

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



Proyecto Especial de Graduación
Inducción a embriogénesis somática en callos de café
(*Coffea arábica* L.) variedad Geisha

Estudiante

Nadya Paula Granda Flores

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Cinthya Martínez, MAE

Honduras, octubre 2024

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento Ciencia y Producción Agropecuaria

JULIO NAVARRO

Secretaría General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos	13
Localización	13
Fuente de Material Vegetal	13
Proliferación de Callo Embriogénico.....	14
Inducción a Embriogénesis Somática.....	14
Medio de Cultivo.....	16
Proliferación de Callos	16
Inducción a Embriogénesis Somática.....	16
Tratamientos Evaluados en Fase de Proliferación.....	17
Tratamientos Evaluados en Fase de Inducción a ES	17
Diseño Experimental y Análisis Descriptivo	17
Proliferación de Callo	19
Inducción a Embriogénesis Somática.....	21
Callo en Medio Semisólido.....	21
Callo en Medio Líquido	24
Conclusiones	31
Recomendaciones.....	32

Referencias.....33

Anexos.....36

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado para la proliferación de callos e inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha	16
Cuadro 2 Reguladores de crecimiento añadidos al medio MS para proliferación de callo embriogénico de café variedad Geisha.....	17
Cuadro 3 Tratamientos evaluados para la inducción a ES en callos café variedad Geisha.....	17

Índice de Figuras

Figura 1 Callo de café variedad Geisha proveniente de explantes foliares cultivados in vitro ...	13
Figura 2 Refrescamiento de muestras de café variedad Geisha en medio semisólido.....	15
Figura 3 Filtración de muestras de callo de café variedad Geisha para refrescamiento de medio líquido.....	15
Figura 4 Proliferación de callo de café variedad Geisha	21
Figura 5 Estructuras que parecen ser embriones somáticos de café variedad Geisha en medio MS semisólido suplementado con BAP (1.12 mg/L)	23
Figura 6 Tratamiento semisólido sin reguladores de crecimiento en inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha.....	24
Figura 7 Tratamiento sin reguladores para inducción de embriones somáticos de café variedad Geisha en medio líquido.....	25
Figura 8 Estructuras observadas en callos de café variedad Geisha filtrados el día 49 de embriogénesis somática en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.....	26
Figura 9 Estructuras que parecen ser embriones somáticos de café variedad Geisha en etapa de inducción a embriogénesis somática con desarrollo normal de forma globular y cotiledonar en tratamiento líquido sin reguladores de crecimiento	26
Figura 10 Estructuras observadas en inducción a embriones somáticos de café variedad Geisha con desarrollo anormal en medio de cultivo MS líquido sin reguladores de crecimiento.	28
Figura 11 Estructuras observadas en inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha con desarrollo anormal en tratamiento líquido sin reguladores de crecimiento	28
Figura 12 Porcentaje y cantidad de estructuras observadas que podrían ser embriones somáticos con formación normal.....	30
Figura 13 Porcentaje y cantidad de estructuras observadas con desarrollo anormal.....	30

Índice de Anexos

Anexo A Estructuras que parecen ser embriones, callos secundarios y brotes en medio de cultivo MS semisólido, suplementado con Kinetina (2mg/L) y 2,4-Diclorofenoxiacético (0.5 mg/L) sin refrescamiento de medio.....	36
--	----

Resumen

El Café (*Coffea arabica* L.) es la semilla del cafeto, una de sus variedades más apetecidas es el Geisha que destaca por características de calidad de taza y cierta resistencia a la roya del cafeto. El café, se propaga por métodos sexuales y asexuales. Una de las vías de regeneración de plantas *in vitro* es la embriogénesis somática (ES). Actualmente existen escasos estudios sobre ES en café Geisha, en consecuencia, los objetivos de esta investigación fueron describir el efecto de Kinetina (KIN) + ácido 2,4-D en la proliferación de callos embriogénicos y describir el efecto de BAP en la inducción a embriogénesis somática. Para los dos experimentos se utilizó un diseño completamente al azar y un análisis descriptivo con observaciones, anotaciones y fotografías cada 7 días, hasta el día 180 en proliferación. En inducción a embriogénesis somática se evaluó la presencia o ausencia de estructuras que podrían ser embriones somáticos y sus características morfológicas en forma, color y tamaño hasta el día 120. Los resultados indicaron que en medio de proliferación suplementado con KIN (2mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L) los callos se mostraron compactados, fenolizados y deshidratados siendo estas las características deseadas en un callo con potencial embriogénico al final de la fase de proliferación. En el experimento de inducción a ES se observaron estructuras que podrían ser embriones somáticos con desarrollo normal y anormal en medio semisólido con BAP (1.12 mg/L) y en medio líquido sin reguladores de crecimiento. Las estructuras observadas concuerdan en tamaño y forma con las reportadas por otras investigaciones en otras variedades de café.

Palabras clave: Proliferación, embriogénesis somática, KIN, 2,4-D, BAP

Abstract

Coffee (*Coffea arabica* L.) is the seed of the shrub known as the coffee plant. One of its most sought-after varieties is Geisha, which stands out for its cup quality and slightly resistance to coffee leaf rust. Coffee can be propagated through both sexual and asexual methods. One of the ways to regenerate plants in vitro is somatic embryogenesis (SE). Currently there are few studies on SE in Geisha coffee; therefore, the objectives of this research were to describe the effect of KIN + 2,4-D acid on the proliferation of embryogenic callus and to describe the effect of BAP on the induction of somatic embryogenesis. Both experiments utilized a completely randomized design and a descriptive analysis, with observations, notes, and photographs taken every 7 days until day 180 during proliferation. In the induction of somatic embryogenesis, the presence or absence of structures that could be somatic embryos and their morphogenic characteristics in terms of shape, color, and size were evaluated up to day 120. The results indicated that in the proliferation medium supplemented with KIN (2 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L), the calluses appeared compact, phenolic, and dehydrated, which are the desired characteristics for a callus with embryogenic potential at the end of the proliferation phase. In the experiment for the induction of SE, structures that could be somatic embryos with normal and abnormal development were observed in a semisolid medium with BAP (1.12 mg/L) and in a liquid medium without growth regulators. The observed structures matched in size and shape with those reported by other studies in different coffee varieties.

Keywords: Proliferation, Somatic embryogenesis, KIN, 2,4-D, BAP

Introducción

El café es el grano proveniente del arbusto conocido como cafeto que pertenece a la familia Rubiaceae, los cafetos poseen hojas persistentes que crecen de manera opuesta, tienen flores blancas y su fruto es una drupa rojiza, dentro de la cual se encuentra la semilla o grano conocido como café. Es cultivado en regiones tropicales y ecuatoriales debido a sus requerimientos climáticos (Mesa et al., 2017). Según informes presentados por el Acuerdo Internacional del Café (2020) la familia de las rubiáceas consta de aproximadamente 500 géneros y más de 6.000 especies, entre estas destacan *Coffea arabica* (café Arábica), *Coffea canephora* (café Robusta) y *Coffea liberica* (café Libérica) como las más reconocidas y producidas a nivel mundial, siendo las dos primeras las más importantes desde el punto de vista económico y resaltando *Coffea arabica* debido a que supone casi las dos terceras partes de la producción mundial cultivada principalmente en el Centro y Sur de América.

De forma comercial, se produce café en más de 50 países a nivel mundial, por lo tanto, es un producto básico de exportación. En el panorama mundial, se estima un consumo de más de 3 000 millones de tazas al día, lo que genera montos de ingresos anuales para el sector que rondan los \$200 000 millones (International Trade Center [ITC], 2022). Los cinco países productores de café que históricamente han sido los de mayor producción en el mundo son Brasil, Vietnam, Indonesia, Colombia y Etiopía (Instituto Hondureño del Café [IHCAFE], 2020). Aunado a ello, el café representa también una actividad económica importante en Centroamérica que se encuentra representando alrededor del 10% de la producción mundial siendo Honduras el principal productor en la región y el sexto a nivel mundial (Enríquez et al., 2020). Estos seis países representan alrededor del 76.5% de la producción de café a nivel mundial, destacando Brasil como el de mayor participación (IHCAFE, 2020).

La roya del cafeto se considera la enfermedad más devastadora en el rubro y puede causar pérdidas de hasta el 50% de la producción por defoliación en el cultivo, lo cual implica riesgos económicos para los productores, por tal motivo, en la actualidad, la siembra de variedades de café resistentes a la roya causada por el hongo (*Hemileia vastatrix*) ha incrementado, el cultivo de

Catimores y Sarchimores es evidencia de esto, son dos variedades híbridas consideradas base para el desarrollo de nuevas y mejores, entre las que se destaca el Geisha (Velásquez, 2019). Originario de los bosques de café en Etiopía, según informes del World Coffee Research (2024) fue recolectado por primera vez aproximadamente en el año 1930 en una zona próxima a una montaña cuyo nombre se traduce como Gesha en inglés, posteriormente se transportó al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en donde fue registrada como T2722, el Geisha posee hojas con tonalidades verde y bronce, se desarrolla mejor en la altura y se ve influenciado por la latitud, además, se considera susceptible a nemátodos como *Meloidogyne exigua* o *Pratylenchus spp.* y a enfermedades como Antracnosis causada por *Colletotrichum kahawe*. Orozco (2019) reporta que el café Geisha sobresale de otras variedades porque alcanza niveles altos de calidad, asimismo, indica que una taza de este es más ligera, delicada y compleja que una de café tradicional, aunado a ello, destaca por matices, aromas y sabores ligeramente frutales. En suma, es atractivo por sus consideraciones de resistencia a la roya, calidad de taza y mercado exclusivo como lo describe Velásquez (2019).

La propagación de café puede realizarse por métodos sexuales o asexuales; en la propagación sexual se utiliza la semilla en grano, mientras que la propagación asexual es realizada por medio de material vegetativo de la planta como estacas, esquejes o injertos, asimismo, el café puede ser propagado por cultivo de tejidos, meristemas o microestacas (Monroig, 2018). Tanto para la propagación sexual como para la asexual existen aspectos para considerar, entre las ventajas de la propagación sexual se puede resaltar aumento de diversidad en plantas alógamas, rápida multiplicación de materiales estables en autógamias y la inducción de características deseables, sin embargo, presenta limitantes como la reducción de diversidad en plantas autógamias y la necesidad de muchas generaciones para obtener un material estable. Por otro lado, la reproducción asexual presenta ventajas como, reproducir exactamente la planta originaria y la regeneración de líneas en alógamas que, a su vez, presenta desventajas como la disminución de biodiversidad, posible pérdida

de resistencia biótica y la dificultad para multiplicar masivamente con técnicas convencionales tal como lo reporta Ramírez (2009).

La micropropagación es como la reproducción vegetativa o asexual de individuos genéticamente iguales in vitro, es decir, bajo condiciones controladas de laboratorio, una vía de regeneración de plantas in vitro es embriogénesis somática, un proceso biológico por medio del cual, las células somáticas forman embriones que se regeneran en plantas genéticamente iguales a la madre, estos pueden formarse a partir de células del explante que se desdiferencian en callos y luego se diferencian en embriones (Sánchez et al., 2019). En la micropropagación se utilizan reguladores de crecimiento y medios de cultivo. Los reguladores de crecimiento son compuestos químicamente sintetizados u obtenidos de otros organismos que en pequeñas cantidades pueden llegar a estimular, inhibir o cambiar el crecimiento. Son ampliamente usados debido a su capacidad para controlar el crecimiento y actividad bioquímica de las plantas (Alcantara et al., 2019).

Por otro lado, el medio de cultivo se define como un conjunto de elementos o nutrientes que ofrecen las condiciones idóneas para el desarrollo controlado del cultivo (Rodríguez y Zhurbenko, 2018), el medio más usado en la inducción a embriogénesis somática de café es el de Murashige y Skoog (1962) suplementado con auxinas como 2,4-D, asimismo, Castro (2020) describe que las citoquininas (BAP, KIN, AIA, AIB) son fundamentales en el proceso de maduración de los embriones somáticos.

Si bien se han realizado varios estudios relacionados a la embriogénesis somática (ES) de café, para la variedad Geisha la información de inducción a embriogénesis somática es escasa, la mayoría de las investigaciones describen únicamente protocolos de asepsia y desinfección de explantes, son escasos los estudios que se enfocan en las condiciones de cultivo, por lo que se vio la necesidad de desarrollar este estudio con los objetivos de describir el efecto de Kinetina + ácido 2,4-Diclorofenoxiacético en los callos embriogénicos durante la fase de proliferación; y describir el efecto de 6-Bencilaminopurina en la fase de inducción a embriogénesis somática.

Materiales y Métodos

Localización

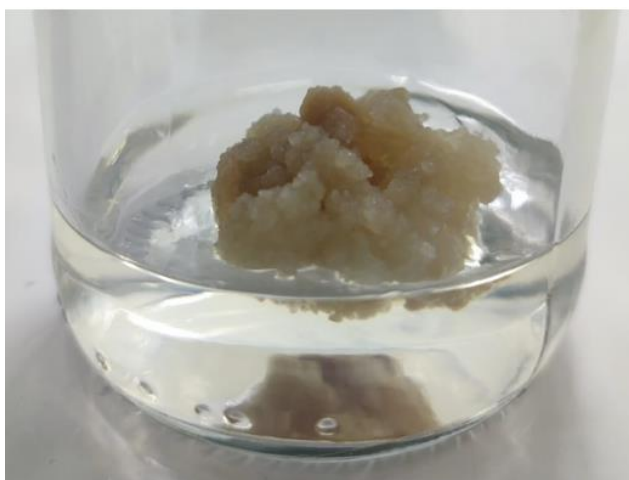
La investigación fue realizada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, localizada a 30 km al SE de Tegucigalpa, Honduras Valle del Yeguaré, en el municipio San Antonio de Oriente, departamento Francisco Morazán.

Fuente de Material Vegetal

Se utilizaron callos provenientes de explantes foliares de café variedad Geisha (Figura 1). Los callos se obtuvieron del cultivo in vitro de láminas foliares los cuales estuvieron durante ocho meses en medio de Murashige y Skoog a mitad de concentración de sales minerales, y suplementado con 2,4-Diclorofenoxiacético 0.5 mg/L + Kinetina 1.5 mg/L e incubados en obscuridad. Luego los explantes fueron transferidos a medio MS a mitad de concentración de sales minerales y sin reguladores de crecimiento en luz por 16 horas, 4 kLux, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de radiación fotosintéticamente activa (RFA), 22 °C y 35% humedad relativa.

Figura 1

Callo de café variedad Geisha proveniente de explantes foliares cultivados in vitro



Proliferación de Callo Embriogénico

Para estimular la proliferación del callo, se preparó previamente la cámara de flujo laminar horizontal y se realizó la correcta esterilización de los materiales a utilizar; posteriormente se retiró el callo del frasco para después colocarlo en papel estéril, aquí se procedió a separar los callos en trozos pequeños y eliminar el tejido muerto, con pinzas estériles se colocaron los callos en los frascos con medio de cultivo estéril y fresco; aproximadamente 6 meses después, los frascos con los distintos tratamientos fueron transferidos a medio para inducción a embriogénesis somática.

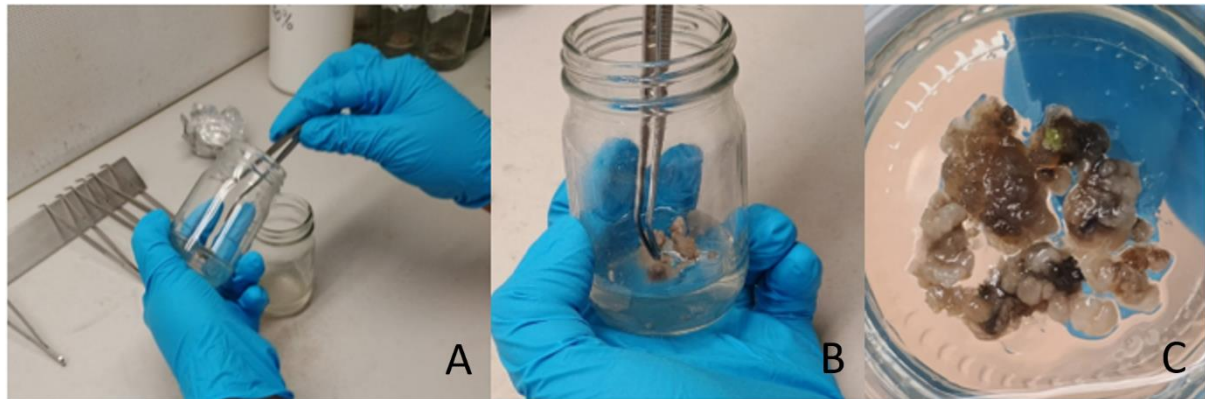
Inducción a Embriogénesis Somática

Para la fase de inducción a embriogénesis somática (ES) los callos de la fase de proliferación fueron colocados en papel estéril antes de ser transferidos a medio semisólido y almacenarlos en el cuarto de incubación o a medio líquido, estos últimos se colocaron en un agitador orbital a 110 RPM, en esa fase los callos se incubaron a 22 °C, 16 horas luz 4 kLux, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (RFA) y 8 horas de oscuridad

A los 49 días en medio de inducción a ES se hizo refrescamiento del medio manteniendo los callos en el mismo tratamiento. Para el refrescamiento del medio semisólido, con ayuda de material completamente aséptico se trasladaron los callos directamente a los frascos con 20 mL de medio de cultivo fresco (Figura 2). En el refrescamiento del medio líquido se realizó un filtrado utilizando papel marca Whatman grado 1 de 90mm de diámetro con un poro de 11 μm de tamaño y luego se colocó los callos en matraces de Erlenmeyer de 125 mL de capacidad con 30 mL de medio de cultivo (Figura 3).

Figura 2

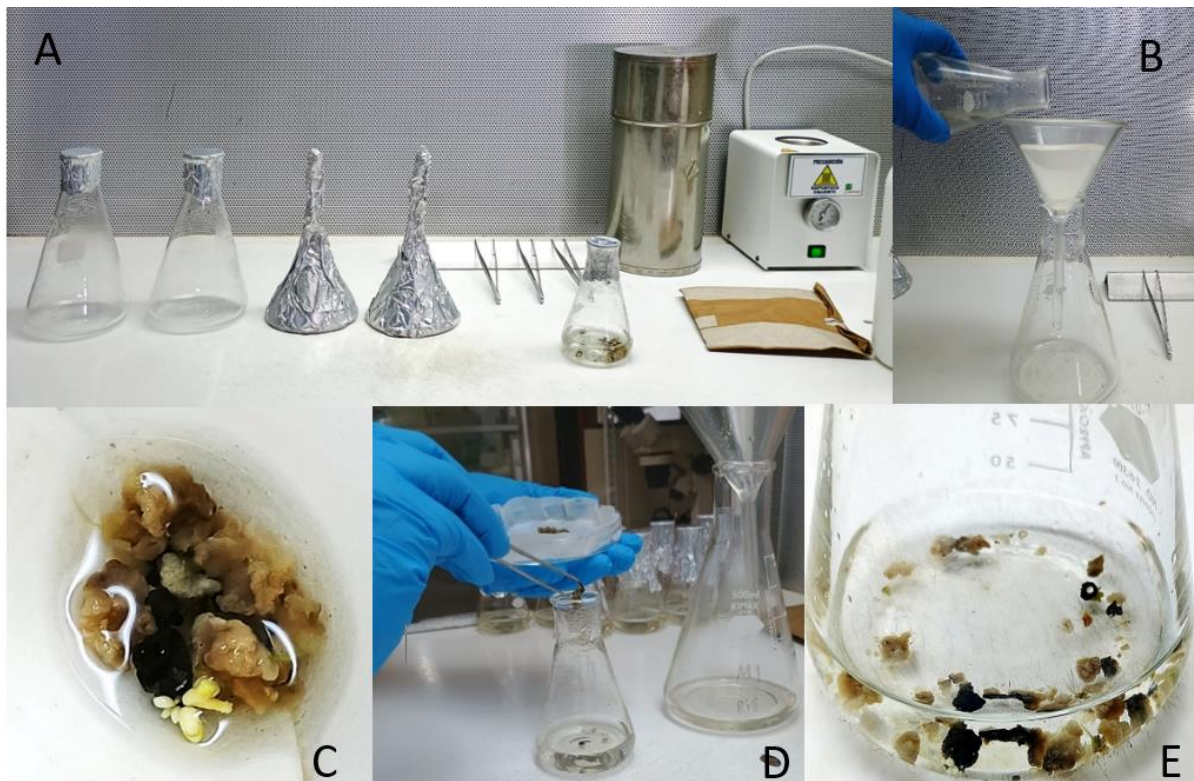
Refrescamiento de muestras de café variedad Geisha en medio semisólido



Nota. A. Extracción de callos del medio de cultivo; B. Ubicación correcta y distanciada de callos en medio fresco; C. Callos distribuidos en el medio de cultivo.

Figura 3

Filtración de muestras de callo de café variedad Geisha para refrescamiento de medio líquido



Nota. A. Material para filtración completamente estéril en cámara de flujo laminar horizontal; B. Filtrado de medios líquidos; C. Vista superior filtración de medio; D. Siembra de muestras en medio nuevo; E. Muestras sembradas en medio de cultivo líquido.

Medio de Cultivo

Proliferación de Callos

Para la proliferación de callos se utilizó las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de concentración y vitaminas de Yasuda (Cuadro 1). El medio fue suplementado con reguladores de crecimiento según el tratamiento evaluado. El pH de todos los medios fue ajustado a 5.6 y la solidificación se realizó con Phytigel 1.8 g/L. Luego fueron esterilizados en autoclave a 121°C, con una presión de 1.054 kg/cm² durante 20 minutos.

Inducción a Embriogénesis Somática

Para la inducción a embriogénesis somática se utilizó las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de concentración y vitaminas de Yasuda (Cuadro 1) suplementado con reguladores según el tratamiento evaluado. El pH de todos los medios fue ajustado a 5.6 y según fuera medio líquido o sólido se usó Phytigel 1.8g/L. Luego los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C, con una presión de 1.054 kg/cm² durante 20 minutos.

Cuadro 1

Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) modificado para la proliferación de callos e inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	3.100
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0125
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.0125
	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 bihidratado	0.125
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.300
	FeNa EDTA	Hierro Sodio Etilendiaminotetraacético	25.000
Vitaminas		Inositol	100.000
		Tiamina	1.000

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
		Piridoxina	1.000
		Ácido Nicotínico	1.000
Antioxidante		Cisteína	25.000
Carbohidratos		Sacarosa	30000.000

Nota. Adaptado de Roca y Mroginski (1991)

Tratamientos Evaluados en Fase de Proliferación

Para el proceso de proliferación de callo se evaluaron tres tratamientos dos combinaciones de reguladores de crecimiento y un tratamiento sin reguladores de crecimiento, estos son descritos en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Reguladores de crecimiento añadidos al medio MS para proliferación de callo embriogénico de café variedad Geisha

Tratamientos		Referencias
KIN mg/L	2,4-D mg/L	
2.0	0.5	Paredes et al. (2013)
1.5	0.5	Sánchez et al. (2019)
0	0	Sin reguladores

Tratamientos Evaluados en Fase de Inducción a ES

Para la inducción a ES se evaluaron cuatro tratamientos descritos en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Tratamientos evaluados para la inducción a ES en callos café variedad Geisha

Tratamientos		Referencias
BAP mg/L	Medio de cultivo	
1.12	Semisólido	López et al. (2016) y Chaves (2010)
1.12	Líquido	
0	Semisólido	
0	Líquido	

Diseño Experimental y Análisis Descriptivo

Se utilizó un diseño completo al azar en los dos experimentos (proliferación y diferenciación). En el experimento de proliferación se evaluaron tres tratamientos con 20 repeticiones por cada uno.

En el experimento de inducción a ES se evaluaron cuatro tratamientos con 15 repeticiones por cada uno.

El análisis descriptivo permitió caracterizar cada uno de los cambios observados en el proceso de investigación, este tipo de análisis se define como cualitativo sustentado en la observación y caracterización, es utilizado cuando los datos o el carácter de la investigación no permiten realizar análisis cuantitativos (Mendenhall et al., 2009). Se realizaron observaciones cada 7 días tomando fotografías y anotaciones detalladas de lo observado hasta el día 180 en la fase de proliferación refiriendo los cambios morfogénicos de los callos en aspectos de color, tamaño, textura y estructura; En la fase de inducción a embriones somáticos se llevó a cabo hasta el día 120 observando en primer lugar, la presencia o ausencia de estructuras que parecían ser embriones somáticos y posteriormente detallando las características morfogénicas en forma, tamaño y el color de estas estructuras.

Resultados y Discusión

Proliferación de Callo

Al inicio del experimento el callo se apreciaba como una masa sin forma específica y textura arenosa granular sin ninguna organización. Luego de 14 días en los tratamientos de proliferación, el color de los callos se tornó más intenso y levemente oscurecido en los dos tratamientos con reguladores de crecimiento (KIN y 2,4-D). Asimismo, empezaron a presentar cambios en su apariencia viéndose estructuralmente más voluminosos, todavía sin presentar organización o compactación bien definida. En el tratamiento sin reguladores de crecimiento los callos se mantuvieron de color claro y sin aparente aumento en tamaño. A los 42 días de iniciada la fase de proliferación, se observó diferencias visibles de manera superficial en aspectos de, tamaño, textura y estructura en los callos de los tres tratamientos. En cuanto a color el tratamiento sin reguladores de crecimiento no presentó cambios.

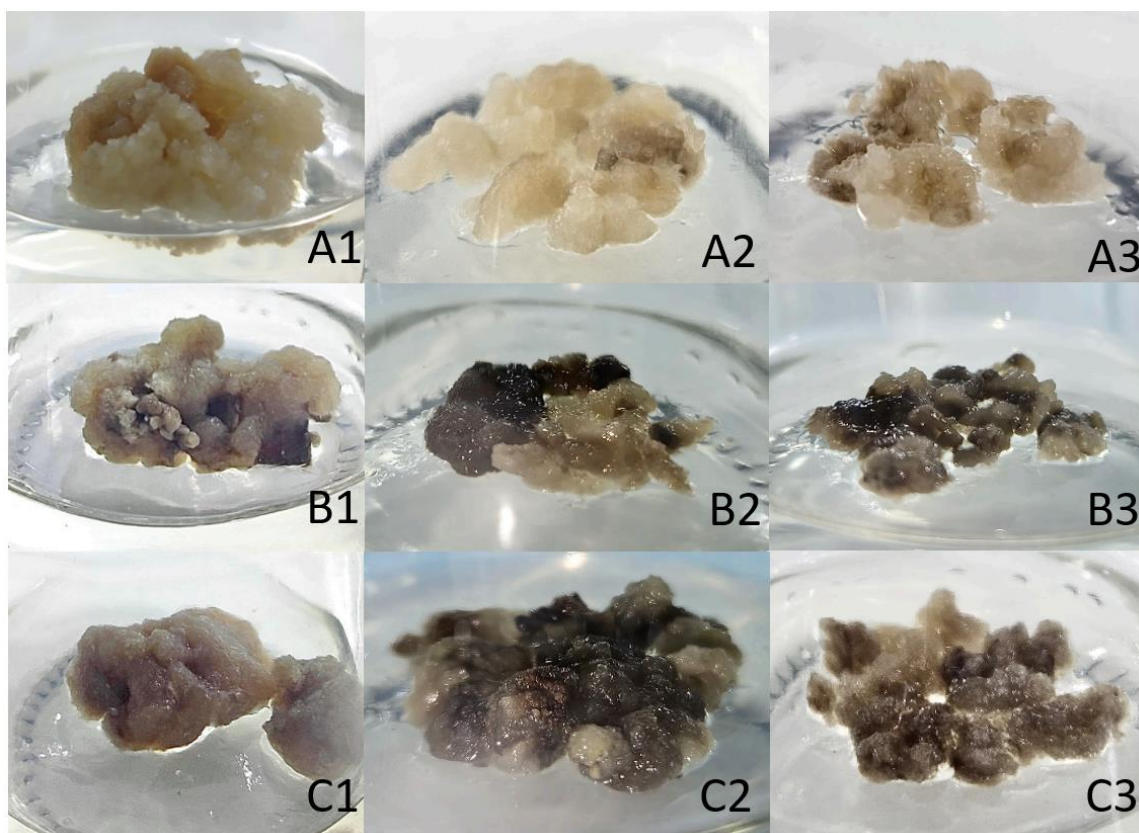
Después de seis meses de iniciada la fase de proliferación se observaron cambios aún más notables en los callos, siendo estos de estructura compacta y apreciándose visualmente listos para inducción a embriogénesis somática. Este cambio de estructura se notó en los tres tratamientos. Sin embargo, fue específicamente en los callos en medio con reguladores de crecimiento donde se observaron mayores cantidades de cambios visibles en aspectos de color y compactación (Figura 4). Los resultados en los tres tratamientos evidencian el proceso de proliferación de callo descrito por Arzate y Mejía (2011) quienes en su experimento indican que observaron cambios periódicamente y como resultado obtuvieron callos de color blanco y amarillo con consistencia dura o compacta, y otros de color blanco cremoso con consistencia friable. En la presente investigación no se observó la presencia de callos friables, por el contrario, los callos que se obtuvieron en cada uno de los tratamientos presentan características de compactación con consistencia granular y colores intensos en tonalidades amarillo y café, lo cual como lo reportan López et al. (2016) representa las características de un callo embriogénico.

Según Gómez et al. (2006) la observación de callos translúcidos, compactos y de color amarillo a café, se atribuyen constantemente a una forma de comportamiento embriogénico para especies leñosas. Estas mismas características se lograron observar en el presente experimento mayormente en los tratamientos suplementados con reguladores de crecimiento y en su mayoría para el tratamiento de KIN (2mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L).

Shriram et al. (2008) afirman que las elevadas concentraciones de hormonas como auxinas y citoquininas inducen la producción de callo, del mismo modo, señalan que el aspecto de este está directamente influenciado por el tipo de hormona que se está utilizando para la proliferación.

Los callos que presentaron los niveles ideales para posterior inducción a embriogénesis somática son los C3 que se observan en la Figura 4, provenientes del medio de cultivo suplementado con KIN (2mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L) debido a que presenta los niveles de fenolización ideales que le permiten a la célula activar mecanismos de defensa y formar una estructura embrionaria, por otro lado, el callo B3 de la Figura 4, proveniente del medio de cultivo suplementado con KIN (1.5 mg/L) + 2,4-D (0.5mg/L) presenta un nivel de fenolización mayor que es considerado indeseable en este proceso pues puede generar daños a nivel de viabilidad en los callos.

Este proceso de formación y proliferación de callo embriogénico se lleva a cabo debido a que por la estimulación de los reguladores de crecimiento las células somáticas, que son células diferenciadas atraviesan un proceso de reprogramación por medio de modificaciones epigenéticas que se manifiestan como cambios en la expresión del genotipo, esta reprogramación activa genes de pluripotencia y elimina las marcas de diferenciación. Los genes de pluripotencia permiten a las células diferenciarse en varios tipos celulares como los embriones somáticos, asimismo, por medio de los reguladores de crecimiento se recuperan los genes de totipotencia que pueden haberse perdido durante los procesos de división celular en la proliferación, así posteriormente se puede dar lugar a un embrión somático y a las estructuras para regenerar un organismo completo (Tang et al., 2020).

Figura 4*Proliferación de callo de café variedad Geisha*

Nota. A. Sin reguladores; B KIN (1.5 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L); C. KIN (2 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L); 1. Día 14; 2. Día 42. 3; Día 180.

Inducción a Embriogénesis Somática

Callo en Medio Semisólido

Los callos con buen nivel de proliferación, en la etapa de diferenciación en los dos tratamientos (6-BAP y sin reguladores) en medio semisólido mostraron vastas diferencias visuales en cuanto al proceso de inducción a ES, estas serán discutidas por separado.

Efecto del 6-BAP en el Callo Embriogénico

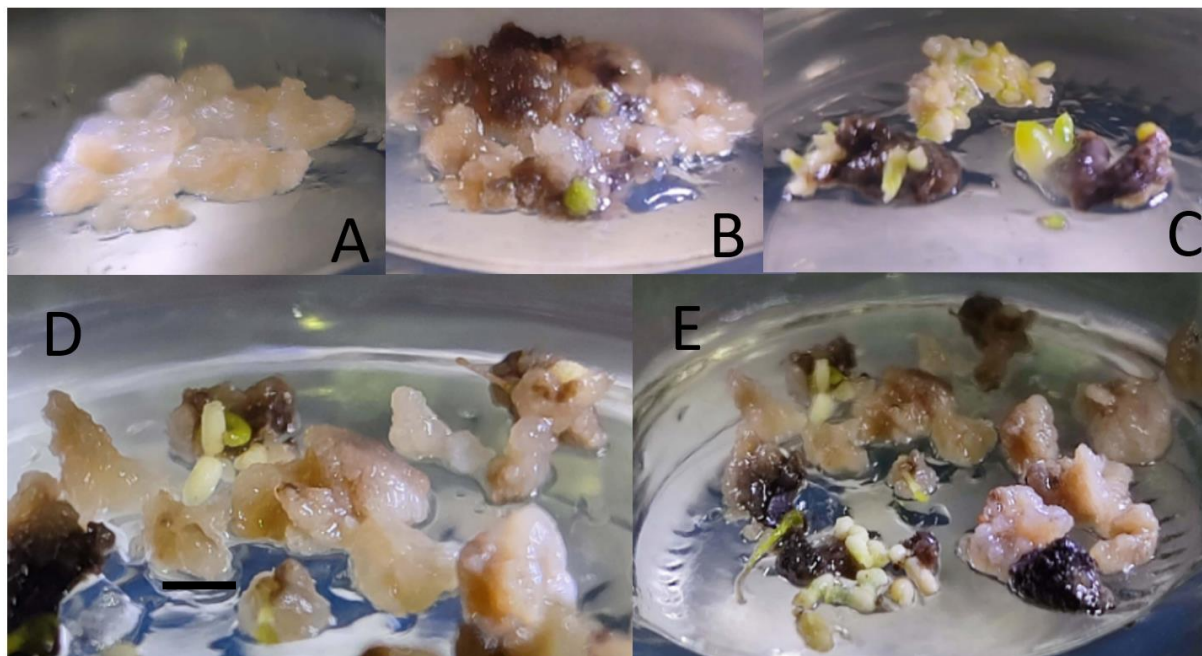
A los 28 días de los 15 frascos con callos embriogénicos en medio de cultivo semisólido suplementado con BAP (1.12mg/L), en dos se observó que el color se volvió amarillo y con notas oscuras. Asimismo, se identificaron las primeras estructuras de color verde con formas redondeadas. Estas estructuras pre-embriónicas se apreciaban de forma globular (Figura 5).

A los 49 días se observó mayor presencia de estructuras de color verde y blanco, identificándose el cambio de globular a forma de corazón (Figura 5). Del mismo modo, se observaron estructuras de color blanco y granulares sobre el callo proliferado, estas se identificaron como callo secundario y se observaron en uno de los frascos. Esta formación de callo secundario puede deberse a la presencia de citoquininas como el 6-BAP en el medio de cultivo (Larson et al., 2006). El uso de 6-BAP da buenos resultados en las fases de calogénesis y embriogénesis, esto depende del genotipo y el material vegetal utilizado, considerando que las hojas jóvenes tienen altas concentraciones de citoquininas endógenas que al tener interacción con auxinas pueden activar sus mecanismos de acción en diversas funciones como la división celular.

A los 63 días se observó cambios morfológicos en las estructuras, cambiando de color verde a color blanco tornándose alargadas y aumentando su tamaño indicando la presencia de posibles estructuras embrionarias en estado torpedo y cotiledonar. Del mismo modo, se observó la presencia de algunas estructuras con formación anormal (Figura 5). Pérez et al. (2017) señalan que a pesar de que la utilización de la auxina 2,4-D está asociado con una alta tasa de éxito en la obtención de embriones somáticos, la exposición prolongada de los callos a altas concentraciones de este regulador en las fases de inducción y multiplicación puede causar la formación de estructuras embriogénicas anormales.

Figura 5

Estructuras que parecen ser embriones somáticos de café variedad Geisha en medio MS semisólido suplementado con BAP (1.12 mg/L)



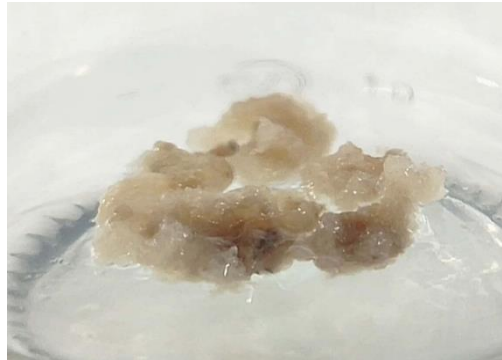
Nota. A. Callo después de tratamiento de proliferación; B. Callo en el día 28 leve oscurecimiento y observación de la primera estructura color verde; C. Callo en el día 49 observación de más estructuras de color verde y nuevas estructuras pequeñas de color blanco; D. Observación de estructuras embrionarias emergiendo, en forma globular a los 63 días barra 2 mm; E. Desarrollo de estructuras embrionarias con forma de torpedo y cotiledonar de apariencia normal y anormal.

Efecto del Tratamiento Testigo en el Callo Embriogénico

En el tratamiento semisólido de inducción a embriogénesis somática, donde el medio de cultivo no fue suplementado con reguladores de crecimiento, no se logró diferenciar estructuras embriogénicas, en ninguno de los callos independiente al tratamiento de proliferación del cual estos provenían; manteniéndose con apariencia compacta en el medio, sin embargo, con colores pálidos o translúcidos a diferencia de los callos en medio de cultivo suplementado con BAP (1.12 mg/L) (Figura 6).

Figura 6

Tratamiento semisólido sin reguladores de crecimiento en inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha

***Callo en Medio Líquido***

Los dos tratamientos en medio líquido también presentaron diferencias apreciables visualmente entre ellos, al estar en medio líquido y en agitación los callos tuvieron mayor contacto con el medio y por lo tanto se pudo observar una reacción en menos tiempo, de la misma manera, se consideraron otros aspectos como la necesidad de realizar refrescamientos de medio de cultivo con más frecuencia (cada 35 días) por la sedimentación que se observó al mantener los callos durante mucho tiempo en el mismo medio.

Efecto del Tratamiento Testigo en el Callo Embriogénico

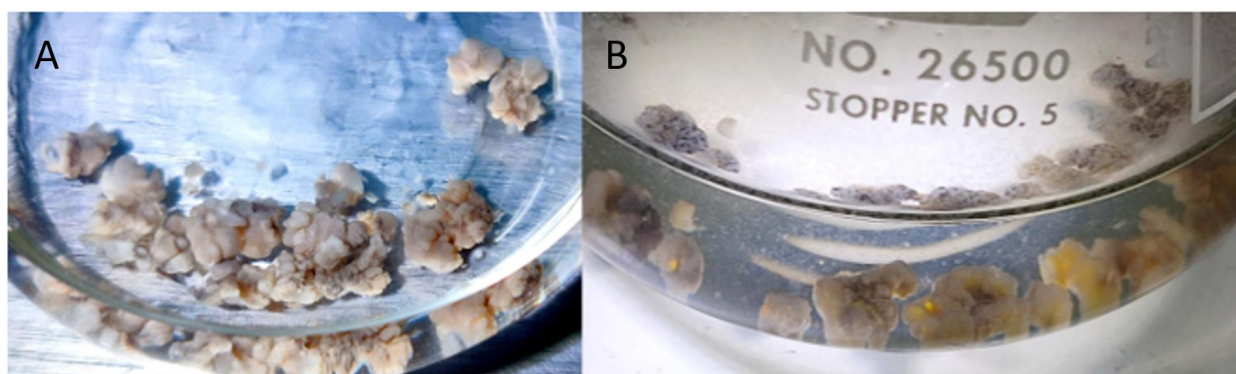
El primer cambio apreciable luego de pasar los callos del medio de proliferación semisólido a un medio líquido fue la separación de estos que antes formaban una masa en estructuras con formas irregulares. A los 14 días en el medio líquido sin reguladores de crecimiento se logró observar en tres de los 15 Erlenmeyers la presencia de las primeras estructuras de color verde, cada una de distinta forma y tamaño, en primera instancia adheridas al callo como estructuras posiblemente pre-embriónicas, las cuales con el pasar de los días fueron separándose (Figura 7). A los 49 días se realizó la primera filtración para observar de manera más clara las estructuras, visualizando formas globulares y acorazonadas de aproximadamente 1mm (Figura 8).

Solo se observó presencia de estructuras que pueden ser embrionarias en los callos provenientes del experimento de proliferación suplementados con KIN (2mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L), los callos provenientes de los otros dos tratamientos permanecieron con la apariencia observada durante los primeros días de diferenciación, es decir, en estructuras separadas levemente oscurecidas y compactas los provenientes de KIN (1.5 mg/L) + 2,4-D (0.5 mg/L), por otro lado, los callos provenientes del tratamiento testigo de proliferación permanecieron mostrando colores más pálidos. Estos diversos colores en los callos pueden estar influenciados por los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, las citoquininas específicamente pueden fomentar la producción de compuestos fenólicos por parte del explante, esta coloración es un buen indicador para el proceso de embriogénesis somática de café.

Avila et al. (2023) menciona en su estudio que únicamente lograron obtener embriones de café en distintas variedades a partir de la células productoras de fenoles que se observaron de coloración marrón. Del mismo modo, la coloración marrón en los callos puede deberse a un estrés hídrico presentado por el callo, es decir estos callos marrones poseen menos cantidad de agua en su estructura, esta característica también es favorable para la producción de embriones somáticos considerando que el estrés hídrico puede inducir cambios fisiológicos entre estos la producción de embriones somáticos.

Figura 7

Tratamiento sin reguladores para inducción de embriones somáticos de café variedad Geisha en medio líquido



Nota. A. Callos en medio líquido sin regulador de crecimiento visiblemente separados con formas irregulares; B. Callos en el día 14 observación de las primeras estructuras de color verde.

Figura 8

Estructuras observadas en callos de café variedad Geisha filtrados el día 49 de embriogénesis somática en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento.

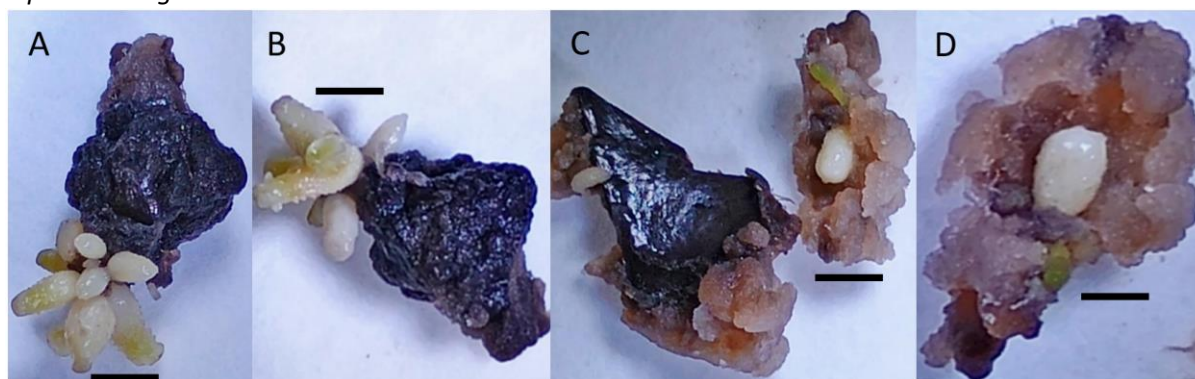


Nota. Barra 1mm

A los 84 días se realizó una segunda filtración para evaluar el cambio morfológico de las estructuras previamente observadas, en donde se notó cambios morfogénicos en tamaño, forma y color, visualizando estructuras que podían ser embriones somáticos de aproximadamente 2mm con forma de torpedo y cotiledonar que empezaban a tornarse en tonalidades blancas y verdes (Figura 9).

Figura 9

Estructuras que parecen ser embriones somáticos de café variedad Geisha en etapa de inducción a embriogénesis somática con desarrollo normal de forma globular y cotiledonar en tratamiento líquido sin reguladores de crecimiento



Nota. Barra 2mm; A y B estructura cotiledonar; C y D estructura en estado torpedo.

Se logró distinguir también la presencia de algunas estructuras con formación anormal, distinguiéndose raíces adheridas al callo, brotes y de estructuras que podrían ser embriones con formas anormales (Figura 10). La visualización de estructuras de desarrollo normal como embriones somáticos en sus diversas formas de crecimiento y anormal como la presencia de brotes y raíces dentro del mismo callo está directamente relacionado con la presencia, consumo e interacción de hormonas como auxinas y citoquininas en el explante.

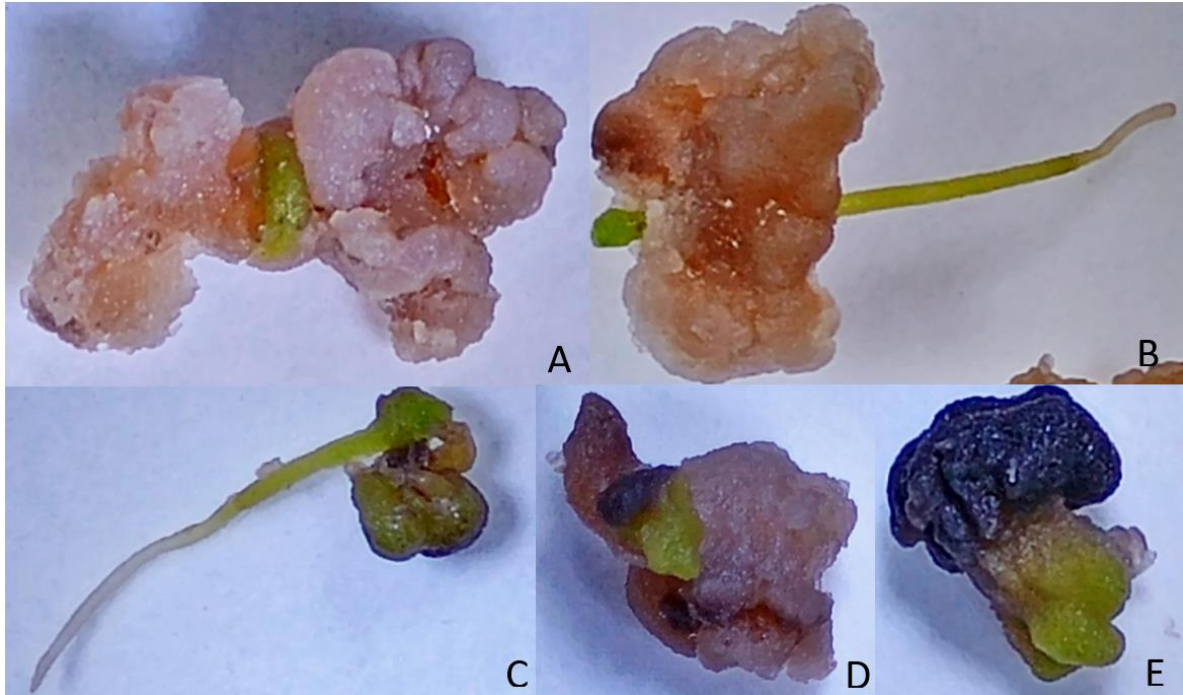
En el proceso de inducción a embriones somáticos, las auxinas se consumen con mayor velocidad que las citoquininas, esto indica que cuando el callo consuma todas las reservas de auxinas que necesite y las agote del medio, el tejido habrá perdido el potencial para continuar con un proceso de embriogénesis, por lo tanto, en las células que alcanzaron las reservas se observa la formación de embrioides, mientras que, las células restantes al ser influenciadas por las citoquininas que han quedado en el medio desarrollan otro tipo de estructuras que se catalogan como desarrollo anormal, en este caso brotes, raíces y embriones que no completaron su adecuada formación (Watson et al., 2021).

Otra explicación para la presencia de estructuras con desarrollo anormal es la variación somaclonal, que se define como los cambios genéticos que se observan durante la propagación in vitro, la variación somaclonal en la inducción a embriogénesis somática no es algo deseable, sin embargo, no necesariamente se considera algo negativo puesto que puede dar lugar a la producción de nuevos genotipos (Rajan y Singh, 2021).

Durante el proceso de filtración se observó que dichas estructuras con formación anormal presentaban una medida de aproximadamente 2mm o mayor y formas que se asemejaban al desarrollo normal de embriones somáticos sin completar el proceso (Figura 11).

Figura 10

Estructuras observadas en inducción a embriones somáticos de café variedad Geisha con desarrollo anormal en medio de cultivo MS líquido sin reguladores de crecimiento.



Nota. A. Estructura color verde que parece ser embrión somático sin formarse por completo; B y C. Estructuras con forma de raíz; D y E. Estructuras de color verde con desarrollo anormal que podrían ser embrión somático en estado corazón.

Figura 11

Estructuras observadas en inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha con desarrollo anormal en tratamiento líquido sin reguladores de crecimiento



Nota. Barra 2mm

Efecto del 6-BAP en el Callo Embriogénico

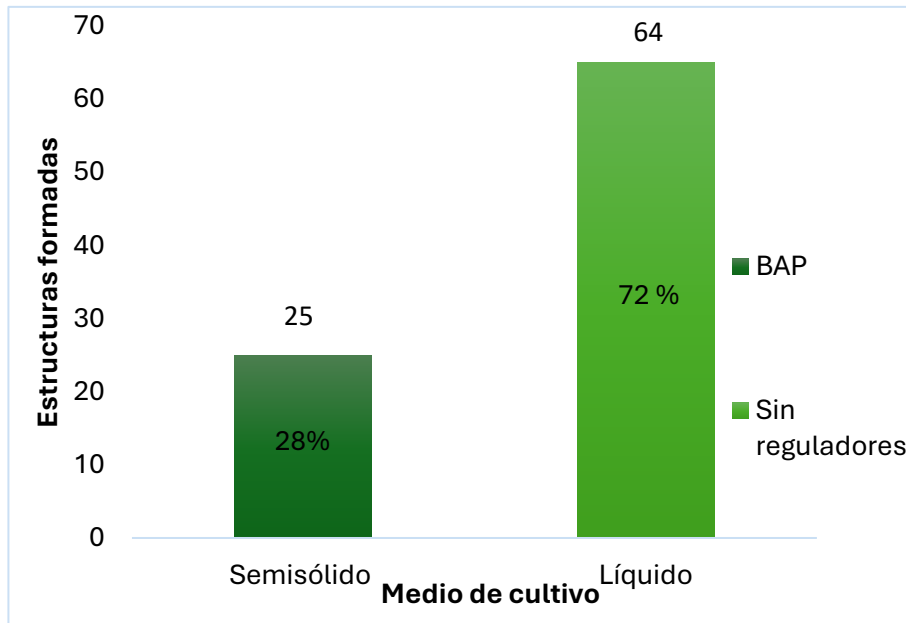
Los callos en medio líquido suplementados con BAP (1.12 mg/L) no presentaron diferenciación embrionaria, se observó la separación del callo en estructuras redondeadas y sueltas, sin embargo, durante el tiempo de evaluación del estudio no se logró distinguir ningún cambio en los callos que indicara formación de estructuras que podrían ser embriones somáticos. Se observó que el medio líquido suplementado con BAP, tenía mayor tasa de sedimentación en menor tiempo que el tratamiento en medio sin reguladores de crecimiento, por lo que el refrescamiento de medio debió realizarse con mayor frecuencia

Todas las estructuras que parecen ser embriogénicas, de formación normal y anormal en los tratamientos sólidos y líquidos se observaron únicamente en los callos que al ser proliferados fueron suplementados con KIN (2mg/L) y 2,4-D (0.5 mg/L), esto puede deberse a que los resultados de proliferación para dicho tratamiento evidenciaban un callo más compacto, lo que coincide con los resultados presentados por Avila et al. (2023) quienes en su estudio de embriogénesis somática en distintas variedades de café obtuvieron mayor formación de embriones a partir de callos compactos.

En la Figura 12 se representa la cantidad y el porcentaje de estructuras que podrían ser embriones somáticos con desarrollo normal, porcentaje basado en el total de estructuras observadas tanto en medio líquido como semisólido con y sin suplementación de BAP (1.12 mg/L).

Figura 12

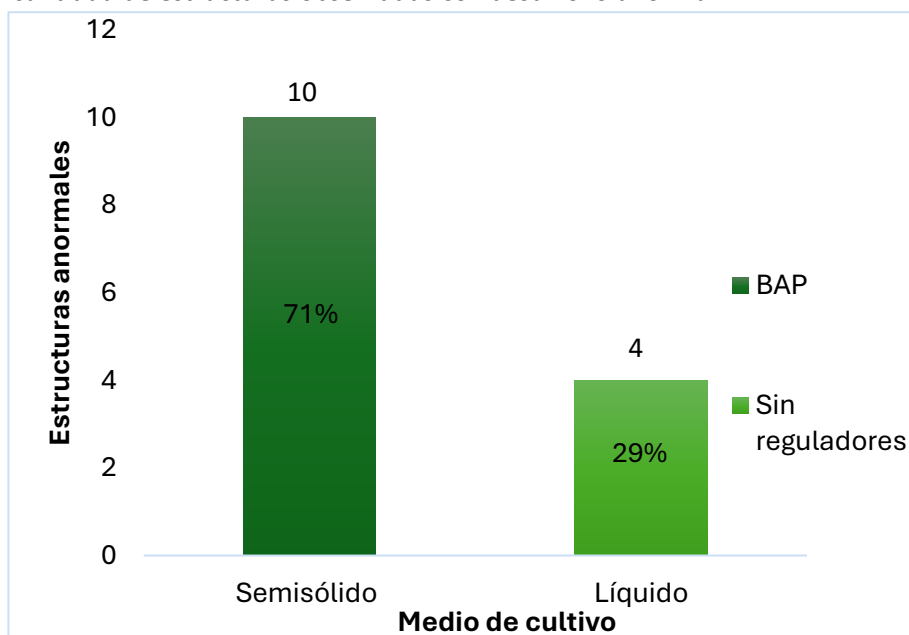
Porcentaje y cantidad de estructuras observadas que podrían ser embriones somáticos con formación normal



En la Figura 13 se representa la cantidad y porcentaje de estructuras con desarrollo anormal, porcentaje basado en el total de estructuras tanto en medio semisólido como líquido, con y sin suplementación de BAP (1.12mg/L).

Figura 13

Porcentaje y cantidad de estructuras observadas con desarrollo anormal



Conclusiones

En el proceso de proliferación de callo embriogénico de café variedad Geisha se observó que la combinación de Kinetina (2.00 mg/L) + ácido 2,4-D (0.50 mg/L) resulta en la formación de callos compactos con potencial embriogénico.

En la inducción a embriogénesis somática de café variedad Geisha se observó que el regulador de crecimiento 6-Bencilaminopurina (1.12 mg/L) en medio de cultivo semisólido promueve la formación de estructuras que podrían ser embriones somáticos en una muy baja frecuencia.

Recomendaciones

Suplementar el medio de cultivo para proliferación de callo embriogénico de café variedad Geisha con las concentraciones 2.0 mg/L de Kinetina y 0.5 mg/L de 2,4-Diclorofenoxiacético para obtener mayor presencia de callos compactos con altas probabilidades de continuar el proceso embriogénico.

Para la inducción de embriogénesis somática de café Geisha utilizar callos compactos, deshidratados y fenolizados, cultivarlos en medio de cultivo líquido sin reguladores de crecimiento.

Evaluar la inducción a embriogénesis somática manteniendo de los callos de café variedad Geisha en el medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog a mitad de concentración y vitaminas de Yasuda suplementado con Kinetina + 2,4-Diclorofenoxiacético durante las fases proliferación e inducción a embriogénesis somática sin realizar refrescamientos de medio.

Realizar refrescamientos de medio de cultivo cada 35 días en la fase de inducción a embriones somáticos para mantener el equilibrio hormonal entre auxinas y citoquinina evitando la formación de estructuras anormales y la variación somaclonal.

Referencias

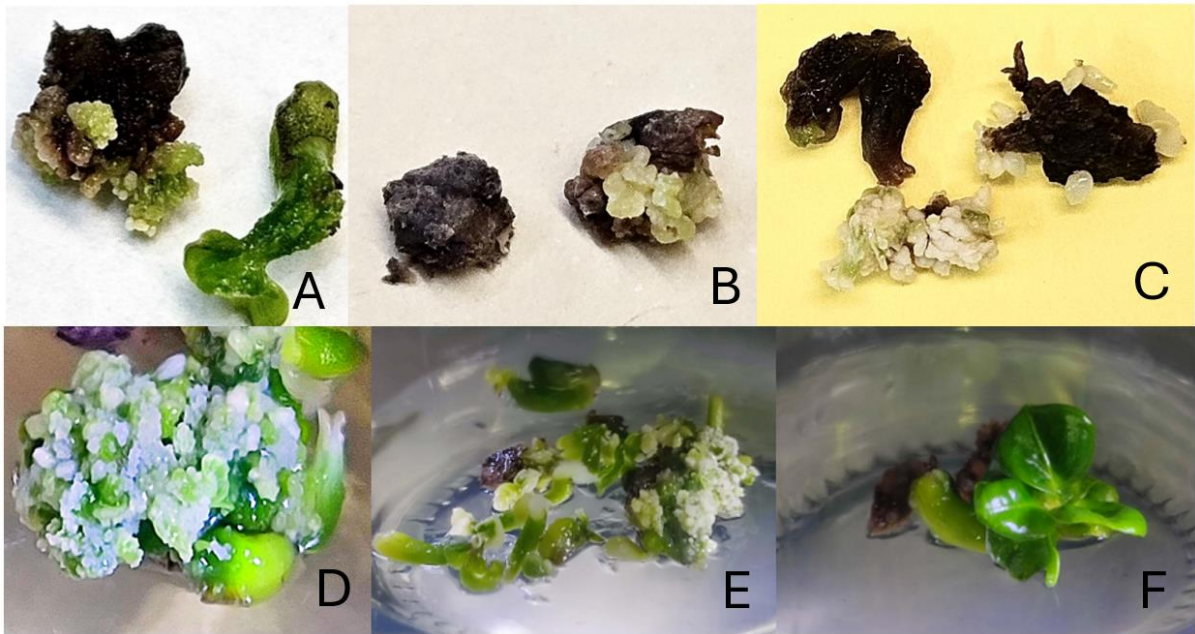
- Acosta, J. (2022). *Efecto del 2,4-D, BAP y Kinetina en la inducción a embriogénesis somática en láminas foliares de café* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/3cce1084-9701-406e-a33e-e8c9b846a9cc/content>
- Acuerdo Internacional del Café. (2020). *International Coffee Organization - Aspectos botánicos/es/botanical_c.asp*. https://www.ico.org/es/botanical_c.asp
- Alcantara, J., Acero, J., Álcantara, J. y Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Arzate, A. y Mejía, R. (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(2), 101–106. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v34n2/v34n2a8.pdf>
- Avila, C., Arjona, E., Iracheta, L., Valdez, J., Gómez, F. y Robledo, A. (2023). Callus Type, Growth Regulators, and Phytigel on Indirect Somatic Embryogenesis of Coffee (*Coffea arabica* L. Var. Colombia). *Plants*, 12(20). <https://doi.org/10.3390/plants12203570>
- Castro, E. (2020). *Inducción a Embriogénesis somática en explantes foliares de café: Revisión de literatura* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/374df0c0-ab0d-4173-b3fc-bc936a10ea19/content>
- Chaves, V. (2010). ICAFE desarrolla proyecto de caracterización de la fertilidad de los suelos cafetaleros. *Revista Informativa I-2010 Icafe*, 1. https://www.icafe.cr/wp-content/uploads/revista_informativa/Revista-I-Sem-10.pdf
- Enríquez, J. P., Retes-Cálix, R. F. y Vásquez-Reyes, E. F. (2020). Importancia, genética y evolución del café en Honduras y el mundo. *Innovare: Revista de ciencia y tecnología*, 9(3), 149–155. <https://doi.org/10.5377/innovare.v9i3.10649>
- Gao, F., Peng, C., Wang, H., Shen, H. y Yang, L. (2021). Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*, 32(2), 483–491. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01147-1>
- Gómez, C., Uribe, M., Ríos, D. y Sánchez, M. (2006). Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia*, 31(10). https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442006001000008&script=sci_arttext
- Instituto Hondureño del Café. (2020). *Informe Estadístico 2019-2020*. Instituto Hondureño del Café (IHCAFE). <https://www.ihcafe.hn/wp-content/uploads/2021/08/INFORME-FINAL-Resumen-CIERRE-EXPORTS-2019-2020-3.pdf>
- International Trade Center. (2022). *The Coffee Guide* (4ª ed.). *Trade impact for good*. United Nations. https://intracen.org/sites/default/files/media/file/media_file/2022/06/29/itc_coffee_4th_report_20211029_es_web.pdf

- Larson, C., Gómez, C., Sánchez, M. y Ríos, D. (2006). Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque*, 27(3), 250–257. <https://www.scielo.cl/pdf/bosque/v27n3/art04.pdf>
- López, P., Iracheta, L., Del Ojeda, M. C. y Ducos, J. P. (2016). Medio de cultivo e inhibidores de etileno en la embriogénesis somática de café. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 7(7). <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263149504021.pdf>
- Mendenhall, W., Beaver, R. y Beaver, B. ... (2009). *Introduction to probability and statistics* (13ª ed.). Brooks/Cole Cengage Learning. https://observatorio.dadep.gov.co/sites/default/files/documentos/li16_introduccion_a_la_probabilidad.pdf
- Mesa, N., Medrano, J., Martínez, M., Grave, M. y Cabrera, Y. (2017). Efecto anticariogénico del café. *Correo Científico Médico*, 21(3). <http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v21n3/ccm22317.pdf>
- Monroig, M. (2018). Manual para la propagación del cafeto en Puerto Rico. <https://www.uprm.edu/cafes/wp-content/uploads/sites/292/2020/01/Portada-Manual-de-Propagaci%C3%B3n-2018F-merged.pdf>
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). Un medio para un crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejidos de tabaco. *Physiol. Plant*, 15, 473–497.
- Orozco, C. (2019). *Café Geisha*. Expo Café. <https://www.expocafe.mx/wp-content/uploads/2020/03/Bol-3-Caf%C3%A9-Geisha.pdf>
- Paredes, G., Peña, C. y 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://doi.org/10.26807/remcb.v34i1-2.236>
- Pérez, J., García, L., Veitía, N., Bermúdez, I., López, R. y Torres, D. (2017). Efecto de la morfología de los embriones somáticos en la regeneración de plantas de soya (*Glycine max* L. Merrill). *Cultivos Tropicales*, 38(2), 28–35. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v38n2/ctr04217.pdf>
- Rajan, R. y Singh, G. (2021). A review on application of somaclonal variation in important horticultural crops. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22(35), 161–175. https://www.researchgate.net/profile/Rony-Rajan-2/publication/353635805_A_REVIEW_ON_APPLICATION_OF_SOMACLONAL_VARIATION_IN_IMPORTANT_HORTICULTURE_CROPS/links/63a1d93d51f6c723c6b4922c/A-REVIEW-ON-APPLICATION-OF-SOMACLONAL-VARIATION-IN-IMPORTANT-HORTICULTURE-CROPS.pdf
- Ramírez, J. (2009). 60 años de Investigación y Transferencia de Tecnología en Café. *Revista Informativa II-2009 Icafe*. https://www.icafe.cr/wp-content/uploads/revista_informativa/Revista-II-Sem-09.pdf
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. <https://cgspace.cgiar.org/items/2c684d6a-a61e-43f4-a11a-f9547c71b6dc>
- Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2018). Manual de medios de cultivo. <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Sánchez, K., Cabrera, R. y Jiménez, J. (2019). Induction of somatic embryogenesis from foliar explants in three varieties of coffee. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259–264. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>

- Shriram, V., Kumar, V. y Shitole, M. G. (2008). Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44(3), 186–193. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9108-3>
- Tang, L., Zhang, X. y Su, Y. (2020). Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *ABIOTECH*, 1(185-193). <https://link.springer.com/article/10.1007/s42994-020-00029-8#citeas>
- Velásquez, R. (2019). *Guía de variedades de café*. Asociación Nacional del Café (ANACAFE). <https://www.anacafe.org/uploads/file/9a4f9434577a433aad6c123d321e25f9/Gu%C3%ADa-de-variedades-Anacaf%C3%A9.pdf>
- Watson, W., Jiménez, V. y Brenes, J. (2021). Establecimiento de un protocolo para la inducción de embriogénesis somática indirecta en *Allium Sativum* (Ajo Criollo Costarricense). *Revista Tecnología En Marcha*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.18845/tm.v34i2.4984>
- World Coffee Research. (2024). *Geisha (Panama)*. <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/es/variedades/geisha-panama>

Anexos**Anexo A**

Estructuras que parecen ser embriones, callos secundarios y brotes en medio de cultivo MS semisólido, suplementado con Kinetina (2mg/L) y 2,4-Diclorofenoxiacético (0.5 mg/L) sin refrescamiento de medio



Nota. A. Callo secundario sobre el callo primario y estructura con desarrollo anormal (brote); B. Callo secundario; C. Callo secundario y estructuras que parecen ser embriones en estado globular