

**Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.)
-variedades Geisha y Sarchimor- a partir de
láminas foliares y meristemas axilares**

Rigoberto Morales Del Cid

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.)
-variedades Sarchimor y Geisha - a partir de
meristemos axilares y láminas foliares**

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

Presentado por

Rigoberto Morales Del Cid

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

**Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.)
-variedades Sarchimor y Geisha- a partir de meristemas axilares y láminas foliares**

Rigoberto Morales Del Cid

Resumen. La reproducción vegetativa *in vitro* de café se ha investigado desde 1922. Se evaluó la formación de callos a partir de explantes foliares de café variedad Geisha y formación de brotes en meristemas axilares de café variedad Sarchimor. En el experimento de explantes foliares se evaluaron los tratamientos: 2,4-D 1.1 mg/L+ Kinetina (KIN) 4.3 mg/L y 6-Bencilaminopurina (BAP) 6.75 mg/L para la inducción de calogénesis. Para la estimulación de estructuras proembriogénicas se evaluaron dos tratamientos: sin fitohormonas y KIN 0.5 mg/L + ANA 0.01 mg/L. Se realizó un análisis descriptivo observando la respuesta de los explantes. Se obtuvo el 100% de callos con 2,4-D 1.1 mg/L + KIN 4.3 mg/L y con BAP 6.75 mg/L no hubo sobrevivencia. En la estimulación de estructuras proembriogénicas se observaron estructuras globulares en el medio sin fitohormonas. Los meristemas se establecieron y multiplicaron en medios semi sólido (Phytigel® 1.8 g/L) y líquido. Se evaluó sobrevivencia y número de brotes por explante al día 82, realizando una prueba t de Student ($P \leq 0.05$). Se estableció el 85% de los meristemas en medio semi sólido y el 50% en líquido. Se obtuvo una media de 2.24 brotes por meristemo en el medio semi sólido y 1.38 en líquido. Se logró la formación de callos embriogénicos suplementando 2,4-D 1.1 mg/L + KIN 4.3 mg/L y de estructuras proembriogénicas en medios sin fitohormonas. El medio más favorable para la sobrevivencia y formación de brotes por meristemas es el medio semi sólido.

Palabras clave: Calogénesis, callos embriogénicos, inducción, meristemas axilares.

Abstract. The *in vitro* vegetative reproduction of coffee has been investigated since 1922. Callus formation from leaf explants of Geisha coffee variety and bud formation in axillary meristems of Sarchimor coffee variety were evaluated. The treatments for the induction of callogenesis using leaf explants were: 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetine (KIN) 4.3 mg /L and 6-Benzylaminopurine (BAP) 6.75 mg / L. For the stimulation of proembryogenic structures, two treatments were evaluated: KIN 0.5 mg/L + ANA 0.01 mg/L and without phytohormones . A descriptive analysis was performed by observing the explant response. With 2.4-D 1.1 mg / L + KIN 4.3 mg/L 100% callus was obtained and with BAP 6.75 mg / L there was no survival. In the stimulation of proembryogenic structures, globular structures were observed in the medium without phytohormones. The meristems were established and multiplied in semi-solid medium (Phytigel® 1.8g / L) and liquid medium. Survival and number of buds per explant were evaluated in the day 82, performing a Student t test ($P \leq 0.05$). 85% of the meristems were established in semi solid medium and 50% in liquid. An average of 2.24 buds per meristem was obtained in the semi solid medium and 1.38 in liquid medium. The formation of embryogenic calli was achieved by supplementing 2,4-D 1.1 mg/L + KIN 4.3 mg/L and proembryogenic structures in medium without phytohormones. The most favorable medium for the survival and formation of buds by meristems is the semi solid medium.

Key words: Axillary meristems, callogenesis, embryogenic callus, induction.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES	14
5. RECOMENDACIONES	15
6. LITERATURA CITADA.....	16

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado a la mitad de concentración de sales para el establecimiento de meristemos axilares y multiplicación de los brotes de café -variedad Sarchimor-.....	4
2. Medio de cultivo para el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de café – variedad Geisha-.....	6
3. Supervivencia y promedio de brotes por meristemo axilar de café -variedad Sarchimor-, establecidos <i>in vitro</i> en medio semi sólido y líquido.	9

Figuras	Página
1. Meristemos axilares de café -Variedad Sarchimor-.....	4
2. Desarrollo de meristemos axilares de café -variedad Sarchimor- en medio semi sólido (A y B) y líquido con puente de papel filtro (C y D). A y C a 10 días de establecimiento. B y D a 21 días de establecimiento.	8
3. Crecimiento de brotes de meristemo axilar de café -variedad Sarchimor- en medio de multiplicación semi sólido.....	8
4. Subcultivo de brotes de café -variedad Sarchimor-.....	9
5. Respuesta de los explantes foliares de café –variedad Geisha- al medio suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L.....	10
6. Respuesta de los explantes foliares de café –variedad Geisha- al medio MS suplementado con 6-Bencilaminopurina (BAP) 6.75mg/L.....	11
7. Respuesta de los explantes foliares de café -variedad Geisha- al medio de estimulación de estructuras pro-embriogénicas sin reguladores de crecimiento....	12
8. Respuesta de los explantes foliares de café -variedad Geisha- al medio de estimulación de estructuras proembriogénicas suplementado con Kinetina 0.5 mg/L y ANA 0.01 mg/L.	13

1. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los cultivos más importantes en el mercado internacional, debido a que se exportan siete millones de toneladas de café con un crecimiento del 4.4% (PROCOMER 2017), es por esto que se desarrollan nuevas investigaciones para su mejoramiento genético y para hacer más eficientes los métodos de reproducción masiva, como lo es la reproducción *in vitro*. Estas metodologías de reproducción han generado múltiples avances en las investigaciones de propagación masiva, genética, fito mejoramiento y fitopatología (Dublin 1991a).

El café es originario de África, constituido por más de 100 especies del genero *Coffea*, de las cuales dos se cultivan comercialmente: *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner. Existen híbridos como lo son los Sarchimores, que son el resultado del cruzamiento entre el Híbrido de Timor y la variedad Villa Sarchi, el cual se desarrolló en el Centro Internacional de las Royas del Café (Oeiras, Portugal). Son de porte bajo, brote verde o bronce o ambos según la línea, vigor y producción alta, bien adaptado en zonas de baja y mediana altura, resistente al hongo de la roya. En zona baja y de media altura generan buena taza (Anzueto 2013).

La variedad arábica pura de café denominada Geisha es originaria del sur oeste de Etiopía, en 1931. Es de porte alto y de abundante follaje, forma un eje central y muchas bandolas ortotrópodas basales, las cuales se desarrollan entre el segundo y cuarto nudo. Las hojas son oblongo-elípticas, coriáceas, cóncavas. Color verde oscuro, mate, y ápices agudos. Las bandolas adquieren una forma de una “s” paralela al suelo, tienen entrenudos largos y frutos grandes y de buen rendimiento (Miranda 2006).

Al momento de evaluar la variedad Geisha, resultó tener excelentes características organolépticas como lo es su aroma a jazmín y a variedades de frutas como el arándano y la cereza que se degustan al momento de tomar una taza de café de esta variedad. Esto permitió que el kilogramo de dicha variedad se vendiera a \$1322.2 en la XXI subasta electrónica “The Best of Panamá”, convirtiéndose en la variedad mejor pagada en las subastas electrónicas (Rosario 2017).

Las técnicas de propagación *in vitro* pueden acortar los ciclos de selección y acelerar la multiplicación vegetativa para fines de investigaciones en mejoramiento genético. Es el único método de reproducción asexual que permite reproducir variedades élite y con características únicas, como resistencia a enfermedades, altos rendimientos productivos y ausencia de algún patógeno que dañe las buenas características de la variedad (Dublin 1991a).

La reproducción vegetativa *in vitro* de los cafetos se viene explorando desde hace mucho tiempo. Existen dos métodos altamente eficientes, uno de los procedimientos más destacados de la micropropagación de café es el de Sondahl et al. (1985), obteniendo en seis meses aproximadamente 7.5 brotes nuevos de cada meristemo axilar establecido.

El segundo método es el de Dublin (1991a) que usa explantes foliares, los cuales son inducidos a la formación de callos embriogénicos, para posteriormente obtener aproximadamente de 100 a 200 embriones somáticos por explante, obteniendo una planta de café por cada embrión somático.

Debido a las ventajas mencionadas anteriormente se realizó la investigación de establecimiento *in vitro* de las variedades de café Sarchimor y Geisha.

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar la formación de brotes provenientes de meristemos axilares de café –variedad Sarchimor- en medio semisólido y líquido.
- Evaluar la formación de callos embriogénicos a partir de explantes foliares de café - variedad Geisha-.

2. METODOLOGÍA

Ubicación del estudio.

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de Zamorano, Honduras.

Experimento 1: Establecimiento de meristemos axilares de café -variedad Sarchimor-

Fuente de material vegetal.

Se utilizaron los meristemos axilares presentes en cada entrenudo de las bandolas de plantas provenientes de la plantación de café de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Desinfección superficial de bandolas. Previo a desinfectar el material vegetal se eliminaron las hojas dejando únicamente la bandola con los peciolo de las hojas. Se procedió a separar las bandolas en segmentos nodales. Luego realizó un lavado con agua y jabón. Se sumergieron los segmentos nodales por diez minutos en una solución de 1 mL/L de Clorotalonil + 0.3 g/L de Estreptomina y oxitetraciclina 1 mL/L. Seguidamente se hizo otra inmersión durante 10 segundos en etanol al 70% y finalmente en una solución de NaClO al 30% v/v (Magia Blanca con 4.7% de hipoclorito de sodio) adicionándole Tween[®] 80 (2 gotas/100ml) durante 30 minutos. Cumplido el tiempo se realizó el triple lavado dentro de la cámara de flujo laminar con agua destilada estéril con el fin de remover los residuos del NaClO. Posteriormente se procedió a colocar todos los segmentos nodales en una solución antioxidante estéril (100 mg/L de Ácido Ascórbico + 150 mg/L de Ácido Cítrico) durante 10 minutos.

Extracción y establecimiento de meristemos axilares. El meristemo se encuentra adherido en el tejido de la bandola (crecimiento plagiotrópico), justo debajo del peciolo de la hoja. Al momento de la extracción de los meristemos se utilizó un estereoscopio para observarlos mejor y hacer el corte exacto de los dos tejidos protectores del meristemo, los cuales se deben de retirar con bisturí de punta fina para dejar expuesto el meristemo y hacer más fácil su extracción. Ya realizado el corte se colectó el meristemo con la punta de una aguja, colocándolo inmediatamente dentro del tubo de ensayo con el medio específico para su crecimiento.



Figura 1. Meristemos axilares de café –Variedad Sarchimor–. A. las flechas señalan las yemas del meristemo. B. Meristemos en medio semisólido. C. Meristemo en medio líquido con puente de papel filtro.

Medios de cultivo para establecimiento de meristemos axilares.

Para el establecimiento de los meristemos se utilizó el medio de Murashige y Skoog (MS) modificado con las sales minerales al 50% (Cuadro 1). El pH del medio se ajustó a 5.8.

Cuadro 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado a la mitad de concentración de sales para el establecimiento de meristemos axilares y multiplicación de los brotes de café -variedad Sarchimor-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.0000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.0000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.0000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.0000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.0000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	3.1000
	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	0.4150
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.1500
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.1200
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.3000
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	25.0000
Compuestos orgánicos		Inositol	100.0000
		Ácido Nicotínico	0.5000
		Piridoxina	0.5000
		Tiamina	0.4000
		BAP (6-bencilaminopurina)	2.2500
	Sacarosa	30,000.0000	

Fuente: Dublín (1991a)

Transferencia de meristemos al medio de cultivo para multiplicación. Culminada la fase de establecimiento, se procedió al traslado de los meristemos provenientes de los medios semisólidos y líquidos al medio de multiplicación, el cual contenía las sales minerales del medio MS descritas en el Cuadro 1 y además suplementado con Inositol (100 mg/L), 6-Bencilaminopurina (1 mg/L), Cisteína (30 mg/L), Sacarosa (30 g/L), (Dublin 1991a; Lozano Kretschmar 2014).

Tratamientos evaluados.

Tanto en establecimiento como en multiplicación se evaluaron dos tratamientos: 1. Medio semisólido (Phytigel[®] 1.8 g/L) y 2. Medio líquido. En el medio líquido se utilizó un puente de papel filtro como medio de sostén del meristemo. Se realizaron dos refrescamientos de medio cada 21 días.

Variables medidas.

Se observó la sobrevivencia, número de brotes por explante hasta los 82 días.

Diseño experimental.

En las dos etapas (establecimiento y multiplicación), se utilizó un diseño completamente al azar. El experimento consistió en dos tratamientos y 98 repeticiones para el medio semisólido y 77 repeticiones para el medio líquido.

Análisis estadístico.

Se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4) para evaluar los datos, se utilizó la prueba t de Student para determinar diferencia estadística con un nivel de significancia $P \leq 0.05$ para número de brotes por meristemo y para la sobrevivencia.

Experimento 2 Establecimiento de explantes foliares de café -variedad Geisha-

Fuente de material vegetal.

El material que se utilizó para la investigación con explantes foliares fue de la variedad de café Geisha, de un año de edad, traída de Marcala, La Paz, Honduras.

Desinfección superficial de los explantes foliares. Las hojas fueron lavadas con agua y jabón. Luego se sumergió por diez minutos en la solución de 1ml/L de Clorotalonil + 0.3 g/L de Estreptomicina y oxitetraciclina. Seguidamente se sumergieron en una solución de NaClO al 30% v/v (Magia Blanca con 4.7% de hipoclorito de sodio) adicionándole Tween[®] 80 (2 gotas/100 mL) durante 30 minutos. Cumplido el tiempo se realizó el triple lavado dentro de la cámara de flujo laminar con agua destilada estéril, con el fin de remover los residuos del NaClO. No se realizó la inmersión en etanol al 70% debido a que es tóxico para las hojas del cafeto.

Medio de cultivo para inducción a callogénesis.

Se utilizó el medio MS modificado con las sales minerales a la mitad de la concentración, (Cuadro 2) y suplementado con los reguladores de crecimiento según el tratamiento a evaluar. El pH se ajustó a 5.8, y se solidificó los medios con Phytigel[®] 1.8 g/L.

Tratamientos a evaluar.

En este experimento se evaluó el efecto de 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L (Dublin 1991) y BAP 6.75 mg/L Paz Ramírez (2000).

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar. El experimento consistió en dos tratamientos (2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L y BAP 6.75 mg/L) y 50 repeticiones por tratamiento.

Análisis.

Se realizó un análisis visual comparativo entre los dos tratamientos para observar la respuesta de los explantes a las fitohormonas.

Cuadro 2. Medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de café – variedad Geisha-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/lt
Macroelementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.0000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.0000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.0000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.0000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.0000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	3.1000
	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	0.4150
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.1500
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.1200
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.3000
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	25.0000
Compuestos Orgánicos	Inositol		100.0000
	Tiamina		1.0000
	Cisteína		30.0000
	Sacarosa		30,000.0000

Fuente: Dublin (1991a)

Medio de cultivo para estimulación de estructuras proembriogénicas.

Al finalizar la etapa de establecimiento se procedió a cambio de medio transfiriendo los callos obtenidos en el medio de inducción a callogénesis del tratamiento 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L a los tratamientos a evaluar.

Tratamientos a evaluar.

Para la estimulación de estructuras proembriogénicas, se procedió a transferir este callo a medio de cultivo Murashige y Skoog al 50% de la concentración de las sales minerales, dejando únicamente el KNO_3 con el 100% de su concentración y suplementándolo o no con fitohormonas según el tratamiento: sin fitohormonas y Kinetina 0.5 mg/L + ANA 0.01 mg/L.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar. El experimento consistió en dos tratamientos y 45 repeticiones por tratamiento.

Análisis.

Se realizó un análisis visual comparativo para observar la respuesta de los callos a los medios de estimulación de estructuras proembriogénicas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Establecimiento de meristemos axilares de café -variedad Sarchimor-

A los 21 días del establecimiento se pudo observar que los meristemos aumentaron su tamaño, formando un pequeño abultamiento en la parte basal de cada yema e iniciaron a brotar las primeras hojas (Figura 2).



Figura 2. Desarrollo de meristemos axilares de café -variedad Sarchimor- en medio semi sólido (A y B) y líquido con puente de papel filtro (C y D). A y C a 10 días de establecimiento. B y D a 21 días de establecimiento.

Multiplicación. Se realizó a los 42 días de haber establecido los meristemos, observando en el día 10, la elongación de la parte basal (abultamiento) y el crecimiento normal de las hojas principales, pudiendo distinguir perfectamente el número de brotes por meristemo (Figura 3).

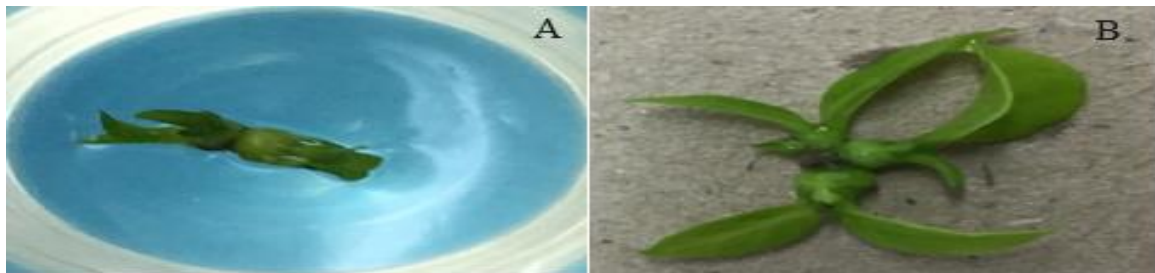


Figura 3. Crecimiento de brotes de meristemo axilar de café -variedad Sarchimor- en medio de multiplicación semi sólido. A. Brotes de meristemo a los 10 días del cambio de medio de establecimiento. B. Brotes de meristemo axilar a los 30 días del cambio de medio al de multiplicación (82 días de edad).

Sobrevivencia y brotes por explante. Se obtuvo una mayor sobrevivencia y mayor número de brotes/meristemo en el medio semi sólido (Cuadro 3). Según Dublin (1991b) se obtiene una media de 2.2 brotes por meristemo, lo que nos indica que el medio sólido está brindando los mejores resultados. Se observó también una mayor vigorosidad en el crecimiento, ya que en el medio líquido los meristemos que se formaron eran muy pequeños, con hojas deformes y con poca vigorosidad (Figura 4).

Cuadro 3. Sobrevivencia y promedio de brotes por meristemo axilar de café -variedad Sarchimor-, establecidos *in vitro* en medio semi sólido y líquido.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	Brotes/meristemo
Semi sólido	85.00a	2.24a
Líquido	50.00b	1.38b
Valor t	3.104	5.55
Grados de libertad	76.00	46.68
Probabilidad	0.003	0.05

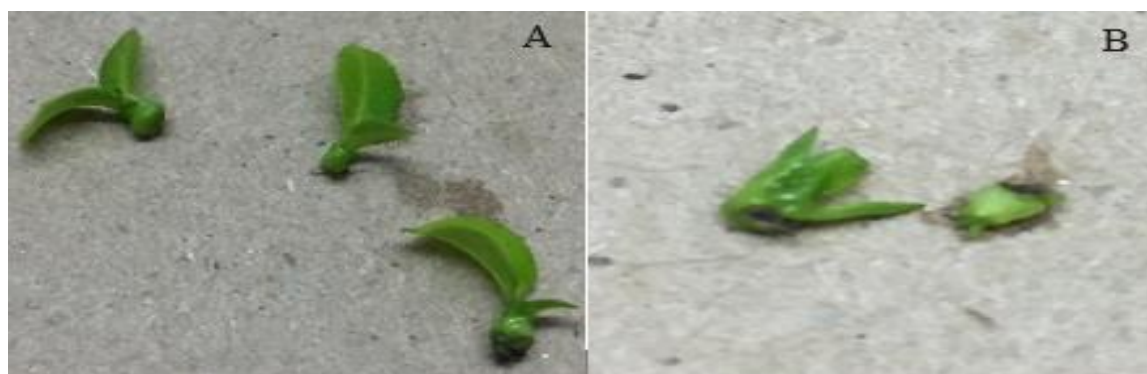


Figura 4. Subcultivo de brotes de café -variedad Sarchimor-. A. División de brotes establecidos en medio semisólido. B. División de brotes establecidos en medio líquido con puente de papel filtro.

Experimento 2. Establecimiento de explantes foliares de café -variedad Geisha-

La respuesta de los explantes al medio suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L, se puede observar en la Figura 5. Se observó la formación de callos en los bordes de los explantes foliares a partir del día 18, formando callos de color blanco, enrollamientos en la hoja debido a la división celular acelerada que se dio en el explante, según Pincay (2017) al exponer los explantes a reguladores de crecimiento en el medio se generan los enrollamientos de los explantes. Entre los días 24 y 39 se observó que los cuatro lados del explante se cubrieron de callo y continuó con su crecimiento hasta formar una segunda capa de callo encima del principal.

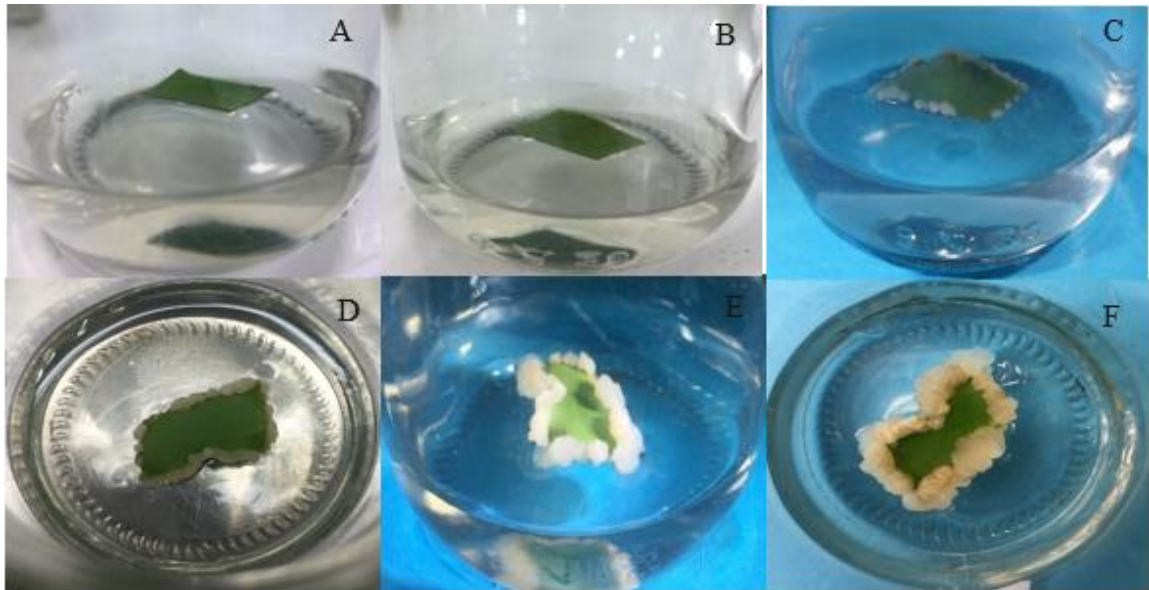


Figura 5. Respuesta de los explantes foliares de café -variedad Geisha- al medio suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L. A. Establecimiento de explante. B. Ensanchamiento de los bordes del explante en el día 10. C. Inicio de formación de callos en el día 18. D. Formación de callos en los cuatro lados del explante al día 24. E. Crecimiento de callo a los 39 días del establecimiento. F. Formación de segunda capa de callo en la cima de los callos.

La respuesta de los explantes al medio suplementado con BAP 6.75 mg/L se pudo observar en el desarrollo de los callos a partir del día 10, en donde se iniciaron a hinchar los bordes de las hojas creando una pared gruesa de callo. Dentro de los días 18 y 24 días de establecimiento se formaron pequeñas esferas de callos de color blanco cremoso. El crecimiento de dichos callos fue más lento en comparación con la masa de callo que se generó en el medio MS suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L, ya que del día 24 al día 39 los callos no aumentaron su tamaño, y al llegar a los 50 días todos los explantes presentaron mortalidad (Figura 6).

Según Paz Ramírez (2000) realizó un estudio de inducción a callos embriogénicos en café variedad Caturra, obteniendo las mayores producciones de callos con 9 mg/L BAP. Posiblemente la mortalidad de los callos embriogénicos de este experimento es debido a que se utilizó una dosis menor de BAP en el medio o a al uso de una especie de café diferente.

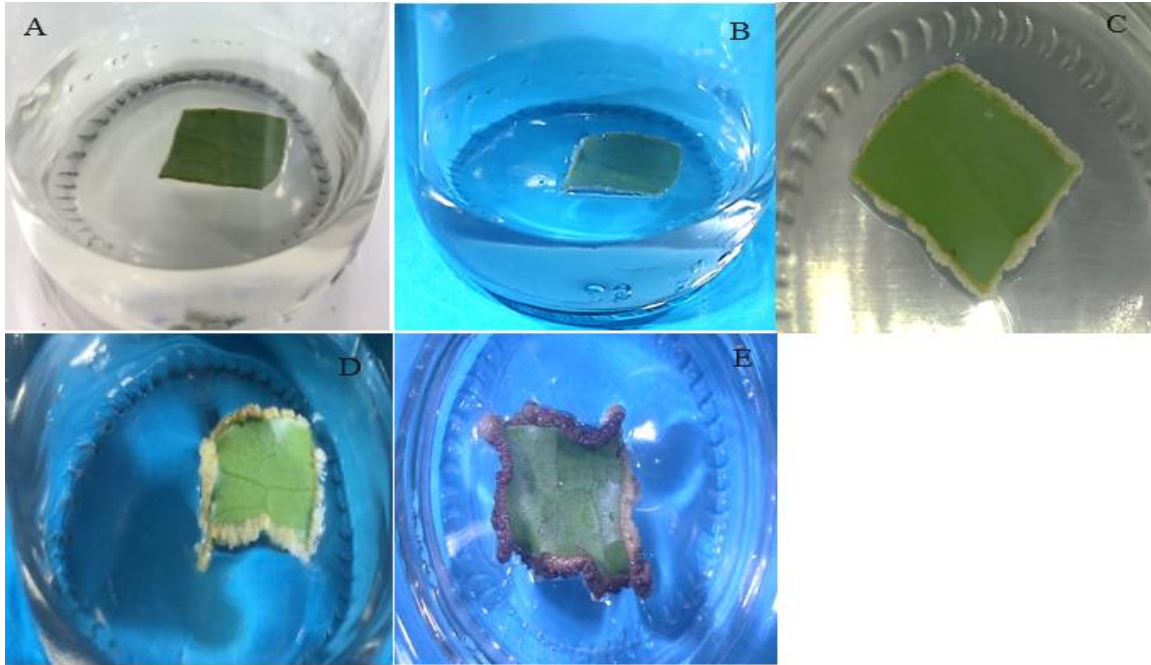


Figura 6. Respuesta de los explantes foliares de café -variedad Geisha- al medio MS suplementado con 6-Bencilaminopurina (BAP) 6.75mg/L. A. Establecimiento de explante. B. Ensanchamiento de los bordes del explante en el día 10. C. Inicio de formación de callos en el día 18. D. Formación de callos en los cuatro lados del explante al día 24. E. Crecimiento de callo a los 39 días del establecimiento. Mortalidad total de callos en el día 50.

Estimulación de estructuras proembriónicas. Se realizó la estimulación de estructuras proembriónicas de los callos formados en la fase de calogénesis en el medio suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L. Como se puede observar en la Figura 7. A los 5 días después del traslado al medio de estimulación de estructuras proembriónicas sin fitohormonas se observó el cambio de coloración en los callos blancos a color verde, esto fue debido a que se expusieron a la luz. En el día 18, se observaron pequeñas costras por encima de los callos existentes, tornándose necróticas. Observando también que en la parte interior del callo necrótico emerge una esfera de color verde. El resto del callo presentó estructuras globulares pero sin llegar a observar los embriones somáticos.

Según Sondahl et al. (1985) utilizaron este mismo medio sin fitohormonas en inducción a embriones somáticos en café variedad Mundo Novo, para acelerar el proceso de formación de embriones somáticos, obteniendo de 100 a 200 embriones por callo embriónico en un periodo de tiempo de seis semanas, ya que al utilizar el protocolo de estimulación embriónica de la variedad Bourbon los embriones se inician a observar a partir de la semana 19 de haber establecido los callos embriónicos en medio suplementado con ANA+KIN. La ausencia de embriones posiblemente se debe a que se utilizó la variedad Geisha.

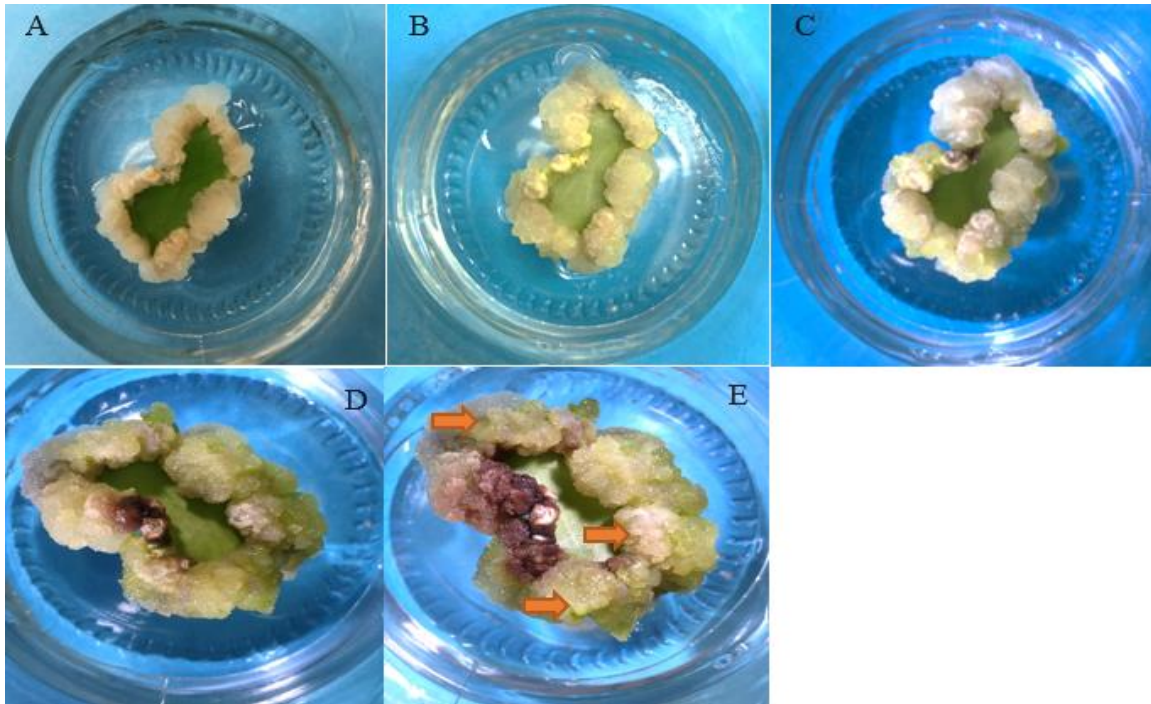


Figura 7. Respuesta de los explantes foliares de café -variedad Geisha- al medio de estimulación de estructuras pro-embriogénicas sin reguladores de crecimiento. A. Establecimiento de explante proveniente de calogénesis. B. Cambio de coloración en el callo por efecto de la exposición a la luz al día 8 de su traslado. C. Formación de costras de color blanco cremoso encima de los callos existentes a los 16 días de su traslado. D. Presencia de tejido necrótico en los callos a los 24 días. E. Expansión del tejido necrótico en los callos a los 32 días del traslado. La → indica estructura globular.

La respuesta de los explantes al medio suplementado con Kinetina 0.5 mg/L y ANA 0.01 mg/L se puede observar en la Figura 8, en donde los callos iniciaron a presentar cambios de coloración, de blancos cremosos a café claro, a los 16 días de su traslado. La coloración café continuó presentándose en todos los callos. Se observaron pequeñas formaciones globulares de color blanco crema a los 24 días de su traslado. Se observó la muerte del tejido foliar y el rompimiento de las estructuras globulares que se formaron a los 24 días del traslado.

Según Gonzales (2007) al realizar un estudio en estimulación de embriones somáticos en *Coffea canephora* con medio MS suplementado con 0.1 mg/L ANA + 0.5 mg/L KIN observó que el crecimiento se detuvo y también el cambio de coloración marrón en el callo.

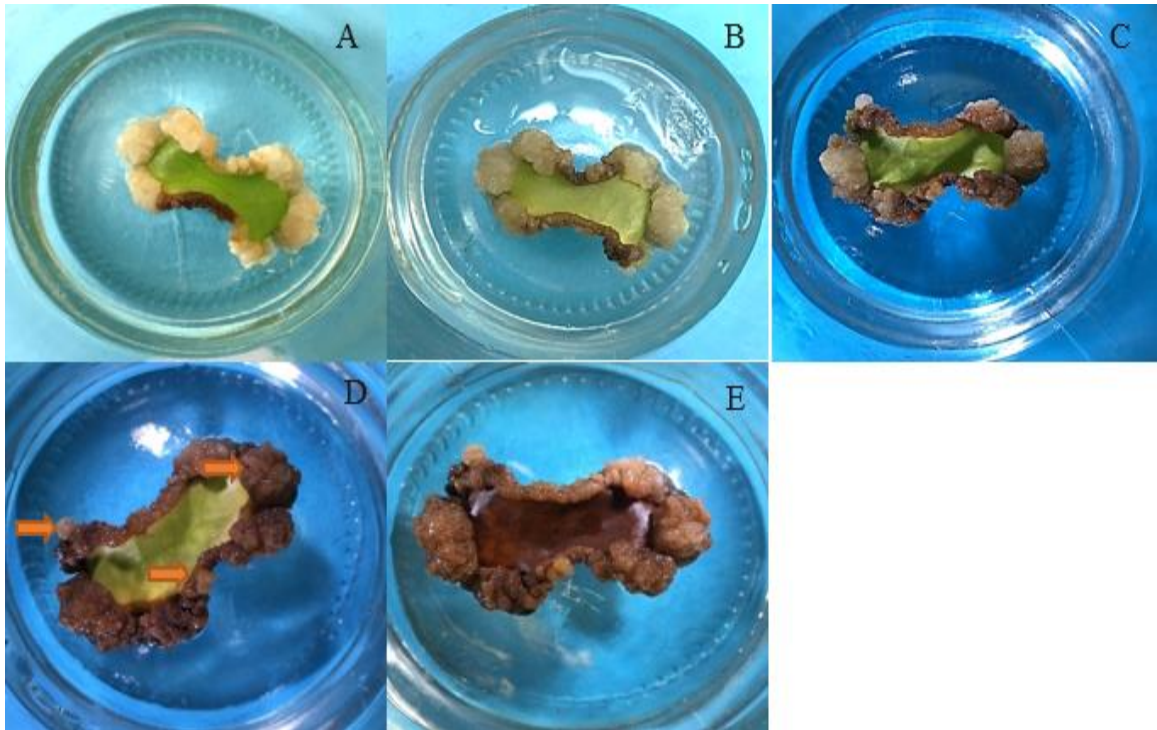


Figura 8. Respuesta de los explantes foliares de café -variedad Geisha- al medio de estimulación de estructuras proembriogénicas suplementado con Kinetina 0.5 mg/L y ANA 0.01 mg/L. A. Establecimiento de explante proveniente de callogénesis. B. Cambio de coloración en el callo por efecto de la exposición a la luz al día 8 de su traslado. C. Oscurecimiento de los callos provenientes de la etapa de callogénesis a los 16 días de su traslado. D. Presencia de tejido necrótico en los callos a los 24 días. E. Expansión del tejido necrótico en todos los callos y lamina foliar a los 32 días del traslado. La → indica formaciones globulares en el callo.

4. CONCLUSIONES

- El medio más favorable para la formación de brotes por meristemo de café -variedad Sarchimor- es el medio semisólido.
- Se logró la formación de callos embriogénicos en los explantes foliares de café -variedad Geisha- en el medio, suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L y estructuras proembriogénicas en el medio sin fitohormonas.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar con las fases de multiplicación y enraizamiento de los brotes obtenidos a partir de meristemas axilares de café -variedad Sarchimor-.
- Dar seguimiento a las estructuras proembriogénicas obtenidas para lograr inducción de embriones somáticos de café -variedad Geisha-.

6. LITERATURA CITADA

- Anzuetto F. 2013. Variedades de café resistentes a la roya [internet]. Guatemala: Anacafé; [consultado 2016 nov 07]. https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_resistentes_a_roya
- Dublin P. 1991a. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia: CIAT. 577-596 p.
- Dublin P. 1991b. Propagación *in vitro* de café. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia: CIAT. 622-642 p.
- Gonzales M. 2007. Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios del cafeto (*Coffea canephora* P.). Rcb. 1:16-22.
- Lozano Kretschmar G. 2014. Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*) -variedad Lempira- a partir de meristemas [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 23 p.
- Miranda A. 2006. Programa nacional de café: el café Geisha de Panamá rompe record mundial. Panamá: MIDA, [consultado 2017 jun 16]. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A4506e/A4506e.pdf>
- Paz Ramírez A. 2000. Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 42 p.
- Pincay V. 2017. Multiplicación *in vitro* de café caturra rojo *Coffea arabica* L. con la interacción de dos fitohormonas [Tesis]. Universidad de Guayaquil - Ecuador. 55 p.
- PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica) 2017. Las perspectivas internacionales del café en el 2017 [internet]. Bogotá (Colombia): Legiscomex; [consultado 2017 ago 02]. <https://www.legiscomex.com/BancoConocimiento/P/perspectivas-internacionales-cafe-2017-ene-25-17-15not/perspectivas-internacionales-cafe-2017-ene-25-17-15not.asp?CodSubseccion=353&Codseccion=&numArticulo=69492>

Rosario M. 2017. Café especial de Panamá alcanza un precio "récord" de 601 dólares en subasta [internet]. Panamá Café. Boquete (Panamá): Agencia EFE; [consultado 2017 ago 25]. <https://www.efe.com/efe/america/portada/cafe-especial-de-panama-alcanza-un-precio-record-601-dolares-en-subasta/20000064-3330468>

Sondahl M, Nakamura T. Sharp W. 1985. Propagation of Coffee. In: Henke RR, Hughes KW, Constantin MJ, Hollaender A, Wilson CM (eds). Tissue Culture in Forestry and Agriculture Basic Life Sciences. Springer Boston, MA. 32:215-232.