INIFAP 95-8, 97-12, 00-24, 2000-1128 y 00-28, no alcanzaron la DL_{50} de 4% de NaClO. Por otro lado, los genotipos INIFAP 95-9, 97-10, 97-20 y 2000-692 constituyeron el tercer grupo que fue el tolerante con DL_{50} entre 4.0 y 9.6% de NaClO (Cuadro 1).

Most of the genotypes when subjected to NaClO presented a lower LD_{50} with respect to $Ca(ClO)_2$, with the exception of INIFAP 97-20 genotype which showed higher tolerance (with LD_{50} of 9.6% of NaClO). Vargas and García (1997), mention that NaClO can be phytotoxic at high concentrations and even recommend the use of this

Cuadro 1. Dosis letal media calculada como porcentaje de hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio [$Ca(ClO)_2$] y la combinación de ambos para 13 genotipos de *Coffea* spp.

Table 1. Median lethal dose calculated as a percentage of sodium hypochlorite (NaClO), calcium hypochlorite [$Ca(ClO)_2$] and their combination for 13 genotypes of *Coffea* spp.

Genotipo INIFAP	DL_{50} NaClO (%)†	DL_{50} $Ca(ClO)_2$ (%)†	DL_{50} NaClO + $Ca(ClO)_2$ (%)†
97-15	0.7 ($r^2=0.83$)	4.5 ($r^2=0.87$)	1.2 + 5.5 ($r^2=0.84$)
97-18	0.8 ($r^2=0.81$)	3.5 ($r^2=0.93$)	2.2 + 7.5 ($r^2=0.96$)
97-19	1.2 ($r^2=0.99$)	10.4 ($r^2=0.99$)	2.7 + 8.5 ($r^2=0.91$)
2000-1018	1.8 ($r^2=0.93$)	10.1 ($r^2=0.99$)	1.2 + 5.5 ($r^2=0.84$)
95-8	3.7 ($r^2=0.99$)	11.5 ($r^2=0.88$)	2.2 + 7.5 ($r^2=0.90$)
97-12	2.3 ($r^2=0.95$)	9.2 ($r^2=0.98$)	2.2 + 7.5 ($r^2=0.87$)
00-24	3.4 ($r^2=0.95$)	9.2 ($r^2=0.97$)	2.7 + 8.5 ($r^2=0.98$)
2000-1128	3.4 ($r^2=0.71$)	9.9 ($r^2=0.81$)	0.3 + 3.5 ($r^2=0.94$)
00-28	2.7 ($r^2=0.88$)	2.8 ($r^2=0.86$)	0.3 + 3.5 ($r^2=0.83$)
95-9	5.1 ($r^2=0.81$)	9.1 ($r^2=0.95$)	3.2 + 9.5 ($r^2=0.98$)
97-10	5.0 ($r^2=0.98$)	36.5 ($r^2=0.97$)	4.2 + 11.5x ($r^2=0.98$)
97-20	9.6 ($r^2=0.95$)	11.1 ($r^2=0.88$)	2.7 + 8.5 ($r^2=0.97$)
2000-692	4.1 ($r^2=0.83$)	12.6 ($r^2=0.91$)	0.3 + 3.5 ($r^2=0.73$)

†= dosis letal calculada con base en la sustitución de valores de oxidación en la ecuación de regresión que presentó el mejor ajuste (lineal o polinomial de segundo o tercer orden).

La mayoría de los genotipos al ser sometidos al NaClO presentaron DL_{50} más bajas con respecto al $Ca(ClO)_2$, a excepción del genotipo INIFAP 97-20 que presentó mayor tolerancia (con DL_{50} de 9.6% de NaClO). Vargas y García (1997), mencionan que el NaClO puede llegar a ser fitotóxico en altas concentraciones e incluso recomiendan el uso de este desinfectante en cultivos de tejidos vegetales a concentraciones de 0.01 a 3%, lo cual indica una variabilidad de respuesta dependiendo del tejido.

La mayor susceptibilidad de los explantes al hipoclorito de sodio está asociada al catión Na^+ ; el cual corresponde a un ion no esencial en la mayor parte de los tejidos vegetales y que es altamente tóxico en una gran variedad de plantas (Hasegawa *et al.*, 2000; Mäser *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002).

La mayor tolerancia al NaClO por parte del genotipo INIFAP 97-20, podría estar asociada a la capacidad de este genotipo para ajustarse osmóticamente a concentraciones elevadas de dicho desinfectante.

disinfectant in plant tissue cultures at concentrations of 0.01 to 3%, indicating a variability response depending on the tissue.

The greater susceptibility of explants to sodium hypochlorite is associated with the cation Na^+ ; which corresponds to a not essential ion in most of the plant tissues and is highly toxic in a variety of plants (Hasegawa *et al.*, 2000; Mäser *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2002).

The greater tolerance to NaClO by INIFAP 97-20 genotype, could be associated with this genotype's ability to osmotically adjust to high concentrations of the disinfectant.

In the case of leaf explants subjected to disinfection with $Ca(ClO)_2$, the genotypes formed two groups, genotypes INIFAP 97-15, 97-18 and 00-28 were more sensitive because they did not reach LD_{50} of 5%; while the rest of the genotypes showed more tolerance with a LD_{50} of 9 to 12% and even higher in the INIFAP 97-10 genotype (Table 1).

En el caso de los explantes de hoja sometidos a desinfección con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, se observó que los genotipos formaron dos grupos, los genotipos INIFAP 97-15, 97-18 y 00-28 fueron más sensibles, ya que no alcanzaron la DL_{50} de 5%; mientras que el resto de los genotipos presentaron mayor tolerancia con una DL_{50} de 9 a 12% e incluso mayores en el genotipo INIFAP 97-10 (Cuadro 1).

A pesar de que el hipoclorito de calcio fue menos agresivo con los tejidos foliares no siempre fue el mejor para controlar la contaminación. El menor daño a los tejidos se atribuyó a que este desinfectante es menos fitotóxico (Vargas y García, 1997); además que el calcio (Ca^{2+}) es esencial en muchos procesos del metabolismo vegetal, ya sea como elemento estructural de la lámina media de la pared celular, constituyente o activador enzimático vía calmodulina o como segundo mensajero asociado con fitohormonas (Bressan *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 2000). Esto explica valores altos en la DL_{50} de hipoclorito de calcio para todos los genotipos, comparado con el hipoclorito de sodio.

Adicionalmente el hipoclorito de calcio podría estar aportando calcio soluble a los tejidos y ayudar a neutralizar los ácidos orgánicos y la producción de fenoles o polifenoles en los tejidos, ya que estas sustancias contribuyen a la oxidación de los explantes al ser sometidos a los métodos de desinfección (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004). Sin embargo, aún es necesario evaluar la efectividad en la contaminación de los tejidos a largo plazo.

Cuando se aplicó la combinación NaClO y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, la mayoría de los genotipos mostraron una DL_{50} más baja que al aplicar los desinfectantes de forma individual, lo que demostró una menor tolerancia a dicha combinación. Sin embargo, al calcular la DL_{50} de cada uno de los agentes desinfectantes en cada combinación, fue posible identificar dos grupos en cada uno de estos (Cuadro 1); de tal forma que en dicha combinación de desinfectantes, para NaClO el primer grupo, conformado por los genotipos INIFAP 00-24, 00-28, 97-15, 2000-692, 2000-1128 y 2000-1018, presentaron DL_{50} por abajo de 2% de NaClO ; por su parte el segundo grupo comprendió a los genotipos INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-20, 97-18, 97-19 y 97-12 con DL_{50} de 2 a 4% de NaClO .

Even though calcium hypochlorite was less aggressive with the leaf's tissues, it was not always the best in pollution control. The minor tissue damage was attributed to its less phytotoxicity (Vargas and García, 1997); calcium (Ca^{2+}) is also essential in many processes of plant metabolism, either as a structural element of the middle lamella of the cell wall, constituent or calmodulin activator or as a second messenger associated with phytohormones (Bressan *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 2000). This explains the high values of calcium hypochlorite LD_{50} for all genotypes compared with sodium hypochlorite.

Additionally, calcium hypochlorite may be providing soluble calcium to the tissues and helping to neutralize organic acids and the production of phenols or polyphenols in the tissues, as these substances contribute to the oxidation of the explants when they undergo disinfection methods (Sánchez-Cuevas and Salaverría, 2004). However, it is still necessary to evaluate the effectiveness on tissue contamination at long-term.

When the combination of NaClO and $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ was applied, most of the genotypes showed an LD_{50} lower than when the disinfectants were applied individually, which showed a lower tolerance to this combination. However, when the LD_{50} of each disinfectant in each combination was calculated, it was possible to identify two groups in each of these (Table 1); so that in this combination of disinfectants, for NaClO of the first group, comprised by genotypes INIFAP 00-24, 00-28, 97-15, 2000-692, 2000-1128 and 2000-1018, presented LD_{50} lower than 2% of NaClO ; the second group comprised genotypes INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-20, 97-18, 97-19 and 97-12 with LD_{50} from 2 to 4% of NaClO .

In the case of $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, two groups were identified according to the tolerance level to disinfecting agents. In the first group the genotypes INIFAP 00-28, 97-15, 2000-692, 2000-1128 and 2000-1018 showed LD_{50} of less than 6% of $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, while in the second group the genotypes INIFAP 00-24, 95-8, 95-9, 97-10, 97-12, 97-18, 97-19 and 97-20 showed LD_{50} of 6 to 11.5% of $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

In general, genotypes showed response variability for disinfectant's LD_{50} . Genotypes INIFAP 97-15 and 97-18 were the most susceptible to NaClO and

En el caso del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, de igual forma se identificaron dos grupos de acuerdo al nivel de tolerancia a los agentes desinfectantes. En el primer grupo los genotipos INIFAP 00-28, 97-15, 2000-692, 2000-1128 y 2000-1018 presentaron DL_{50} inferiores a 6% de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, mientras que en el segundo grupo los genotipos INIFAP 00-24, 95-8, 95-9, 97-10, 97-12, 97-18, 97-19 y 97-20 mostraron DL_{50} de 6 a 11.5% de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

En general, los genotipos presentaron variabilidad de respuesta para la DL_{50} de desinfectante. Los genotipos INIFAP 97-15 y 97-18 fueron los más susceptibles al NaClO y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. Por otra parte, los genotipos INIFAP 95-9, 97-10, 97-20 y 2000-692 fueron los que presentaron una mayor tolerancia al NaClO ; sin embargo la mayoría de los genotipos fueron menos afectados por el $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

Los resultados anteriores señalan la necesidad de aplicar un método de desinfección específico, para cada genotipo durante el establecimiento aséptico.

Concentración óptima para la desinfección

Los explantes foliares presentaron diferencias significativas en el porcentaje de contaminación en la mayoría de los genotipos, excepto en INIFAP 97-19, 95-9 y 2000-1018, lo cual fue debido a los diferentes agentes desinfectantes y a las dosis probadas en cada uno de ellos (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Porcentaje de contaminación de explantes para la determinación del mejor método de desinfección en el establecimiento aséptico de siete genotipos élite de *Coffea* spp.

Table 2. Percentage of contamination of explants in order to determine the best disinfection method in aseptic establishment of seven elite genotypes of *Coffea* spp.

Agente desinfectante (%)	Genotipo INIFAP (% de contaminación) [†]						
	97-20	97-19	2000-1128 ^{††}	97-12	97-10	2000-692 ^{††}	97-18
1% NaClO + 7% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	0 c	100 a	50 ab	66 ab	83 a	33 b	66 ab
1% NaClO	83 ab	100 a	50 ab	66 ab	100 a	50 ab	100 a
3% NaClO	66 b	100 a	66 ab	50 ab	0 b	16 b	50 ab
6% NaClO	100 a	100 a	33 ab	100 a	83 a	33 b	33 b
3.5% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	0 c	100 a	83 a	100 a	0 b	100 a	33 b
7% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	100 a	100 a	50 ab	66 ab	100 a	50 ab	66 ab
10.5% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	100 a	100 a	16 b	33 b	100 a	33 b	83 ab

[†]=medias con letras iguales por columna no son estadísticamente diferentes (LSD, 0.05) de acuerdo a la transformación raíz cuadrada de $X+1$, promedio de seis repeticiones por tratamiento; ^{††}=genotipos élite de *C. arabica* L., el resto de los genotipos corresponden a *C. canephora* P.

$\text{Ca}(\text{ClO})_2$. Moreover, the genotypes INIFAP 95-9, 97-10, 97-20 and 2000-692 were those with greater tolerance to NaClO , but most of the genotypes were less affected by $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

The above results indicate the need for a genotype-specific disinfection method during aseptic establishment.

Optimal concentration for disinfection

The leaf explants showed significant differences in contamination percentage in most genotypes, except INIFAP 97-19, 95-9 and 2000-1018, which was attributed to the different disinfecting agents and the doses tested in each of them (Tables 2 and 3).

INIFAP 97-19 and 95-9 genotypes were those with the highest contamination rates (66 to 100%), regardless of the type and concentration of disinfectant, this contamination was observed at the tissue edges, indicating the presence of endogenous contamination. By contrast, genotypes with the lowest range of values for contamination percentage (0 to 50%) were INIFAP 2000-1018 and 00-24; in the rest of the genotypes, the contamination percentages were from 0 to 100% depending on genotype (Table 2 and 3).

The application of different disinfection treatments in the explants, led to high rates of aseptic in twelve of established genotypes, although these were not always

Cuadro 3. Porcentaje de contaminación de explantes para determinar el mejor método de desinfección en el establecimiento aséptico de genotipos élite de *Coffea* spp.**Table 3. Percentage of contamination of explants in order to determine the best disinfection method in aseptic establishment of elite genotypes of *Coffea* spp.**

Agente desinfectante (%)	Genotipo INIFAP (% de contaminación) [†]					
	95-9	95-8	00-28	00-24	97-15	2000-1018 ^{††}
1% NaClO + 7% Ca(ClO) ₂	100 a	100 a	66 ab	16 a	33 abc	50 a
1% NaClO	100 a	100 a	100 a	16 a	66 a	0 a
3% NaClO	83 a	0 b	33 b	16 a	16 bc	33 a
6% NaClO	100 a	0 b	50 ab	0 a	0 c	50 a
3.5% Ca(ClO) ₂	83 a	16 b	100 a	0 a	50 b	16 a
7% Ca(ClO) ₂	66 a	0 b	50 ab	0 a	0 c	50 a
10.5% Ca(ClO) ₂	100 a	100 a	83 ab	16 a	0 c	16 a

[†]= medias con letras iguales por columna no son estadísticamente diferentes (LSD, 0.05) de acuerdo a la transformación raíz cuadrada de X+1, promedio de seis repeticiones por tratamiento; ^{††}= genotipos élite de *C. arabica* L., el resto de los genotipos corresponden a *C. canephora* P.

Los genotipos INIFAP 97-19 y 95-9 fueron los que presentaron porcentajes de contaminación más altos (66 a 100%), sin importar el tipo y concentración del agente desinfectante, esta contaminación se observó en los bordes del tejido, lo cual indica la presencia de contaminación endógena. Por el contrario, los genotipos con la gama de valores más baja para el porcentaje de contaminación (0 a 50%), fueron INIFAP 2000-1018 y 00-24; en el resto de los genotipos los porcentajes de contaminación fueron de 0 a 100% dependiendo del genotipo (Cuadro 2 y 3).

La aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección en los explantes propiciaron altos porcentajes de asepsia en doce de los genotipos establecidos, aunque estos no siempre fueron buenos para evitar la oxidación de los explantes (Cuadros 2 y 3); por tanto, la elección del mejor método de desinfección se llevó a cabo considerando la concentración que presentó bajos niveles de oxidación y contaminación (Cuadro 4); fue preferible incluso sacrificar el porcentaje de contaminación a favor de aquellos tratamientos con el menor índice de oxidación; ya que la respuesta morfogénica de los explantes depende en mayor medida del grado de oxidación del explante; es decir, de nada serviría tener explantes asépticos cuando el tejido está oxidado y sin capacidad de respuesta. Al respecto Abdelnour y Escalant (1994), mencionan que la concentración óptima del desinfectante es aquella con la que se logra la desinfección del explante, causándole el menor daño posible.

good to prevent explants oxidation (Tables 2 and 3); so the choice of the best disinfection method was carried out considering the concentration that showed low levels of oxidation and contamination (Table 4); to sacrifice the contamination percentage for those treatments with the lowest rate of oxidation was preferable; as the morphogenetic explants response depends more on the degree of explant oxidation; i.e., there is no point in having aseptic explants when the tissue is oxidized and unresponsive. Abdelnour and Escalant (1994), mention that the optimal concentration of disinfectant is one that achieves explant disinfection causing minimal damage.

The control's disinfection treatment (3% of NaClO + 7% of Ca(ClO)₂), was not included in the treatments with lower contamination rates and especially oxidation, in none of the evaluated genotypes. Due to the synergistic action of disinfecting agents on explants oxidation.

Four groups of disinfection treatments were identified, that were more appropriate for the aseptic establishment of explants and control of the oxidation. Thus, 1 and 3% of NaClO were the best treatments for 10 of 13 genotypes, whereas 3.5 and 7% of Ca(ClO)₂ were only for three genotypes (Table 5).

Disinfection procedures with sodium hypochlorite have been described by several authors and they agree significantly with the results obtained in some genotypes

Cuadro 4. Comparación de dosis de NaClO y Ca(ClO)₂ que propiciaron el mejor control de la contaminación y la oxidación en explantes de hoja de 13 genotipos de *Coffea* spp., a cinco días del establecimiento *in vitro*.

Table 4. Comparison of doses of NaClO and Ca(ClO)₂ which led to better control of contamination and oxidation in leaf explants of 13 genotypes of *Coffea* spp., five days after the establishment *in vitro*.

Genotipo INIFAP	Tratamiento	Contaminación (%) ^{†††}	Oxidación (%) ^{†††}	Tratamiento alternativo ^{††}	Contaminación (%) ^{†††}	Oxidación (%) ^{†††}
97-20	3.5% Ca(ClO) ₂	0	0	Ninguno	--	--
97-19	10.5% Ca(ClO) ₂	100	50	1% NaClO	100	8.33
2000-1128 [†]	10.5% Ca(ClO) ₂	16	66.66	1% NaClO	50	8.33
97-12	10.5% Ca(ClO) ₂	33	12.5	1% NaClO	66	8.33
97-10	3% NaClO	0	0	Ninguno	--	--
2000-692 [†]	3% NaClO	16	79.16	1% NaClO	50	33.33
97-18	3.5% Ca(ClO) ₂	33	20.83	3% NaClO	50	12.5
95-9	7% Ca(ClO) ₂	66	45.83	3% NaClO	83	0
95-8	3% NaClO	0	0	Ninguno	--	--
00-28	3% NaClO	33	0	Ninguno	--	--
00-24	3.5% Ca(ClO) ₂	0	0	1% NaClO	16	0
97-15	10.5% Ca(ClO) ₂	0	20.83	3% NaClO	16	4.16
2000-1018 [†]	1% NaClO	0	0	Ninguno	--	--

[†]= genotipos élite de *C. arabica* L., el resto de los genotipos corresponden a *C. canephora* P. ^{††}= grupo de tratamientos que representaron una opción por bajos niveles de oxidación. ^{†††}= promedio de seis repeticiones por tratamiento.

El tratamiento de desinfección testigo (3% de NaClO + 7% de Ca(ClO)₂), no figuró dentro de los tratamientos con los menores porcentajes de contaminación, y sobre todo de oxidación, en ninguno de los genotipos evaluados. Ello debido a la acción sinérgica de los agentes desinfectantes sobre la oxidación de los explantes.

Se logró identificar cuatro grupos de tratamientos de desinfección que resultaron ser más apropiados para el establecimiento aséptico de los explantes y control de la oxidación. De esta manera, el 1 y 3% de NaClO fueron los mejores tratamientos para 10 de 13 genotipos evaluados; mientras que 3.5 y 7% Ca(ClO)₂ sólo fueron para tres genotipos (Cuadro 5).

Los procedimientos de desinfección con hipoclorito de sodio han sido descritos por varios autores y concuerdan de manera significativa con los resultados obtenidos en algunos genotipos aquí probados, así la desinfección de explantes foliares provenientes de café aplicando una solución al 3% de hipoclorito de sodio durante 15 min y en otros genotipos del género *Coffea* spp., ha dado buenos resultados en estudios sobre embriogénesis somática (González *et al.*, 2001; Cevallos *et al.*, 2002).

Al respecto, De Rezende *et al.* (2003), han sugerido la aplicación de alcohol al 70% por 1 min, e hipoclorito de sodio al 1% por 15 min en *C. arabica* L. cv. Obata. Ayub y Nisio

tested here, so disinfection of leaf explants from coffee by applying a 3% solution of sodium hypochlorite for 15 min and other genotypes of the genus *Coffea* spp. has been successful in studies of somatic embryogenesis (González *et al.*, 2001; Cevallos *et al.*, 2002).

Cuadro 5. Métodos de desinfección obtenidos de la comparación de los porcentajes de contaminación y oxidación para cada genotipo.

Table 5. Disinfection methods obtained by comparing the contamination and oxidation percentages for each genotype.

Genotipo INIFAP	Tratamiento	Genotipo INIFAP	Tratamiento
97-19	1% NaClO	97-15	3% NaClO
97-12	1% NaClO	95-8	3% NaClO
2000-1128 [†]	1% NaClO	00-28	3% NaClO
2000-1018 [†]	1% NaClO	00-24	3.5% Ca(ClO) ₂
2000-692 [†]	1% NaClO	97-20	3.5% Ca(ClO) ₂
97-10	3% NaClO	95-9	7% Ca(ClO) ₂
97-18	3% NaClO		

[†]= genotipos élite de *C. arabica* L., el resto de los genotipos corresponden a *C. canephora* P.

In this regard, De Rezende *et al.* (2003), have suggested the application of 70% alcohol for 1 min, and 1% sodium hypochlorite for 15 min in *C. arabica* L. cv. Obata.

(2003), aplicaron un método de desinfección en explantes de hojas jóvenes de *C. arabica* cultivar IAPAR 59, híbrido de Sarchimor, que consistió en la inmersión de las hojas en alcohol al 70% por 40 s seguida de una inmersión en solución de NaClO al 2% y Tween 80 al 1% por 15 min. Por su parte, Fernandez-Da Silva *et al.* (2005), sugieren la aplicación de NaClO al 1.575% por 30 min para *C. arabica* cv. Catimor.

Las concentraciones de los desinfectantes antes citados resultaron ser parecidas a la obtenida en este trabajo de investigación, en cuanto a las concentraciones de hipoclorito de sodio; no obstante, resalta la variabilidad de respuesta entre cultivares. Por otro lado, en el caso del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, no se han reportado métodos de desinfección parecidos en alguna especie; sin embargo, las concentraciones encontradas son congruentes con las sugeridas por Vargas y García (1997), para este agente desinfectante en la asepsia de distintas especies de tejidos vegetales (6 a 12% de hipoclorito de calcio).

Como se puede apreciar en el Cuadro 5, la dosis óptima que se eligió para diez de los genotipos (INIFAP 97-19, 97-12, 2000-1128, 2000-1018, 2000-692, 97-10, 95-8, 00-24, 97-20, 95-9), estuvo por debajo del valor de la DL_{50} de NaClO o $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ reportada en este trabajo (Cuadro 1). Sin embargo, en el caso de los genotipos INIFAP 00-28, 97-15 y 97-18, las dosis que tuvieron mejor control de la contaminación y la oxidación estuvieron por encima del valor de la DL_{50} , esto se puede atribuir por una parte que la evaluación en este experimento se llevó a cabo al quinto día del establecimiento, mientras que en el experimento de DL_{50} la evaluación se llevó a cabo al sexto día, pudiéndose manifestar cambios en la oxidación de un día para otro en estos genotipos.

Otra causa de la menor sensibilidad a los agentes desinfectantes de estos tres genotipos en el experimento de establecimiento aséptico, podría estar asociada al estatus hídrico de las hojas al momento de la colecta en campo, lo anterior debido que durante la colecta de las hojas para el experimento de DL_{50} los niveles de precipitación en campo fueron nulos, en cambio cuando se efectuó el experimento de establecimiento aséptico la precipitación mensual fue de 50 mm (Com. Pers. Alonso, M. Registro Climatológico del Campo Experimental Rosario Izapa, 2005-2006).

Por tanto, un menor contenido de agua en los tejidos foliares pudieron haber propiciado DL_{50} bajas en estos tres genotipos. En este sentido el déficit hídrico en los suelos afectó el

Ayub and Nisio (2003), applied a disinfection method in young leaf explants of *C. arabica* IAPAR 59 cultivate, Sarchimor hybrid, which consisted of immersing the leaves in 70% alcohol for 40 s followed by immersing in a 2% NaClO solution and 1% Tween 80 for 15 min. Meanwhile, Fernandez-Da Silva *et al.* (2005), suggest the application of 1.575% NaClO for 30 min for *C. arabica* cv. Catimor.

The concentrations of disinfectants mentioned above, were found to be similar to those obtained in this research in terms of concentrations of sodium hypochlorite, however, it highlights the variability of response among cultivars. On the other hand, in the case of $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, similar disinfection methods in some species have not been reported, but the concentrations found are consistent with those suggested by Vargas and García (1997), for this disinfectant in asepsis of different species of plant tissues (6 to 12% of calcium hypochlorite).

As shown in Table 5, the optimal dose that was chosen for ten genotypes (INIFAP 97-19, 97-12, 2000-1128, 2000-1018, 2000-692, 97-10, 95-8, 00-24, 97-20, 95-9), was below the LD_{50} value of NaClO or $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ reported in this paper (Table 1). However, in the case of INIFAP 00-28, 97-15 and 97-18 genotypes, the doses that had better control of contamination and oxidation were above the LD_{50} value, this can be due in part because the evaluation in this experiment was conducted on the fifth day of the establishment, while in the LD_{50} experiment, the evaluation was conducted on the sixth day, it could have been oxidation changes overnight in these genotypes.

Another cause of lower sensitivity to disinfectants of these three genotypes in the aseptic establishment experiment, could be associated to leaf water status at the time of collection in the field, because during the leaves' collection for the LD_{50} experiment, precipitation levels in the field were zero, however when the aseptic establishment experiment was conducted, monthly precipitation was 50 mm (Com. Pers. Alonso, M. Climate Records of Experimental Field Rosario Izapa, 2005-2006).

Therefore, lower water content in leaf tissues may have resulted in lower LD_{50} in these three genotypes. The water deficit affected the crop growth, which created an imbalance that interfered with mineral nutrition and cell metabolism (Leidi and Pardo, 2002).

crecimiento del cultivo, lo cual creó un desequilibrio, que interfiere generalmente con la nutrición mineral y el metabolismo celular (Leidi y Pardo, 2002).

Al respecto, Gálvez-López (2007) en comunicación personal indica que, en estudios de relaciones hídricas con las mismas dosis y tipos de agentes desinfectantes utilizadas en este trabajo, los explantes foliares del genotipo INIFAP 97-15 carecieron de la capacidad de ajuste osmótico, mientras que en el genotipo INIFAP 97-18 el ajuste osmótico fue bajo, lo cual podría indicar el efecto adverso que puede provocar la disponibilidad de agua en la calidad del explante y capacidad para resistir a los agentes desinfectantes. De igual forma señala que el genotipo INIFAP 97-10 carece de ajuste osmótico, pero que es uno de los más tolerantes a la oxidación. Lo anterior implica que este último genotipo presenta un mecanismo de tolerancia a los desinfectantes diferente al resto de los genotipos.

CONCLUSIONES

Existe variabilidad en la tolerancia a los desinfectantes, puesto que la DL_{50} varió dependiendo del genotipo y el agente desinfectante evaluado. No obstante, la mayor parte de los genotipos fueron menos tolerantes a concentraciones elevadas de hipoclorito de sodio ($DL_{50} \leq 4.1\%$), las concentraciones bajas de este desinfectante (1 a 3%) resultaron ser más efectivas para controlar la contaminación y mantener índices de oxidación aceptables.

Por otro lado, la tolerancia de los explantes varió dependiendo de la época de colecta y del estado hídrico de la planta madre. El empleo del hipoclorito de sodio se puede aplicar en bajas concentraciones hasta 1% para controlar la oxidación y contaminación en diez genotipos de café, mientras que el hipoclorito de calcio resultó efectivo en sólo tres de los genotipos evaluados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Fondos Sectoriales SAGARPA-CONACYT-COFUPRO-2004-C01-116 y a la empresa S. A. de C. V., por el financiamiento otorgado para este trabajo de investigación.

In this regard, Gálvez-López (2007) in personal communication, suggests that water relations studies with the same doses and disinfectants types used in this study, leaf explants of INIFAP 97-15 genotype lacked the capacity for osmotic adjustment, while in INIFAP 97-18 genotype the osmotic adjustment was low, which may indicate the adverse effect that water availability could cause in the explant's quality and on its ability to resist disinfectants. Likewise, he states that INIFAP 97-10 genotype has no osmotic adjustment, but it is one of the most tolerant to oxidation. This implies that the latter genotype has a tolerance mechanism to disinfectants which is different from the other genotypes.

CONCLUSIONS

There is variability in tolerance to disinfectants, since LD_{50} varied depending on the genotype and the disinfectant tested. However, most of the genotypes were less tolerant to high concentrations of sodium hypochlorite ($LD_{50} \leq 4.1\%$), low concentrations of this disinfectant (1 to 3%) were more effective in controlling contamination and maintaining acceptable oxidation indexes.

On the other hand, explants tolerance varied depending on the time of collection and water status of the mother plant. Sodium hypochlorite can be applied at low concentrations (up to 1%); in order to control oxidation and contamination in ten genotypes of coffee, while calcium hypochlorite was effective in only three of the evaluated genotypes.

End of the English version



LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A. y Escalant, J. V. 1994. Conceptos básicos de cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 38 p.
- Afreen, F.; Zobayed, S. M. A. and Kozai, T. 2002. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. Ann. Bot. 90:11-19.

- Ayub, R. A. y Nisio, G. A. 2003. Embriogenese somatica em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. UEPG Ci Exatas Terra, Ponta Grossa. 9:25-30.
- Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. 1998. Plants use calcium to resolve salt stress. Trends in Plant Sci. 3:411-412.
- Cevallos, M.; Sánchez, I. S. y Montes, S. 2002. Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* P. var. Robusta. Revista Protección Vegetal. 17:14-19.
- De Rezende, M. A. L.; Pasqual, M.; Pereira, A. R.; Costa, D. J.; Bortolotti, D. A. and Ferreira, D. L. 2003. Embriogênese somatica indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obata. Ciência Agrotec Lavras. 27:107-116.
- Echeverría, R. G. 2000. Opciones para reducir la pobreza rural en América Latina y el Caribe. Revista de la CEPAL. 70:147-160.
- Escamilla, P. E.; Ruiz, R. O.; Díaz, P. G.; Landeros, S. C.; Platas, R. D. E.; Zamarripa, C. A. y González H. V. A. 2005. El agroecosistema café orgánico en México. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 76:5-16.
- Etienne, H.; Barry-Etienne, D.; Vasquez, N. y Berthouly, M. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café. In: desafíos de la caficultura en Centroamérica. Bertrand, B. y Rapidel, B. (eds.). IICA. San José, Costa Rica. 457-495 pp.
- Fernandez-Da Silva, R.; Hermoso-Gallardo, L. and Menéndez-Yuffá, A. 2005. Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. Interciencia. 30:694-698.
- Gamborg, O. L. 2002. Plant tissue culture. The technology. Part 1. Exegetics Ltd. Edington. 547 p.
- González, M. E.; Santana, N. y López, C. 2001. Efecto de la composición del medio de cultivo y el genotipo de la inducción de la embriogénesis somática en clones de *Coffea canephora* P. Var Robusta. Cultivos Tropicales. 22:17-21.
- Hasegawa, P. M.; Bressan, R.; Zhu, J. K. y Kohnert, J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Mol. Biol. 51:463-499.
- Leidi, E. O. y Pardo, J. M. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. Universidad Nacional de Rosario. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias. 2:319-325.
- Mäser, P.; Thomine, S.; Schroeder, I. J.; Ward, J. M.; Hirsch, K.; Sze, H.; Talke, I. N.; Amtmann, A.; Maathuis, F. J.; Sanders, D.; Harper, J. F.; Tchieu, J.; Gribskov, M.; Persans, M. W.; Salt, D. E.; Kim, S. A. and Gueriot, M. L. 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 126:1646-67.
- Murata, Y.; Katsura, S.; Obi, I. and Kakutani, T. 2000. Alterations in Ca^{2+} binding on plasma membrane after adaptation to salt stress of tobacco cells in suspension. Plant Cell Physiol. 41:1286-1292.
- Sánchez-Cuevas, M. C. y Salaverría, J. L. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria*ananassa* Duch.). UDO Agrícola. 4:21-26.
- Scott, A. M. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 1:112-121.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 1997. Cary, NC, USA. 917 p.
- Staritsky, G. 1970. Embryo formation in callus tissues of coffee. Acta Botánica Neerlandica. 19:509-514.
- Vargas, T. y García, E. 1997. Propagación *in vitro* de "Cala Blanca" *Spathiphyllum* sp. Agronomía Tropical. 47:171-183.
- Yasuda, T.; Fuji, Y. and Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol. 26:595-597.
- Yokoi, S.; Quintero, F. J.; Cubero, B. L.; Ruiz, M. T.; Bressan, R.; Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* $\text{Nhx Na}^+/\text{H}^+$ antiporters in the salt stress response. Plant J. 30:529-539.