

Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas

Guillermo Andrés Lozano Kretzschmar

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas

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

Presentado por

Guillermo Andrés Lozano Kretzschmar

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2014

Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas

Presentado por:

Guillermo Andrés Lozano Kretzschmar

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

Renan Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Mauricio Huete Ramirez, Ing.
Asesor

Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas

Guillermo Andrés Lozano Kretzschmar

Resumen: La propagación *in vitro* es la multiplicación masiva de material vegetal genéticamente igual a la planta madre y libre de enfermedades. El objetivo de este trabajo fue elaborar el protocolo de micropropagación de café -variedad Lempira- para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano, Honduras. Para el establecimiento se utilizó meristemas plagiotrópicos, el medio de Murashige y Skoog modificado con las sales al 50% y las vitaminas al 100% suplementado con 0.19 mg/L de ANA y 2.25 mg/L de BAP. En la multiplicación se utilizaron las sales de Murashige y Skoog con 100 mg/L de inositol, 30 mg/L de cisteína, 1 mg/L de BAP y 30 g/L de sacarosa y en el subcultivo cuatro también se suplementó con 0.05 mg/L de ácido giberélico. Para enraizamiento se utilizó las sales del medio Murashige y Skoog al 50% suplementado con 1 y 5 mg/L de ANA y 10 g/L de sacarosa haciendo un choque hormonal por siete días. En el enraizamiento *ex-vitro* se trató la base de los microesquejes con 0.01% de AIB y se utilizó Jiffys[®]. En el establecimiento se obtuvo una sobrevivencia del 13% y un inicio del crecimiento de los meristemas en el día 16. En la etapa de multiplicación se obtuvo en promedio 6.3 brotes por explante establecido. Los microesquejes después de 50 días de inoculados en el medio de cultivo de enraizamiento no formaron raíces. Se observó formación de raíces *ex-vitro* en el 21% de los esquejes estos se caracterizaron porque formaron callo en su base antes de ser trasplantados y tratados con el AIB.

Palabras clave: Auxinas, choque hormonal, enraizamiento, establecimiento, hormonas, micropropagación, multiplicación.

Abstract: *In vitro* culture is the massive multiply of heterogeneous genetic structures free of diseases. The main objective of this work is to make the protocol of micropropagation of coffee -Lempira variety- for the Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano, Honduras. (Tissue culture lab at Zamorano Honduras). For the establishment it was used plagiotropic meristems with the medium of Murashige y Skoog modified with the salts at a 50% and vitamins at a 100% and with 0.19 mg/L of ANA and 2.25 mg/L of BAP. In multiplication it was used the salts of the medium of Murashige and Skoog with 100 mg/L of inositol, 20 mg/l of cysteine and 1 mg/L of BAP in the subcultures and in the fourth subculture also with 0.05 mg/L of gibberellic acid. For rooting it was used the half part of the medium of Murashige and Skoog with 1 and 5 mg/L of ANA and 10 g/L of syrup making an hormone shock for seven days. We also tried taking root *ex-vitro*, sowing cuttings in Jiffys® with 0.01% of AIB at the base. At the establishment we got a survival of 13% and the meristems started to grow at the day 16. In the multiplication we got an average of 6.3 new shoots for each cutting. The micro cuttings after 50 days didn't have any roots. We had roots *ex-vitro* in the 21% of the cuttings, this where the ones that presented callus at the base treat with AIB.

Key words: Auxins, establishment, hormone, hormone shock, micropropagation, multiplication, rooting.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4 CONCLUSIONES.....	18
5 RECOMENDACIONES.....	19
6 LITERATURA CITADA	20
7 ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado para establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.	6
2. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado para la multiplicación (subcultivo 1,2 y 3) de microesquejes de café -variedad Lempira-.	7
3. Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado para la multiplicación (subcultivo 4) de microesquejes de café -variedad Lempira-.	8
4. Medio basal de Murashige y Skoog (1962) modificado para el enraizamiento de microesquejes de café -variedad Lempira-.	10
5. Tratamientos usados para estimular el enraizamiento de microesquejes de café -variedad Lempira-.	11
6. Producción de brotes en etapa de multiplicación utilizando meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.	15
Figuras	Página
1. Preparación de esquejes de café -variedad Lempira- para realizar su desinfección previa al establecimiento <i>in vitro</i>	4
2. Extracción de meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira- con ayuda del estereoscopio.	4
3. Meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.	5
4. Esquejes de café -variedad Lempira- obtenidos a partir del establecimiento de meristemas plagiotrópicos.	9
5. Esquejes de café -variedad Lempira- establecidos <i>ex-vitro</i> para su enraizamiento.	12
6. Esquejes de café -variedad Lempira- establecidos en Jiffys® y cubiertos Agribón® con tratamiento de 0.1% de AIB en su base para su enraizamiento.	12
7. Formación de brotes a partir de meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.	14

8. Microesqueje de café -variedad Lempira- con un brote.	15
9. Callo presentado en la base de un esqueje de café -variedad Lempira- a los siete días de haber sido trasplantado a medio de enraizamiento <i>in vitro</i>	16
10. Raíces en un esqueje de café -variedad Lempira- enraizado <i>ex-vitro</i>	17

Anexos	Página
--------	--------

1. Plantas madre de café -variedad Lempira- de donde se obtuvo el material vegetal para establecer los explantes <i>in vitro</i>	22
2. Inmersión en la solución desinfectante de benomilo y estreptomicina.	23
3. Inmersión en la solución de cloro al 30% vol/vol.	23

1. INTRODUCCIÓN

El sector cafetalero está sufriendo actualmente una gran crisis debido a la infestación por el hongo *Hemileia vastatrix* conocido comúnmente como roya del café. La roya del café apareció por primera vez en Centroamérica en 1976, pero nunca había afectado la producción tan gravemente como en el ciclo 2012-2013 (*PROMECAFÉ e IICA 2013*).

El impacto económico de la roya del café en la región centroamericana y Caribe es alto. Al final del ciclo cafetero 2012/2013 se estima que el 16.4% de la producción de café de la región se perdió por la roya, el área afectada estimada en 593,037 Hectáreas (54.8% del total), la mano de obra desplazada fue de en 373,584 personas (17.2% del total). La pérdida de cosecha fue de 3.5 millones de sacos de 60 kilos (19% del total), con \$499 millones (16% del total) de divisas no percibidas (PROMECAFE).

Este hongo se presenta en la planta como tejido necrótico en las hojas y en los pedúnculos causando la caída de los granos de café. En los últimos años se han desarrollado variedades resistentes a la roya pero estas son híbridos de los que aún no se tiene gran cantidad de semillas para su propagación sexual. Al establecer métodos de propagación *in vitro* de este cultivo, se puede hacer una propagación masiva de estas variedades y se puede seleccionar la planta que cuente con las mejores características ya que con este método se obtienen plantas genéticamente iguales. Al utilizar esta técnica de propagación se podrá en un tiempo más corto aumentar la cantidad de plántulas de variedades élite (Ayala 2013).

En comparación con los procedimientos hortícolas de propagación asexual convencional, la técnica de micropropagación presenta las siguientes ventajas: tasas de multiplicación mucho más elevadas, material (microesquejes) de tamaño reducido que puede transportarse a largas distancias a menor costo y producción de material vegetal libre de enfermedades (Dublin 1991).

Teniendo en cuenta los costos de producción, relativamente altos de las plantas *in vitro*, es recomendable utilizar esta técnica para propagar plantas que realmente vayan a tener un impacto económico positivo en la producción y calidad del café (Dublin 1991). Este sería el caso de la reproducción de los cafetos de *C. arábica* y de los híbridos de individuos de alto desempeño, con resistencia a la roya, producción abundante y vigor híbrido, con problemas de multiplicarse por vía sexual por falta de material (Dublin 1991).

Desde hace varios años se cuenta con varios procedimientos de reproducción vegetativa *in vitro* de los cafetos, tanto de *C. arabica* y *C. canephora* como de los híbridos interespecíficos de estas dos especies (Dublin 1991). Los microesquejes plagiotrópos pueden obtenerse de diferentes fuentes: yemas plagiotrópas preexistentes (laterales o

terminales), yemas plagiotrótopas neoformadas, reversión de la plagiotropía, y cultivo de ápices (Dublin 1991).

Se han documentado procedimientos de micropropagación de café entre ellos se destaca el de Dublin con el que se puede obtener hasta 20,000 plántulas aproximadamente en un año a partir de una yema, esto es un altísimo rendimiento para la propagación *in vitro* (Ayala 2013). Este método consiste en utilizar las yemas obtenidas de una planta *in vitro* y de ella propagar más. Existe otro método desarrollado por Nakamura y Sondahl el cual consiste en establecer yemas ortótropas para la propagación mediante brotes del microesqueje primario, con este método se logra conseguir 7.5 brotes por yema en promedio de seis meses (Ayala 2013).

En el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano se ha trabajado en desarrollar un protocolo para micropropagar café a partir de meristemas plagiotrótopos preexistentes, se utilizó meristemas en lugar de yemas para poder reducir la oxidación fenólica y contaminación de los explantes, ya que a menor tamaño del explante a establecer menor es el riesgo de contaminación. Se ha logrado llegar a las etapas de establecimiento y multiplicación con éxito, pero no se ha logrado enraizar los esquejes obtenidos. Con este estudio se pretende:

- Elaborar el protocolo de establecimiento y multiplicación *in vitro* de café.
- Establecer la tasa de multiplicación.
- Determinar el medio de cultivo adecuado para estimular el desarrollo de raíces en los esquejes de café -variedad Lempira-.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales situado en las instalaciones de la Carrera de Ingeniería Agronómica Zamorano. Las plantas utilizadas fueron previamente establecidas a partir de semillas de café -variedad Lempira- teniendo al momento de la extracción del material vegetal dos años de edad. Estas plantas están situadas en el invernadero dos del laboratorio.

Establecimiento. El establecimiento de las plantas *in vitro* se realizó por medio de meristemas plagiotrópicos. Para el establecimiento del material vegetal se desinfectaron los esquejes, donde se encuentran los meristemas, haciendo un lavado con agua y jabón (Figura 1) y sumergiéndolo por diez minutos en 1 g/L de benomilo y 0.3 g/L de estroptomicina. Luego se le hizo una inmersión en una solución de NaOCl al 30% v/v (Magia Blanca con 4.72% de hipoclorito de sodio) con Tween80 durante 30 minutos. En la cámara de flujo laminar se realizaron tres lavados en agua destilada estéril para eliminar el NaOCl. Al momento de extraer los meristemas se sumergieron en una solución de antioxidante estéril (100 mg/L de ácido ascórbico y 150 mg/L de ácido cítrico) durante diez segundos.

La extracción de los meristemas se realizó con ayuda de bisturí y aguja. Con el bisturí se cortó el pedúnculo al ras de la rama plagiotrópica primaria para tener un acceso más fácil y poder retirar el material vegetal que cubre el meristema (Figura 2). Al momento de tenerlo descubierto se retira de la rama plagiotrópica con la aguja y se pone inmediatamente en contacto con la solución antioxidante estéril previo a su siembra (Figura 3).

Multiplificación. La multiplicación se llevó a cabo con las plantas establecidas a partir de meristemas. Se utilizó el método de Nakamura y Sondahl el cual consta en realizar la separación de los brotes adventicios de las esquejes. Según Nakamura y Sondahl se puede obtener un promedio de 7.5 brotes nuevos por cada esqueje.

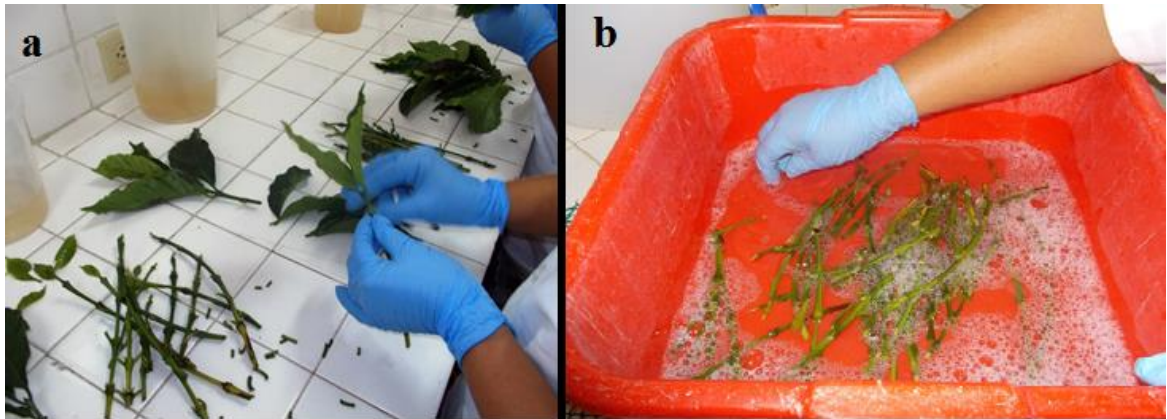


Figura 1. Preparación de esquejes de café -variedad Lempira- para realizar su desinfección previa al establecimiento *in vitro*. (a) Eliminación de hojas (b) Lavado del material vegetal con agua y jabón líquido.

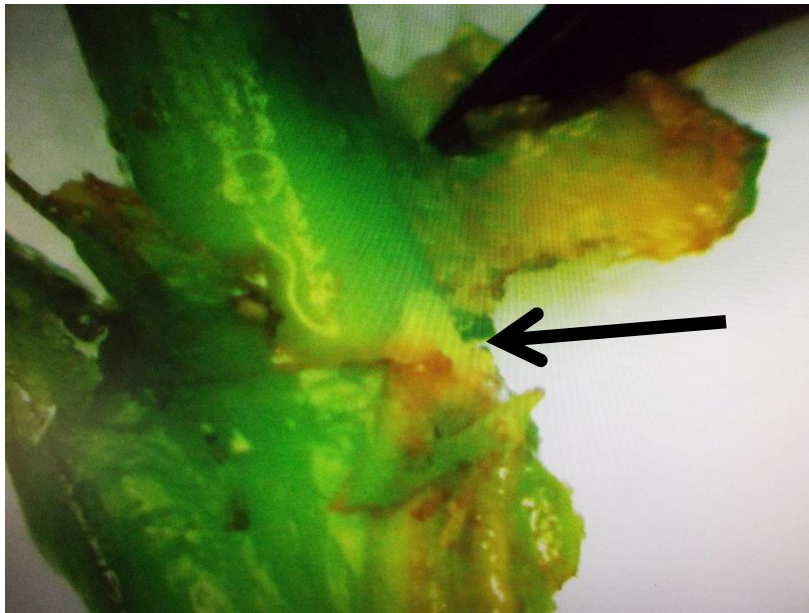


Figura 2. Extracción de meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira- con ayuda del estereoscopio (la flecha señala el meristema).

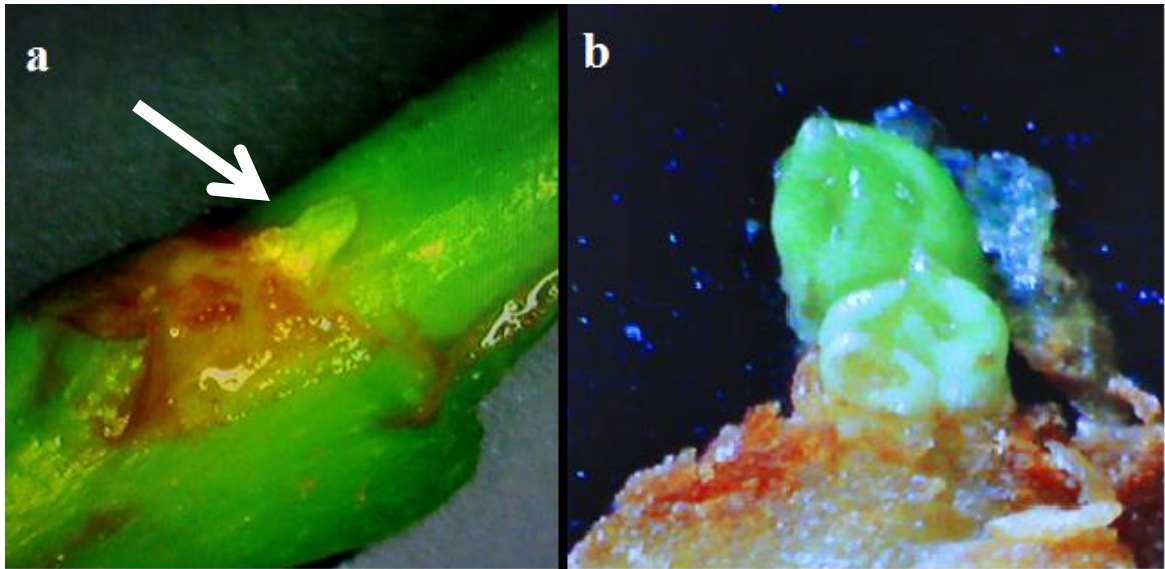


Figura 3. Meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-. (a) Meristemas de crecimiento en el explante (la flecha señala los meristemas). (b) Vista frontal de los meristemas extraídos del explante.

Medio de cultivo. En la etapa de establecimiento se utilizó las sales minerales de Murashige y Skoog al 50%, se suplementó con inositol, sacarosa, ácido nicotínico, piridoxina y tiamina, 2.25 mg/L de BAP y 0.19 mg/L de ANA (Cuadro 1). En la etapa de multiplicación se usaron dos medios de cultivo. En los primeros tres subcultivos de la etapa de multiplicación se utilizó el medio de cultivo con las sales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg/L de inositol, 30 mg/L de cisteína, 1 mg/L de BAP y 30 g/L de sacarosa (Cuadro 2). En el cuarto subcultivo se utilizó el mismo medio de los tres subcultivos anteriores pero agregándole 0.05 mg/L de ácido giberélico (Cuadro 3).

Cuadro 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado para establecimiento *in vitro* de explantes de meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	3.100
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.013
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.013
	KI	Yoduro de potasio	0.415
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.150
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratao	0.125
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.300
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido	25.000
		Etilendiaminotetraacético	
Vitaminas		Inositol	100.000
		Ácido Nicotínico	0.250
		Piridoxina	0.250
		Tiamina	0.200
Auxinas		Ácido Naftaleneacético	0.190
		6-bencilaminopurina	2.250
		Sacarosa	30000.000

(Dublin 1991), adaptado por el autor.

Cuadro 2. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado para la multiplicación (subcultivo 1,2 y 3) de microesquejes de café -variedad Lempira-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido	50.000
		Etilendiaminotetraacético	
Vitaminas		Inositol	100.000
Auxinas		Cisteína	30.000
		6-bencilaminopurina	1.000
		Sacarosa	30000.000

(Dublin 1991), adaptado por el autor.

Cuadro 3. Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado para la multiplicación (subcultivo 4) de microesquejes de café -variedad Lempira-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido	50.000
		Etilendiaminotetraacético	
Vitaminas		Inositol	100.000
Auxinas		Cisteína	30.000
		6-bencilaminopurina	1.000
		Ácido giberélico	0.050
		Sacarosa	30000.000

(Dublin 1991), adaptado por el autor.

Enraizamiento *in vitro*. Los esquejes utilizados fueron clasificados por tamaño (Figura 4). Para la etapa de enraizamiento se usó el medio basal y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) (Cuadro 4) suplementado con ANA y sacarosa, y reduciendo la dosis de minerales al 50% según los tratamientos a probar. En el testigo se utilizó el medio basal y las vitaminas al 100% junto con 1 mg/L de ANA durante todo el tiempo hasta obtener raíces. En los tratamientos se probó realizar un golpe hormonal con 1 mg/L de ANA en el primer tratamiento y 5 mg/L en el segundo. Los explantes se dejaron solo por siete días en este medio, al día ocho se cambiaron al mismo medio pero con la ausencia de la auxina (Cuadro 5). También se disminuyó la dosis de sacarosa según lo recomendado por Alvarenga Venutolo (2004).

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada, se ajustó el pH a 5.6 con KOH y/o HCL con ayuda del medidor de pH Meter S20 Seven Easy™. Los medios se solidificaron con 1.8 gr/L de Phytigel. Luego se dispensó 20ml de medio de cultivo por cada frasco de vidrio de 100 mL y se esterilizó en el autoclave Market Forge Sterilmatic STM- E a 15 PSI de presión, 121°C y durante 20 minutos.



Figura 4. Esquejes de café -variedad Lempira- obtenidos a partir del establecimiento de meristemas plagiotrópicos. Clasificación por tamaño, de izquierda a derecha: grande, mediano, pequeño.

Cuadro 4. Medio basal de Murashige y Skoog (1962) modificado para el enraizamiento de microesquejes de café -variedad Lempira-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido	50.000
		Etilendiaminotetraacético	
Vitaminas		Inositol	100.000
		Ácido Nicotínico	0.500
		Piridoxina	0.500
		Tiamina	0.400

(Dublin 1991)

Cuadro 5. Tratamientos usados para estimular el enraizamiento de microesquejes de café -variedad Lempira-.

Tratamiento	Días	Medio MS (%) [*]	ANA (mg/L) [§]	Sacarosa (g/L)
Testigo	28	100	1	30
ANA 1	7	50	1	10
	21	50	0	10
ANA 5	7	50	5	10
	21	50	0	10

(Alvarenga Venutolo 2004, Abdelnour-Esquivel y Vincent Escalant 1994, Dublin 1991), adaptado por el autor.

* El medio MS lleva todos los componentes del cuadro 4 al 100% o al 50% a excepción de las vitaminas que siempre llevan el 100%.

§ ácido naftalenacético

Enraizamiento *ex-vitro*. Se realizó una prueba para enraizar los esquejes *ex-vitro*. Para esta prueba se utilizaron catorce esquejes los cuales se sembraron en Jiffys[®] (sustrato comprimido para enraizamiento) previamente humedecidos y esterilizados en el autoclave. A la base de los esquejes se les aplicó ácido indol-3 butírico al 0.1% previo a su siembra (Figura 5). La bandeja con las plántulas se cubrió con tela Agribón[®] para protegerlas durante su enraizamiento. Se tuvieron en el cuarto de crecimiento del laboratorio a 23°C, 16 horas luz a 2000 lux, una humedad relativa del 50% durante 21 días (Figura 6). Luego se trasladaron al invernadero, siempre tapados con el Agribón[®] retirándolo hasta el día 52. Los esquejes sembrados en los Jiffys[®] se mantuvieron con constante humedad en el medio.



Figura 5. Esquejes de café -variedad Lempira- establecidos *ex-vitro* para su enraizamiento.



Figura 6. Esquejes de café -variedad Lempira- establecidos en Jiffys® y cubiertos Agribón® con tratamiento de 0.1% de AIB en su base para su enraizamiento.

Análisis Estadístico. En las etapas de establecimiento y multiplicación se utilizó estadística descriptiva para obtención de medias, desviación estándar y porcentajes. En la etapa de enraizamiento se usó un Diseño Completamente al Azar con tres tratamientos, tres repeticiones y 35 unidades experimentales por repetición.

Datos Evaluados. En la etapa de establecimiento se evaluó contaminación por hongos y bacterias y el inicio del crecimiento a diario. En la etapa de multiplicación se evaluó el número de brotes obtenidos por cada explante al final de cada subcultivo. En la etapa de enraizamiento las variables que se midieron fueron la presencia de callo y raíces en los esquejes. En el enraizamiento *ex-vitro* se evaluó la sobrevivencia de los esquejes y esquejes enraizados cada siete días.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento. De los 255 meristemas establecidos se obtuvo un 13.02% de sobrevivencia. Hubo un 6.25% de contaminación por hongos en los primeros seis días y un 80.73% por bacteria en los primeros nueve días. Se observó que el inicio del crecimiento de los meristemas fue, en promedio, al día 16 desde su establecimiento (Figura 7).



Figura 7. Formación de brotes a partir de meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.

Multiplicación. El procedimiento de multiplicación consistió en la separación de nuevos brotes de la base del microesqueje (Figura 8). En esta etapa se logró obtener un promedio de 6.3 brotes nuevos por cada esqueje primario al finalizar la etapa de multiplicación (Cuadro 6), lo que es más bajo a lo obtenido por Nakamura y Sondahl que es de 7.5 en promedio posiblemente debido a que ellos utilizaron meristemas ortótropos y en esta investigación se utilizaron meristemas plagiotótropos (Ayala 2013). En el subcultivo 1 se obtuvo la mayor cantidad de brotes con una media de 2.3 por esqueje. El subcultivo 5 no es recomendable realizarlo debido a que solo se obtuvo un promedio de 0.1 brotes por explante. Se observó que los cambios de medio se deben de realizar máximo cada 21 días ya que los esquejes a partir de ese día empiezan a morirse sino son cambiados a medio fresco.



Figura 8. Microesqueje de café -variedad Lempira- con un brote.

Cuadro 6. Producción de brotes en etapa de multiplicación utilizando meristemas plagiotrópicos de café -variedad Lempira-.

	Multiplicación						Final
	II	II.1	II.2	II.3	II.4	II.5	
No. Brotes nuevos	33.0	75.0	56.0	50.0	26.0	2.0	209.0
Media		2.3	1.7	1.5	0.8	0.1	6.3
Desviación estándar		0.8	1.2	1.3	1.1	0.3	3.3

Enraizamiento *in-vitro*. Se observó al día tres la presencia de callo de forma globular (Figura 9). Ese día se vió la aparición del callo en los tres tratamientos y en los tres tamaños de explantes, solo en los pequeños la incidencia era menor. En el cuarto y sexto día la presencia de explantes con callo fue mayor, en los pequeños dejaron de aparecer en el sexto día. Al realizar el cambio de medio de los tratamientos a los siete días, sin limpiar la base de las plantas, se notó un crecimiento rápido en las plantas y los callos preexistentes obtuvieron un color verde más intenso los primeros días. En el día 10 el crecimiento de callo en los tratamientos se redujo y en el testigo continuó hasta el día 16.



Figura 9. Callo presentado en la base de un esqueje de café -variedad Lempira- a los siete días de haber sido trasplantado a medio de enraizamiento *in vitro*.

Al realizar el cambio a medio fresco en el día 21 los callos se hincharon levemente. En el transcurso de la investigación se observó que las plantas no sobreviven por más de 21 días en el mismo medio de cultivo. Nunca hubo presencia de raíces en los tratamientos ni en el testigo.

El método de golpe hormonal que se utilizó en los tratamientos para el enraizamiento consiste en aplicarle hormonas por siete días a las plantas y luego cambiarlas a un medio sin hormonas. El golpe hormonal causa estrés a la planta ya que al momento de aplicarlo la planta va a tener un balance hormonal adecuado y al momento de pasarlo a un medio sin hormona se induce el estrés logrando que la planta acelere su metabolismo y creando nuevo tejido para su sobrevivencia (Read y Yang 1989).

La no formación de raíces en los esquejes se puede deber a que haya quedado residuos en del ácido giberélico en el esqueje. El ácido giberélico se da de manera natural en las plantas para el crecimiento de las células y la elongación de los tallos, se utiliza en plantas que sufren de enanismo para producir un crecimiento normal (Rojas Garcidueñas y Rovalo Merino 1984). En la propagación *in vitro* el ácido giberélico induce la elongación entre nudos pero a la vez, por lo general, inhibe la iniciación de raíces (Espinal de Rueda 2009). Otra causa puede ser el uso del ácido naftalenacético (ANA) en la inducción, esta auxina es excelente en la inducción del crecimiento de raíces, pero también para inducir el crecimiento de tejido callogénico por lo que únicamente se formó este tejido en los esquejes (Weaver 1989). Estos resultados contrarrestan a los obtenidos por Alvarenga Venutolo (2004), Abdelnour-Esquivel y Vincent Escalant (1994) y Dublin (1991) quienes observaron enraizamiento en café *in vitro* en presencia de ANA.

Enraizamiento *ex-vitro*. Al día 21 se observó que la base de la planta estaba hinchada pero sin presencia de raíces y se trasladaron del cuarto de incubación al invernadero. Luego a los 52 días se le retiró el Agribón® de las plantas y al día 59 se observó la primera raíz, en el 21% de las plantas (Figura 10). Al día 85 se observó que en las plantas que no tenían callo al momento del trasplante no formaron raíces y con las que si tenían se obtuvo el 100% de enraizamiento. Las plantas pequeñas que se sometieron a enraizamiento *ex-vitro* murieron, las medianas tuvieron 33% sobrevivencia y las grandes un 83%. Se observó una respuesta favorable a la aplicación de AIB. El ácido indol-3 butírico es una auxina sintética que promueve la formación de raíces adventicias a bajas concentraciones (Read y Yang 1989).

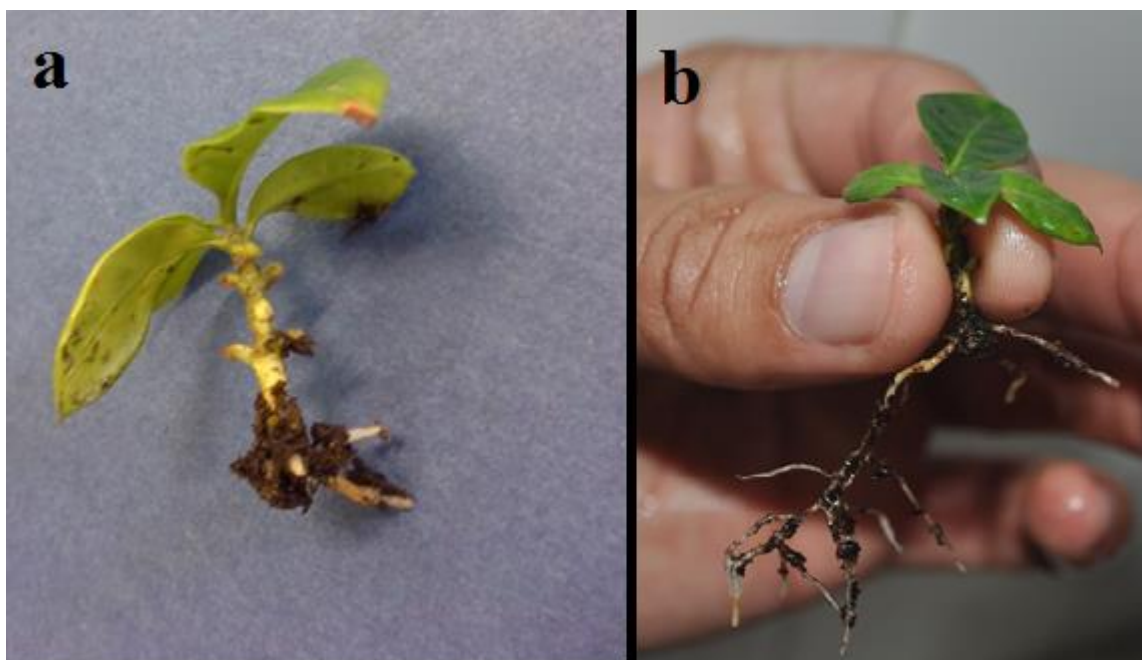


Figura 10. Raíces en un esqueje de café -variedad Lempira- enraizado *ex-vitro*. (a) A los 59 días después del trasplante. (b) A los 85 días después del trasplante.

4. CONCLUSIONES

- Se estableció el protocolo de micropropagación de café -variedad Lempira- por medio de meristemas plagiotrópicos.
- La tasa de multiplicación obtenida en la etapa de multiplicación fue de 6.3 brotes por esqueje.
- No se obtuvo formación de raíces *in vitro* con la suplementación de ANA en el medio de cultivo pero se logró obtener enraizamiento *ex-vitro* utilizando AIB.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar los cambios de medio cada 21 días para evitar la muerte de los esquejes.
- No utilizar el ácido giberélico en la etapa II subcultivo 4 para la elongación de los esquejes.
- Si los esquejes son muy pequeños se puede utilizar después de la multiplicación el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) sin auxinas haciendo cambio cada 21 días a medio fresco hasta obtener esquejes de cuatro a seis nudos.
- En la etapa de enraizamiento *in vitro* utilizar el medio de cultivo de Murashige y Skoog suplementado con 1 mg/L de ANA por 14 días para inducción callogénesis y luego pasarlos al enraizamiento *ex-vitro* con ácido indol-3 butírico al 0.01%.

6. LITERATURA CITADA

Abdelnour-Esquivel, A. y J. Vincent Escalant. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetal. CATIE. 16 p.

Alvarenga Venutolo, S. 2004. Laboratorio Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología. 47 p.

Ayala, P. 2013. Cultivo *in vitro* (micropropagación) de yemas de café (*Coffea arabica*) (en línea). Tesis Ing. en Biotecnología, Cultivo de Tejidos Vegetales. Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí, Ecuador. 2 p. Disponible en: http://es.slideshare.net/pahola_estefy/yemas-de-caf

Dublin, P. 1991. Multiplicación Vegetativa de café, hevea y cacao, capítulo 26. In: Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 577-596 p.

Espinal de Rueda, D. 2009. Guía para la producción *in vitro* de cultivos: fundamentos y prácticas de laboratorio. Módulo de Biotecnología, Cultivo de Tejidos Vegetal y Reproducción In vitro. Zamorano, Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. 85 p.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. In: J. Janick (ed). 2000. Classic Papers in Horticultural Science. Blackburn Press. p. 59.

PROMECAFE e IICA. Junio 2013. La crisis del café en Mesoamérica, causas y respuesta apropiada (en línea). Disponible en: <http://www.iica.int/Esp/prensa/BoletinRoya/2013/N01/Roya-MA.pdf>

PROMECAFE. Visto el 15 de mayo del 2014. La Caficultura y la Roya del Café (en línea). Consultado 21 de mayo de 2014. Disponible en: http://www.promecafe.org/web/index.php?option=com_content&view=article&id=55:roya-del-cafe&catid=34:promecafe&Itemid=118

Read P. y G. Yang. 1989. Response *in vitro* of explants chemically treated via forcing solutions. Consultado 6 de octubre del 2014. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01997594#page-1>

Rojas Garcidueñas, M. y M. Rovalo Merino. 1984. Fisiología vegetal aplicada. Tercera edición. 204-226 p.

Weaver, R. J. 1989. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Sexta reimpresión. 143-172 p.

7. ANEXOS



Anexo 1. Plantas madre de café -variedad Lempira- de donde se obtuvo el material vegetal para establecer los explantes *in vitro*.



Anexo 2. Inmersión en la solución desinfectante de benomilo y estreptomicina.



Anexo 3. Inmersión en la solución de cloro al 30% vol/vol.