



“Por un Desarrollo Agra
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría Interinstitucional en Biotecnología

Trabajo de Tesis

**Embriogénesis somática con explantes
foliares de *Coffea arabica* cv.
Centroamericano y *Coffea canephora* cv.
Conilón**

Autor

Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona

Asesor

M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Managua, Nicaragua

Julio, 2020



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría Interinstitucional en Biotecnología

Trabajo de Tesis

**Embriogénesis somática con explantes
foliares de *Coffea arabica* cv.
Centroamericano y *Coffea canephora* cv.
Conilón**

Autor

Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona

Asesor

M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga

Presentado a la consideración del honorable tribunal
examinador como requisito final para optar al grado
de Maestro en Ciencias

**Managua, Nicaragua
Julio, 2020**

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por la coordinación de la Maestría Interinstitucional de Biotecnología como requisito final para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología

Miembros del Tribunal Examinador

PhD. Jorge Ulises Blandón Díaz
Presidente

PhD. Leandro Páramo Aguilera
Secretario

PhD. Wilber Salazar Antón
Vocal

Lugar y Fecha: Managua, 10 de julio de 2020

DEDICATORIA

Al Creador, fuente de mi existencia y mi esperanza para alcanzar las metas propuestas, que logran hacer cambios continuos y positivos en el transcurso de mi vida y en mi entorno. Nunca se aparte de mí porque “SIN TI, CREADOR”, no soy nada.

A mi hermosa Madre Alba E. Cardona, que nos ha demostrado todo el esfuerzo que una Madre pueda hacer para ayudar a sus hijos. Gracias por forjarme como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se lo debo a Usted, incluyendo este proyecto. Me motivó constantemente para alcanzar mis anhelos, con su comprensión, paciencia y gran amor, que siempre me ha tenido y demostrado, sin Usted las cosas nunca se lograrían, por su entrega y apoyo incondicional, transmitiéndonos cada día amor y respeto a Dios, al prójimo y a la Madre Naturaleza. ¡Madre! Para ti todo el amor del mundo y mucho más.

A mi hermana Judith “La Nena”, gracias por el apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo alentándome para alcanzar mis metas. Son fortalezas que nos hacen sentir unidas y seguras y a mi sobrina Rebeca Nohemí, quien ha sido un gran apoyo en los momentos más importantes en el acompañamiento para mi Madre.

AGRADECIMIENTO

Agradeciendo primeramente a Dios, por mis estudios, por la guía que me ha brindado y por las personas que puso en mi camino para poder seguir con mi titulación.

Al staff de investigadores del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de esta investigación. En especial a mi Asesor M.Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga que me ha transmitido sus conocimientos sin necesidad de esperar un reconocimiento. Sus pertinentes y grandes consejos me han enseñado a comprender el camino de la investigación y ha sido un gran apoyo en la colaboración y supervisión en el desarrollo de la tesis.

A la Vicepresidencia de Nicaragua-CONICYT y a la Universidad Nacional Agraria que me seleccionaron para poder cumplir mi deseo de tener el Título de Maestro en Ciencias con especialidad en Biotecnología. En especial a la Facultad de Agronomía que contribuyó en mi formación profesional.

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Características generales de <i>Coffea arabica</i> L. y <i>Coffea canephora</i> P. ex Froehner	4
3.2 Micropropagación por embriogénesis somática de café	7
3.2.1 Embriogénesis directa (ESD)	9
3.2.2 Embriogénesis indirecta (ESI)	9
3.2.3 Origen de los embriones somáticos	10
3.2.4 Fases de crecimiento de la embriogénesis somática	11
3.2.5 Factores que influyen sobre la embriogénesis somática	11
3.2.6 Inmersión temporal	14
3.2.7 Micropropagación por micronudos y microestacas	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Localización del experimento	17
4.2 Descripción del material genético	17
4.3 Lavado de cristalería e instrumentos y su esterilización	17
4.4 Preparación y desinfección de explantes	18
4.5 Experimentos en micropropagación por embriogénesis somática y micronudos	19
4.5.1 Inducción de callo	19
4.5.2 Multiplicación de callo embriogénico	21
4.5.3 Germinación de embriones somáticos en Biorreactores	23

4.5.4	Propagación por micronudos en medios de cultivo semisólidos	25
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1	Inducción de callo	27
5.1.1	Cultivar Centroamericano	27
5.1.2	Cultivar Conilón	28
5.1.3	Cicatrización de explantes de hoja y consistencia de los callos.	31
5.2	Multiplicación de callo embriogénico	34
5.2.1	Cultivar Centroamericano	34
5.2.2	Cultivar Conilón	35
5.2.3	Peso fresco de callo embriogénico cultivar centroamericano	38
5.2.4	Peso fresco de callo embriogénico cultivar Conilón	39
5.3	Germinación de embriones somáticos en Biorreactores (BEIT)	40
5.3.1	Cultivar Centroamericano	40
5.3.2	Cultivar Conilón	40
5.4	Propagación por micronudos en el cultivar centroamericano.	43
5.4.1	Cultivar centroamericano	43
5.4.2	Cultivar Conilón	45
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	RECOMENDACIONES	51
VIII.	LITERATURA CITADA	52
IX.	ANEXOS	60

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Medios de cultivo en la inducción de callo en segmentos foliares de café Centroamericano y café Conilón	20
2.	Medios de cultivo en inducción de callo embriogénico en segmentos foliares de café Centroamericano y café Conilón	22
3.	Medios de cultivo en la germinación de embriones somáticos de café Centroamericano y café Conilón	24
4.	Medios de cultivo para la propagación de micronudos de segmentos apicales, centrales y basales Centroamericano y café Conilón	26
5.	Respuesta del cultivar Centroamericano a la cicatrización de los explantes de hojas y la consistencia de los callos a los 42 días de establecidos	32
6.	Respuesta del cultivar Conilón a la cicatrización de los explantes de hojas y la consistencia de los callos	33
7.	Respuesta del cultivar Centroamericano a la reactividad embriogénica y colores que presentaron los callos embriogénicos a las doce semanas	35
8.	Respuesta del cultivar Conilón a la reactividad embriogénica y colores que presentaron los callos embriogénicos a las 12 semanas	36
9.	Respuesta del cultivar Centroamericano a la germinación de embriones somáticos	40
10.	Respuesta del cultivar Conilón a la germinación de embriones somáticos	41
11.	Respuesta del cultivar Centroamericano a la propagación por micronudos de segmentos apicales	43
12.	Respuesta del cultivar Centroamericano a la propagación por micronudos de segmentos centrales	44
13.	Respuesta del cultivar Centroamericano a la propagación por micronudos de segmentos basales	45
14.	Respuesta del cultivar Conilón a la propagación por micronudos de segmentos apicales	46
15.	Respuesta del cultivar Conilón a la propagación por micronudos de segmentos centrales	46
16.	Respuesta del cultivar Conilón a la propagación por micronudos de segmentos basales	47

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Estado de desarrollo óptimo de la hoja de café para iniciar la embriogénesis somática. Izquierda: cultivar Centroamericano. Derecha: cultivar Conilón.	18
2.	Izquierda: secciones de hoja a descartar a, b y c. Centro: segmentos de hojas. Derecha: segmentos de hojas establecidos en la fase de inducción de callos.	19
3.	a) Espátula metálica, conteniendo un peso aproximado de 150 mg callo en estado globular. b) Biorreactores Económicos de inmersión Temporal (BEIT).	24
4.	Izquierda: planta de café obtenida de embriogénesis somática. Centro: micronudos. a: Apical. b: Central. c: Basal. Derecha: siembra en medio de cultivo.	25
5.	Influencia de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el cultivar Centroamericano, a las tres semanas de iniciada la fase de inducción de callo en la variable color presente en los explantes.	27
6.	Influencia de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el cultivar Conilón, a las tres semanas de iniciada la fase de inducción de callo en la variable color presente en los explantes.	28
7.	Formación de callos en los bordes de explantes de hojas que presentaron color verde, amarillo y café.	29
8.	Izquierda: cicatrización de callos en los bordes de explantes de hojas: Centro: callo acuoso. Derecha: callo friable.	33
9.	Callo embriogénico del cultivar Centroamericano producidos en explantes de hojas.	35
10.	Callo embriogénico del cultivar Conilón producidos en explantes de hojas.	36
11.	Peso fresco de callo embriogénico cultivar Centroamericano en los protocolos P1 (Boxtel and Berthouly, 1996), P2 (Teixeira et al., 2004) y P3 (Söndhal and Sharp, 1977).	38
12.	Peso fresco de callo embriogénico cultivar Conilón en los protocolos P1 (Boxtel and Berthouly, 1996), P2 (Teixeira et al., 2004) y P3 (Söndhal and Sharp, 1977).	39
13.	a: Plantas germinadas en Biorreactores (BEIT). b: plantas del cultivar Centroamericano. c: plantas del cultivar Conilón.	41
14.	Plantas reproducidas por micronudos. Izquierda: plantas del cultivar Conilón. Derecha: plantas del cultivar Centroamericano.	47

INDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Constituyentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)	60
2.	Modelos de Biorreactores Recipientes de Inmersión Temporal (RITA®) y Biorreactor Económico de Inmersión Temporal BEIT.	61

RESUMEN

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12.5 carretera panamericana norte Managua, Nicaragua, entre noviembre del año 2017 y agosto del 2019. Se estudió la embriogénesis somática indirecta y la micropropagación por micronudos en los cultivares Centroamericano *Coffea arabica* L. y Conilón *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. El cultivar Centroamericano en la inducción de callo con 2 mg L⁻¹ de 2IP, 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de IBA presentó mayor porcentaje de explantes color café (63.75%). En la categoría mayor al 50% de cicatrización y en formación de callos friables respondieron mejor con 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de Kinetina con 47.75% y 73.00% respectivamente. En el cultivar Conilón la inducción de callo con 2 mg L⁻¹ de 2IP, 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de IBA presentó similar comportamiento estadístico en los colores café (58.25%) y amarillo (28.50%). Con 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de Kinetina se obtuvieron los mejores resultados en la categoría de mayor al 50% de cicatrización y en callo friable con 47.60% y 75.80% respectivamente. El cultivar Centroamericano en 2 mg L⁻¹ de 2IP, 2.21 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de IBA respondieron mejor la reactividad embriogénica (85%), los colores de callo crema (38%), amarillo (30%) y en peso fresco de callo con 232.30 mg. En el cultivar Conilón con 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de Kinetina resultó superior en reactividad embriogénica (88%), en el color amarillo de los callos (48%) y en peso de callo fresco con 288.70 mg. En los BEIT el cultivar Centroamericano con adiciones de 0.30, 0.45 y 0.60 mg L⁻¹ de AIA resultaron estadísticamente similares en germinación de embriones y en número de hojas, mientras que en el cultivar Conilón sin adición de AIA y con 0.15 mg L⁻¹ resultaron significativamente superiores en número de embriones y número de hojas. En los dos cultivares los micronudos respondieron mejor con 1 mg L⁻¹ de AIA y de BAP.

Palabras Claves: Embriogénesis somática, *Coffea* spp., biorreactores, micronudos

ABSTRACT

The study was developed in the Tissue Culture Laboratory of the National Agrarian University (UNA), km 12.5 Pan-American Highway North Managua, Nicaragua, between November 2017 and August 2019. Indirect somatic embryogenesis and micropropagation by micronude were studied in the Centroamericano cultivars *Coffea arabica* L. and Conilón *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. The Centroamericano cultivar in callus induction with 2 mg L⁻¹ of 2IP, 0.5 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1 mg L⁻¹ of IBA presented a higher percentage of brown explants (63.75%). In the category greater than 50% healing and friable callus formation, responded better with 1.1 mg L⁻¹ of 2,4-D and 4 mg L⁻¹ of Kinetin with 47.75% and 73.00% respectively. In the Conilón cultivar, callus induction with 2 mg L⁻¹ of 2IP, 0.5 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1 mg L⁻¹ of IBA presented similar statistical behavior in the colors brown (58.25%) and yellow. (28.50%). With 1.1 mg L⁻¹ of 2,4-D and 4 mg L⁻¹ of Kinetin, the best results were obtained in the category of greater than 50% healing and in friable callus with 47.60% and 75.80% respectively. The Centroamericano cultivar in 2 mg L⁻¹ of 2IP, 2.21 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1 mg L⁻¹ of IBA responded better to embryogenic reactivity (85%), cream callus colors (38%), yellow (30%) and in fresh callus weight with 232.30 mg. In the Conilón cultivar with 1.1 mg L⁻¹ of 2,4-D and 4 mg L⁻¹ of Kinetin, it was superior in embryogenic reactivity (88%), in the yellow color of callus (48%) and in fresh callus weight 288.70 mg. In the BEIT, the Centroamericano cultivar with additions of 0.30, 0.45 and 0.60 mg L⁻¹ of IAA were statistically similar in embryo germination and in number of leaves, while in the cultivar Conilón without addition of IAA and with 0.15 mg L⁻¹ were significantly higher in number of embryos and number of leaves. In the two cultivars, the micronudos responded better with 1 mg L⁻¹ of IAA and BAP.

Keywords: Somatic embryogenesis, *Coffea* spp., Bioreactors, microcuts.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Coffea* L. la especie más cultivada comercialmente es *Coffea arabica* L., *Coffea canephora* Pierre ex Froehner y *C. liberica* Bull (Fernández *et al.*, 2010). El café (*Coffea arabica* L.) desempeña un papel importante en la economía de más de 60 países, principalmente en América Latina, África y Asia. Es una de las bebidas más valiosas y comunes que se consumen casi el 75% a nivel mundial y la segunda especie más cultivada es *Coffea canephora*, que contribuye con el 25% restante de la producción mundial (Ahmed, *et al.*, 2013).

En el 2018, ESPANICA destacó lo siguiente:

El café arábico originario de Etiopía, tiene calidad, es suave y aromático, con bajos índices de cafeína y que puede beberse sin mezclar con otras variedades. Es un cultivo costoso y delicado debido a su poca resistencia al calor, las plagas y los cambios meteorológicos bruscos; mientras que el café robusto procede del Zaire (África ecuatorial), tiene un alto contenido en cafeína, con un sabor fuerte y amargo. Crece a baja altitud y es más resistente a las plagas y a la intemperie, su cultivo es más fácil, menos costoso y arroja mayores beneficios.

El café es el rubro de mayor importancia en el sector agrícola de Nicaragua, ocupa el sexto lugar en el PIB. El café es producido por 44 519 productores y productoras que cultivan un área total de 126 154 ha y genera aproximadamente 300,000 empleos directos e indirectos que representan el 53% del total de empleos del sector agropecuario y el 14% del total de empleos a nivel nacional. El 93% son pequeños productores ubicados principalmente en los departamentos de Jinotega, Matagalpa, Estelí, Madriz y Nueva Segovia (MAGFOR, 2012). En el ciclo 2018-2019 la exportación de café de Nicaragua fue de 3.1 millones de quintales oro, valoradas en US\$ 417.9 millones (Plan Nacional de Producción, Consumo y Comercio, 2019-2020).

En Nicaragua el café *Canephora* recientemente se introdujo con el propósito de destinar la producción al consumo nacional como producto de agroindustria y es por esta razón que mediante la resolución ministerial 187-2016, emitida por el Ministerio Agropecuario, se autorizó la siembra de café robusta en los departamentos de Río San Juan, León, Chinandega,

Granada, Masaya, Rivas, Chontales y en las Regiones Autónomas del Caribe Norte y Sur, excepto en Waslala (La Gaceta, 2016).

Existen variedades mejoradas de café que presentan características con altos rendimientos, calidad organoléptica, resistencia a plagas y enfermedades; estas características pueden ser propagadas utilizando técnicas biotecnológicas. Varios autores (Venkataiah *et al.*, 2016; Georgeta *et al.*, 2017) afirmaron que la técnica de “Cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que permite propagar masivamente distintas especies de importancia económica”; así mismo, Otoniano (2018) explicó que “existen otros métodos de propagación asexual como es el injerto utilizado fundamentalmente con miras a mejorar el crecimiento de ciertas variedades e híbridos”.

Berthouly (1997, citado por Sánchez *et al.*, 2019) afirma que “el cultivo *in vitro* de café se puede llevar a cabo por dos vías: la micropropagación por embriogénesis somática indirecta (ESI) y por micronudos, facilitando material sano, libre de plagas y enfermedades, multiplicación masiva de genotipos deseados, plantaciones uniformes, cosechas más precoces y mayores producciones”.

Aguilar y Cruz (2013) afirmaron que:

La producción a gran escala de plantas *in vitro* de cualquier especie, requiere de estrategias para bajar los costos de producción y utilizar innovaciones que solventen esta necesidad; como son los sistemas de inmersión temporal en biorreactores que constituye una herramienta tecnológica para el sector dedicado a la multiplicación masiva asexual de plantas; porque mejora la eficiencia de los procesos de propagación *in vitro* en distintas especies y se reduce el costo por unidad de planta producida.

En la presente investigación se desarrolló la micropropagación por ESI en las fases de inducción de callo, multiplicación de callo embriogénico, germinación de embriones somáticos con el empleo de los equipos conocidos como Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) innovados en la Universidad Nacional Agraria (UNA), así mismo se estudió la multiplicación por micronudos en medio de cultivo semisólido.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Generar información sobre la micropropagación de *Coffea arabica* L. cv. Centroamericano y *Coffea canephora* cv. Conilón por embriogénesis somática indirecta y por micronudos.

2.2 Objetivos Específicos

Definir los mejores medios de cultivo en tres fases de embriogénesis somática indirecta (ESI).

Evaluar en los BEIT la conversión de embriones globulares a plantas formadas en base a la respuesta morfológica al efecto de cinco variantes de medios de cultivo.

Determinar las variantes de medios de cultivo que permitan una mejor respuesta morfológica en micronudos apicales, centrales y basales.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Características generales de *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner

En el 2012, Castilla afirmó que “las especies vegetales a partir de las cuales se obtiene una bebida producto del procesamiento de los frutos, es muy consumida a nivel mundial y se agrupan en el género *Coffea*, correspondiente a un conjunto de plantas de la familia Rubiaceae. Este género abarca unas 103 especies, de las cuales las más utilizadas para la producción del estimulante néctar, son el café arábico (*Coffea arabica* L.) y el café canephora (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) y en menor medida, *C. liberica*.

El café arábico, es nativo de las tierras altas de Etiopía y posiblemente nativo de otras partes de África y Arabia en Asia (Figuerola, Pérez y Godínez, 2015). Se cultiva en zonas altas en América Latina; planta autógena alotetraploide ($2n=4X=48$), autocompatible, por tanto, se reproduce por semillas (Dublin, 1991).

Velásquez (2019) señala que “las variedades Típica y Bourbon, presentaron mutaciones naturales o por cruzamientos espontáneos e inducidos y dieron origen a variedades como el Caturra, Mundo Novo, Catuaí, Pache, Villa Sarchí, Pacas, Maragogipe, etc. Situación que estrecha la base genética entre ellas, afectando la tolerancia a ciertas plagas o resistencia a enfermedades”

Las plantaciones de café arábico presentan problemas de índole genético y fitosanitario como la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*), por lo que es necesario renovarlas o repoblarlas con plantas de buena calidad. Los métodos convencionales de propagación por esquejes o semillas, pueden enfrentarse al alto costo de la mano de obra requerida, baja tasa de enraizamiento o rápida pérdida de la viabilidad (Etienne *et al.*, 2002).

Este híbrido L13A44 es producto del cruce de Sarchimor T5296 x un Rume Sudan, conocido como cultivar “Centroamericano”, tiene en común que uno de sus progenitores es un Sarchimor, lo cual explicaría su tolerancia a la roya. El Sarchimor es producto del cruce de la variedad Villa Sarchí de *Coffea arabica* L con el Híbrido de Timor, el cual a su vez se originó del cruce

espontáneo de *Coffea arabica* L con *Coffea. Canephora* Pierre ex Froehner (Mesén y Jiménez, 2016).

El cultivar Centroamericano tiene un porte intermedio (2.15 metros de altura), estructura compacta de forma cónica, eje principal con entrenudos cortos (4.60 centímetros), bandolas largas (88 centímetros) y un sistema radicular fuerte, con una productividad promedio en cuatro cosechas consecutivas de 60.70 quintales oro por ha (Velásquez, 2019).

La especie café canephora, es nativa de los bosques ecuatoriales de África, desde la costa oeste hasta Uganda y la parte sur de Sudán, lo mismo que de la parte de África occidental, entre las latitudes de 10° norte y 10° sur, en elevaciones desde el nivel del mar hasta más o menos 1000 metros de altura (Figueroa, Pérez y Godínez, 2015).

Varios investigadores describen que el *Coffea canephora* Pierre ex Froehner cv. Conilón:

Es una planta alógama con 100% de fecundación cruzada, es decir que su óvulo no puede ser fertilizado con su propio polen, ocasionada principalmente por la autoincompatibilidad gametofítica que inviabiliza la autofecundación o el cruzamiento entre plantas que presentan la misma constitución genética. Este tipo de cruzamiento implica una alta variabilidad en el tipo y en la producción cuando se trata de obtener plantas por semilla, por eso para obtener plantas genéticamente igual a la variedad, se debe propagar por métodos asexuales. (Ramírez, 2015)

El Conilón es una planta diploide ($2n=2x=24$), variable y productiva, resistente a la roya, produce una bebida de menor calidad; su mejoramiento genético comprende dos etapas: una sexual que conduce a poblaciones heterogéneas y una vegetativa que resulta en clones y sólo puede emplearse en una mezcla policlonal a causa de su incompatibilidad. Berthouly (1997), señaló que existen “técnicas hortícolas de multiplicación asexual o vegetativa, como la siembra por estaca que permiten la clonación, pero no son aplicables a gran escala al café arábica”.

Es un arbusto más grande que el café arábico y su crecimiento es robusto. El sistema de raíces es poco profundo comparado con arábico y la masa de raíces de

alimentación está confinada a las capas superiores del suelo. El contenido de cafeína de los granos es casi dos veces mayor que el de los granos de arábico (2 al 2.5% comparado con 1.1 al 1.5%). Posee varias características útiles como una gran tolerancia al patógeno de la roya de la hoja, al barrenillo blanco del tallo, a la invasión de nematodos y el potencial de producir rendimientos constantes. (Velásquez, 2019)

Reyes y colaboradores (2016), afirmaron lo siguiente:

La propagación por estacas es actualmente la técnica más utilizada en café canephora y puede ser realizada a partir de fragmentos de tallo ortotrópico (tallos de crecimiento vertical), que luego se procede a la estimulación radicular para el éxito de prendimiento durante el trasplante. En esta técnica se implementa la injertación que es otro proceso por el cual se coloca una especie de interés comercial (por lo general café arábigo) sobre una especie de café, en este caso la variedad Robusta o Conilón.

En 1997, IICA-PROMECAFE, publicó que la técnica de propagación por estacas, consiste en preparar esquejes a partir de entrenudos de chupones ortotrópicos; el tallo se corta a los 4 -5 cm por debajo de cada nudo y por encima de la base de los pecíolos” (p. 31). Así mismo se puede combinar con otras técnicas como es la injertación de embriones de café, como lo plantearon varios investigadores (Charrier y Berthaud, 1985; Cambrony, 1989; Berthouly, 1997), destacando “la importancia de esta técnica para la recuperación de material que no se hubiera podido salvar en condiciones normales de germinación; además de permitir el desarrollo de híbridos entre especies de café genéticamente apartados”.

El número de estacas ortotrópicas que puede producir una planta de café es limitado y en el caso de una multiplicación a gran escala, esto puede conducir a lapsos de tiempo considerables entre la creación de una variedad y su posterior difusión. Además, la reproducción por estacas exige la instalación de jardines clonales, lo que implica diversos problemas, entre ellos el mantenimiento de las superficies utilizadas (Berthouly, 1997).

3.2 Micropropagación por embriogénesis somática de café

De los Santos- Briones y Hernández (2006), aseguraron que “el cultivo de tejidos vegetales ha permitido mejorar la capacidad de multiplicación de plantas agrícolas con rasgos de interés agronómico, además de ser una herramienta importante para la investigación básica y práctica en la agricultura”. Por su parte, Torres *et al.* (1998) mencionan que las principales técnicas de cultivo de tejidos vegetales son la propagación clonal a gran escala de plántulas (micropropagación), la regeneración de plantas libres de virus y patógenos (limpieza clonal), la conservación de los recursos genéticos de las plantas (conservación de germoplasma), producción haploide, doble haploide y la producción de plantas transgénicas.

Cultivo de tejidos consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado (Olmos *et al.*, 2010). La reproducción asexual del café por medio de cultivo de tejidos, ha sido una técnica de importancia para el mejoramiento genético, debido a las múltiples herramientas disponibles para el desarrollo de nuevos métodos de selección, reproducción y propagación (De Los Santos- Briones y Hernández, 2006; Etienne *et al.*, 2002 citados por Echeverría *et al.*, 2014).

Las limitantes de los protocolos de micropropagación convencional son bajos coeficientes o tasas de multiplicación, altos costos de la mano de obra y escasa posibilidad de automatización. Estos factores repercuten negativamente en el precio unitario de la planta obtenida a través de este proceso, además de limitar el empleo masivo de la micropropagación a escala comercial, convirtiéndose en una técnica factible de aplicar sólo a aquellas especies en las cuales el valor unitario de la semilla propagada convencionalmente es muy alto o cuando se desea masificar la producción de clones de alto valor genético (De Feria *et al.*, 2002).

La micropropagación además de ser una tecnología de alto costos, requiere de transferencias periódicas del material plantado a un medio fresco, después de 4-6 semanas, debido al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo y por el continuo crecimiento y proliferación de los cultivos, la cual es rápidamente limitado por el tamaño de los contenedores de cultivo (Etienne y Berthouly, 2002).

La embriogénesis somática indirecta (ESI) es una valiosa herramienta para la propagación clonal de especies de *Coffea*. Es un proceso biológico por el cual células somáticas desarrollan embriones semejantes a los embriones cigóticos y se regeneran en plantas genéticamente iguales a la planta madre (Campos *et al.*, 2017). Es la reestructuración de las células sobre la base de la totipotencia celular de las plantas superiores. Estos embriones poseen, al igual que los embriones cigóticos, una estructura bipolar con ápices de tallo y de raíz (Lelu *et al.*, 1993).

En las plantas, en contraste con los animales, la diferenciación celular usualmente es un proceso reversible, particularmente cuando las células diferenciadas son removidas de la planta y colocadas en condiciones de cultivo *in vitro*. Bajo estas condiciones, las células pasan por un proceso de desdiferenciación en el cual pierden su destino celular y reinician la división celular y bajo las concentraciones apropiadas de nutrientes y hormonas de crecimiento vegetal, es posible regenerar una planta completa (Taiz y Zeiger, 2002 reportado por Rueda, 2019).

Contrario a lo que se creía no todas las células somáticas pueden formar callos. Ahora es evidente que la formación de callos es iniciada por la activación de una población celular especializada que se encuentra parcialmente diferenciadas y que se esparcen a través del cuerpo de la planta (Sugimoto *et al.*, 2011). Los embriones somáticos se pueden formar tanto a partir de células del explante o previo a la formación de callo, estas dos vías diferentes se denominan embriogénesis somática directa (ESD) e indirecta (ESI) respectivamente (Campos *et al.*, 2017).

Actualmente la embriogénesis somática indirecta empleada en café incluye la introducción de un segmento de hoja en condiciones *in vitro*, asépticas y controladas, para la inducción de un callo de alta frecuencia o secundario, del cual se obtendrán masas celulares que serían multiplicadas en medios líquidos durante un tiempo determinado, hasta alcanzar una mayor cantidad de pro embriones (Van Boxtel y Berthouly, 1995; Etienne *et al.*, 1999 citado por Gatica Arias *et al.*, 2008).

En algunas especies de café y otras que estén estrechamente relacionadas pueden presentar algunas dificultades en el proceso de regeneración de tejidos embriogénicos conforme a un protocolo estándar de producción. La dificultad en la regeneración puede ser debida a muchos

factores: adquisición de competencia, inducción y diferenciación que pueden ser medidas de diferentes manera y determinadas empíricamente (Litz y Gray, 1992). La generación de plántulas por ESD como por ESI, es una oportunidad para obtener altos niveles de fidelidad genética, porque permite seleccionar las plantas deseables desde muy temprano, en caso de que haya una respuesta bastante uniforme (Krikorian, 1991).

3.2.1 Embriogénesis directa (ESD)

De acuerdo con Lindsey y Jones (1992), es directa la ES cuando el desarrollo de los embriones se produce a partir de células somáticas del explante original, puede utilizarse para la micropropagación de un número limitado de especies. Yang y Zhang (2010), mencionan a diferentes autores quienes afirman que la iniciación de la vía embriogénica está restringida a ciertas células que tienen el potencial para activar genes involucrados en la generación de células embriogénicas. Una vez que estos genes son activados, un programa de expresión de genes embriogénicos sustituye al establecido patrón de expresión genética en los tejidos del explante.

Los tejidos nucleares de muchas plantas tienen capacidad para la ESD *in vitro*. Los embriones adventicios *in vitro* se forman directamente sobre los embriones cigóticos de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, sobre todo en partes de plántulas jóvenes (especialmente hipocotilos y los cotiledones) y sobre embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (George y Debergh, 2008). El inconveniente de la ESD es que la cantidad de embriones obtenidos por explante cultivado es muy reducida en comparación a la cantidad obtenida a través de la ESI (Gatica, 2002).

3.2.2 Embriogénesis indirecta (ESI)

Gatica Arias *et al.* (2008) reportaron que la ESI consiste en el desarrollo del embrión a partir de callo o suspensiones celulares los embriones somáticos pueden desarrollarse y germinar de modo análogo a la germinación de los embriones cigóticos, a partir de células, tejidos u órganos. En el proceso se desarrollan callos capaces de producir embriones somáticos (callo embriogénico), estos son fáciles de obtener de un explante durante la fase inicial del cultivo y son producidos por tejido no morfogénicos. Los callos embriogénicos se reconocen por su

aspecto nodular y son producidos de una parte de un explante, probablemente porque las células de esa parte son embriogénicamente pre-determinadas (Sharp *et al.*, 1980).

Las plantas regeneradas a través de la embriogénesis somática por lo general son morfológica y citológicamente normales, pero a veces una parte de las plantas que se obtienen son aberrantes. Esto ocurre cuando la embriogénesis es iniciada de callos o de cultivos en suspensión después de un período de crecimiento desorganizado o cuando los cultivos embriogénicos se mantienen por muchos meses (George y Debergh, 2008).

3.2.3 Origen de los embriones somáticos

“Los embriones somáticos se pueden obtener de varias fuentes de tejidos tales como: hojas jóvenes, hojas inmaduras, inflorescencias, pecíolos, etc.” (Gómez, 1998). Sin embargo, el explante de hoja es el tipo más utilizado para la aplicación de embriogénesis somática directa o indirecta en genotipos de *C. arabica*, esto ha estado ocurriendo desde el trabajo pionero de Sondhal y Sharp (1977, citados por Almeida, 2020).

La ESI tiene mayor preferencia en relación a la organogénesis, debido a que se puede desarrollar una planta completa requiriendo únicamente la maduración de los embriones, mientras en la organogénesis ocurre que se desarrollan brotes o raíces de los callos e inducción de estructuras complementarias, frecuentemente requiere diferentes formulaciones de medios de cultivos (Smith y Drew, 1990; Jiménez, 1998).

Durante la ESI, las células somáticas son inducidas a formar células embriogénicas totipotentes capaces de regenerar plantas completas. Tal desarrollo implica cambios de una serie de eventos relacionados con el reconocimiento molecular de señales internas y estímulos externos (Chugh y Khurana, 2002, citados por Yang y Zhang, 2010).

Moreira *et al.* (2001) mencionan que factores como el tipo de explante, la composición del medio de cultivo, su estado físico, las condiciones de incubación como luz y temperatura, puede afectar la formación de callos. Litz y Jarret (1991) señalan que los factores que afectan la respuesta morfológica del explante a la embriogénesis del callo está en dependencia del genotipo

y del estado de desarrollo de la planta madre. Tran Thanh Van y Trinh (1990) consideran que la respuesta a la formación de callos en café es de mucha importancia el pasado de la planta madre, así como los componentes nutricionales, fitohormonales o ambientales aplicados al explante.

3.2.4 Fases de crecimiento de la embriogénesis somática

Gómez (1998) señala que Fujimura y Komamine (1980) describen cuatro fases morfológicas en la embriogénesis somática de zanahoria, fases 0 ,1 ,2 ,3. En la fase 0 la célula aislada por continuas divisiones forma los agregados celulares embriogénicos, con la presencia de auxina en el medio de cultivo. En la fase 1, es inducida por la transferencia de los agregados celulares a un medio libre de auxinas, es una fase relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación en los 3 primeros días. En la fase 2, ocurre una división celular rápida a los 4 días del cultivo en ciertas partes del agregado celular, dando lugar a la formación del embrión en estado globular. En la fase 3, se produce el continuo desarrollo del embrión al estado corazón y torpedo.

Pliego y Barceló (2001) describen 2 fases en el proceso de ESI, en la fase 1 tiene lugar cuando en presencia de auxina, se forman masas de células proembriónicas a partir de células competentes presentes en el explante; en la fase 2 se hace la transferencia de los explantes a medios sin auxinas, hay una aceleración del crecimiento, debida a la división activa de los agregados que contienen células con citoplasma muy denso. Desde que las células embriogénicas se han formado, continúan su proliferación y forman masas proembriogénicas (PEMs). La auxina es requerida para la proliferación de PEMs pero es inhibitoria para el desarrollo de embriones somáticos (Yang y Zhang, 2010).

3.2.5 Factores que influyen sobre la embriogénesis somática

a. Genético

Estudios detallados para comparar la expresión temporal de determinados genes en los procesos de ES y embriogénesis cigótica (EC) como es el caso de los genes *lea*, parece ser que durante la ES la expresión ocurre en estadios de desarrollo más tempranos en la formación de masas proembriogénicas y en el estado globular. En la EC estos genes se expresan fundamentalmente durante el estado cotiledonal. La inducción de la ES está restringida a determinadas células del

tejido del explante, las cuales presentan potencial para activar los genes implicados en la generación de células embriónicas (Pliego y Barceló, 2001).

b. Polaridad

La formación de embriones somáticos prosigue del establecimiento de la polaridad en las células indiferenciadas (Merkle *et al.*, 1990). La polaridad en el desarrollo de embriones en estado globular a embriones es regulada por el transporte de auxinas, vinculadas con la iniciación y el mantenimiento del crecimiento polarizado de embriones somáticos (Liu *et al.*, 1993). Es una expresión del proceso de desarrollo embriónico, que se regula por secuencias temporales de expresión génica, ocurriendo en los primeros estadios de desarrollo. Influyen varios factores tales como la luz, la gravedad e incluso células adyacentes (Portillo y Santa Cruz, 2006).

c. Determinación

Jiménez (1998) afirmó que las células y los tejidos están determinados por rutas morfogénicas y metabólicas específicas:

En estas rutas se da un proceso ordenado y predecible, formando órganos y regenerando plantas, dependiendo lógicamente de la propia naturaleza del tejido, de su estado vegetativo y del tratamiento que ha recibido, produciéndose a veces, nuevos fenotipos que perduran en ausencia de los factores causantes del cambio.

El potencial de desarrollo del tejido cambia y se reduce a medida que procede el estado de determinación. Sin embargo, estos cambios no siempre son irreversibles, hay varios tipos de células y órganos, altamente determinados y que son totipotentes si reciben un estímulo adecuado.

Hay que mencionar, que también existen una serie de especies que en estado silvestre son capaces de regenerarse a partir de pequeños fragmentos de tejidos cortados, esto nos muestra la gran capacidad de plasticidad del desarrollo vegetal. (p. 45)

d. Competencia

Muchas células vegetales no tienen la capacidad de regenerar nuevas plantas, aquellas que sí tienen esa posibilidad y sufren procesos de morfogénesis cuando tienen el estímulo adecuado, se dice que tienen competencia. La competencia de una célula se expresa como la habilidad de

esta para la regeneración de ciertas partes de la planta, por ejemplo, si una célula tiene la facultad de enraizar fácilmente, no tendrá la misma facilidad de formar retoños (Bieberach, 1995). Las células que han adquirido competencia para la morfogénesis *in vitro* o que ya poseen competencia morfogénica al tiempo de establecerlas, están preparadas para expresar un patrón de desarrollo en un ambiente apropiado *in vitro*. El patrón de desarrollo está determinado por la consistencia del medio de cultivo, factores genéticos y epigenéticos (Litz y Gray, 1992).

e. Densidad celular

Ciertas sustancias esenciales pueden pasar fuera de las células por difusión, se sabe que estas sustancias pueden ser liberadas dentro del medio como alcaloides, aminoácidos, enzimas, reguladores de crecimiento y vitaminas. Las pérdidas no tienen consecuencia cuando las agrupaciones celulares crecen muy próximas entre sí o donde la relación tejidos y el medio son altos. Sin embargo, cuando las células son inoculadas sobre un medio de crecimiento ordinario a una baja densidad de población, la concentración de sustancias esenciales en las células y en el medio puede ser inadecuada para la sobrevivencia de los cultivos (George, 1993).

f. Medio de cultivo y componentes

Existen genotipos particulares que las condiciones de cultivo *in vitro* y las etapas de la ES (capacidad embriogénica, inducción, maduración de embriones somáticos y conversión a plántulas) deben optimizarse, especialmente con los compuestos del medio de cultivo (Reyes *et al.*, 2018). Aunque los factores involucrados en la condición del medio de cultivo son desconocidas, la presencia de proteínas de bajo peso molecular secretadas en el medio, se correlacionan con las fases tempranas del desarrollo de los embriones somáticos (De Vries *et al.*, 1988 citados por Thorpe, 1993).

Varios factores pueden afectar la ESI en café, tales como la combinación de sales, presencia o ausencia de algunas hormonas, así como el ambiente gaseoso de los contenedores *in vitro* (López-Gómez *et al.*, 2010). La presencia de alguna auxina es siempre necesaria para la obtención de callo embriogénico (Van Boxtel y Bertouly, 1996; Pierson *et al.*, 1983). Se ha comprobado que varios componentes del medio de cultivo estimulan la ES. El hierro es esencial para el desarrollo de los embriones somáticos; el nitrógeno, suministrado como ion amonio,

nitrate, glutamina, alanina, caseína hidrolizada, es esencial para la iniciación y maduración de los embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991; Berthouly, 1997).

El proceso de ES se inicia muy a menudo en un medio de cultivo rico en auxinas, principalmente el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido indolacético (AIA). Otras auxinas como el ácido naftalenacético (ANA), el picloram, el ácido paraclorofenoxiacético y el ácido 2-benzothiazol acético han demostrado ser bastante efectivas (Litz y Jarret, 1991). En cuanto a las citoquininas juegan un papel importante en la maduración de los embriones somáticos. Dentro de las citoquininas, se menciona que la bencilaminopurina (BAP) tiene cierta influencia en la ESI de café arábico y del híbrido Arabusta. (Dublin, 1981; Yasuda *et al.*, 1985).

3.2.6 Inmersión temporal

El uso de biorreactores para la propagación de plantas, fue reportado por Takayama y Misawa en 1981 para la propagación de Begonia. A partir de este momento, esta técnica ha sido aplicada para muchas especies de plantas incluyendo brotes, bulbos, microtubérculos, cormos, etc., (Preil, 1991; Debergh y Zimmerman, 1991). Los modelos de biorreactores más utilizados en la propagación *in vitro* de plantas a nivel mundial, es el desarrollado por Teisson y Alvard (1994) que denominaron Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®). Los sistemas de inmersión temporal combinan la renovación de la atmósfera interna del recipiente, con el contacto intermitente entre toda la superficie del tejido y el medio de cultivo en estado líquido.

Nguyen (2014) reporta que la técnica de inmersión temporal en los tejidos de café se desarrolló con el objetivo de reducir los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos, así como para lograr un aumento en la eficiencia de la micropropagación dada por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de los propágulos, permitiendo una producción masiva de embriones somáticos entre 15 y 35,000 embriones/litro de medio de cultivo.

El funcionamiento del biorreactor conocido como RITA® (Recipiente de inmersión temporal automatizada) es descrito por Alvard *et al.* (1993) como un recipiente único donde el compartimento superior contiene los explantes y el compartimento inferior contiene el medio de cultivo líquido. Están unidos entre sí, de modo que cuando se aplica una sobrepresión en el

compartimiento inferior, el medio sube al compartimiento superior y cuando la sobrepresión baja, el medio líquido regresa al compartimiento inferior.

En el diseño y construcción del biorreactor BEIT es producto de la modificación del sistema sistema RITA[®] resultandos similares en cuanto a que la inmersión de los tejidos se realiza en un solo recipiente por inyección de aire comprimido que permite que el medio de cultivo líquido suba hasta la parte superior del material de poliuretano donde se colocan los tejidos. La entrada del flujo de aire provoca un burbujeo en el medio de cultivo, permitiendo que se remuevan los tejidos y se oxigenen durante el tiempo de inmersión y una vez que se suspenda la presión de aire, el medio líquido se asienta. En el anexo 2 se presentan modelos de RITA[®] y BEIT.

Una ventaja adicional del diseño del BEIT es que pueden ser armados con materiales de fácil adquisición en el mercado nacional, es sencilla su manipulación durante la siembra de los tejidos, se puede ajustar a diferentes volúmenes del recipiente de acuerdo al objetivo que se persigue en la micropropagación.

El desarrollo de los biorreactores de inmersión temporal, reduce los costos de producción de las plantas, mejora el porcentaje de enraizamiento y supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación, todos estos aspectos son limitantes en la micropropagación convencional.

3.2.7 Micropropagación por micronudos y microestacas

La técnica de ESI requiere de personal y laboratorios especializados, una inversión considerable y un tiempo prolongado para la generación de plantas listas para el campo, elevando el costo de la planta. Según Etienne *et al.* (1999), la técnica de micronudos comprende tres fases: i) instalación del material vegetal *in vitro*, seguida de la obtención de micronudos provenientes de la inducción de yemas axilares; ii) multiplicación de los micronudos y iii) enraizamiento *in vitro* de los micronudos y su aclimatación a condiciones *ex vitro*. La principal ventaja de esta técnica es la garantía de una propagación genéticamente idéntica a la planta madre (Juma *et al.*, 1994).

La técnica de micronudos, consiste en obtener una planta a partir de un nudo portador de yemas preexistentes (rebrote); el tejido vegetal tiene 5-7 cm de longitud y dos entrenudos. Estos nudos

pueden ser utilizados como estacas *in vitro* y así sucesivamente hasta obtener un gran número de individuos. Dicha metodología incluye los siguientes pasos: cultivo de segmentos de tallos ortotrópicos y obtención *in vitro* de nuevos tallos ortotrópicos, multiplicación clonal *in vitro*, enraizamiento y aclimatación (Berthouly, 1989).

Según Dublin (1991) la primera etapa, donde se obtienen las ramas ortótropas en condiciones *in vitro*, es sumamente delicada. En efecto, durante el paso de las condiciones *in vivo* a las condiciones *in vitro*, se afrontan los problemas de contaminación (bacterias, hongos) y de oxidación fenólica, que son más acentuados en las regiones tropicales y aún más cuando los explantes se toman directamente del campo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del experimento

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía (FAGRO) perteneciente a la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicado en el km 12 ½ carretera Norte, Managua, Nicaragua sus coordenadas geográficas son: 12.1480° N, 86.1613° W. La investigación se llevó a cabo en el periodo comprendido entre los meses de mayo y diciembre del 2018.

4.2 Descripción del material genético

En el estudio se emplearon dos genotipos, uno de café arábica, híbrido H₁ conocido como cultivar "Centroamericano" elegido para el desarrollo del presente estudio por su alto rendimiento y resistencia a la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) y el segundo genotipo de café canephora, cultivar "Conilón" que se destaca por su alto rendimiento y tolerancia a los nematodos.

4.3 Lavado de cristalería e instrumentos y su esterilización

Para el lavado de frascos de vidrio con capacidad de 220 mL, los biorreactores (BEIT) con capacidad de 1000 mL, Beaker y Erlenmeyer de 2000 mL, se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO₃) diluido al 1% que se agregó en una tina plástica con capacidad de 30 litros, donde la cristalería fue sumergida durante 20 minutos. Posteriormente se extrajeron del recipiente y se procedió a lavarlos con detergente, enjuagarlos con agua del grifo para eliminar los residuos de cloro y se dejaron escurrir durante 30 min.

Para el lavado de placas metálicas, pinzas y escalpelos se realizó el mismo procedimiento utilizado para el lavado de cristalería. Una vez que los instrumentos se secaron a temperatura ambiente, se procedió a empacarlos en papel kraft de forma separada de acuerdo al tipo de instrumento y se procedió a esterilizarlos en un horno a temperaturas de 180 °C durante 1 hora. Previo a la siembra de los tejidos *in vitro*, el área de trabajo de la cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 70%, posteriormente se expuso a luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos, iniciando la siembra 15 minutos después de la desactivación de la UV.

4.4 Preparación y desinfección de explantes

De los genotipos Centroamericano y Conilón se extrajeron hojas de plantas madres localizadas en el sombreadero del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la UNA. Tres días antes del corte de las hojas, las plantas madres de los dos genotipos fueron asperjadas con una solución fungicida de Amistar® 50 WG (Azoxystrobina) a razón de 1 g L⁻¹.

Se procedió a la colecta del material vegetal seleccionando hojas planas, jóvenes (sin ondulaciones en los bordes) sin daños físicos ni manifestaciones de enfermedades, correspondientes al primer y segundo par de hojas expandidas en sentido basípeto. Una vez que se seleccionaron y cortaron las hojas se colocaron en un beaker de 200 mL y posteriormente se trasladaron al área de lavado del laboratorio donde fueron enjuagadas con agua del grifo para eliminar las partículas de polvo.

Se preparó una solución fungicida con Benomyl (Benlate® 50 WG) a razón de 3 g L⁻¹ y fue aplicado por sumersión de las hojas durante 10 minutos en beaker de 2 litros, este tratamiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar ubicada en el cuarto de transferencia de tejidos. Transcurridos los 10 minutos de desinfección, se procedió a realizarles dos enjuagues con agua estéril y una vez finalizados el tratamiento, las hojas permanecieron en reposo en agua esterilizada durante 10 minutos. En la Figura 1 se aprecia el estado fisiológico y fitosanitario óptimo de las hojas de los cultivares Centroamericano y Conilón para inducir las a la producción de embriones somáticos.



Figura 1. Estado de desarrollo óptimo de la hoja de café para iniciar la embriogénesis somática. Izquierda: cultivar centroamericano. Derecha: cultivar Conilón.

Se efectuó una segunda desinfección que consistió en la inmersión de las hojas durante 5 minutos en una solución de NaClO₃ a una concentración de 1% (v/v). Transcurridos los 5 minutos se procedió a enjuagar las hojas tres veces con agua estéril y se les agregó una solución

constituida por 30 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 150 mg L⁻¹ de ácido cítrico permaneciendo en esta solución durante el período de siembra. Este procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo modificado por López-Gómez *et al.* (2010).

4.5 Experimentos en micropropagación por embriogénesis somática y micronudos

En los cultivares Centroamericano y Conilón para el estudio de micropropagación por ESI, se determinó la mejor respuesta de los tejidos a diferentes variantes de medios de cultivo en la inducción de callos, multiplicación de callo embriogénico y germinación de embriones somáticos. En los dos cultivares se estudió la micropropagación por micronudos en base a la respuesta a cuatro variantes de medios de cultivo.

4.5.1 Inducción de callo

Finalizados la desinfección de las hojas dentro de la cámara de flujo laminar se procedió con el bisturí a efectuar cortes longitudinales descartándose como explantes para la inducción de callo, las nervaduras centrales, los bordes, los extremos basales y apicales de las hojas. Las franjas de las hojas se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 cm² que fueron transferidos a frascos de vidrio transparente con capacidad de 220 mL que contenía 20 mL de medio de cultivo. En la Figura 2 se presenta el proceso de corte y establecimiento de los explantes.



Figura 2. Izquierda: secciones de hoja a descartar a, b y c. Centro: segmentos de hojas. Derecha: segmentos de hojas establecidos en la fase de inducción de callos.

a. Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1.5 atmósfera de presión por 15 minutos, posteriormente se almacenaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de

26 ± 1 °C durante tres días para detectar posibles contaminantes previo a la siembra de tejidos. El ensayo de inducción de callo consistió en la comparación de tres protocolos: el propuesto por Van Boxtel y Berthouly (1996) nombrado en el estudio como P₁, el protocolo de Teixeira *et al.* (2004) nombrado P₂ y el protocolo de Söndhal y Sharp (1977) nombrado P₃. Los constituyentes de cada protocolo se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Medios de cultivo en la fase de inducción de callo en segmentos foliares de café Centroamericano y café Conilón

Compuestos	(P₁)	(P₂)	(P₃)
Concentración de sales MS (%)	50	50	50
Cysteína (mg L ⁻¹)	0	0	25
Caseína (mg L ⁻¹)	100	100	0
Glycina (mg L ⁻¹)	1.0	1.0	0
Tiamina (mg L ⁻¹)	10.0	10.0	10.0
Pyridoxina (mg L ⁻¹)	1.0	1.0	0
Ácido nicotínico (mg L ⁻¹)	1.0	1.0	0
Myo-inositol (mg L ⁻¹)	100	100	100
Extracto de malta (mg L ⁻¹)	400	400	0
2IP (mg L ⁻¹)	2.0	1.0	0
2,4-D (mg L ⁻¹)	0.5	2.21	1.1
IBA (mg L ⁻¹)	1.0	1.0	0
Kinetina (mg L ⁻¹)	0	0	4.0
Azúcar (g L ⁻¹)	30	20	40
Agar (g L ⁻¹)	3.0	3.0	3.0
pH	5.7	5.7	5.7

Nota: Protocolos: P₁ (Boxtel and Berthouly. 1996); P₂ (Teixeira et al., 2004); P₃ (Söndhal and Sharp. 1977)

En cada tratamiento se emplearon veinte frascos y en cada frasco se colocaron cinco explantes para un total de cien tejidos por tratamiento. Los explantes se incubaron bajo condiciones de oscuridad total a 26 ± 1°C y 85% de humedad relativa hasta que se realizó la evaluación determinada en cada protocolo. El protocolo de Teixeira *et al.* (2004) fue modificado del 100% al 50% en el contenido de las sales de Murashige y Skoog (MS), (1962). (Anexo 1)

b. Variables evaluadas

Para determinar el mejor tratamiento en los explantes de hojas se evaluaron las siguientes variables:

- ✓ Reactividad. Se definieron tres rangos de escala en base a la formación de callogénesis: Sin reacción (SR), menor o igual a 50% (≤50%), mayor a cincuenta

(>50%) del explante.

- ✓ Color de los explantes. Se establecieron tres categorías de coloración de los explantes: verde, amarillo y café.
- ✓ Tipo de callo: friable o acuoso.

c. Diseño estadístico

En todos los experimentos comprendidos en el presente estudio, la introducción de datos y su procesamiento estadístico se realizó por cultivar. Para el estudio de la inducción de callos en cada cultivar se constituyó la unidad experimental conformada por 100 explantes de segmentos de hojas, para cada tratamiento se estableció un total de 20 frascos en cada frasco se sembró 5 explantes. Se empleó un diseño completo al azar (DCA) con arreglo unifactorial.

A los datos obtenidos en la fase de inducción de callo se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, se les practicó la prueba de normalidad con Shapiro-Wilks y producto del resultado obtenido se procedió a efectuar la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, con el objetivo de determinar el grado de significancia, las sumas de rangos se compararon por la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) con un nivel de significancia de 0.05 %. Los datos se procesaron y analizaron en el programa estadístico INFOSTAT versión 2020. El análisis estadístico practicado en la inducción de callo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Hernández *et al.* (2010).

Las variables porcentaje de reactividad, coloración de tejidos y consistencia del callo, se evaluaron a los 30 días después del establecimiento de los tejidos en los protocolos P₁ y P₂; mientras que en el protocolo P₃ se evaluaron a los 40 días.

4.5.2 Multiplicación de callo embriogénico

Se estudió la respuesta en la multiplicación de callos secundarios por efecto de los constituyentes adicionados a cada protocolo (P₁, P₂ y P₃) como se detalla en la Cuadro 2. Para estimular la formación de callos de segunda generación o callos embriogénicos, se seleccionaron callos primarios de consistencia friable formados en el estudio de inducción. Se emplearon frascos de vidrio transparente con capacidad de 220 mL; cada uno se le agregaron 20 mL de medios de

cultivo y se establecieron 5 explantes de hoja con capacidad embriogénica alta.

a. Medios de cultivo

El protocolo P₂ en la multiplicación de callo embriogénico se modificó la concentración de las sales MS al 50%.

Cuadro 2. Medios de cultivo en fase de inducción de callo embriogénico en segmentos foliares de café Centroamericano y café Conilón

Compuestos	Boxtel y Berthouly (1996) (P₁)	Teixeira et al., (2004) (P₂)	Söndhal Y Sharp (1977) (P₃)
Concentración de sales MS (%)	50	50	50
Cysteina (mg L ⁻¹)	40	40	40
Glycina (mg L ⁻¹)	20	20	0
Tiamina (mg L ⁻¹)	20	20	10
Myo-inositol (mg L ⁻¹)	200	100	100
KNO ₃ (mg. L ⁻¹)	1900	0	0
Extracto de malta (mg L ⁻¹)	0	400	0
2IP (mg L ⁻¹)	0	1.0	0
2,4-D (mg L ⁻¹)	1.0	2.21	0
BAP (mg L ⁻¹)	4.0	0	0
IBA (mg L ⁻¹)	0	1.0	0
ANA (mg L ⁻¹)	0	0	0.09
Kinetina (mg L ⁻¹)	0	0	0.54
Azúcar (g L ⁻¹)	30	20	20
Agar (g L ⁻¹)	3.0	3.0	3.0
pH	5.7	5.7	5.7

Nota: Protocolos: P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996); P₂ (Teixeira et al., 2004); P₃ (Söndhal and Sharp, 1977)

b. Variables evaluadas

Para determinar el mejor tratamiento en la formación de callo embriogénico se evaluaron las siguientes variables:

- ✓ Reactividad del explante en formación de callo embriogénico.
- ✓ Color del callo embriogénico en la última semana de evaluación: blanco cremoso, crema y amarillo.
- ✓ Peso fresco de callo expresado en miligramos, se utilizó una balanza analítica de 0.001 mg de precisión.

Las variables de reactividad de callo embriogénico, coloración de la masa y peso del callo embriogénico, se evaluaron a los 120 días.

c. Diseño estadístico

Cada unidad experimental se conformó con 10 frascos que contenían 50 explantes por tratamiento y un total de 150 por cultivar. Se utilizó un diseño completo al azar DCA con arreglo unifactorial. A los datos obtenidos se les practicó la prueba de normalidad con Shapiro-Wilks, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y la prueba de SNK con el programa estadístico descritos en el acápite 4.5.1 inciso *c*. En el caso de la variable peso fresco de callo se efectuó el análisis de varianza de clasificación simple y para determinar las diferencias entre medias la prueba de rangos múltiples de Tukey al 5% de probabilidad. Los datos del peso fresco de los callos se procesaron y analizaron en el programa estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.5.3 Germinación de embriones somáticos en Biorreactores

Tomando en cuenta los éxitos reportados por Sánchez y Rocha (2016) con el uso de BEIT en la producción de microtubérculos de papa, así como en la micropropagación de plátano por Castro y Maradiaga (2015) y en caña de azúcar por Navarro (2018) se incluyó el empleo de este modelo de biorreactores considerando que en la embriogénesis de café en estado globular se facilita la germinación y maduración de los embriones, siempre y cuando las condiciones nutritivas y ambientales fuera y dentro de los biorreactores sean las adecuadas.

La esterilización de los medios se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el acápite 4.5.1 inciso *a*. Se utilizaron recipientes polipropileno de un galón por cada tratamiento; una vez esterilizados los medios de cultivo se llevaron al cuarto de siembra donde permanecieron durante tres días para descartar posibles contaminantes, transcurrido ese tiempo se procedió a la distribución de los cinco tratamientos en los BEIT dentro de la cámara de flujo laminar.

Después de tres días de distribuido los tratamientos en los BEIT, se procedió a realizar la inoculación de los embriones globulares a los biorreactores (Figura 3.a). Finalizado el proceso de siembra se procedió a sellar cada BEIT con cinta de plástico transparente y después se llevaron al cuarto de crecimiento, con un periodo de permanencia de 85 días en condiciones

ambientales de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas en oscuridad y una intensidad de 2000 lux. Se suministró un riego de inmersión al día con duración de tres minutos. Para el suministro de aire los BEIT se conectaron a un filtro central Millipor de $0.22\mu\text{m}$ que se conecta al sistema de aireación (bomba de vacío) a una presión de salida de 0.2 bar para que impulse el medio de la cámara inferior a la superior durante el periodo de inmersión (Figura 3.b).



Figura 3. a) Espátula metálica, conteniendo un peso aproximado de 150 mg callo en estado globular. b) Biorreactores Económicos de inmersión Temporal (BEIT).

a. Medios de cultivo

La modificación del protocolo de Van Boxtel y Berthouly (1996) consistió en agregar 5 variantes de concentraciones de la hormona Ácido Indol Butírico (AIB). En el Cuadro 3 se presentan las variantes de medios de cultivo.

Cuadro 3. Medios de cultivo en fase de germinación de embriones somáticos de café Centroamericano y café Conilón

Compuestos	Variantes de medio de cultivo				
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Concentración de sales MS (%)	100%	100%	100%	100%	100%
Glycina (mg L ⁻¹)	1	1	1	1	1
Tiamina (mg L ⁻¹)	10	10	10	10	10
Pyridoxina (mg L ⁻¹)	1	1	1	1	1
Ácido nicotínico (mg L ⁻¹)	1	1	1	1	1
Myo-inositol (mg L ⁻¹)	100	100	100	100	100
AIB (mg L ⁻¹)	0.00	0.15	0.30	0.45	0.60
Azúcar (g L ⁻¹)	30	30	30	30	30

Nota: Variantes de medios de cultivo (M₁, M₂, M₃, M₄, M₅)

b. Variables evaluadas

El experimento se evaluó 85 días después de establecido y se analizaron las siguientes variables:

- ✓ Número de plantas formadas
- ✓ Longitud de plantas (cm)
- ✓ Número de hojas
- ✓ Longitud de raíces (cm)

c. Diseño estadístico

Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA) con cinco tratamientos, empleándose por cada tratamiento 5 BEIT cada uno conteniendo 40 embriones. A los datos obtenidos en los cinco tratamientos se les realizó un análisis de varianza de clasificación simple y para determinar el grado de significancia entre las medias se utilizó la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. Los datos se procesaron y analizaron en el programa estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.5.4 Propagación por micronudos en medios de cultivo semisólidos

De las plantas formadas en la germinación de los embriones en los BEIT, se seleccionaron los que presentaban tres pares de hojas y se procedió a diseccionarlas en tres estratos conformados cada uno por micronudo de segmento apical, micronudo de segmento central y micronudo de segmento basal como se aprecia en la Figura 4. Cada tipo de micronudo se sembró por separado en cada uno de los cuatro tratamientos.



Figura 4. Izquierda: planta de café obtenida de embriogénesis somática. Centro: micronudos. a: Apical. b: Central. c: Basal. Derecha: siembra en medio de cultivo.

a. Medios de cultivo

Se evaluaron cuatro tratamientos (medio de cultivo semisólido) como se detalla en el Cuadro 4. Todos los tratamientos contenían las sales de MS al 100% de concentración; se emplearon cinco frascos por cada tratamiento y por cada tipo de micronudo. Los micronudos sembrados se incubaron a temperaturas de 26 ± 1 ° C con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Todos los medios de cultivo utilizados en este estudio fueron esterilizados en autoclave de acuerdo a la temperatura, duración y presión descrita en el acápite 4.5.1 inciso *a*.

Cuadro 4. Medios de cultivo para la propagación de micronudos de segmentos apicales, centrales y basales centroamericano y café Conilón

Compuestos	M₁	M₂	M₃	M₄
Concentración de sales MS (%)	100%	100%	100%	100%
Glycina (mg L ⁻¹)	1	1	1	1
Tiamina (mg L ⁻¹)	10	10	10	10
Pyridoxina (mg L ⁻¹)	1	1	1	1
Ácido nicotínico (mg L ⁻¹)	1	1	1	1
Myo-inositol (mg L ⁻¹)	100	100	100	100
6-BAP (mg L ⁻¹)	0	1	0	1
AIA (mg L ⁻¹)	0	0	1	1
Azúcar (g L ⁻¹)	30	30	30	30

Nota: Variantes de medios de cultivo (M₁, M₂, M₃, M₄)

b. Variables evaluadas

Para determinar el mejor tratamiento se evaluaron las siguientes variables:

- ✓ Longitud de la planta
- ✓ Número de hojas
- ✓ Número de raíces
- ✓ Longitud de raíces

c. Diseño estadístico

Cada tratamiento consistió de 25 unidades por tipos de micronudos (apicales, centrales y basales), contenidas en 5 frascos con 5 plantas cada uno. A los datos obtenidos se les practicó un análisis de varianza de clasificación simple y para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey al 5%. Se utilizó un DCA con arreglo unifactorial. Los datos se procesaron y analizaron en el programa estadístico INFOSTAT versión 2020.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Inducción de callo

5.1.1 Cultivar Centroamericano

En el estudio de inducción, a las tres semanas de establecidos los explantes de hojas presentaron contaminación por hongos en un 10% de los explantes en los tres tratamientos. De acuerdo con Roca *et al.* (1991), la contaminación se debe porque en la nervadura central y las nervaduras secundarias poseen domacios que son poros profundos (alrededor 0.18 mm de diámetro) en los cuales se acumulan microorganismos contaminantes endófitos y simbioses.

Los tejidos foliares en el tratamiento P₁ presentó un porcentaje del 63.75% con coloración café, resultando significativamente superiores a los explantes de color amarillo y verde con porcentajes del 21.25% y 15% respectivamente. En el tratamiento P₂ se observó los colores amarillo y café con una respuesta estadística de 35.26% y 45.78% superior a la media de los explantes de color verde con el 19.04%. En el tratamiento P₃ no se presentaron diferencias significativas entre las medias obtenidas en los tres colores. Los resultados se presentan en la Figura 5.

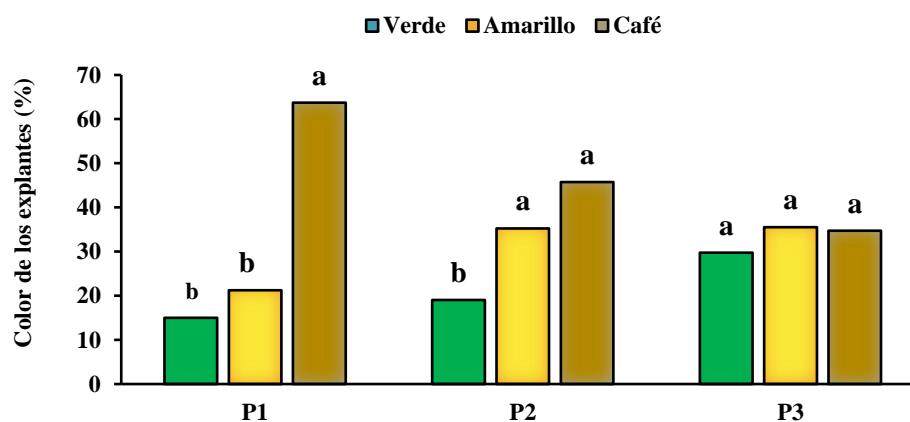


Figura 5. Influencia de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el cultivar Centroamericano, a las tres semanas de iniciada la inducción de callo en la variable color presente en los explantes.

P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996); P₂ (Teixeira *et al.*, 2004); P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.1.2 Cultivar Conilón

En el tratamiento P₁ el 58.25% de los explantes de hoja presentaron color café, resultando similar estadísticamente a los explantes que expresaron el color amarillo con porcentaje de 28.50%. Únicamente los explantes con color amarillo presentaron una respuesta estadística sin reflejar diferencias significativas con las medias obtenidas en el color verde (13.25%) ni con la media del color café.

En el tratamiento P₂ en los colores de los explantes amarillo y café se obtuvieron porcentajes respectivos de 40.50% y de 43% con similar y mejor categoría estadística. Estos resultados superaron significativamente al porcentaje de 16.50% que se obtuvo en el color verde. Por efecto de los constituyentes del tratamiento P₃ el 53.25% de los explantes presentaron el color amarillo que resultó superior a los porcentajes que se lograron en los colores verde y café con 26 y 20.75% respectivamente. No se registraron diferencias estadísticas entre las medias obtenidas en los colores de explantes verdes y cafés. En la Figura 6 se presentan los resultados de los tres tratamientos y en la Figura 7 se observan explantes de hojas que presentaron color verde, amarillo y café.

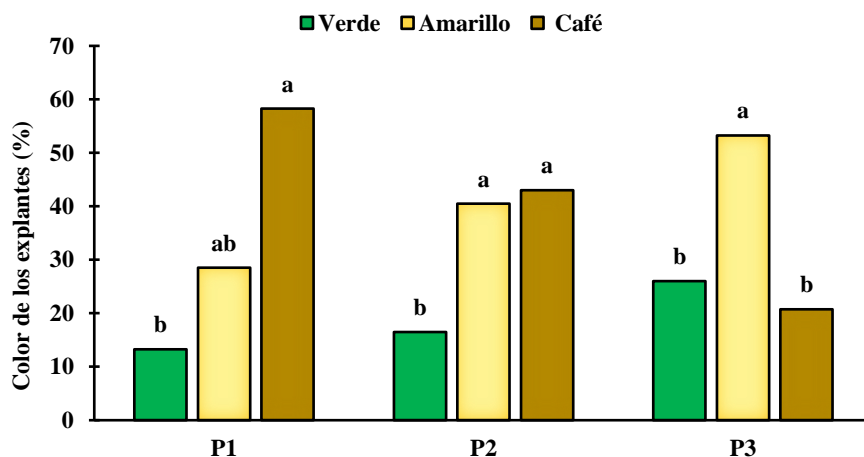


Figura 6. Influencia de las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en el cultivar Conilón, a las tres semanas de iniciada la fase de inducción de callo en la variable color presente en los explantes.

P1 (Boxtel and Berthouly, 1996); P2 (Teixeira et al., 2004); P3 (Söndhal and Sharp, 1977). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

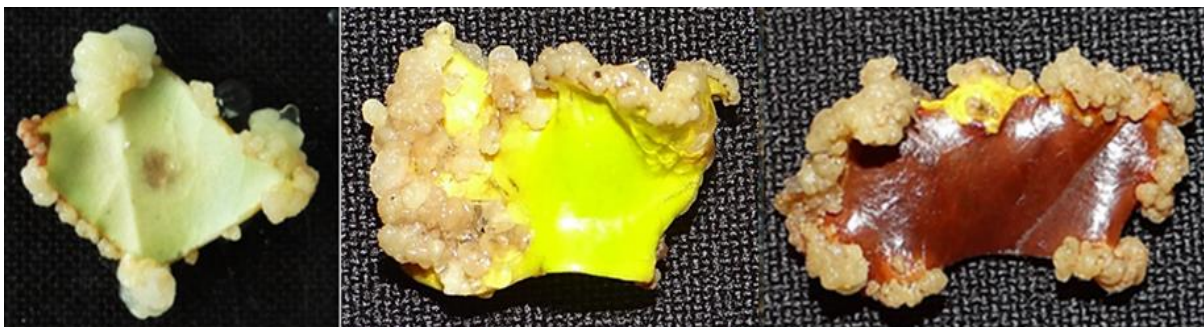


Figura 7. Formación de callos en los bordes de explantes de hojas que presentaron color verde, amarillo y café.

En la inducción de callos de los dos cultivares de café es evidente que intervinieron varios factores que propiciaron que en el haz y el envés de los explantes de hojas se presentaran de color verde, amarillo o café. Entre estos factores destacamos el efecto de los reguladores del crecimiento (PGR) adicionadas a los medios de cultivo y del genotipo de los cultivares. En los dos cultivares en estudio se observó que en el tratamiento P_1 al que se le agregó una concentración de 0.5 mg L^{-1} de la auxina 2,4-D fue predominante el porcentaje de explantes que presentaron color café con el 63.75% en el cultivar centroamericano y de 58.25% en el cultivar Conilón. Cuando la concentración de 2,4-D se incrementó a 2.21 mg L^{-1} prevalecieron los colores amarillo y café en porcentajes del 80.98% en el cultivar centroamericano y el 83.50% en el cultivar Conilón.

En el tratamiento P_3 se adicionaron 1.1 mg L^{-1} de 2,4-D y una alta dosis de la citoquinina conocida como kinetina a 4 mg L^{-1} se redujo el porcentaje de explantes que se tornaron color café en los dos cultivares. El comportamiento de los genotipos de café, se debió posiblemente al efecto de la citoquinina de retardar la senescencia de las hojas permitiendo que permanezcan más tiempo verde gracias a que prevalece un mayor contenido de clorofilas funcionales. Esta respuesta no significa necesariamente que los callos que se formaron en los bordes de los explantes fuesen en un alto porcentaje callos no embriogénicos (Jordán y Casaretto, 2006).

En la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la

planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos). Por ejemplo, en explantes de tomate se ha reportado la presencia de vainilina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído (Harms *et al.*, 1983; Rao *et al.*, 1985; Abdelwahd *et al.*, 2008).

Liu *et al.* (2015) mencionan que el color marrón de los explantes generalmente es causado por la oxidasa; por ejemplo, el polifenol oxidasa (PPO), oxida los fenoles para producir ubiquinoles de color marrón, que se acumulan en los explantes y se liberan en el medio. Sin embargo, el color marrón del explante también puede ser causado por el estrés ambiental u otras condiciones adversas, incluida la muerte celular programada (PCD) y la muerte natural (necrosis).

Quiroz-Figueroa *et al.* (2001), destaca el efecto de factores como los compuestos fenólicos que pueden actuar como sustancias inductoras o inhibitorias de la embriogénesis somática. González *et al.* (2005), determinaron para la formación de callos la época del año en que se toman los explantes foliares ejerce un marcado efecto en la respuesta morfogénica y bioquímica en los genotipos evaluados. Comprobando que los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre-diciembre resultaron más favorables para obtener un alto porcentaje de formación de callos, son bajos los índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un mayor contenido de proteínas totales.

Azofeifa (2009) destaca que en el cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, el volumen y la calidad del recipiente de cultivo. Asimismo, Córdova (2014), reportó que bajo las condiciones de estrés los explantes expresan varias enzimas oxidasas como los polifenoles oxidasas, fenolasas, tirosinasas y peroxidasas que al actuar sobre sus sustratos generan radicales libres que causan el ennegrecimiento y eventualmente la muerte del explante.

En los tres protocolos estudiados se presentaron los colores verde, amarillo y café en el segmento de los tejidos que no incluye el área de cicatrización con callos, pero no se observó la producción de exudados de sustancias oxidativas disgregadas en los medios de cultivo, posiblemente debido a tres factores: a) los explantes se extrajeron de hojas en estado juvenil b) a los tres tratamientos

se agregaron las sales al 50% de su concentración c) a la fecha del año en que se tomaron las hojas para la siembra de los tejidos.

Sánchez *et al.* (2019), reporta que los explantes provenientes de hoja inmadura y hoja joven de *Coffea* spp., presentaron mejor capacidad de respuesta morfogénica que los de hoja madura, en cuanto a la inducción de callo. Esta inducción de callo también varió entre genotipos, y el callo generado no siempre fue embriogénico (López *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos pueden actuar como sustancias inductoras o inhibitorias de la embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2001). Azofeifa (2009) recomienda para la reducción de la oxidación en los explantes de hojas de café se deben seleccionar en estado juvenil, además de agregar las sales del medio de cultivo a la mitad de concentración y la incubación de los tejidos en oscuridad.

Samson *et al.* (2006) mencionan que la concentración de los reguladores de crecimiento y especialmente el balance entre las auxinas y citocininas es un factor clave en la inducción de callo y la iniciación de la embriogénesis somática. La citoquinina promueve la formación de embriones somáticos posiblemente por la síntesis de una sustancia inductora o por la eliminación de un inhibidor (Söndhal *et al.*, 1991).

5.1.3 Cicatrización de explantes de hoja y consistencia de los callos.

a. Cultivar Centroamericano

En el tratamiento P₁ se observó cicatrización con callos en los bordes de los explantes, resultando significativamente superior la escala de cicatrización $\leq 50\%$ con el 62.50% en relación a la escala $> 50\%$ de cicatrización que fue del 11.00%. El 26.50% de los explantes no formaron callo. En el tratamiento P₂ no se presentaron diferencias estadísticas entre las escalas que formaron callo con medias respectivas de 51.25% en la escala $\leq 50\%$ y 43.00% en la escala $> 50\%$; únicamente el 5.75% de los explantes de hoja no formaron callo. Similar comportamiento estadístico se observó en el tratamiento P₃ con porcentajes de 45% en la escala de cicatrización $\leq 50\%$ y 47.75% en la escala $> 50\%$; el 7.25% de los explantes no formaron callo.

Se registró la formación de callos friables en el tratamiento P₁ con el 54.75% superando en respuesta estadística a los callos acuosos que se formaron en el 18.75%. En el protocolo P₂ no se presentaron diferencias significativas entre callos friables y acuosos con medias respectivas de 48.25% y 46.00%. La respuesta a la formación de callos friables en el protocolo P₃ con una media de 73.00% resultó significativamente superior al tipo de callo acuoso que presentó una media del 20.75%. Los resultados se presentan en la Cuadro 5.

Cuadro 5. Respuesta del cultivar Centroamericano a la cicatrización de los explantes de hojas y la consistencia de los callos a los 42 días de establecidos

Tratamientos	SR*	Cicatrización (%)		Consistencia (%)	
		≤50%	>50%	Friable	Acuoso
P ₁	26.50 b	62.50 a	11.00 b	54.75 a	18.75 b
P ₂	5.75 b	51.25 a	43.00 a	48.25 a	46.00 a
P ₃	7.25 b	45.00 a	47.75 a	73.00 a	20.75 b

P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996); P₂ (Teixeira et al., 2004); P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). *SR: Sin reacción
Letras distintas entre filas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis; Student-Newman-Keuls, p< 0,05).

b. Cultivar Conilón.

En los tratamientos P₁ y P₂, la cicatrización de callos en los bordes de las hojas en la escala de cicatrización ≤50% resultaron con mejor respuesta estadística con el 50% y 48.20% respectivamente en comparación a la escala >50% que les correspondió el 20% y el 25.52%. En el tratamiento P₃ las medias obtenidas en las dos escalas de cicatrización con callos, presentaron similar comportamiento estadístico, en la escala de cicatrización ≤50% fue de 35.40% mientras que en la escala >50% de 47.60%.

En el tratamiento P₁ se presentaron diferencias estadísticas entre las medias de callos de consistencia friable con el 62.80%, superior a los callos de consistencia acuosa con el 7.20%. La consistencia friable en los tratamientos P₂ y P₃ con medias respectivas de 54.20% y 75.80%, resultaron significativamente superiores a la media de callos de consistencia acuosa de 17.60% en el tratamiento P₂ y de 7.20% en el tratamiento P₃. Los resultados de cicatrización en los explantes y de consistencia de los callos se presentan en la Cuadro 6 y en la Figura 8 se presentan la cicatrización de callos y los tipos de callos acuoso y friable.

Cuadro 6. Respuesta del cultivar Conilón a la cicatrización de los explantes de hojas y la consistencia de los callos

Tratamientos	Cicatrización (%)			Consistencia (%)	
	SR*	≤50%	>50%	Friable	Acuoso
P ₁	30.00 b	50.00 a	20.00 b	62.80 a	7.20 b
P ₂	26.28 b	48.20 a	25.52 b	54.20 a	17.60 b
P ₃	17.00 b	35.40 ab	47.60 a	75.80 a	7.20 b

P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996); P₂ (Teixeira et al., 2004); P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). *SR: Sin Reacción. Letras distintas entre filas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, p< 0,05).



Figura 8. Izquierda: cicatrización de callos en los bordes de explantes de hojas: Centro: callo acuoso. Derecha: callo friable.

Santos *et al.* (2013) reportaron que la inducción de callos ejecutada en 15 clones de Conilón, solo en 12 de ellos se formaron callos, pero solo en 9 de ellos la inducción fue del 100%, considerando que los resultados diferentes de callogénesis están en dependencia de las distintas constituciones genéticas de los clones.

Contrario a lo que se creía no todas las células somáticas pueden formar callos, se sabe que la formación de callos es iniciada por la activación de una población celular especializada que se encuentra parcialmente diferenciadas y que se esparcen a través del cuerpo de la planta (Sugimoto *et al.*, 2011).

Sánchez y Alvarenga (2015) afirman que la inducción del callo en (*Uncaria tomentosa* Willd DC) se inició en las zonas de corte (bordes) y en las regiones de incisión de las hojas y aducen que la tendencia de los tejidos vegetales a formar callo a partir de las heridas es resultado de una reacción defensiva natural. Santana (1993) reportó que al emplear segmentos de hojas en el

cultivo del café para inducir la formación de los callos en explantes de tallos se inició en la zona en que se hicieron los cortes, es decir, a partir del tejido de cicatrización y a continuación se produjo un engrosamiento de las células perivasculares del haz, con un posterior crecimiento en todas las direcciones.

Resultados obtenidos por Sánchez *et al.* (2019) mencionan que los explantes y cicatrización de callos se oscurecieron a las cinco semanas de iniciado el cultivo, pero no impidió en la inducción de embriones somáticos en tres variedades de café. Sin embargo, algunos de estos callos tienen la capacidad de formar embriones somáticos, lo que indica que parecen haber estado "latentes" durante este tiempo. Además, se observa que no todos los explantes de *C. arabica* forman callos, reflejo de que la capacidad embriogénica somática puede variar entre los explantes de la misma planta o de la misma hoja.

Gatica (2002) señaló que cuando utilizó como medio de cultivo el protocolo de Yasuda *et al.* (1985) para la inducción de callos vía embriogénesis directa a partir de hojas de plantas *in vitro* de *Coffea arabica* cv. Caturra y Catuai y posteriormente un medio para el desarrollo de embriones el protocolo de Hatanaka *et al.* (1991) observó que la cicatrización se volvió marrón oscuro después de cuatro semanas de cultivo. López-Gómez *et al.* (2010) consideran que la inducción de callo puede ser variable y sólo en algunos tejidos se logra una mayor proporción de callo embriogénico, caracterizado por la presencia de células isodiamétricas con núcleos grandes; otros tejidos producen mayor cantidad de callo conformado por células parenquimatosas alargadas no embriogénicas.

5.2 Multiplicación de callo embriogénico

5.2.1 Cultivar Centroamericano

En los tres tratamientos la producción de callo embriogénico se evaluó a las 12 semanas, presentándose diferencias significativas en cuanto a las categorías callos con reacción embriogénica y callos sin reacción embriogénica. Observándose en los tres tratamientos que los callos sin reacción embriogénica presentaron diferencias significativas inferiores en comparación a los callos que presentaron reactividad.

En la coloración que presentaron los callos embriogénicos se observó que en el tratamiento P₁ con media del color crema de 36% resultó mejor estadísticamente a las medias que se lograron en los colores blanco cremoso y amarillo con el 22% y 16% respectivamente. En el tratamiento P₂ con una media de 18% de callos de color blanco cremoso, resultó significativamente inferior a las medias obtenidas en los callos de color crema y amarillo con medias respectivas de 38% y 30%. En el tratamiento P₃ la media de color blanco cremoso con el 38% resultó significativamente superior a las medias de 10% y los 12% logradas en el color crema y amarillo respectivamente. Los resultados de reactividad embriogénica y del color de los callos embriogénicos se presentan en la Cuadro 7 y en la Figura 9 se observan los callos embriogénicos formados en el borde de los explantes de hoja.

Cuadro 7. Respuesta del cultivar Centroamericano a la reactividad embriogénica y colores que presentaron los callos embriogénicos a las doce semanas

Tratamientos	Reactividad embriogénica (%)		Color callo embriogénico (%)		
	Sin	Con	Blanco cremoso	Crema	Amarillo
P ₁	26.00 b	74.00 a	22.00 b	36.00 a	16.00 b
P ₂	15.00 b	85.00 a	18.00 b	38.00 a	30.00 a
P ₃	40.00 b	60.00 a	38.00 a	10.00 b	12.00 b

P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996); P₂ (Teixeira et al., 2004); P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). Letras distintas entre filas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, p< 0,05).

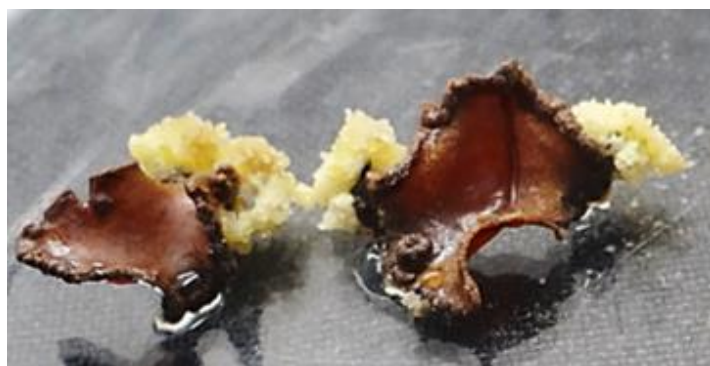


Figura 9. Callo embriogénico del cultivar Centroamericano producidos en explantes de hojas.

5.2.2 Cultivar Conilón

En los tres protocolos se registraron diferencias significativas que favorecieron a los callos que presentaron reactividad embriogénica. En el tratamiento P₁ el 42% de los callos embriogénicos

exhibieron el color blanco cremoso únicamente superando estadísticamente a la media de 14% de callos color amarillo. En el protocolo P₂ con media del 40% el color crema resultó superior a los colores blanco cremoso y amarillo con medias respectivas de 20 y 16%. El color amarillo registró mejor respuesta estadística en el tratamiento P₃ con media de 48%, en relación a los colores blanco cremoso y crema con medias respectivas de 24 y 22%. Los resultados de reactividad embriogénica y del color de los callos embriogénicos se presentan en el Cuadro 8 y en la Figura 10 se observa la formación de callo embriogénico en los bordes de los explantes.

Cuadro 8. Respuesta del cultivar Conilón a la reactividad embriogénica y colores que presentaron los callos embriogénicos a las 12 semanas

Tratamientos	Reactividad Embriogénica (%)		Color callo embriogénico (%)		
	Sin	Con	Blanco cremoso	Crema	Amarillo
P ₁	16.00 b	84.00 a	42.00 a	28.00 ab	14.00 b
P ₂	24.00 b	76.00 a	20.00 b	40.00 a	16.00 b
P ₃	12.00 b	88.00 a	24.00 b	22.00 b	48.00 a

P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996); P₂ (Teixeira et al., 2004); P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). Letras distintas entre filas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls; p< 0,05).



Figura 10. Callo embriogénico del cultivar Conilón producidos en explantes de hojas.

En los dos cultivares de café estudiados no se formó el 100% de callo embriogénico en los bordes de las hojas debido posiblemente a factores como el genotipo, la competencia entre conglomerados de células, los constituyentes de los medios de cultivo, el contacto de los callos con la superficie de los medios de cultivo y el efecto de la oxidación enzimática. Teixeira *et al.* (2004) establecieron rangos para su estudio entre 0 y el 100% para varios genotipos; estos

presentaron porcentajes de callos embriogénicos superiores al 25% que se pueden emplear para la producción de plántulas clonales a escala comercial.

López-Gómez *et al.* (2010) señalan que la capacidad de formación de callo no siempre conduce a la capacidad de formación de embriones somáticos. Rezende (2011) refuerza la hipótesis de que la producción de embriones somáticos depende en gran medida de factores genotípicos. Sin embargo, destaca que la composición química del medio de cultivo junto con las características genéticas del material vegetal a evaluar, ejercen una marcada influencia en la respuesta morfogénica del material cultivado *in vitro*.

Basándonos en los resultados obtenidos que podemos considerarlos como satisfactorios es posible impulsar la producción masiva de plantas *in vitro* empleando el tratamiento P₂ en el cultivar Centroamericano en el que obtuvo el 85% de reactividad embriogénica, callos de color crema el 38% y de color amarillo el 30%. En el cultivar Conilón el tratamiento P₃ resultó el mejor en reactividad embriogénica con el 88%, color crema de los callos del 22% y color amarillo el 48%. González (2003), considera que el comportamiento de las variables coloración, crecimiento rápido y callos friables, en café *canephora* se deben a la existencia de una acentuada diferencia entre las combinaciones hormonales más que al genotipo del explante.

Algunos autores estudiando diversos genotipos de café robusta mencionan que es necesaria la presencia de auxinas e incluso un balance entre auxinas y citocininas, que favorezcan la formación de callo con potencial embriogénico (González, 2003; Van Boxtel and Berthouly, 1996; Denchev *et al.*, 1992). Berthouly and Etienne (1999) afirman que la obtención de embriones somáticos a partir de callos se logra con el uso de dos medios de cultivo, uno de inducción de callo embriogénico y otro para la regeneración de embriones; el primero, con altas concentraciones de auxinas, solo o en combinación con citoquininas; y el segundo, disminuyendo la concentración de auxinas o eliminándolas del medio de cultivo.

En cuanto a la respuesta de reactividad de acuerdo al genotipo, se coincidió con los resultados reportados por diferentes autores (Berthouly and Michaux-Ferrire, 1996; Fuentes *et al.*, 2000; Quiroz-Figueroa, 2002; Santana *et al.*, 2004; Gatica *et al.*, 2007), quienes destacan que en café

canephora generalmente es mejor la respuesta de inducción del callo embriogénico en relación a café arábico.

5.2.3 Peso fresco de callo embriogénico cultivar centroamericano

El cultivar de café Centroamericano en el peso fresco del callo embriogénico se obtuvo una media de 232.30 mg en el tratamiento P₂ que resultó significativamente superior a las medias logradas por los tratamientos P₁ y P₃ que fueron de 114.70 y 69 mg respectivamente. Esta respuesta indica que los constituyentes adicionados al tratamiento P₂ resultaron favorables para alcanzar un alto porcentaje de embriones germinados y con buenas características morfológicas y fisiológicas. Los resultados se presentan en la Figura 11.

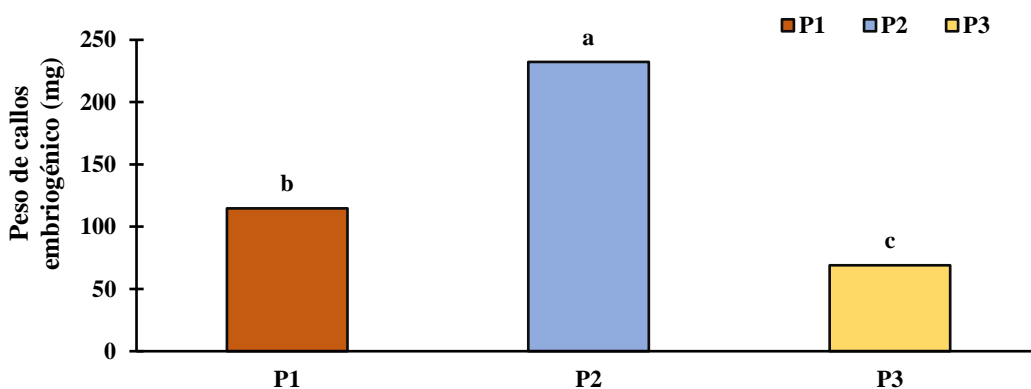


Figura 11. Peso fresco de callo embriogénico cultivar Centroamericano en los protocolos P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996), P₂ (Teixeira *et al.*, 2004) y P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

El tratamiento P₁ se diferenció de los tratamientos P₂ y P₃ por contener altas cantidades de KNO₃ a razón de 1900 mg L⁻¹ más 1 mg L⁻¹ de la auxina 2,4-D y de una alta concentración de la citoquinina BAP con dosis de 4 mg L⁻¹. El tratamiento P₃ se caracterizó por contener una baja dosis de la auxina ANA con 0.09 mg L⁻¹ y baja dosis de la citoquinina kinetina (0.54 mg L⁻¹). En el tratamiento P₂ fue mayor el peso fresco de los callos embriogénicos posiblemente porque favoreció la adición combinada de una citoquinina (1 mg L⁻¹ de 2IP) y dos auxinas (2.21 mg L⁻¹ de 2,4-D más 1 mg L⁻¹ de IBA) y 400 mg de extracto de malta.

Sánchez *et al.* (2019) mencionan que en el caso de la variedad Catuaí de *Coffea arabica*, se observaron embriones somáticos en los medios de cultivo con solo 2,4-D como regulador de

crecimiento a razón de 0.1, 0.50 y 1 mg L⁻¹, aduciendo ese comportamiento a que las hojas jóvenes de esta variedad presentan alta concentración de citoquininas endógenas.

5.2.4 Peso fresco de callo embriogénico cultivar Conilón

En el tratamiento P₃ con peso fresco de callo embriogénico de 288.70 mg resultó significativamente superior a las medias de 195.80 mg y 142.30 mg obtenidas en los tratamientos P₁ y P₂ respectivamente. En la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos en peso de callo embriogénico.

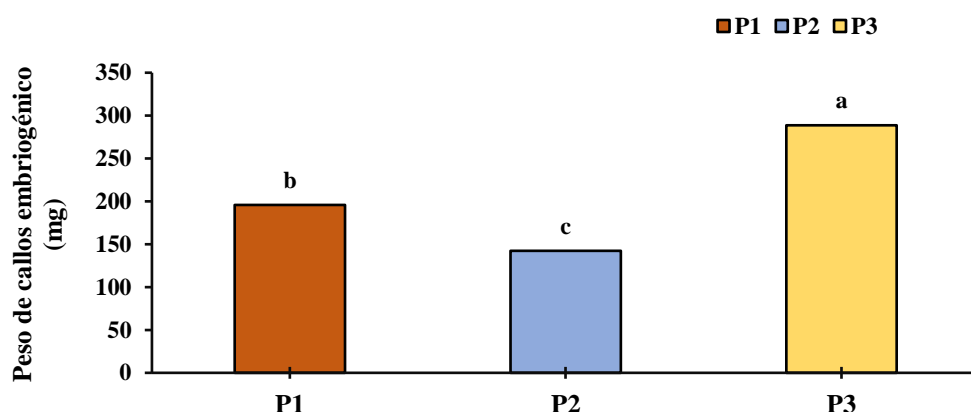


Figura 12. Peso fresco de callo embriogénico cultivar Conilón en los protocolos P₁ (Boxtel and Berthouly, 1996), P₂ (Teixeira *et al.*, 2004) y P₃ (Söndhal and Sharp, 1977). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

En al cultivar Conilón el mejor resultado en peso fresco de callo embriogénico se obtuvo en el tratamiento P₃ que se caracterizó por no contener glycina y bajas concentraciones de los reguladores del crecimiento ANA y kinetina. Los resultados demuestran que la fase de multiplicación de callos está influenciada por los constituyentes agregados a los medios de cultivos y por el genotipo. Rezende *et al.* (2012) experimentando en café arábico con el clon 28 en fase de multiplicación de callo embriogénico con los medios de cultivo reportados por Albarran *et al.* (2004) conteniendo las sales MS al 50% y los reguladores del crecimiento de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D con 1 mg L⁻¹ kinetina, obtuvieron un peso fresco de los callos de 7.11 g y en el medio de cultivo descrito por Teixeira *et al.*, (2004), con las sales MS reducidas al 50% y los reguladores del crecimiento con 1.1 mg L⁻¹ 2,4-D, 1 mg L⁻¹ IBA y 2 mg L⁻¹ de 2iP el peso fresco

de los callos fue 6.40 g. Los mejores resultados en peso fresco de los callos a los 63 días de establecidos los obtuvieron en ambos medios con consistencia semisólida o gelatinosa.

González (2003) reportó que en el medio de cultivo con 2 mg L⁻¹ de kinetina más 0.9 mg L⁻¹ de RIZOBAC obtuvo en los clones de *C. Canephora* M-229 peso fresco de callo de 1.5 g, seguido del clon k-234 con una media de 1.48 g y el clon M-28 con media de 0.58 g, aunque este último clon resultó inferior estadísticamente a los dos clones anteriores y superior al tratamiento testigo.

5.3 Germinación de embriones somáticos en Biorreactores (BEIT)

5.3.1 Cultivar Centroamericano

Con las adiciones de AIA de 0.30, 0.45 y 0.60 mg L⁻¹ se presentaron respuestas estadísticas similares en número de embriones con medias de 173, 174 y 177 respectivamente y en número de hojas que le correspondieron medias de 1.99, 1.83 y 1.83. En los tratamientos a los que no se les adicionó AIA o solamente la cantidad de 0.15 mg L⁻¹ se obtuvieron medias respetivas en número de embriones de 147 y 152 y en número de hojas medias correspondientes de 1.31 y 1.12. En las variables longitud de embriones y longitud de raíces no se presentaron diferencias significativas entre las medias de los cinco tratamientos como se aprecia en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Respuesta del cultivar Centroamericano a la germinación de embriones somáticos

Variantes de Medios de cultivo	AIA (mg L ⁻¹)	Número de embriones	Longitud de embriones (cm)	Número de hojas	Longitud de raíces
M ₁	0.00	147 b	1.29 a	1.31 b	0.97 a
M ₂	0.15	152 b	1.34 a	1.12 b	0.98 a
M ₃	0.30	173 a	1.74 a	1.99 a	1.23 a
M ₄	0.45	174 a	1.82 a	1.83 a	1.37 a
M ₅	0.60	177 a	1.44 a	1.83 a	1.35 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).

5.3.2 Cultivar Conilón

Cuando no se adicionó AIA o solo 0.15 mg L⁻¹ en la variable número de embriones se presentaron medias respectivas de 172 y 164 obteniéndose mayor significancia estadística en relación a los tratamientos que se les agregaron cantidades AIA entre 0.30 y 0.60 mg L⁻¹. En

longitud de embriones y número de raíces no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias de los diferentes tratamientos. En número de hojas la adición de 0.60 mg L⁻¹ únicamente resultó con una media estadísticamente inferior a la media obtenida en el tratamiento sin AIA. Entre las medias de número de raíces no se presentaron diferencias estadísticas. Los resultados se presentan en la Cuadro 10. En la Figura 13 se presentan el BEIT y plantas obtenidas del proceso de germinación de embriones en los cultivares Centroamericano y Conilón.

Cuadro 10. Respuesta del cultivar Conilón a la germinación de embriones somáticos

Variantes de Medios de cultivo	AIA (mg L ⁻¹)	Número de embriones	Longitud de embriones (cm)	Número de hojas	Número de raíces (cm)
M ₁	0.00	172 a	1.75 a	1.89 a	1.15 a
M ₂	0.15	164 a	1.56 a	1.67 ab	1.05 a
M ₃	0.30	138 b	1.47 a	1.50 ab	1.16 a
M ₄	0.45	143 b	1.30 a	1.36 ab	1.13 a
M ₅	0.60	138 b	1.33 a	1.28 b	1.06 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).



Figura 13. a: Plantas germinadas en Biorreactores (BEIT). b: plantas del cultivar Centroamericano. c: plantas del cultivar Conilón.

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas: La enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permitiendo obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente (Encina y Quesada, 1997). Los sistemas de cultivo en medio líquido para producción a gran escala de embriones somáticos en biorreactores, permite la automatización de la producción de embriogénica y su uso comercial (Salaj *et al.*, 2007).

El cultivar Centroamericano (género *Coffea arabica*) es necesario adicionar AIA al medio de cultivo en dosis de 0.30 a 0.60 mg L⁻¹ porque produce mayor número de embriones y de hojas, además, se incrementa la longitud de los embriones y de las raíces. El cultivar Conilón (género *Coffea Canephora*) respondió mejor al medio de cultivo sin adición de la hormona AIA o agregando dosis bajas de 0.15 mg L⁻¹. Von Arnold *et al.* (2002) afirma que la respuesta genética está predeterminada por los tipos de hormonas y según la especie que se esté estudiando.

Ammirato (1983) destaca que los embriones somáticos sufren una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, pasando a los estados de corazón y torpedo, seguido por la fase de maduración y germinación que darán lugar a plantas completas.

Después de inoculados los embriones globulares en los BEIT paulatinamente pasaron a la conversión de los estados de corazón, torpedo, maduración, germinación y finalmente la formación de plantas durante un período de 12 semanas, sin necesidad del refrescamiento del medio de cultivo. Con la respuesta favorable a la ESI lograda con el empleo de los BEIT se posibilita la reproducción masiva de plantas de café con una mayor estabilidad genética de los genotipos, reduciéndose el riesgo de aparición de variantes somaclonales.

Resultados similares con el empleo de biorreactores en la propagación por embriogénesis somática indirecta en café los reporta Rezende (2008), haciendo alusión a diferentes autores que obtuvieron una producción masiva de embriones somáticos utilizando inmersión temporal. En todos los estudios se obtuvieron altas frecuencias de tejidos embriogénicos y regeneración de plantas.

5.4 Propagación por micronudos en el cultivar centroamericano.

5.4.1 Cultivar centroamericano

a. *Micronudos de segmentos apicales*

En longitud de brotes apicales en los tratamientos M₃ con media de 3.42 cm y el tratamiento M₄ con media de 3.71 cm, resultaron superiores estadísticamente al tratamiento M₁ que no contenía reguladores del crecimiento cuya media fue de 3.07 cm. Mientras que el tratamiento M₂ con media de 3.38 cm en longitud de planta presentó igual comportamiento estadístico que las medias obtenidas en los tratamientos M₃ y M₄. Los tratamientos M₁ y M₂ con medias respectivas de 2.13 y 2.53 hojas emitidas, resultaron significativamente inferiores a los valores de las medias que se obtuvieron en los micronudos que crecieron en los tratamientos M₃ y M₄ con medias de hojas de 3.27 y 3.73.

En número y longitud de raíces producidas se presentaron similares categorías estadísticas en los tratamientos M₁, M₂ y M₃ con medias de número raíces de 0.47, 0.80 y 1.00 respectivamente y medias de longitud de raíces respectivas de 0.36, 0.41 y 0.75 cm. El tratamiento M₄ con media de número de raíces de 1.33 y longitud de raíces de 1.17 cm resultó superior estadísticamente únicamente al tratamiento M₁. Los resultados se presentan en la Cuadro 11.

Cuadro 11. Respuesta del cultivar Centroamericano a la propagación por micronudos de segmentos apicales

Variantes de Medios de cultivo	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
M ₁	3.07 b	2.13 b	0.47 b	0.36 b
M ₂	3.38 ab	2.53 b	0.80 ab	0.41 b
M ₃	3.42 a	3.27 a	1.00 ab	0.75 ab
M ₄	3.71 a	3.73 a	1.33 a	1.17 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).

b. *Micronudos de segmentos centrales*

La longitud del brote principal lograda con la siembra de micronudos de segmentos centrales en el tratamiento M₄ con media de 3.91 cm superó significativamente solamente a la media de 3.11

cm obtenida en el tratamiento M₁, aunque en este tratamiento esa misma variable presentó similar comportamiento estadístico a las medias obtenidas en los tratamientos M₂ y M₃ con medias respectivas de, 3.49 cm y 3.68 cm. Se presentó similar respuesta estadística en la variable número de hojas con medias respectivas 2.87, 3.20 y 3.47 en los tratamientos M₂, M₃ y M₄. Solo el tratamiento M₁ con una media de número de hojas de 2.20 resultó significativamente inferior a los tratamientos M₃ y M₄.

En las medias de número de raíces la respuesta estadística fue similar en los tratamientos M₁, M₂ y M₃ con medias respectivas de 0.73, 0.87 y 1.13 raíces, aunque las dos primeras fueron superadas significativamente por la media de 1.73 raíces que se logró en el tratamiento M₄. No se presentaron diferencias significativas entre las medias de longitud de raíces obtenidas en los cuatro tratamientos. Los resultados de longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces se presentan en la Cuadro 12.

Cuadro 12. Respuesta del cultivar Centroamericano a la propagación por micronudos de segmentos centrales.

Variantes de Medios de cultivo	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
M₁	3.11 b	2.20 b	0.73 b	0.75 a
M₂	3.49 ab	2.87 ab	0.87 b	1.13 a
M₃	3.68 ab	3.20 a	1.13 ab	1.15 a
M₄	3.91 a	3.47 a	1.73 a	1.43 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).

c. Micronudos de segmentos basales

La respuesta estadística en longitud de brotes en los tratamientos M₂, M₃ y M₄ fue similar con medias respectivas de 3.51 cm, 3.74 cm y 3.87 cm. Solo la media de 3.24 obtenida en el tratamiento M₁ resultó significativamente inferior a la media alcanzada en el tratamiento M₄. Con media de 3.47 hojas emitidas en el tratamiento M₄ superó significativamente a las medias producidas de los tratamientos M₁, M₂ y M₃ que fueron de 2.47, 2.67 y 2.93 respectivamente.

Entre las medias de número de raíces producidas en los cuatro tratamientos no se presentaron diferencias estadísticas entre sí. En longitud de raíces, el tratamiento M₄ con media de 1.70 cm superó significativamente a las medias obtenidas en los tratamientos M₁ y M₂ con medias respectivas de 0.70 cm y 0.81 cm. El tratamiento M₃ con media de 1.10 cm resultó estadísticamente similar a las medias de los tratamientos M₁ y M₂ y M₄. En el Cuadro 13 se presentan los resultados de longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces.

Cuadro 13. Respuesta del cultivar Centroamericano a la propagación por micronudos de segmentos basales.

Variantes de Medios de cultivo	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
M ₁	3.24 b	2.47 c	1.27 a	0.70 b
M ₂	3.51 ab	2.67 bc	1.33 a	0.81 b
M ₃	3.74 ab	2.93 b	1.40 a	1.10 ab
M ₄	3.87 a	3.47 a	1.47 a	1.70 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).

5.4.2 Cultivar Conilón

a. *Micronudos de segmentos apicales*

En longitud del segmento apical se logró mejor respuesta estadística en los tratamientos M₃ y M₄ con medias respectivas de 4.25 y 4.37 cm, superando a las medias de 3.10 y 3.18 cm obtenidas en los tratamientos M₁ y M₂ respectivamente. Con medias en número de hojas de 3.00, 3.33 y 3.67 correspondiente a los tratamientos M₂, M₃ y M₄ no se presentaron diferencias estadísticas entre sí. Solo el tratamiento M₁ con media de 2.34 resultó inferior estadísticamente al tratamiento M₄. En el tratamiento M₃ se obtuvo una media de número de raíces de 2.00 resultando solamente superior en respuesta estadística a la media de 1.20 cm lograda en el tratamiento M₁ que contenía reguladores de crecimiento. Con longitud de raíces de 2.31 cm en el tratamiento M₄ resultó superior estadísticamente a los tratamientos M₁ y M₂ que alcanzaron medias respectivas de 1.37 y 1.50 cm. Los resultados de longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces se presentan en la Cuadro 14.

Cuadro 14. Respuesta del cultivar Conilón a la propagación por micronudos de segmentos apicales.

Variantes de Medios de cultivo	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
M ₁	3.10 b	2.34 b	1.20 b	1.37 b
M ₂	3.18 b	3.00 ab	1.40 ab	1.50 b
M ₃	4.25 a	3.33 ab	2.00 a	2.01 ab
M ₄	4.37 a	3.67 a	1.67 ab	2.31 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).

b. Micronudos de segmentos centrales

En los tratamientos M₃ y M₄ con medias de longitudes del brote principal respectivos de 4.41 y 4.56 cm resultaron significativamente superiores a los tratamientos M₁ y M₂ con medias respectivas de 3.28 y 3.39 cm. En la variable número de hojas se observó igual orden de respuesta de las categorías estadísticas obtenidas entre los tratamientos con la variable longitud del brote. Entre las medias de número de raíces no se registraron diferencias estadísticas. En longitud de raíces con media de 2.08 cm el tratamiento M₄ superó estadísticamente a los tratamientos M₁, M₂ y M₃ que presentaron medias respectivas de 1.30, 1.41 y 1.61 cm. En el Cuadro 15 se presentan los resultados de longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces.

Cuadro 15. Respuesta del cultivar Conilón a la propagación por micronudos de segmentos centrales.

Variantes de Medios de cultivo	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
M ₁	3.28 b	2.20 b	1.33 a	1.30 c
M ₂	3.39 b	2.33 b	1.47 a	1.41 bc
M ₃	4.41 a	3.27 a	1.67 a	1.61 b
M ₄	4.56 a	3.40 a	1.60 a	2.08 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).

c. *Micronudos de segmentos basales*

En longitud del microesquejes basales el tratamiento M₄ resultó ser estadísticamente el mejor con una media de 4.17 cm, superando a las medias de 3.44 y 3.37 cm obtenidas en los tratamientos M₁ y M₂ respectivamente. Los tratamientos M₃ y M₄ resultaron con similar comportamiento estadístico. La emisión de número de hojas de los micronudos que crecieron en el tratamiento M₄ con media de 2.87 superó significativamente a los tratamientos M₁ y M₂ que alcanzaron medias respectivas de 2.00 y 2.07.

No se presentaron diferencias estadísticas entre el número de raíces producidas en los cuatro tratamientos. La longitud de raíces de las micronudos en el tratamiento M₄ con media de 2.53 cm resultó significativamente superior a las medias de 1.26, 1.51 y 1.71cm obtenidas en los tratamientos M₁, M₂ y M₃ respectivamente. En el Cuadro 16 se presentan los resultados de longitud de brotes, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces. En la Figura 14 se presentan plantas los cultivares centroamericano y Conilón.

Cuadro 16. Respuesta del cultivar Conilón a la propagación por micronudos de segmentos basales

Variantes de Medios de cultivo	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Longitud de raíces (cm)
M ₁	3.44 b	2.00 c	1.20 a	1.26 b
M ₂	3.37 b	2.07 bc	1.60 a	1.51 b
M ₃	4.08 ab	2.80 ab	1.80 a	1.71 b
M ₄	4.17 a	2.87 a	1.60 a	2.53 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según Tukey ($p \leq 0.05$).



Figura 14. Plantas reproducidas por micronudos. Izquierda: plantas del cultivar Conilón. Derecha: plantas del cultivar Centroamericano.

Los brotes de los micronudos centrales en los dos cultivares presentaron mayor crecimiento y vigor en relación a los apicales y basales. Con los micronudos apicales la brotación axilar fue reducida, por tanto, la mayoría de ellos continúan su crecimiento como una consecuencia de la ausencia del fenómeno de la dominancia apical, misma que se ha observado en gran número de especies vegetales independientemente del origen del material donante. El mayor vigor mostrado por los brotes producidos en los tres tipos de micronudos, se debió posiblemente a un equilibrio favorable entre las hormonas endógenas y a la adición de auxina al tratamiento M₃ y la adición de auxina y citoquinina al tratamiento M₄.

Es mínima la literatura científica que reporta el empleo de la micropropagación de café por medio de micronudos extraídos directamente de plantas obtenidas por embriogénesis somática indirecta. Dublin (1991) realizó investigaciones en las especies de café arabusta y en arábico a partir de plantas producidas por ES, obteniendo los primeros tallos ortotrópicos que posteriormente cortaron en micronudos; cada micronudo conteniendo un par de hojas con sus láminas reducidas a la mitad y con fragmento de entrenudo. Los primeros micronudos los cultivó en un medio caulógeno (BAP entre 1 y 5 mg L⁻¹ con 40 g L⁻¹ de sacarosa) favoreciendo exclusivamente el desarrollo de yemas latentes en los nuevos tallos ortotrópicos. De éstos se cortan nuevos micronudos que se colocan en el mismo medio de cultivo, y así sucesivamente.

La propagación de micronudos de café es otra técnica que podría potenciar el proceso de ES. Según Georgeta *et al.* (2017) es difícil propagar los árboles de café arábico mediante técnicas hortícolas convencionales, como los esquejes, ya que son enraizantes recalcitrantes o mediante injertos, lo que requiere demasiada mano de obra.

De acuerdo a los resultados obtenidos el empleo de micronudos en café es una alternativa para propagar material *in vitro* procedente de los biorreactores BEIT, permitiendo la selección de plantas que expresen las mejores características morfológicas y fisiológicas bajo condiciones de asepsia, de manera que de cada planta seleccionada se pueda obtener tres micronudos libres de contaminación.

VI. CONCLUSIONES

El cultivar Centroamericano a las tres semanas de la fase de inducción de callo los explantes de hoja color café presentaron el mejor comportamiento estadístico en el tratamiento 2 mg L⁻¹ de 2IP, 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de IBA con un porcentaje de 63.75%. En La categoría mayor al 50% de cicatrización en los bordes de las hojas y formación de callos friables presentaron resultados superiores en el medio con 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de Kinetina con porcentajes respectivos de 47.75% y 73.00%.

En el cultivar Conilón en la inducción de callo se observó que en el tratamiento 2 mg L⁻¹ de 2IP, 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de IBA los explantes de hoja presentaron similar comportamiento estadístico en los colores café (58.25%) y color amarillo (28.50%). En el tratamiento 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de Kinetina se obtuvieron los mejores resultados estadísticos en la categoría de mayor al 50% de cicatrización y en la variable callo friable con porcentajes respectivos de 47.60% y 75.80%.

En la fase de multiplicación de callo embriogénico el cultivar Centroamericano en el tratamiento 2 mg L⁻¹ de 2IP, 2.21 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de IBA resultó mejor en reactividad embriogénica con el 85%, en los colores de callos crema (38%), amarillo (30%) y en peso fresco de callo con 232.30 mg. En el cultivar Conilón el tratamiento 1.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de Kinetina respondió mejor en reactividad embriogénica con el 88%, en el color amarillo de los callos con porcentaje del 48% y en peso de callo fresco con 288.70 mg.

En el cultivar Centroamericano con las adiciones de AIA de 0.30, 0.45 y 0.60 mg L⁻¹ en los BEIT se presentó respuesta estadística similar en número de embriones con medias de 173, 174 y 177 respectivamente y en número de hojas que le correspondieron medias de 1.99, 1.83 y 1.83. En las variables longitud de embriones y longitud de raíces no se presentaron diferencias significativas entre las medias de los cinco tratamientos.

En el cultivar Conilón cuando no se adicionó AIA o solo 0.15 mg L⁻¹ en el número de embriones se presentaron medias respectivas de 172 y 174 que resultaron con mayor significancia estadística en relación a los tratamientos con adiciones entre 0.30 y 0.60 mg L⁻¹ AIA. En número

de hojas con la adición de 0.60 mg L^{-1} resultó con una media de 1.28 significativamente inferior al tratamiento sin AIA que obtuvo una media de 1.89 hojas. En longitud de embriones y número de raíces no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias de los diferentes tratamientos.

En los micronudos extraídos de segmentos apicales, centrales y basales de los cultivares Centroamericano y Conilón, se presentó la mejor respuesta estadística en el tratamiento que contenía 1 mg L^{-1} de AIA y 1 mg L^{-1} de BAP en las variables longitud del brote, número de hojas, número de raíces y longitud de raíces.

VII. RECOMENDACIONES

En base a las expresiones morfológicas y fisiológicas observadas en la fase de inducción de callo, deben ser evaluadas de acuerdo a su particularidad por separado en cada una de las fases posteriores de la ESI de acuerdo a los siguientes factores: a) mes del año en que se colectan las hojas; b) color que presenten los explantes al final de la fase de inducción de callo; c) ubicación de los explantes en el limbo de la hoja; d) efecto de los constituyentes de los medios de cultivo.

Los buenos resultados obtenidos en el presente estudio de ESI con el empleo de los BEIT, demuestran que es posible utilizarlos en la producción a gran escala de plantas *in vitro* de café.

Realizar estudios con suspensiones celulares en base a la experimentación con variantes de medio de cultivo en estado líquido, con el objetivo de potenciar la capacidad embriogénica y el incremento exponencial de las células.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M and Udupa, S.M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (8), pp. 997-1002.
- Aguilar, M. y Cruz. R. (2013). Empresa de producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.) de alta calidad genética y fitosanitaria para mejorar el nivel de vida y la actividad económica y productiva de agricultores de los departamentos de Estelí, Matagalpa y Jinotega. Proyecto de Innovación "Empresa de producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.)". Pp. 4-9. Managua, Nicaragua.
- Ahmed, W., T. Feyissa and T. Disasa. (2013). Somatic embryogenesis in hybrid coffee. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 88 (4) 469–475.
- Albarran, J.; Bertrand, B.; Lartaud, M.; Etienne, H. (2004). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 81, n. 1, pp. 27-36.
- Almeida, J.A.S. (2020). Observations on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. In: Castanheira DT (ed) Coffee-production and research, IntechOpen, London, United Kingdom, pp. 1–20.
- Alvard, D., Cote, F., Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: 55-60.
- Ammirato, P.V. (1983). Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. D.A. Evans, W. R. Sharp. P. V. Ammirato, and Y. Yamada (ed.). Macmillan, New York, in press.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesomeamericana 20(1): 153-175
- Berthouly, M. (1997). Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, San José, Costa Rica. pp. 25-49.
- Berthouly, M. (1989). Micropropagación del café. In: Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, 1. Xalapa (México) 12-15 abril. 1989. Instituto Mexicano del Café, pp. 17-27.
- Berthouly, M and Michaux-Ferriere, N. (1996). High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44, 169–176.
- Bieberach, C. (1995). Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de *Musa* spp. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 86.

- Cambrony, H. R. 1989. Le caféier. En: Le Technicien d' Agriculture Tropicale. Recuperado de <http://www.nzdl.org/cgi-bin/library.cgi?e=d-00000-00-off-0unesco-00-0-0-10-0-0-0direct-10-4-0-11--11-en-50-20-about-00-0-1-00-0-0-11-1-0utfZz-8-00&cl=CL1.9&d=HASH3cbaebe987bc780364410a>=2>.
- Campos, N., Panis, B., Carpentier, S. (2017). Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science* 8: 1460.
- Castilla, V. Y. (2012). Conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: Una alternativa para su preservación. *Cultivos Tropicales*, vol. 33, no. 4, pp. 29-39.
- Castro, E., Maradiaga, E. (2015). Micropropagación tradicional y en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal del cultivar de plátano (*Musa* spp.) Tesis. CEMSA. Universidad Nacional Agraria. Managua-Nicaragua.
- Charrier, A., Berthaud, J. (1985). Botanical classification of coffee. In: *Coffee*. Ed. Springer, Boston, M.A, pp. 13-47.
- Córdova, A.M., Cobos, M., Imán, S.A y Castro, J.C. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria* 5: 25 – 34.
- De Feria, M; Jiménez, E y Chávez, M. 2002. Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. *Biología vegetal*. Vol. 2, No. 3: 143-147.
- De los Santos–Briones C y T, Hernández–Sotomayor. (2006). Coffe biotechnology. *Minireview Braz. J. Plant Physiol.* 18:217–227.
- Debergh, P. C and Zimmerman R. H. (1991). *Micropropagation. Technology and application*. Kluwer Academic publishers. Dordrecht, The Netherlands. 7: 1-93.
- Denchev, P.D., Kuklin, A.I and Scragg A.H. (1992). Somatic embryo production in bioreactors. *J. Biotechnol.* 48: 115-168.
- Dublin, P. (1981). Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabust. *Café Cacao* 25:237–242.
- Dublin, P. (1991). Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W. M y Mroginski L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 578-619.
- Echeverría, F., Barquero, M y Rodríguez, D. (2014). Estudio del desarrollo radical en almácigo de híbridos F₁ de café obtenidos por cultivo de tejidos. *Agronomía Costarricense* 38(1): 67-74.

- Encina, C. L., Quesada, R. P. (1997). Embriogénesis somática. "Encuentros en la Biología", vol. 39, no. 5. Recuperado: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros39/embriogenesis.html>.
- ESPANICA. (2018). Café de Nicaragua. Recuperado el día 17 de agosto del 2019. Recuperado: <https://espanica.org/cafe-de-nicaragua/>.
- Etienne, H and Berthouly M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Org Cult*: 69, 215-231.
- Etienne-Barry, D., Bertrand, B., Vásquez, N and Etienne, H. (1999). Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports*, 19: 111–117.
- Fernández, R., Cróquer, Z. de G. y Menéndez, Yuffá, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética del café. *Revista de investigación*, vol. 34, no. 71, pp. 57-84.
- Figuroa, E., Pérez, F y L. Godínez. (2015). La producción y el consumo del café. México: ECORFAN. 170 páginas.
- Fuentes, S, Calheiros, M., Manetti-Filho, J., Vieira, L. (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*: 60: 5-13.
- Gatica A. (2002). Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología Centro de investigación en Biología Celular y Molecular Universidad de Costa Rica. Cartago, Costa Rica, 92 p.
- Gatica, A.M., G. Arrieta, and A. Espinoza. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs Caturra and Catuaí. *J. Biotechnol.* 11: pp 1-11.
- Gatica-Arias, A., Arrieta, G and Espinoza A. (2007). Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí: effect of triconanol, light condition, and medium consistency. *Agronomía Costarricense*, 32(1).
- George, E. F and Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: Uses and methods. In: George, E. F. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd. Ed. Springer, Netherlands, p 29-64.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Part 1. The technology. Exegetics Ltd., 2nd edition. Great Britain. 574 p.
- Georgeta, F., Courtel, P., Garcia, E. M., Hidalgo, M., Alpizar, E., Breitler, J. C. (2017). Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: a boost for somatic embryogenesis. *Sci. Hortic.* 216:177–185.
- Gómez, R. (1998). Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN. (Ed) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Pp. 57-77. IBP, Santa Clara, Cuba.

- González, M.E., Hernández, M. M., Mazorra, J.M., Rodríguez, Y., Cabrera, M. (2005). Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfológica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. *Biotechnología Vegetal* 5 (2): 121 – 127.
- González, M. (2003). Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de café (*Coffea canephora* P.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1:16–22
- Harms, C.T., Baktir, I and Oertli I.I. (1983). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2, 93-102.
- Hatanaka, T., Arakawa, O., Yasuda, T, Uchida, N and Yamaguchi, T. (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.* 10: 179–182
- Hernández, R. M., E. Diosdado., J. C. Cabrera and Coll, F. (2010). Efecto de los biorreguladores del crecimiento en la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni*. Hort ex Tan). *Cultivos Tropicales*. 31(3): 32-38.
- IICA/PROMECAFE. (1997). Memoria XVIII Simposio Latino americano de Caficultura. San José. Costa Rica. 542 pp.
- Jiménez, E. (1998). Cultivo de ápices y meristemas. En: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp. 45-56.
- Jordan, M., Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Squeo, F, A., & Cardemil, L. (eds.). *Fisiología Vegetal* (pp. 1 – 28). La Serena: Ediciones Universidad La Serena.
- Juma, C. 1994. Tissue culture for coffee: The case of Uganda. *Biotechnology and Development Monitor*, v. 20.
- Krikorian, A.D. (1991). Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos *in vitro*. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W.M., Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. pp. 313-338.
- La Gaceta Diario Oficial de Nicaragua. (2016). Resolución ministerial 187-2016, del Ministerio Agropecuario. número 230. 36 p.
- Lelu, M. A., Klimaszewska, K. K., Jones, C., Ward, C., Von Aderkas, P. and Charest, P. J. (1993). A laboratory guide to somatic em A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch. Petawawa National Forestry Institute. Canada. Publications Distribution Centre. 57 p.
- Lindsey, K., Jones, M.G.K. (1992). *Biotechnología Vegetal Agrícola*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 276 p.
- Litz, R y R, Jarret. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (eds.) Roca, W. y Mroginski, L. Cali, Colombia. P 143-172.

- Litz, R.E. & Gray, D.J. (1992). Organogenesis and somatic embryogenesis. In *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, eds Hammerschlag, F.A. & Litz, R.E. pp. 3–34. Wallingford, UK: CAB International.
- Liu, C., Z. Xu y N. Chua. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5, 621-630.
- Liu, C.P: Yang, L and Shen, H.L. (2015). Proteomic Analysis of Immature *Fraxinus mandshurica* Cotyledon Tissues during Somatic Embryogenesis: Effects of Explant Browning on Somatic Embryogenesis. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 13692-13713.
- López-Gómez, P., Iracheta-Don juan, L., Castellanos-Juaréz, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivez, A., Aguirre-Medina, J., Ojeda-Zacarías, Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Rev. fitotec. mex* vol.33 n°3 Chapingo.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A. and William, E.G. (1990). Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning, in S. S. Bhojwani (ed.), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 67–92.
- Mesén F y Jiménez L.D. (2016). Producción de clones de café por miniestacas. Turrialba, Costa Rica.
- Ministerio Agropecuario y Forestal de Nicaragua (MAGFOR). (2012). IV Censo Nacional Agropecuario, 2011. Managua.
- Moreira, J.M; Molina; R.V: Guardiola, J. L, García, L. A. (2001). Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange *Sci. Hortic.* 87: 275–290.
- Murashige, T and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays witch tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*15:473-497.
- Navarro, J. (2018). Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) del cultivar CCO6-791. Universidad Nacional Agraria. Managua-Nicaragua. <http://repositorio.una.edu.ni/3821/1/tnf02n322.pdf>.
- Nguyen. H.T. (2014). Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® y su conversión en casa de cultivo. Tesis en opción al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Marta Abreu, Santa Clara, Cuba. Páginas 55.
- Pierson E.S., Van Lammeren A.A.M., Schel J.H.N., Staristsky G. (1983). *In vitro* development of embryoids from punched leaf disks of *Coffea canephora*. *Protoplasma* 115: 209–216.
- Plan Nacional de Producción, Consumo y Comercio 2019-2020. Managua, Nicaragua, p. 67.

- Pliego, F. y A. Barceló. (2001). Morfogénesis *in vitro*. En: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y Aplicaciones. (eds) J. L. Caballero., V. Valpuesta y J. Muñoz. Córdoba, España: pp: 233-242. Córdoba.
- Preil, W. (1991). Application of bioreactor in plant propagation, pp. 425-445. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic, Boston.
- Quiroz-Figueroa F., Méndez-Zeel M., Rojas-Herrera, R and Loyola-Vargas V. (2001). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Reports, 20 (12): 1141–1149.
- Quiroz-Figueroa, M., Méndez-Zeel, F., Sánchez-Teyer, R and Rojas-Herrera. (2002). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*. Journal of Plant Physiology. Volume 159. Pages 1267-1270.
- Ramírez, J. (2015). Propagación vegetativa de café Conilon para producción de almácigo clonal. Comunicaciones Técnicas de Café. Número 23. Recuperado de <https://www.ramirezcaficulturadesdecostarica.com/a-23>.
- Rao, I.U., Rao I.V.R and Narang V. (1985). Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. Plant Cell Rep. 4: 191–194.
- Reyes-Díaz, J., Arzate-Fernández, A y Piña-Escutia J. (2018). Fuentes de sacarosa y nitrógeno orgánico influyen en la embriogénesis somática de *Agave angustifolia*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9nov. 9 (7):1508-13.
- Rezende, J. C. 2008. Embriogênese somática indireta em clones elite de *Coffea arabica* L. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras. 91 p.
- Rezende, J.C.D., Carvalho, C.H.S.D., Santos, A.C.R., Pasqual, M., Teixeira, J.B. (2012). Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. ActaScientiarum. Agronomy 34(1):93-98.
- Roca, W & Mroginski, L. (1991). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cultivo de tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia.
- Rueda, N. (2019). Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas. Magister Microbióloga Industrial. Universidad de Santander. Colombia. P. 76.
- Salaj, T., Blehová, A. & Salaj, J. (2007). Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. Acta Physiol Plant 29, 225–231. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0028-3>.

- Samson, P., Campa, C., Le Gal, L., Noirot, M., Thomas, G., Lokeswari, T and de Kochko, A. (2006). Effect of primary culture medium on high frequency somatic embryogenesis in different Coffee species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 37–45.
- Sánchez, Jhong., Cabrera, R y Jiménez, D. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*. Lima, Perú. vol.10 no.2. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>
- Sánchez y Rocha. (2015). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L), cultivar Servane en Biorreactores económicos de inmersión temporal. Managua, Nicaragua. NIC. Pág. 58.
- Sánchez, C. L and Alvarenga, V. S. (2015). Calogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*. Vol. 28, Nº 1, enero-marzo. Pág 105-120
- Santana, N., González, M.E., Valcárcel, M., Canto-flick, A., Hernández, M., Fuentes-Cerda, C.F.J., Barahona, F., Mijangos-Cortés, J and Loyola-vargas V.M. (2004). Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40:95-101.
- Santana, N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* spp.). Tesis de doctorado. INCA, La Habana, Cuba. 230 p.
- Santos, M.R.A., M.G.R. Ferreira., C.L.L.G, Oliveira., A.R. Ramalho and M.C, Espíndula. (2013). Vegetative vigor of Conilon coffee and its potential for *in vitro* callus induction. *Coffee Science*, 8(4): 432-438..
- Sharp, W., Sondahl, M., Caldas, L and Maraffa, S. (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hortic Rev* 2: 268-310., doi: 10.1002/9781118060759.ch6.
- Smith, M.K and Drew, R.A. (1990). Growth and yield characteristics of dwarf off types recovered from tissue-cultured bananas. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30: 575-578.
- Sondahl, M.R and Sharp, W.R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzphysiol. Bd.* 81: 395-408.
- Sugimoto, K., Gordon, S. P., Meyerowitz, E. M. (2011). Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology*, 21(4), 212–218.
- Takayama, S and Misawa, M. (1981). Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant and Cell Physiology*, 22, 461-467.
- Teisson, C and Alvard, D. (1994). A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: temporary immersion. In: VIII th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, pp. S2-2, Abstract.

- Teixeira, J.B., Junqueira, C.S., Pereira, A.J.P.C., Mello, R.I.S., Silva, A.P.D., Mundim D.A. (2004). Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília: pp. 39.
- Thorpe, T.A. (1993). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In Morphogenesis in Plants. Eds. K.A. Roubelakis-Angelakis and K.M. Tran Thanh Van. Plenum Press, New York, pp. 19–38.
- Torres, A. C., L. A Caldas., J. A, Buso. (1998). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Vol. 1. Embrapa. Brasil. 509 p.
- Tran Thanh Van, K. M and T, H, Trin. (1990). Organogenic Differentiation. In: S. Bhojwani (De). Plant Tissue Culture: applications and limitations. Elsevier Science Publishers. B. V. Amsterdam, pp. 44-53.
- Van Boxtel, J. and Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44:7-17.
- Velásquez, R. (2019). Guía de variedades de café. Asociación Nacional del Café, ANACAFÉ. Ciudad Guatemala. Guatemala. 48 p.
- Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Kalyan, S.S., Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *J. Gen. Engin. Biotech.* 14: 55-60.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69: 233-249.
- Yang, X., Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29 (1): 36-57.
- Yasuda, T., Fujii, Y., Yamaguchi, T. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Constituyentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962)

Soluciones Madres	Constituyentes	Cantidad en Medio MS (g/L)
1	NH ₄ NO ₃	24.75
	KNO ₃	28.5
	MgSO ₄ 7H ₂ O	5.55
	KH ₂ PO ₄	2.55
2	H ₃ BO ₃	0.62
	MnSO ₄ H ₂ O	21.76
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.86
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.025
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0025
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0025
3	KI	0.075
4	CaCl ₂ 2H ₂ O	13.2
5	Na ₂ EDTA	1.492
	FeSO ₄ 7H ₂ O	1.114
6	Tiamina HCl	0.02
7	Myoinositol	0.100

Anexo 2. Biorreactores Recipientes de Inmersión Temporal (RITA®) y Biorreactor Económico de Inmersión Temporal BEIT.

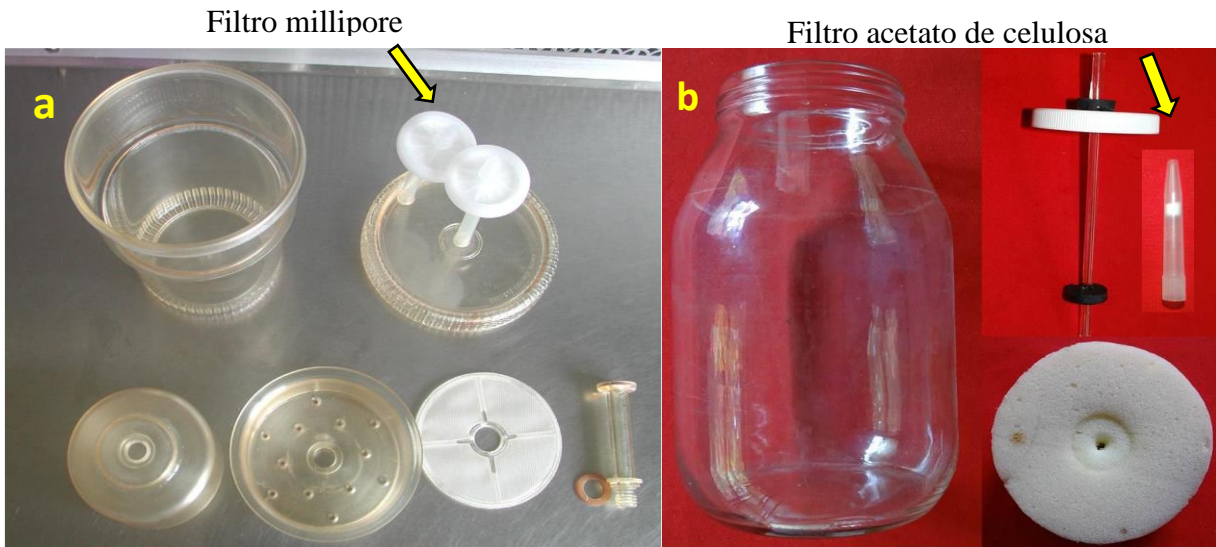


Figura. a) accesorios del Recipientes de Inmersión Temporal (RITA®). b) accesorios del Biorreactor Económico de Inmersión Temporal (BEIT).