

EMBRIOGENESIS SOMATICA EN EL CULTIVO DEL CAFE (COFFEA ARABICA). (PARTE I)

NANCY SANTANA¹, O. MARTINEZ² Y MARIA C. GONZALEZ¹

RESUMEN

Con el objetivo de obtener callos embriogénicos y posteriormente embriones somáticos de los mismos en el cultivo del café (*Coffea arabica*), se cultivaron "in vitro" fragmentos de hojas de ramas plagiotrópicas de plantas establecidas en campo. Los medios de cultivo contenían las sales minerales recomendadas por Murashige y Skoog (1962) y como reguladores del crecimiento se estudiaron el 2,4-D y el BAP, en 11 combinaciones para la inducción del callo embriogénico. Se observó que dosis entre 1-3 mg/l de 2,4-D y 1-10 mg/l de BAP favorecieron notablemente la formación de callos embriogénicos. Estos callos, en una combinación de ANA (0,1 mg/l) y Kinetina (0,5 mg/l), formaron embriones somáticos que, para completar el proceso de germinación, fueron transferidos a un medio de cultivo cuya combinación hormonal fue de Kinetina (0,1 mg/l) y ácido indolbutírico (0,5 mg/l).

INTRODUCCION

Con el empleo de los métodos del cultivo "in vitro" de tejidos vegetales, es posible lograr la propagación masiva y en un tiempo relativamente corto de una planta de ciclo largo. Estos métodos resultan ventajosos, ya que pueden aplicarse a variedades mejoradas, de las cuales se dispone de poco material y su distribución y multiplicación es limitada.

Los primeros cafetos producidos por cultivo de tejidos fueron obtenidos por Staritsky en 1970, mediante la embriogénesis somática a partir de fragmentos de ramas ortotrópicas clorofílicas de *C. canephora*.

Cinco años después, Herman y Hass y luego, en 1977, Sondahl y Sharp obtuvieron embriones somáticos con *C. arabica*, a partir de fragmentos de hojas.

Desde entonces, numerosos investigadores han reportado la embriogénesis somática en diversas variedades del café (Dublin, 1980; Dublin, 1981; Pierson et al., 1983; García y Menéndez, 1987). En nuestro país se han efectuado numerosas introducciones de variedades de café resistentes a la Roya (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.), de las cuales se cuenta con un reducido número de plantas, por lo que es difícil su distribución. Con el objetivo de multiplicar los materiales mencionados en este estudio, nos hemos propuesto obtener embriogénesis somática a partir de tejido foliar, como una importante vía de multiplicación asexual en este cultivo.

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana.

²Instituto de Ciencia Animal, La Habana.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Para el mismo se seleccionaron las líneas 9515, 9722, 9723, H-361-3 y HW-26-13 por su resistencia a la Roya y Caturra como testigo.

Como fuente de inoculos se tomaron los pares de hojas del 3ro. y 4to. nudos de las ramas plagiotropicas de plantas establecidas en el campo.

Para su selección se tuvo en cuenta su color, vigor y limpieza. Una vez en el laboratorio, estas se lavaron con una esponja y solución jabonosa por 2-3 veces y se enjuagaron con abundante agua corriente; posteriormente se sumergieron en una solución de lejía comercial al 20 % durante 20 minutos y se colocaron en el flujo laminar. Transcurrido este tiempo las hojas se enjuagaron con agua destilada y esteril de 3 a 4 veces. Esta agua utilizada para el enjuague y en la que finalmente se mantienen las hojas durante la siembra contiene cisteína (25 mg/l) para contrarrestar la oxidación fenólica.

Luego de la desinfección del material se procedió al seccionado; para ello y con el auxilio de pinzas y tijeras se eliminaron los bordes, la zona basal, apical y la nervadura central. La zona restante se dividió en segmentos de 1 cm² aproximadamente, que se colocaron en el medio de cultivo inmediatamente después del corte de cada hoja.

Para lograr cultivos asepticos, se realizaron incubaciones o presiembras de las secciones de hojas durante 72 horas en la oscuridad. El medio utilizado fue MS 1/2, con la adición de 30 g/l de sacarosa, 25 mg/l de cisteína y 8 g/l de agar técnico No.3. Se transfirieron al medio de inducción de callos aquellos inoculos de aspecto y sanidad adecuados para el establecimiento del cultivo.

El medio nutritivo utilizado contenía las sales recomendadas por Murashige y Skoog (1962) (MS), 20 g/l de sacarosa, 25 mg/l de cisteína, 10 mg/l de tiamina y 100 mg/l de inositol. Para estudiar la interacción 2,4-D-BAP sobre la formación de callos embriogénicos, se probaron 11 medios (Tabla I).

Tabla I. Efecto de la interacción del 2,4-D y BAP (Bencil-amino-purina) sobre la inducción de callo embriogénico.

Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento mg/l		Número de inoculos por tratamiento	Inoculos con callo (%)
	2,4-D	BAP		
MS-I	1	1	40	85
MS-II	1	3	40	87,5
MS-III	1	10	40	87,5
MS-IV	1	30	40	37,5
MS-V	3	1	40	100
MS-VI	3	3	40	100
MS-VII	3	10	40	100
MS-VIII	3	-	40	80
MS-IX	10	1	40	30
MS-X	30	3	40	25
MS-XI	-	3	40	-

Para la inducción de embriones somáticos, se utilizó el medio MS con 0,1 mg/l de Acido Naftalenacético (ANA) y 0,5 mg/l de Kinetina, mientras que para la germinación se combinaron 0,1 mg/l de Kinetina y 0,5 mg/l de ácido Indolbutírico.

En todos los casos el pH se ajustó a $5,7 \pm 0,1$ y la solidificación de los medios con gelrite (2 g/l).

La esterilización se realizó en la autoclave a 1,5 atm de presión durante 15 minutos.

Para el inicio, el desarrollo de callosidades y la inducción de embriones, las siembras se mantuvieron en la oscuridad a $28 - 30^{\circ}\text{C}$, mientras que para la germinación, las siembras se colocaron en un fotoperiodo de 16 horas luz.

Se utilizaron 40 explantes/tratamiento hormonal.

RESULTADOS

El inicio de formación de callos se observó a partir de la primera semana de establecido el cultivo aseptico, comenzando a notarse la proliferación de una masa de color blanco cremoso en la zona de corte del inoculo (Foto 1).

En general, la coloración del callo sufrió cambios a lo largo de su desarrollo, pues se tornó carmelitoso, color que fue más intenso en las variedades H-361-3 y HW 26-13.

El comportamiento de las variedades estudiadas fue similar en cuanto al inicio de formación de callos; sin embargo, a la tercera semana de la siembra, la HW 26-13 y la H-361-3 mostraron una callosidad escasa y de crecimiento lento (Fotos 2, 3, 4 y 5) y su coloración fue más oscura que las variedades restantes. Sobresalieron notablemente las variedades 9722 y Caturra con una formación de callo abundante por inoculo (Fotos 6 y 7).

La interacción 2,4-D BAP favoreció la formación de callos, sin embargo, no siempre fueron embriogénicos. Cuando se combinó 1 mg/l de 2,4-D con concentraciones desde 1 hasta 10 mg/l de BAP (medios MS-I, MS-II y MS-III) y 3 mg/l de 2,4-D con concentraciones desde 1 hasta 10 mg/l BAP (medios MS-IV, MS-V y MS-VI) (Tabla I), se originaron callos embriogénicos aunque no con la misma frecuencia en cada una de estas combinaciones y se observó que cuando se aumentó la cantidad de 2,4-D a 3 mg/l disminuyó ligeramente la formación de este tipo de callo, a pesar de que aumentó el número de explantes formando callos (100 %) y la producción de callos por explante.

Dosis por encima de 10 mg/l de 2,4-D resultaron totalmente negativas para el proceso (Tabla I), mientras que entre 3 y 10 mg/l disminuyó la formación de callos por explante.

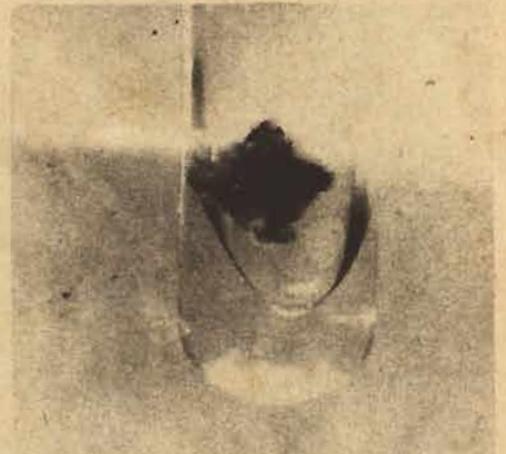
La adición al medio del 2,4-D de forma independiente (3 mg/l) provocó una alta formación de callos de tipo friable (80 %) y no se observó embriogénesis en ninguno de ellos, (Foto 8). El BAP, por otra parte, cuando se adicionó solo al medio no provocó ningún cambio en el tejido con el transcurso del tiempo.

La diferenciación de embrioides fue observada en callos de coloración carmelita oscuro, los que aparecieron como puntos de color blanco brillante (Foto 9) y en callos en que no se practicaron divisiones, es decir, sobre el callo de cicatrización. En su desarrollo los embrioides pasaron por las formas típicas de los embriones somáticos (globular, acorazonado y torpedo), cuya formación no ocurrió sincronizadamente y se observaron simultáneamente las diferentes formas en un mismo callo. Este proceso se inició entre las 15 y 17 semanas de la siembra (Foto 10).

La coloración de los embrioides fue blanca y anaranjada inicialmente, pero una vez pasadas a medio de germinación y colocadas a la luz, se tornaron verdes y llegaron a un verde intenso y brillante las hojas cuando las plantulas estuvieron formadas (Foto 11). Esporádicamente fueron observados embrioides con un desarrollo anormal que no llegaron a formar plantas.

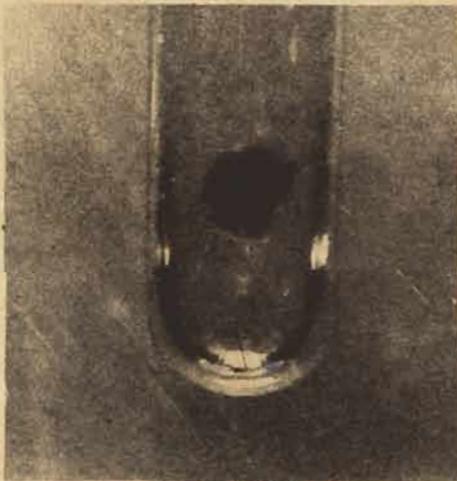


FOTO 1



Var. Hw-26-13

FOTO 2



Var. H-361-3

FOTO 3

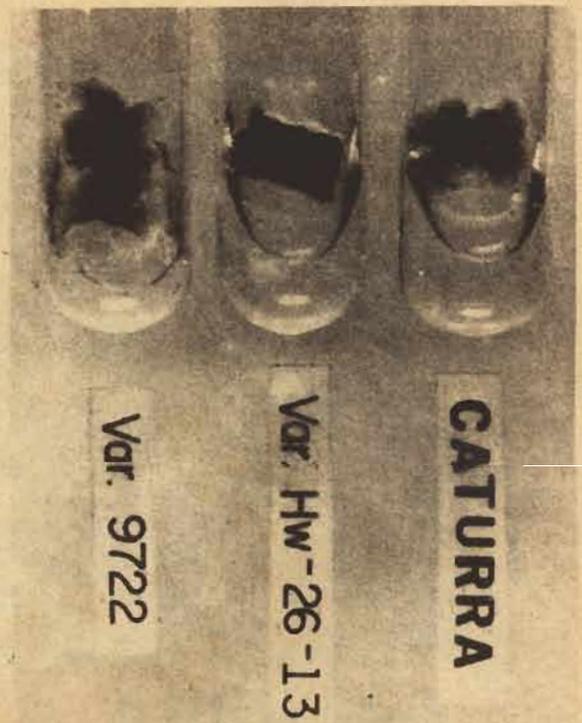


FOTO 4

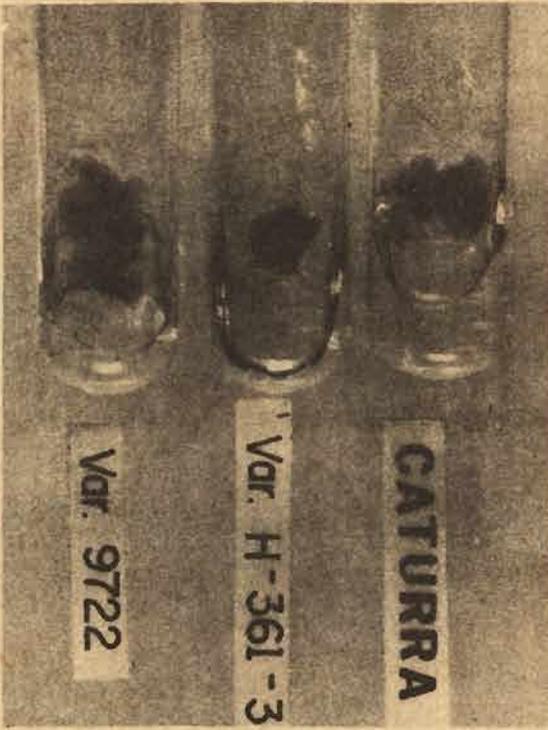


FOTO 5

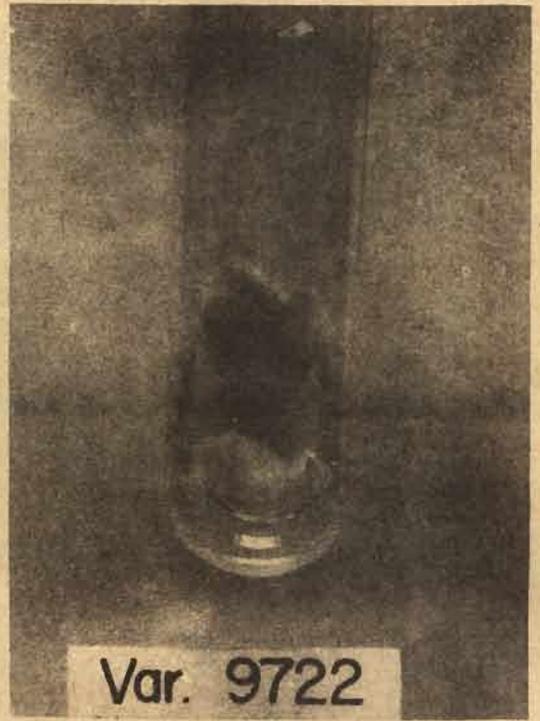


FOTO 6



FOTO 7



FOTO 8



FOTO 9



FOTO 10



FOTO 11

DISCUSION

Un análisis de los resultados nos indica que el sistema 2,4-D-BAP parece ser favorable a la inducción de callo embriogénico y que la presencia de una auxina y una citoquinina favorece el proceso de callogenesis. En un estudio similar, García y Menéndez (1987) y Martínez Gloria (1983), con Catimores y Caturra respectivamente, reportaron que la formación de callo embriogénico es mayor con 2,4-D-BAP que con 2,4-D-Kinetina.

Los embrioides se diferenciaron en callos de color carmelita, lo que coincide con lo reportado por Dublin (1981), Peña (1983), Sondahl (1977), no obstante, este no parece ser un requisito indispensable para la embriogénesis, ya que Pierson et al. (1983), al trabajar con tejidos de *Coffea canephora* y García Menéndez (1987) con Catimor, observaron este proceso en callos de color blanco aunque con baja frecuencia, al parecer por el efecto de otros reguladores del crecimiento y el cambio del agente solidificante por Gelrite.

No obstante los resultados obtenidos, se continuará trabajando para lograr una frecuencia alta de formación de embrioides y establecer un sistema óptimo de multiplicación acelerada en el café.

REFERENCIAS

DUBLIN, P. Induction de bourgeons neoformés et embryogenese somatique. Deux voies de multiplication vegetative "in vitro" des cafeiers cultives. *Café Cacao The.* 24, (2): 121-130, 1980.

X DUBLIN, P. Embryogenese somatique directes sur fragments de feuilles de cafeier Arabusta. *Café Cacao The.* 25 (4) :237-242, 1981.

X GARCIA, E. DE Y A. MENENDEZ. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del café catimor. *Café Cacao The.* 31 (1) :15-21, 1987.

HERMAN, E.B. AND G.J. HASS. Clonal Propagation of *Coffea arabica* L. from Callus Culture. *Hort. Science* 10 (6) :588-589, 1975.

MARTINEZ, GLORIA. Propagación asexual "in vitro" de *Coffea arabica* L. variedad Caturra amarillo a partir de secciones de hoja. Xalapa (Veracruz), 1983. (Tesis de Licenciado en Biología).

MURASHIGE, T. AND F. SKOOG. A Revised Medium for Rapid Growth on Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 :473-497, 1962.

X PIERSON, E.S.; A.A.M. VAN LAMMEREN; J.H.N. SCHEL AND G. STARITSKY. In vitro development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma* 115 (23) :208-216, 1983.

X PEÑA, M. DE. Somatic Embryo Induction and Plant Regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. Simposio sobre Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras (Portugal), 1983. p.493-512.

SODÄHL, M.R. AND W.R. SHARP. High Frequency Induction of somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81 (5) :395-408, 1977.

STARITSKY, G. Embryoid Formation in Callus Tissues of *Coffea*. *Acta Botanica Neerlandesa* 19 (4) :509-514, 1970.

ABSTRACT

SOMATIC EMBRYO FORMATION IN COFFEE (*Coffea arabica* L.) CROP. PART I

This research study was aimed at obtaining embryogenic calli, which further become somatic embryos of coffee (*Coffea arabica* L.). Thus, leaf pieces from plagiotropic branches of field plants were submitted to "in vitro" culture. Culture media consisted of mineral salts, as recommended by Murashige and Skoog (1962) and growth regulators (2,4-D and BAP) in eleven combinations for inducing embryogenic calli. Doses of 1-3 mg/l 2,4-D and 1-10 mg/l BAP enhanced embryogenic callus formation consistently. Such calli, in a combined medium of ANA (0,1 mg/l) and Kinetine (0,5 mg/l), yielded somatic embryos, which were transferred to another medium having a hormone combination with Kinetine (0,1 mg/l) and indolbutiric acid (0,5 mg/l), to complete its germination process.

Manuscrito recibido el 2/XI/87.