

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

Inducción a Embriogénesis somática en explantes foliares de café:

Revisión de literatura

Estudiante

Enmanuel Josue Castro Espinoza

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Cinthya Martínez, M.A.E.

Honduras, agosto 2020

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de cuadros	4
Índice de figuras	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Metodología	10
Revisión de Literatura	11
Micropropagación de Café	11
Embriogénesis Somática	11
Etapas de la Embriogénesis Somática	13
Fuente de Explante y Desinfección del Material Vegetal	14
Selección y Preparación del Material Vegetal	15
Medios de Cultivo para la Inducción a Embriogénesis Somática en Café a partir de Explantes Foliare	16
Proliferación de Callo Embriogénico	18
Aclimatación de las Plántulas Provenientes de Embriones Somáticos	18
Conclusiones	20
Recomendaciones	21
Referencias	22

Índice de cuadros

Cuadro 1 Soluciones desinfectantes con su respectiva dosis para explantes foliares de café.....	15
Cuadro 2 Medios de cultivo para inducir y regenerar embriones, inducir callos, embriogénesis somática, callogénesis, embriones en estado globular, embriones en estado torpedo, embriones somáticos, número de embriones.	17

Índice de figuras

Figura 1 Representación esquemática del proceso de propagación masiva de <i>Coffea arabica</i> (24 meses) mediante embriogénesis somática (ES).	12
Figura 2 Embriogénesis somática directa de <i>Coffea arabica</i> a) Masas proembriogenicas b) Embriones somáticos c) Embriones somáticos en etapa cotiledonar d) Embriones somáticos germinados.....	13
Figura 3 Seccionamiento de la hoja de la primera o segunda posición en el brote de las plantas de café, tamaño del segmento de 5 cm ² y 1 cm ² cada explante.	16

Resumen

La micropropagación es un método de propagación a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, que da como resultado la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Este método nos da la ventaja de obtener clones en cualquier época del año y eliminar patógenos. Los objetivos de esta revisión fueron determinar el procedimiento de desinfección *in vitro* de explantes foliares de café para su establecimiento *in vitro*; y, conocer las formulaciones nutritivas usadas para la inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares de café. La revisión de literatura se realizó entre abril y julio de 2021. La información fue obtenida de las bases de datos: Springer Link, Scielo, Google académico, Dialnet, Semantic Scholar, Research Gate. Se utilizó información de los últimos años enfocado en los avances de la micropropagación del café. Los procedimientos de desinfección se realizan con el uso de detergentes comerciales, hipoclorito de sodio (NaClO), agentes surfactantes como Tween 20 u 80, y también con fungicidas sistémicos como Azoxystrobin 50% Benomilo y bactericidas como estreptomina y oxitetraciclina. También se encontró reportes del uso de antibióticos como clorhidrato de tetraciclina y otros productos como nitrato de plata, tiosulfato de sodio y agua oxigenada. El medio de cultivo más usado para la inducción a embriogénesis somática a partir de explantes foliares es el de Murashige y Skoog suplementado con auxinas, principalmente 2,4-D, por otro lado, se encontró que las citoquininas juegan un papel importante en la maduración de los embriones somáticos (BAP, KIN, AIA, AIB).

Palabras Claves: Embriogénesis somática, estados embriogénicos, micropropagación en café.

Abstract

Micropropagation is a method of propagation asexual from a fragment (explant) of a mother plant, which results in the mass propagation of genetically identical plants, called clones. This method gives us the advantage of obtaining clones at any time of the year and eliminating pathogens. The objectives of this review were to determine the procedure for *in vitro* disinfection of coffee leaf explants for *in vitro* establishment; and to know the nutritive formulations used for the induction of somatic embryogenesis from coffee leaf explants. The literature was conducted between April and July 2021. The information was obtained from the following databases: Springer Link, Scielo, Google Scholar, Dialnet, Semantic Scholar, Research Gate. Information from recent years was used focusing on advances in coffee micropropagation. Disinfection procedures are carried out with the use of commercial detergents, sodium hypochlorite (NaClO), surfactants such as Tween 20 or 80, and also with systemic fungicides such as azoxystrobin 50% and Benomyl and bactericides such as streptomycin and oxytetracycline. There were also reports of the use of antibiotics such as tetracycline hydrochloride and other products such as silver nitrate, sodium thiosulphate and hydrogen peroxide. The most used culture medium for the induction of somatic embryogenesis from leaf explants is Murashige and Skoog medium supplemented with auxins, mainly 2,4-D. It was found that cytokinins play an important role in the maturation of somatic embryos (BAP, KIN, AIA, AIB)

Key words: Somatic embryogenesis, embryogenic stages, micropropagation in coffee.

Introducción

La planta de café es un arbusto, pertenece a la familia de las rubiáceas, al género *Coffea*, consta de más de 6,000 especies (Hernandez et al. 2015). De este género, las especies *C. arábica* y *C. canephora* son las de mayor importancia económica (Toledo 2020). Los principales países productores se encuentran en América del Sur y Central, África y Asia, (Cortijo 2017). Brasil ha sido el mayor productor de café, seguido de Vietnam, Colombia, Indonesia, Etiopia, India, y Honduras que se encuentra en séptimo lugar en producción mundial (IHCAFE 2016). Este cultivo requiere entre 750 mm y los 3,000 mm de agua anuales, en altitudes de entre 1,300 y 1,700 msnm, y con temperaturas medias anuales que oscilan entre los 16°C a 22°C (Fernández et al. 2010). Se cultiva bajo sombra en presencia de materia orgánica y suelos ligeramente ácidos (pH 5 - 6) (Oliveros 2011).

El cafeto está formado por una raíz pivotante un tallo principal ortotrópico del cual se desarrollan ramas plagiotrópicas, crecimiento de yemas ubicadas entre cada nudo, en todo el tallo y en las raíces, para dar origen a las hojas, ramas, tallos o flores, el fruto o drupa alcanza su madurez en 8 y 9 meses después de la fecundación siendo flores hermafroditas (Pineda y Urias 2018). Tiene un ciclo de vida de hasta 20-25 años, y se considera que alcanza su desarrollo y productividad entre los 6 y 8 años de edad (Arcila et al. 2007).

El café es originario de Etiopia y Sudan, África, fue introducido en el continente americano en los años de 1700 y 1800 (Ponce 2020). Convencionalmente, el café se reproduce por propagación sexual y propagación asexual (Vinod Kumar et al. 2006). Es un rubro de gran importancia a nivel mundial y de suma importancia para la economía de Honduras, más de 102 mil familias se dedican a su producción en 15 de los 18 departamentos, representa el 30% del PIB agrícola y el 5% del PIB Nacional, 25 millones de familias son productoras en 80 países de América Latina, África y Asia. Es la segunda materia prima más vendida después del petróleo y 100 millones de personas están involucradas en la producción y procesamiento (Álvarez Welchez 2018). En los últimos años se ha incrementado la siembra de variedades que tienen resistencia a plagas y enfermedades, como son los

Catimores y Sarchimores, variedades híbridas que proceden del cruce de dos padres arábigos genéticamente distintos y que han servido de base para el desarrollo de las variedades Anacafe 90, Catimor T-8667, Costa Rica 95, Lempira, Parainema, Sarchimor, Cuscatleco, Tupi, Geisha, Castillo entre otras (Velasquez 2019).

La producción de café soporta el efecto que ocasiona el cambio climático, bajas temperaturas, alto porcentaje de cobertura, fuentes de agua, reserva de especies animales y vegetales, promueve la reforestación, evita erosión. Además, los países industrializados generan un porcentaje de emisiones de dióxido de carbono entre el 60 % donde las emisiones son generadas en Europa y en los Estados Unidos, en tanto la totalidad de los países en vías de desarrollo el 21% por esta razón se debe priorizar en la adaptación, evaluaciones, investigación, tecnologías y capacitaciones (Isaza y Cornejo 2014).

La técnica de micropropagación consiste en el cultivo de explantes en un ambiente artificial y controlado para obtener un resultado de plantas idénticas a la planta madre (Freire Seijo 2003). La embriogénesis somática, es una de las vías de regeneración de plantas *in vitro*, consiste en desarrollar un embrión a partir de células somáticas, sin la unión y fecundación de gametos, para la propagación masiva del material vegetal élite, y en café se induce a partir de explantes foliares (Kumar et al. 2006).

Los objetivos de esta revisión de literatura fueron conocer el procedimiento de desinfección *in vitro* de explantes foliares de café para su establecimiento *in vitro*; y, conocer las formulaciones nutritivas usadas para la inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares de café.

Metodología

La revisión se realizó entre abril y julio de 2021, la información se obtuvo de artículos científicos sobre micropropagación de café. Las bases de datos utilizadas para la revisión literaria fueron Springer Link, Scielo, Google académico, Dialnet, Semantic Scholar, Research Gate. Algunas de estas bases están disponibles por acceso libre y por suscripción en el sitio web de la Biblioteca Wilson Popenoe de Zamorano.

Los artículos se seleccionaron en función de año de publicación y relación con los objetivos establecidos, se utilizó información de los últimos 28 años, las palabras claves usadas para la búsqueda fueron Embriogénesis somática, estados embriogénicos, micropropagación en café. Se seleccionó artículos en los idiomas español e inglés

Revisión de Literatura

Micropropagación de Café

La micropropagación es una opción o alternativa viable en la propagación de plantas élite a gran escala y en un corto periodo de tiempo, garantizando, la sanidad del material propagado (Montes 2019). Actualmente hay grandes expectativas para obtener plantas libres de patógenos, garantía clonal de cultivos leñosos y grandes cantidades de plántulas en tiempos cortos (Bajaña 2017).

Embriogénesis Somática

Según Martin (2017) la embriogénesis somática (ES) es una técnica biotecnológica eficiente para la propagación de plantas debido a la naturaleza bipolar del embrión, ya que no tiene conexión vascular con el tejido parental y con la posibilidad de automatizar el proceso productivo a altas tasas de multiplicación en cortos periodos de tiempo. La ES, es la formación de embriones que surgen de células somáticas, presentando el potencial de producir clones de un genotipo específico (Freire Seijo 2003).

La ES puede ser indirecta o directa. En la ES indirecta, el explante se somete a un proceso de diferenciación para iniciar la formación de callo embriogénico y luego la conversión de células embriogénicas en embriones somáticos. Mientras que la ES directa ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente de los explantes (Promecafe y IICA 2011). Los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, si no que tendrán el mismo genoma de la planta fuente del explante (Figura 1).

Los factores que pueden afectar la inducción a ES son las condiciones del cultivo, los reguladores de crecimiento, componentes del medio del cultivo y el estado fisiológico de la planta madre y el explante (Freire Seijo 2003).

Figura 1

Representación esquemática del proceso de propagación masiva de Coffea arábica (24 meses) mediante embriogénesis somática (ES).



Nota. Tomado de Etienne et al. (2018)

Según Roca y Mroginski (1993) la mayoría de los sistemas que forman embriones somáticos en las dicotiledóneas lo hacen por la vía indirecta, ya que las células totipotentes siguen patrones de división que dan origen a proembriones, los cuales a su vez dan origen a los estadios de desarrollo denominados globular, corazón, torpeda y cotiledonar. La ES indirecta es más eficiente que la vía directa, en cuanto al número de embriones generados. Pero esta vía de regeneración está fuertemente influenciada por las variedades (genotipo) y los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo (ambiente) (Sánchez et al. 2019).

Etapas de la Embriogénesis Somática

En la ES se observan etapas de desarrollo que inician con las continuas divisiones en las células hasta formar los agregados celulares embriogénicos. Si se desarrolla *in vitro* es frecuente que se requiera la presencia de reguladores de crecimiento. A continuación, estos agregados celulares que se forman desde las células aisladas adquieren la habilidad para el desarrollo de embriones cuando el regulador de crecimiento es eliminado. Seguido de una rápida división a los tres o cuatro días, dando lugar a las etapas denominadas globular, corazón o acorazonado y torpedo en las dicotiledóneas (Seijo (2003). Los embriones presentan una estructura bipolar, donde se desarrollará el meristemo apical y radical de los extremos del mismo eje, también, se caracterizan por no presentar conexión vascular con el tejido materno (Gatica Arias 2002). En la Figura 2 se pueden observar las etapas de desarrollo de los embriones somáticos de café.

Figura 2

Embriogénesis somática directa de Coffea arábica a) Masas proembriogénicas b) Embriones somáticos c) Embriones somáticos en etapa cotiledonar d) Embriones somáticos germinados



Nota. Tomado de Avila et al. (2018)

Los reguladores de crecimiento estimulan el desarrollo y crecimiento de la planta, las citoquininas y auxinas forman parte de las fitohormonas, que han servido como herramienta para controlar el crecimiento y actividad bioquímica de las plantas, entre las citoquininas se encuentra Benzilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN) para proliferación celular y crecimiento en los tejidos vegetales. Las auxinas como ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB). Los reguladores de crecimiento tienen efecto a nivel celular como división, elongación celular y diferenciación celular por lo que su uso en micropropagación es también frecuente (Alcantara Cortez et al. 2019).

Fuente de Explante y Desinfección del Material Vegetal

Los protocolos de desinfección de explantes pueden variar de un laboratorio a otro, según la época del año (lluviosa o seca) y el estado fitosanitario de la planta madre. En explantes foliares para inducir embriogénesis somática en café, se reportan diversos protocolos de desinfección con el uso de hipoclorito de sodio (NaClO) por tiempos y a concentraciones muy variadas, además al utilizar una solución bactericida (estreptomicina y oxitetraciclina) y fungicida (benomilo) pueden obtener un mejor control de los microorganismos contaminantes (Gatica Arias 2002). Sánchez et al. (2019) para la desinfección de hojas usa NaClO al 2.0% durante 5 minutos, y una solución de Benomilo (2.0 g/L) durante una hora.

En la micropropagación de café se utilizan hojas jóvenes y completas de plantas en buenas condiciones fitosanitarias, para la obtención de este material vegetativo realizan procesos de lavado en soluciones de povidona (100 mL/L), clorhidrato de tetraciclina, y peróxido de hidrogeno (Acosta Andrade 2015).

También se ha documentado el uso de AgNO_3 (Nitrato de plata) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Tiosulfato de sodio), para reducir la contaminación bacteriana, oxidación de los explantes y como desinfectantes en diferentes soluciones, obtienen buenos resultados (López Gómez et al. 2016). En el trabajo de Paredes (2013) al recolectar hojas de las partes más cercanas al meristemo apical, las plantas provenientes de invernadero, de aproximadamente cinco meses, realizan tratamientos fitosanitarios por aspersion con un fungicida sistémico Amistar (Azoxystrobin 50%) (1 g/L) sumergiendo el material vegetal durante 10 minutos en el detergente comercial DEJA[®] al 1 % peso/volumen con la adición de 0.1% Tween 20; agregándolas en diferentes concentraciones de cloro (1 y 1.5% volumen/volumen) en diferentes tiempos de inmersión (15 y 20 minutos), y enjuagues en cámara de flujo laminar con agua destilada estéril para ser cortadas del tamaño de $0.25 \times 1\text{cm}^2$. En el Cuadro 1 Se presenta un resumen de protocolos de desinfección.

Cuadro 1

Soluciones desinfectantes con su respectiva dosis para explantes foliares de café.

Referencia	Desinfectantes y sus dosis
Gatica Arias (2002)	Agri-mycin (estreptomycin y oxitetraciclina) 1 g/L + Benlate [®] (benomilo) 1 g/L, 60 minutos 1.6 % y 1% NaOCl v/v 30 minutos
López Gómez et al. (2010)	Amistar [®] (Azoxystrobin 50 %) 1 g/L 3 días 3 % v/v de NaClO 15 minutos
Paredes et al. (2013)	Amistar [®] (Azoxystrobin 50 %) 1 g/L 1% p/v DEJA [®] 10 minutos (detergente comercial) 0.1% Tween 20 + NaClO 1.5 % v/v 20 minutos
Sánchez et al. (2019)	Benlate [®] (benomilo) 2 g/L 1 hora 2% de NaClO por 5 minutos

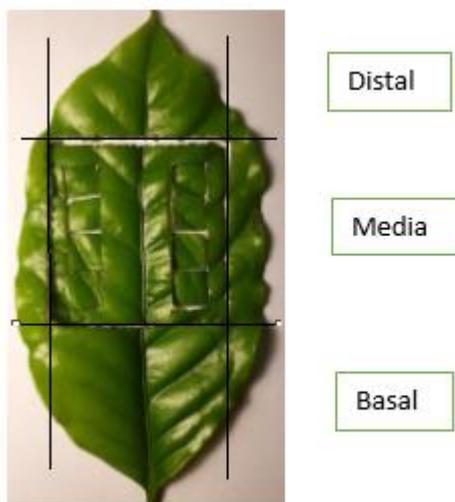
Selección y Preparación del Material Vegetal

El proceso de la micropropagación se inicia en el campo, seleccionando y preparando la planta madre que presenta las mejores características como su color, vigor de crecimiento y sanidad, una vez seleccionada, se elige y se transporta el material vegetal que será recolectado, donde aplican procedimientos de desinfección con el objetivo de eliminar patógenos (Díaz Sigcho 2019). En la investigación de Lopez Gomez et al. (2016) emplean hojas jóvenes y expandidas de *Coffea Canephora* de la variedad Robusta, donde los genotipos se seleccionan por su alto rendimiento.

Para seleccionar los segmentos de la parte de la hoja de café, recomiendan plantas de entre tres y doce meses de edad, con un tamaño de todo el segmento de 7 cm de largo y 4 cm de ancho, de 5 cm² la parte media y de 1 cm² de diferentes muestras del segmento desde la parte distal, media y basal de la hoja, sin ondulaciones en los bordes y sin daños físicos ni manifestaciones de enfermedades (Figura 3) (Gatica Arias 2002).

Figura 3

Seccionamiento de la hoja de la primera o segunda posición en el brote de las plantas de café, tamaño del segmento de 5 cm² y 1 cm² cada explante.



Nota. Adaptada de Gatica Arias (2002)

En el trabajo de Lopez Gómez (2010) Al obtener explantes de 1 cm² con hojas inmaduras de tres meses de edad de color amarillo, se extraen las hojas expandidas en sentido basípeto provenientes de hijuelos de 10 meses siendo plantas crecidas en campo de 9 a 11 años, de igual manera se extraen hojas de color verde (cerca a la madurez) del cuarto par de hojas en el mismo sentido basípeto y hojas maduras de color verde, donde los explantes desinfectados se colocan asépticamente en tubos de ensayo de 16 × 150 mm con 20 mL de medio de cultivo esterilizado.

Medios de Cultivo para la Inducción a Embriogénesis Somática en Café a partir de Explantes Foliares

López Gómez et al. (2016) reportan que al utilizar las sales de Yasuda et al. (1985), vitaminas de Gamborg (2002), 1.12 mg/L de 6-Benzilaminopurina (BAP) y 30 g/L de sacarosa observaron buenos resultados en diferentes fases del desarrollo del embrión. Sánchez et al. (2019) al sembrar explantes de 1 cm² en un medio sólido con sales de MS (Murashige Skoog) y vitaminas de Yasuda et al. (1985) lograron obtener embriones por la vía ES indirecta, en la variedad Catuai con 26,84 (número de

embriones) y al utilizar 0.5 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L KIN. Y por ES directa obtuvo embriones en las variedades Castillo y Costa Rica con una concentración de BAP de 2 mg/L.

Uno de los medios de mayor uso para la inducción de la embriogénesis somática directa en café, es el medio de Yasuda et al. (1985). Se obtienen embriones diferenciados en 16 semanas después de haber colocado las secciones de hojas, posteriormente en el medio de Bieysse et al. (1993) se reduce el tiempo a 10 semanas usando segmentos de hojas en el mismo medio con diferencia de sustituir el agar por el gelrite, el cual esta complementado con benziladenina (BA), donde observó la formación de callo blanco fiable en el borde de los explantes en *Coffea arabica*, cuatro semanas después de la aparición del callo se observó la formación de estructuras globulares y embriones somáticos diferenciados sobre la superficie del callo (Gatica Arias 2002). En el Cuadro 2 se presenta un resumen de medios de cultivo y reguladores y sus efectos.

Cuadro 2

Medios de cultivo para inducir y regenerar embriones, inducir callos, embriogénesis somática, callogénesis, embriones en estado globular, embriones en estado torpedo, embriones somáticos, numero de embriones.

Autor	Medios y reguladores mg /L	Resultado obtenido
López Gómez et al. (2010)	Sales de Yasuda et al. (1985) Vitaminas de Gamborg (2002) BAP (1.12 mg/L)	Inducción de callo Embriogénesis somática % callogénesis
Paredes et al. (2013)	Murashige y Skoog (1962) 2,4-D (0.5 mg/L) KIN (2 mg/L)	Inducción de callo Embriones en estado globular (332) Embriones en estado torpedo (147)
Acosta Andrade (2015)	Murashige Skoog (1962) AIA (2 mg/L) 2,4-D (0.2 mg/L)	Inducción de callos
López Gómez et al. (2016)	Murashige Skoog (1962) (sales) Vitaminas de Gamborg (2002) 2- iP (2 mg/L) 2,4-D (0.5 mg/L) AIB (1 mg/L)	Inducción de callo embriogénico Embriones somáticos

Sánchez et al. (2019)	Murashige Skoog (1962)	Inducción de embriogénesis somática
	2,4-D (0.5 mg/L) KIN (1.5 mg/L)	

Proliferación de Callo Embriogénico

Según López Gómez et al. (2016) con el tratamiento de 50% de sales de MS (Murashige Skoog), vitaminas de Gamborg (2002), 2 mg/L 2iP (2-isopenteniladenina), 2,4-D (0.5 mg/L), 1 mg/L AIB (ácido indolbutírico), 400 mg/L extracto de malta, 100 mg/L caseína hidrolizada, 30 g/L sacarosa, 8 g/L agar. se observa una mayor proliferación de callos (hasta 248 mg). Según Chaves (2010) es posible disgregar el callo embriogénico en suspensiones celulares, las cuales se mantienen en medios líquidos con agitación, separando los grupos celulares con capacidad de producir embriones, con esto se logra aumentar la cantidad de posibles embriones a desarrollar.

Los embriones somáticos pueden ser colocados en recipientes de inmersión temporal automatizados o RITAS, estos recipientes presentan un diseño que favorece el crecimiento de los embriones y facilitan la aclimatización de las plantas bajo condiciones de invernadero, donde las plántulas con raíces más estructuradas y funcionales, son endurecidas y fisiológicamente activadas, de tal forma que reducen la humedad ambiental, variando la temperatura e intercambio gaseoso, luego inician a sustraer nutrientes y activar mecanismos de fotosíntesis para desarrollarse y así alcanzar varios pares de hojas verdaderas.

Aclimatación de las Plántulas Provenientes de Embriones Somáticos

Las plántulas producidas *in vitro* son muy sensibles a cambios bruscos en el ambiente, por lo que el éxito de su adaptación depende de la aclimatización. Después del desarrollo de los embriones las plantas alcanzan una altura de 3 a 4 cm donde se consideran listas para su aclimatización (Castillo 2004).

El substrato a usar para trasplantar la plántula debe ser preferiblemente de textura arenosa, contenido de humus, turba y estar esterilizado, para un mejor desarrollo y facilidad de adaptación de

raíces y evitar cualquier tipo de patógeno, durante una adaptación de 45 días, una vez finalizada la etapa, las plantas están preparadas para realizar su siembra definitiva en campo (Arevalo Roque 2019). La plántula presenta estrés, debido a que vienen de un medio donde no sufren la presión de estar expuesto a cualquier microorganismo contaminante y a la falta de humedad, donde puede generar deshidratación en ella misma. Es importante mantener un ambiente con una humedad de 42% con temperatura de 27 °C y baja intensidad lumínica durante las primeras semanas (Cruz et al. 2017).

Conclusiones

Para la desinfección de explantes foliares de café es necesario iniciar con el uso de fungicidas sistémicos NaClO y Tween 20 u 80.

Para la inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares de café se utilizan las sales de Murashige y Skoog 1962, vitaminas de Yasuda et al. 1985 y fitohormonas (citoquininas y auxinas) las más utilizadas, BAP, KIN, AIA, AIB, 2,4-D.

Recomendaciones

Realizar pruebas experimentales con la presencia y ausencia de auxinas, citoquininas en las etapas de globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar, ya que las células aisladas ganan la habilidad para el desarrollo de embriones cuando la auxina es eliminada.

Utilizar experimentos en diferentes concentraciones de fungicidas, surfactantes, detergentes para obtener numerosas aplicaciones en la recolección de explantes foliares libres de enfermedades y en medios nutritivos.

Referencias

- Acosta Andrade JA. 2015. Embriogénesis somática en café (*Coffea canephora* y *Coffea arabica*): Para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. [Tesis]. Ecuador: Facultad de ciencias naturales escuela de biología; [consultado el 14 de abr. de 2021]. <https://cutt.ly/IQCymG7>.
- Alcantara Cortez JS, Acero Godoy J, Alcántara Cortés JD, Sánchez Mora RM. 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. NOVA; [consultado el 5 de jul. de 2021]. 17(32):109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>.
- Álvarez Welchez MÁ. 2018. Análisis de la Cadena de Valor del Café en Honduras. Honduras: PNUD, IHCAFE, HEIFER. 40 p; [consultado el 4 de may. de 2021]. <https://cutt.ly/5QCyOCK>.
- Arcila J, Farfan F, Moreno A, Salazar LF, Hincapié E. 2007. Sistema de producción de café en Colombia. Colombia: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Cenicafe ; [consultado el 5 de jul. de 2021]. https://www.cenicafe.org/es/publications/sistemas_de_produccion.pdf.
- Arevalo Roque KL. 2019. Micropropagación de *Coffea arabica* L. Var. Typica [Tesis]. Perú: Universidad Nacional de Jaén; [consultado el 17 de abr. de 2021]. <http://repositorio.unj.edu.pe/handle/UNJ/136>.
- Avila V, Martinez I, Ordaz C, Arjona S, Iracheta D, Gomez M, Robledo P. 2018. Embriogénesis somática directa e indirecta en *coffea arabica* var. Colombia. Agroproductividad; [consultado el 9 de may. de 2021]. 11(4):30–35. <https://cutt.ly/mQCyKgY>.
- Bajaña VJ. 2017. Multiplicación in vitro de café caturra rojo *Coffea arabica* L. con la interacción de dos fitohormonas [Tesis]. Ecuador: Universidad de Guayaquil; [consultado el 17 de jun. de 2021]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18266/1/Picay%20Baja%c3%b1a%20Vanessa%20Juliana.pdf>.
- Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Uruguay: INIA; [consultado el 22 de jun. de 2021]. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>.
- Chaves Arias V. 2010. ICAFE desarrolla proyecto de caracterización de la fertilidad de los suelos cafetaleros. Revista Informativa; [consultado el 5 de jun. de 2021]. 1–16. http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/revista_informativa/Revista-I-Sem-10.pdf.
- Cortijo JD. 2017. El mundo del café. Revista Hostel vending; [consultado el 7 de jun. de 2021]. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/01/cafe.pdf>.
- Cruz SM, José M. Lalama-Aguirre, José M. Echeverría-Félix, Lucia Toromoreno-Arévalo, Santiago M. Salazar-Torres, Ernesto S. Benavides-Burgos, Jhony A. Atiaja-Llamba. 2017. Obtención de embriones somáticos de cafeto a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbón Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador. Dominio de las Ciencias; [consultado el 19 de may. de 2021]. 3(2):918–942. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5889731>.
- Díaz Sigcho TdP. 2019. “Procesos biotecnológicos in vitro para la formación de callos a partir de tejidos foliares de cafeto (*Coffea arabica* L.)” [Tesis]. Ecuador: Universidad Nacional de Loja; [consultado el 19 de abr. de 2021]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21596/1/Tania%20del%20Pilar%20D%C3%ADaz%20Sigcho.pdf>.

- Etienne H, Breton D, Breitler J-C, Bertrand B, Déchamp E, Awada R, Marraccini P, Léran S, Alpizar E, Campa C, et al. 2018. Coffee Somatic Embryogenesis: How Did Research, Experience Gained and Innovations Promote the Commercial Propagation of Elite Clones From the Two Cultivated Species? *Front plant Sci.* 9:1630. eng. doi:10.3389/fpls.2018.01630.
- Fernández R, Menéndez A, Zoraya DG. 2010. Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de investigación*; [consultado el 2 de may. de 2021]. 34(71). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-29142010000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Freire Seijo M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*; [consultado el 4 de abr. de 2021]. 3(4):195–209. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/263/237>.
- Gatica Arias A. 2002. Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuai) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja [Tesis]. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica Escuela de Biología Ingeniería en Biotecnología. 92 p; [consultado el 23 de jun. de 2021]. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:khNQ-1-FGvQJ:https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/5647+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=hn>.
- Hernandez E, Soto F, Montoya L. 2015. La producción y el consumo del café. Mexico: Garcia-Miranda, Martha, PhD. ISBN: 978-607-8324-49-1; [consultado el 12 de may. de 2021]. https://www.ecorfan.org/spain/libros/LIBRO_CAFE.pdf.
- [IHCAFE] Instituto Nacional Hondureño del Café. 2016. Importancia del Café en la Economía de Honduras. Honduras: IHCAFE; [consultado el 20 de jul. de 2021]. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:9wA29-y32JwJ:https://www.ine.gob.hn/V3/imag-doc/2019/07/Boletin-del-Cafe-2012-2015.pdf+&cd=26&hl=en&ct=clnk&gl=hn>.
- Isaza CH, Cornejo JM. 2014. Cambio climático y su impacto en el cultivo del café. [sin lugar]: [sin editorial]. ISBN: 9789070526320; [consultado el 22 de abr. de 2021]. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2016/10/CambioClimaticoYCafe.pdf>.
- Kumar V, Madhava Naidu M, Ravishankar GA. 2006. Developments in coffee biotechnology—in vitro plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 87(1):49–65. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11240-006-9134-y.pdf>. doi:10.1007/s11240-006-9134-y.
- López Gómez P, Iracheta Donjuan L, Castellanos–Juárez M, Méndez López I, Sandoval Esquivéz A, Aguirre Medina JF, Ojeda Zacarías MC, Gutiérrez Díez A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotecnia mexicana*; [consultado el 21 de may. de 2021]. 33(3). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000300004.
- López Gómez P, Iracheta Donjuan L, Ojeda-Zacarías MDC, Paul Ducos J. 2016. Medio de cultivo e inhibidores de etileno en la embriogénesis somática de café. *Revista mexicana*; [consultado el 24 de jun. de 2021]. 7(7):1749–1757. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n7/2007-0934-remexca-7-07-1749.pdf>.
- Martin D. 2017. Embriogénesis somática: una herramienta biotecnológica para la propagación in vitro de guayaba. *Biotecnología Vegetal*; [consultado el 8 de abr. de 2021]. 17(4):209–220. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/563/html>.
- Montes ME. 2019. Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (*Coffea arabica*) resistente a roya (*Hemileia vastatrix*). *Cultivos Tropicales*; [consultado el 28 de jun. de

- 2021]. 40(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362019000200004&lang=es.
- Oliveros M. 2011. Cultivo de Café. Guatemala: Blogger; [consultado el 11 de jul. de 2021]. <http://cultivocafe.blogspot.com/2011/08/requerimientos-del-cafe.html>.
- Paredes G, Peña C, Jadán M. 2013. Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. 34(1-2):63–83. <https://www.semanticscholar.org/paper/Obtenci%C3%B3n-de-embriones-en-fase-cotiledonar-de-Caf%C3%A9-Paredes-Pe%C3%B1a/f8c44aa1525c1f36070f16f5333937b194350f6f>. doi:10.26807/remcb.v34i1-2.236.
- Pineda J, Urias C. 2018. Manejo de tejido y la productividad del cafeto. [sin lugar]; [consultado el 22 de may. de 2021]. <https://cutt.ly/RQCoETS>.
- Ponce RS. 2020. Historia del café en Honduras. Honduras; [consultado el 12 de jun. de 2021]. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:uw-Reu6vR6sJ:https://www.ihcafe.hn/%3Fmdocs-file%3D4256+&cd=19&hl=en&ct=clnk&gl=hn>.
- Promecafe, IICA. 2011. Mejoramiento Genético del Café en América Central. Guatemala: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; [consultado el 25 de jun. de 2021]. <http://promecafe.net/documents/Publicaciones/mejoramiento%20genetico%20del%20caf%20en%20amrica%20central%20%20seleccin%20de%20clones%20de%20hbridos%20f1%20de%20coffea%20arabica%20y%20desarrollo%20tecnolgico.pdf>.
- Roca WM, Mroginski LA. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT. 969 p. (CIAT. Publicacion; vol. 151). ISBN: 958-9183-15-8; [consultado el 9 de abr. de 2021]. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf.
- Sánchez K, Cabrera R, Jiménez J. 2019. Induction of somatic embryogenesis from foliar explants in three varieties of coffee. *Scientia Agropecuaria*. 10(2):259–264. https://www.researchgate.net/publication/334352263_Induction_of_somatic_embryogenesis_from_foliar_explants_in_three_varieties_of_coffee. doi:10.17268/sci.agropecu.2019.02.11.
- Toledo D, editor. 2020. Coffee: Production and research. London: IntechOpen. 1 Online-Ressource. ISBN: 978-1-83880-885-3; [consultado el 12 de jul. de 2021].
- Velasquez R. 2019. Guia de variedades de café. Guatemala. Informe no. 49; [consultado el 7 de may. de 2021]. <https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%C3%ADa-de-variedades-Anacaf%C3%A9.pdf>.
- Vinod Kumar, Madhava Naidu M, Ravishankar GA. 2006. Developments in coffee biotechnology—in vitro plant propagation and crop improvement. India: [sin editorial]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11240-006-9134-y.pdf>.