

Efecto de fitohormonas en la callogénesis *in vitro* de café -variedad Obatá-

Jorge Francisco Cruz Muñoz

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Efecto de fitohormonas en la callogénesis *in vitro* de café -variedad Obatá-

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jorge Francisco Cruz Muñoz

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Efecto de fitohormonas en la callogénesis *in vitro* de café -variedad Obatá-

Jorge Francisco Cruz Muñoz

Resumen. Las plagas y enfermedades en el cultivo de café han incrementado, requiriendo el uso de tecnologías para propagar variedades resistentes. Una de las principales alternativas para producir plantas sanas y genéticamente iguales en grandes cantidades es la propagación *in vitro*. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de fitohormonas en explantes foliares de café variedad Obatá. Las fitohormonas evaluadas fueron ácido salicílico 1.38 µg/L, 2,4-D 0.5 mg/L, 2,4-D 0.25 mg/L+ kinetina 0.5 mg/L, picloram 0.1 mg/L y thidiazuron (TDZ) 0.2 mg/L. Se evaluó el crecimiento callogénico, presencia en bordes y nervadura y características del callo (compacto y/o friable) por explante para cada uno de los tratamientos. Se utilizó un diseño completamente al azar. El ácido salicílico, TDZ y picloram no indujeron la formación de callo en los explantes. El medio suplementado con 2,4-D + kinetina fue el que presentó el mayor porcentaje (96%) de explantes con callo. 2,4-D presentó mayor porcentaje de callo compacto (69%) y de 2,4-D + Kinetina presentó mayor porcentaje de callo compacto + friable (45%) y mayor porcentaje de bordes con callo (79%). El medio suplementado con 2,4-D 0.25 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L es el más favorable para la formación de callo compacto en explantes foliares de café variedad Obatá.

Palabras clave: 2,4-D, ácido salicílico, explantes foliares, kinetina, picloram, thidiazuron.

Abstract. Pests and diseases in coffee cultivation have increased, requiring the use of technologies to propagate resistant varieties. One of the main alternatives to produce healthy and genetically equal plants in large quantities is *in vitro* propagation. The objective of this study was to evaluate the effect of phytohormones in leaf explants of Obatá coffee variety. The phytohormones evaluated were salicylic acid 1.38 µg/L, 2,4-D 0.5 mg/L, 2,4-D 0.25 mg/L + kinetin 0.5 mg/L, picloram 0.1 mg/L and thidiazuron (TDZ) 0.2 mg/L. callogenic growth, edge and leaf vein presence and callus characteristics (compact and/or friable) were evaluated by explant for each of the treatments. Was used a completely randomized design. Salicylic acid, TDZ and picloram did not induce callus formation in explants. The medium supplemented with 2,4-D + kinetin was the one with the highest percentage (96%) of explants with callus. 2,4-D had a higher percentage of compact callus (69%) and 2,4-D + Kinetin had a higher percentage of compact + friable callus (45%), higher percentage of callus borders (79%). The medium supplemented with 2,4-D 0.25 mg/L + Kinetin 0.5 mg/L is the most favorable for the formation of compact callus in leaf explants of Obatá coffee variety.

Key words: 2,4-D, kinetin, leaf explants, picloram, phytohormones, salicylic acid, thidiazuron.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4. CONCLUSIONES	12
5. RECOMENDACIONES	13
6. LITERATURA CITADA	14

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo de Murashige y skoog modificado a la mitad de concentración de sales para la inducción a callogénesis en explantes de hojas de café -variedad Obatá-	4
2. Porcentaje de explantes con callo de café -variedad Obatá- como respuesta a 2,4-D, 2,4-D+Kinetina y Ácido salicílico, TDZ y Picloram	6
3. Caracterización del callo obtenido de explantes foliares de café -variedad Obatá- como respuesta a 2,4-D y Kinetina	7
Promedio de bordes con callo y porcentaje de explantes con crecimiento callogénico en bordes y nervaduras en explantes de hojas de café -variedad Obatá-	8
Figuras	Página
1. Café (<i>Coffea arabica</i>) -variedad Obatá-, explante foliar en medio MS y establecimiento de explantes foliares	3
2. Características del callo en explantes foliares de café -variedad Obatá-.....	5
3. Explantes foliares de café -variedad Obatá- en medio sin fitohormona.....	8
4. Efecto del 2,4-D 0.5 mg/L en explantes foliares de café -variedad Obatá-.....	9
5. Efecto de 2,4-D 0.25 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L en explantes foliares de café -variedad Obatá-.....	10
6. Explantes foliares de café -variedad Obatá- en medio suplementado con Ácido salicílico	11

1. INTRODUCCIÓN

Los cultivos de café en Latinoamérica han incrementado notablemente, a lo largo de los años los productores han tratado de aplicar tecnologías que les permitan ser más eficientes al momento de producir para así lograr mayor rentabilidad (ANACAFE 2016). Establecer una finca toma entre dos a tres años dependiendo de la zona en la que se encuentre, esto debido a cada uno de los pasos que se deben llevar a cabo como ser la elaboración del semillero, establecimiento de vivero y siembra (World Coffee Research 2018). Realizar la elaboración del semillero cuenta con una limitante que es la variabilidad genética al momento de establecer una plantación ya que el café es un cultivo autógamo es decir que se puede autopolinizar, pero a la vez se puede dar la polinización cruzada causado por agentes polinizadores como el viento y abejas que podría llegar hasta un 9% (Velásquez 2019). Por lo cual, el reto para el futuro es disminuir la variabilidad genética, tiempo de selección de semilla y uso de plantas que sean resistentes a enfermedades por medio de nuevas tecnologías al momento de establecer un cultivo de café (Anzueto *et al.* 2013).

El café es un cultivo que fue afectado por la roya (*Hemileia vastatrix* Berk y Broom), la cual tuvo un fuerte impacto provocando grandes pérdidas en producción y económicas a los productores (Barrera Gaytán 2017). La pérdida en producción debido a la roya se encuentra entre 23 y 50% por hectárea (CENICAFE 2017). Por lo cual los institutos del café en los países latinoamericanos realizaron investigaciones para lograr introducir una variedad resistente a la roya. El instituto hondureño del café (IHCAFE), introdujo desde Brazil la variedad llamada Obatá, la cual presenta resistencia a roya, así como una excelente calidad de taza y altas producciones que en promedio llegan a 2.9 toneladas por hectárea (IHCAFE 2017).

El café es un cultivo que se propaga de manera sexual y asexual, la ventaja de realizar la propagación de manera sexual es la reducción en costo. Sin embargo, al realizar propagación sexual la variabilidad genética es mayor. Normalmente se propaga de manera asexual para evitar la variabilidad genética. Al realizar la propagación de manera asexual mediante injertos en patrones con resistencia a enfermedades, hongos y bacterias incrementa el costo, debido a eso los productores propagan sus cultivos de manera sexual, esto mediante la recolección de semilla para establecimiento de vivero (Anzueto *et al.* 2015). Sin embargo, se pueden utilizar distintas alternativas para combatir enfermedades como la roya y también al hacer uso de tecnologías se puede propagar plantas de manera masiva a partir de tejidos vegetales de una planta y reducir la variabilidad genética.

Una de las principales alternativas para producir plantas genéticamente iguales masivamente es la propagación *in vitro* la cual requiere el uso de medios suplementados con sales minerales, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento los cuales permiten el control del crecimiento y desarrollo en los tejidos. En cultivo de tejidos de café

se han utilizado fitohormonas para la inducción de callogénesis y embriogénesis somática. Para la inducción a callogénesis ha sido común el uso de auxinas como el 2,4-D en combinación con otras fitohormonas como las citoquininas. Estudios presentaron que el ácido salicílico induce multiplicación celular en café Caturra Rojo, produciendo aumento en el tamaño y cantidad de callos obtenidos a partir de explantes foliares (Quiroz Figueroa 2001).

El uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo es muy importante ya que tienen impacto en la división celular, de esta manera induciendo la formación de callo. Los medios de cultivo son suplementados con fitohormonas para promover la formación callogénica. Entre los grupos de fitohormona más utilizadas se encuentran auxinas y citoquininas. Las auxinas utilizadas en este estudio fueron 2,4-D y Picloram, las citoquininas fueron Thidiazuron (TDZ) y Kinetina en este estudio también se evaluó el efecto de ácido salicílico. La auxina 2,4-D a bajas concentraciones genera aceleración en división celular causando proliferación en la formación de callos (Tapia Bernal 2018). El ácido salicílico es un elicitador que se encarga de promover la formación de fitoalexinas para generar resistencia a hongos, bacterias y virus, también ha sido usado para inducción a callogénesis (Quiroz Figueroa 2001). El picloram es un herbicida de post emergencia utilizado en la inducción a proliferación celular en material vegetal para cultivos *in vitro*.

Las citoquininas como la kinetina inducen la formación de callo ya que promueve la división celular también tiene características enfocadas en el crecimiento y tamaño celular. Esta fitohormona es muy utilizada en propagación de plantas en cultivo de tejidos. El TDZ es considerado un inductor o regulador de crecimiento en plantas leñosas y herbáceas generalmente induce la formación de brotes y embriones somáticos, también es utilizado como herbicida sintético (Dávila 2011).

En el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano se han realizado estudios en propagación *in vitro* de café con variedades Lempira, Geisha y Sarchimor a partir de láminas foliares y meristemas axilares colocados en medio suplementado con fitohormonas en establecimiento y multiplicación para evaluar sobrevivencia y número de brotes por explante y determinar el medio adecuado para inducción a callogénesis (Morales Del Cid 2017; Lozano Kretschmar 2014). Con la variedad Obatá este es el primer estudio realizado, esta variedad es muy difícil de propagar de manera sexual ya que en Honduras no hay semilla disponible en grandes cantidades por lo que la propagación masiva mediante técnicas de cultivo de tejidos es una buena alternativa.

Las técnicas de micropropagación permiten la eficiencia al momento de producir café resistente a enfermedades ya que se logra la multiplicación masiva de plantas genéticamente iguales. La micropropagación de café -variedad Obatá- será de gran beneficio para muchas personas debido a la gran importancia económica de este cultivo en los países centroamericanos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de ácido salicílico, 2,4-D, 2,4-D + Kinetina, Thidiazuron (TDZ) y Picloram en la formación de callo a partir de láminas foliares de café -variedad Obatá-.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos en Zamorano, Honduras.

Fuente de Material Vegetal. Se utilizaron hojas de las plantas de café -variedad Obatá- provenientes de vivero de café establecido en la finca Planes de Cosire, San Juan Intibucá, Honduras. Las plantas obtenidas de la finca se trasplantaron en Zamorano para su establecimiento previo a la toma de material vegetal. Estas plantas madres fueron tratadas con fungicidas y bactericidas sistémicos y de contacto como el Sulfato de Gentamicina + Clorhidrato de Oxitetraciclina 1.5 g/L y Azoxystrobin + Difenconazol 0.3 g/L dos días antes de la recolección de explantes para la siembra. Para el ensayo se tomaron hojas de la parte apical de la planta.

Desinfección superficial del material vegetal. Se realizó el lavado del material vegetal con agua y jabón para su desinfección. Después, se sumergieron las hojas por 30 minutos en una solución de NaClO al 30% v/v (Cloro líquido comercial con 4.7% de hipoclorito de sodio) adicionándole TweenTM80 (2 gotas/100mL) (Morales Del Cid 2017). Después de completar con el tiempo establecido se realizó el triple lavado dentro de la cámara de flujo laminar, utilizando agua destilada estéril con el fin de remover todos los residuos del NaClO. A continuación, se cortó las hojas en explantes de 1.5 × 2 cm. Por último, se procedió a colocar explantes en el medio con las distintas hormonas (Figura 1).



Figura 1. Café (*Coffea arabica*) -variedad Obatá-. A: Plantación de café -variedad Obatá- en Zamorano. B: Hojas jóvenes desinfectadas listas para extracción de explantes. C: Explante foliar. D: Establecimiento de explantes foliares.

Medio de cultivo basal. Se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (Cuadro 1) con las sales minerales a la mitad y suplementado con fitohormonas según el tratamiento a evaluar. Se realizó refrescamiento de medio al día 21 con el mismo medio y la suplementación de las fitohormonas. El pH del medio se ajustó a 5.6, y se solidificó el medio con Phytigel® 1.8 g/L.

Cuadro 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado a la mitad de concentración de sales para la inducción a callogénesis en explantes de hojas de café -variedad Obata-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	220.0000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	85.0000
	KNO_3	Nitrato de potasio	950.0000
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.0000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	825.0000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	3.1000
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0125
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.0125
	KI	Yoduro de potasio	0.4150
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.1500
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.1200
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	4.3000
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	25.0000
Compuestos orgánicos		Inositol	100.0000
		Cisteína	30.0000
		Tiamina	0.4000
		Sacarosa	30,000.0000

Fuente: Dublin 1991

Tratamientos evaluados. Los tratamientos evaluados fueron:

1. 2,4-D: 2,4-D 0.5 mg/L (Dublin, 1991)
2. 2,4-D + K: 2,4-D 0.25 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L (Morales Del Cid 2017)
3. AS: 1.38 μ g/L de ácido salicílico (Quiróz 2001)
4. TDZ: 0.2 mg/L por 10 días (Mata Quirós 2013) al día 11 después de establecimiento en el tratamiento pasaron a un medio sin hormonas.
5. Picloram 0.1 mg/L (Molina *et al.* 2015)
6. Testigo sin fitohormonas

Incubación. Los explantes establecidos se incubaron en el área de crecimiento la cual mantiene una humedad relativa de 70% y temperatura entre 24 y 26 °C. Los explantes fueron incubados en total oscuridad.

Variables Evaluadas. Las variables se evaluaron hasta que los explantes presentaban cambios en cada tratamiento, estas fueron:

- Presencia de callo por explante.
- Características del callo: el callo formado sobre cada explante se calificó según su característica con 5 al callo compacto, 3 a la combinación de callo friable y compacto, 1 al callo friable, y 0 a la ausencia de callo. Un callo compacto las células se encuentran agrupadas y tiene potencial embriogénico. Mientras que un callo friable las células se muestran más individualizadas y no tiene potencial embriogénico (Figura 2).
- Formación de callo en bordes y nervaduras: se contó el número de bordes que presentaron formación de callo por explante.



Figura 2. Características del callo en explantes foliares de café -variedad Obatá-. A: Callo Compacto. B: Callo Friable. C: Callo compacto + Friable.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar, se evaluaron seis tratamientos más el testigo, con 70 repeticiones por tratamiento.

Análisis estadístico. En el experimento se realizó análisis visual comparativo para evaluar la respuesta de los explantes y el desarrollo de callo y su caracterización. Se realizó un análisis de varianza con separación de medias mediante Duncan con probabilidad ≤ 0.05 se utilizó el programa estadístico Infostat 2018.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo crecimiento callogénico en los tratamientos 2,4-D 0.25 mg/L y 2,4-D 0.5 mg/L + kinetina 0.5 mg/L. El testigo y los tratamientos con TDZ, Picloram y Ácido salicílico no presentaron formación de callo (Cuadro 2). La mayor cantidad de explantes con crecimiento callogénico se presentó en el medio suplementado con 2,4-D 0.25 mg/L + kinetina 0.5 mg/L. Se obtuvo poco crecimiento callogénico en los explantes que se encontraban en el medio suplementado con 2,4-D 0.5mg/L debido a la diferencia en las concentraciones y la diferencia en suplementación con kinetina, esto coincide con el estudio realizado por Morales Del Cid (2017) al suplementar el medio con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L para acelerar el crecimiento callogénico. Ambas hormonas originaron callos en los bordes y nervaduras de los explantes.

Cuadro 2. Porcentaje de explantes con callo de café -variedad Obatá- como respuesta a 2,4-D, 2,4-D + Kinetina, Ácido salicílico, TDZ y Picloram.

Tratamiento	% explantes con callo
Testigo	00 c [‡]
2,4-D	46 b
2,4-D + Kinetina	96 a
Ácido Salicílico	00 c
TDZ	00 c
Picloram	00 c
CV	3.64
Probabilidad	0.0001
R ²	0.78

[‡]Valores en la misma columna con diferentes letras, presentan diferencia estadística entre sí.

Para los tratamientos suplementados con 2,4-D y 2,4-D + Kinetina los callos formados presentaron bajo porcentaje de callo friable y en el caso de 2,4-D presentó mayor porcentaje de callo compacto (Cuadro 3). Sin embargo, los explantes en el tratamiento de 2,4-D + Kinetina presentaron mayor porcentaje de callo compacto + friable. El callo con mayor potencial embriogénico es el compacto ya que su crecimiento es constante en el medio de cultivo hasta lograr inhibir la fitohormona con la cual fue suplementado el medio (Tapia Bernal 2018). El tratamiento que muestra callo compacto siendo el deseable con mayor potencial embriogénico es el 2,4-D 0.5 mg/L.

Cuadro 3. Caracterización del callo obtenido de explantes foliares de café -variedad Obatá- como respuesta a 2,4-D y Kinetina.

Tratamientos	Promedio de callo	Friable	Compacto + Friable	
			% de callo	
2,4-D	1.89 b [‡]	15	69	16
2,4-D + Kinetina	3.47a	13	42	45
CV	5.86			
Probabilidad	0.0001			
R ²	0.67			

[‡]Valores en la misma columna con diferentes letras, presentan diferencia estadística entre sí.

Los resultados de formación de callo en bordes y nervaduras para el medio suplementado con 2,4-D + Kinetina muestra que el promedio de número de bordes con callo tuvo una diferencia significativa comparada con el tratamiento suplementado con 2,4-D (Cuadro 4). Entre estos dos tratamientos el 2,4-D + Kinetina es el más favorable para inducción a formación de callo. La mayor formación de callo se presentó en el tratamiento 2,4-D + Kinetina posiblemente se debe a la combinación de auxinas y citoquininas.

Los explantes foliares en medio sin fitohormona no mostraron formación de callo (Figura 3), estos resultados concuerdan con lo observado por Morales Del Cid (2017) en su experimento con explantes foliares de café variedad Geisha. Los explantes foliares en medio sin fitohormona no mostraron formación de callo (Figura 3), estos resultados concuerdan con lo observado por Morales Del Cid (2017) en su experimento con explantes foliares de café variedad Geisha.

Cuadro 4. Promedio de bordes con callo y porcentaje de explantes con crecimiento callogénico en bordes y nervaduras en explantes foliares de café -variedad Obatá-.

Tratamiento	Promedio de bordes con callo/ explante	% 1-2 bordes	%3-4 bordes	% borde + Nervadura
2,4-D	1.54 b [‡]	23	54	23
2,4-D + Kinetina	3.94 a	10	61	29
CV	5.49			
Probabilidad	0.0001			
R ²	0.78			

[‡]Valores en la misma columna con diferentes letras, presentan diferencia estadística entre sí.

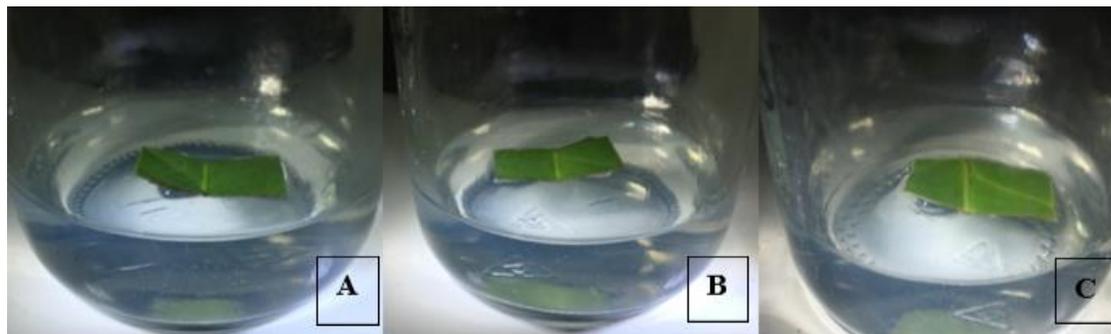


Figura 3. Explantes foliares de café -variedad Obatá- en medio sin fitohormona. A: Establecimiento de explante foliar primer día. B: Día 14 no mostró ningún cambio. C: Día 21 refrescamiento de medio y no mostró ningún cambio.

Los explantes que se encontraban en medio suplementado con fitohormona 2,4-D mostraron enrollamiento a partir del día 14 y a continuación se observó formación de callo en nervaduras y bordes al día 35. A los 50 días el callo cambió de coloración a blanca y café y era más compacto (Figura 4).

En los explantes foliares en medio MS suplementado con 2,4D 0.25 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L se observó enrollamiento en los explantes al día 14. Al día 23, se observa la formación de callo en los explantes. De manera similar hubo formación de callos en nervaduras y bordes (Figura 5).

Estos datos concuerdan con lo observado por Morales del Cid (2017) utilizando un medio suplementado con una concentración mayor de 2,4-D 1.1 mg/L + kinetina 4.3 mg/L en inducción a callogénesis en café variedad Geisha, obteniendo resultados en formación de callo a los 18 días. El aumento en tiempo para la formación de callo a partir de explantes foliares de café -variedad Obatá- posiblemente se debe al uso de menor concentración de fitohormona utilizada.

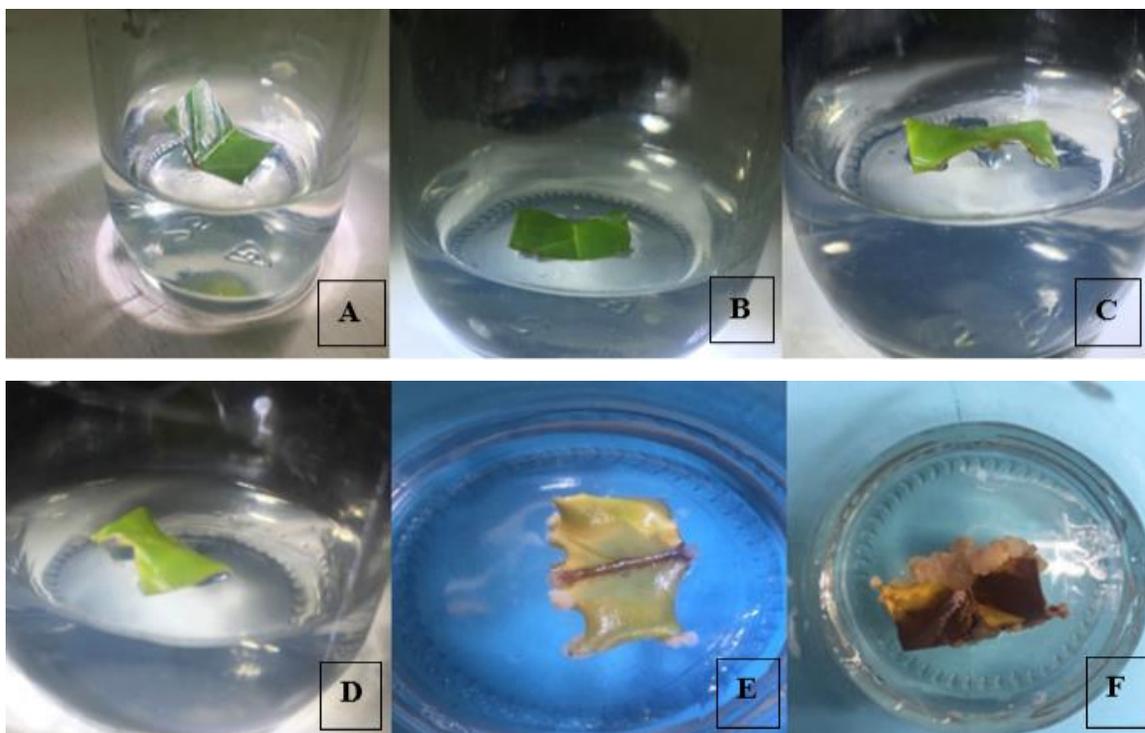


Figura 4. Efecto del 2,4-D 0.5 mg/L en explantes foliares de café -variedad Obatá- A: Explante en el día 1. B: día 8. C: 14. D: día 21. E: día 35 - 40. F: día 50.

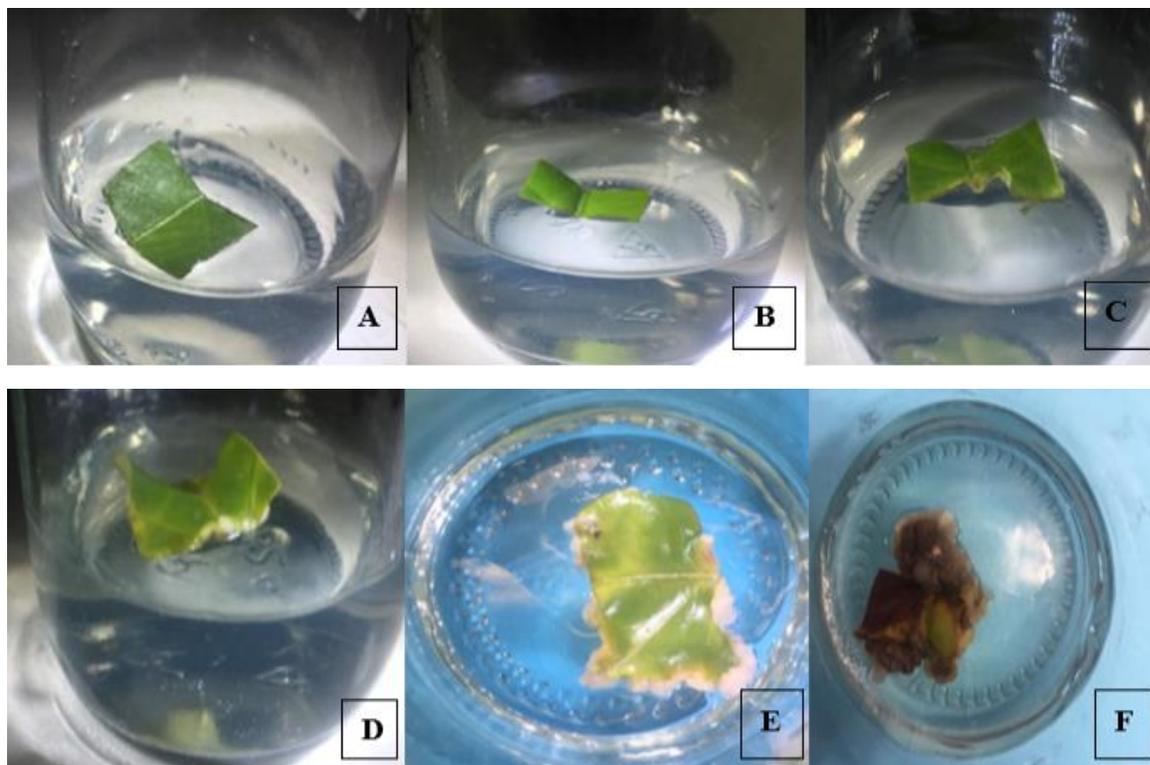


Figura 5. Efecto de 2,4-D 0.25 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L en explantes foliares de café - variedad Obatá- A: medio MS B: explante en el día 9. C: explante en el día 14. D: inicia el crecimiento de callos a los 23 días. E: callo en los bordes. F: Cambio en la coloración al día 56.

El tratamiento suplementado con ácido salicílico 1.38 μ g/L no presentó formación de callo. Según Quiroz Figueroa (2001) la respuesta de los explantes de café variedad Caturra Rojo si presentan cambios a concentraciones bajas de ácido salicílico para la inducción de crecimiento celular. En el café variedad Caturra Rojo se presentó formación de callo ya que es una variedad obtenida por una mutación del Bourbon, y la variedad Obatá se deriva de un cruce del híbrido de Timor \times Villa Sarchi siendo un cultivar con alta resistencia a la oxidación (World Coffee Research 2018).

Los explantes foliares establecidos en medio MS suplementado con las fitohormonas TDZ 0.2 mg/L y Picloram 0.1 mg/L presentaron enrollamiento al día ocho, sin embargo, en los días posteriores, no presentaron más cambios. El Picloram es una auxina utilizada para inducir la proliferación de callo y TDZ es una citoquinina que se utiliza mucho en la propagación *in vitro* debido a que promueve la división celular y formación de brotes (González Paneque 2006). La ausencia de formación de callo puede atribuirse a la variedad Obatá utilizada en este experimento y a que las hormonas no se combinaron. Blanco Flores *et al.* (2016) en cultivo de piña combinó las dos hormonas en medio con TDZ 20 mg/L + picloram 10 mg/L y observó formación de callo.

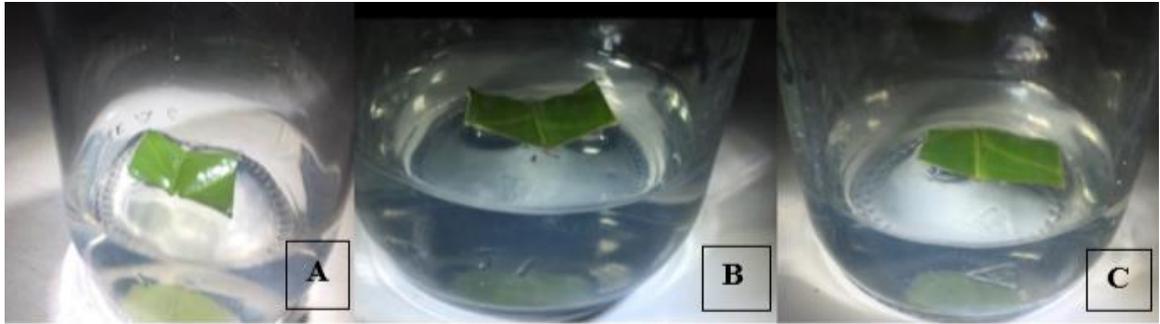


Figura 6. Explantes foliares de café -variedad Obatá- en medio suplementado con ácido salicílico A: Al día 1 B: Al día 8 C: Al día 60.

4. CONCLUSIÓN

El medio suplementado con 2,4-D 0.25 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L es el más favorable para la formación de callo compacto en explantes foliares de café -variedad Obatá-.

5. RECOMENDACIONES

- Hacer pruebas con la suplementación de fitohormonas 2,4-D y 2,4-D + kinetina combinadas con TDZ, Ácido salicílico, y Picloram para evaluar su efecto en callogénesis y embriogénesis somática.
- Hacer uso del callo compacto para inducción a embriogénesis somática.

6. LITERATURA CITADA

- ANACAFE. 2016. Evaluación de tres variedades de café, Obatá, Tupí y Oro Verde, provenientes de Brasil, en Finca las Flores, Barbarena, Santa Rosa, Guatemala, C.A [consultado 2018 Oct 20]; 2-9 p. <http://anacafe.org/glifos/images/5/5e/Boletin-tecnico-diciembre2017.pdf>
- Anzueto F, Pappa F, Duarte MT, Méndez N. 2013. Densidad de siembra. El Cafetal. [consultado 2018 oct 12]; (35): 8-9 p. http://www.anacafe.org/glifos/images/c/c2/2013_36_El_Cafetal.pdf
- Anzueto F, Pappa F, Duarte MT, Méndez N. 2015. Selección variedad de café resistente a la roya. El Cafetal. [consultado 2018 Nov 6]; (41): 4-5 p. http://anacafe.org/glifos/images/0/0c/REVISTA_No._41_EL_CAFETAL_ENE-FEB-MAR-ABR_2015-cambio.pdf
- Barrera Gaytán J. 2017. La roya implacable enemigo del café [consultado 2018 Nov 6]; 11 p. <http://ref.inacol.edu.mx/cafeinred/prcyccver/RoyaCafe-ClaridadesAg.pdf>
- Blanco Flores H, Cedeño T, García E. 2016 Regeneración *in vitro* de plantas de piña (*Ananas comosus*) ecotipo amazónico Gobernadora [Tesis] Universidad Central de Venezuela- Venezuela. 20 p.
- CENICAFE. 2017. Manejo de la roya. [internet]. Manizales (Colombia). [consultado 2019 2 Sep]. <https://www.cenicafe.org/es/publications/AVT0480.pdf>
- Dávila W. 2011. Evaluación de la actividad hormonal de: Thidiazuron (TDZ) Thidiazuron con Ácido naftalene acético (TDZ/ANA) vs Bencil amino purina (BAP/ANA); 6-Bencil amino purina con ácido naftalene acético (BAP/ANA); como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de Balsa (*Ochroma lagopus*). [Tesis] Escuela politécnica del ejército-Sangolquí. 156 p.
- Dublin P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. Colombia: CIAT 598 p.

- González Paneque O. 2006. Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (*Ipomea batatas*). [Tesis] Instituto nacional de ciencias agrícolas-La Habana. 143 p.
- IHCAFE. 2017. Sistema de alerta temprana para el cultivo del café. [internet] Santa Bárbara (Honduras) [consultado 2019 20 Sep] https://www.ihcafe.hn/Ihcafe_nueva2017.sql
- Lozano Kretschmar G. 2014. Propagación *in vitro* de café (*coffea arabica*) –variedad Lempira- a partir de meristemas. [Tesis] Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 31p.
- Mata Quirós A. 2013. Evaluación de dos protocolos para la inducción de embriogénesis somática en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) seleccionados por el programa de mejoramiento genético de cacao del CATIE. [Tesis] Centro Agronómico Tropical De Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 96p.
- Molina M, Aviles Z, Bonomo MLC, Diaz L. 2015. International Journal of Innovation and Applied Studies. [consultado 2019 May 14]; 11(3): 771-777. Esp. <http://www.ijias.issr-journals.org/>
- Morales del Cid R. 2017. Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.) -variedades Geisha y Sarchimor- a partir de láminas foliares y meristemas axilares [Tesis] Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 23p.
- Tapia Bernal B. 2018. Inducción de callo embriogénico en camote (*Ipomea batatas* L.) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético. [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-San Antonio de Oriente. 16 p.
- Quiroz Figueroa F. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. Cell Biology and Morphogenesis. 20:679-684
- Velásquez R, 2019. Guía de variedades de café Guatemala. ANACAFE. [consultado 2019 Sep 25]; (2):1-48 p. <https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%c3%ada-de-variedades-Anacaf%c3%a9.pdf>

World Coffee Research. 2018. Variedad de alta producción y resistente a la roya. Variedad brasileña recientemente introducida a Costa Rica. Variedades de Café Arábica | Obatá Rojo. [consultado 2018 oct 10]. <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/es/varieties/Obatá>.