

ASPECTOS DE LA GERMINACIÓN *in vitro* EN GERMOPLASMA DE CAFETO SOMETIDO A DIFERENTES PERIODOS DE CONSERVACION

María Esther González¹, J. Lacerra², M. Ferrer², Y. Castilla¹, R. Ramos³, M. Valcarcel¹,
L. Rondon¹, A. Suárez

- 1- Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera San José-Tapaste Km 3^{1/2}. Gaveta Postal 1. San José de Las Lajas. Mayabeque. Cuba.
- 2- Estación Agroforestal de Café, IIAF, Jibacoa. Villa Clara.
- 3- Estación Agroforestal Experimental de Tercer Frente. Santiago de Cuba.

Introducción

El estudio de factores relacionados con la preservación de los recursos fitogenéticos de *Coffea* sp. constituye una importante prioridad para trabajos de mejoramiento genético y establecimiento de nuevas plantaciones. Los mismos son esenciales para mantener la vida en la tierra, su conservación como acción encaminada a preservar la biodiversidad e incrementar la posibilidad de su manejo, ha tenido importancia desde su concepción.

El café es considerado como uno de los principales productos agrícolas proveniente de naciones en vías de desarrollo, su producción y comercialización es una actividad de amplia relevancia económica a nivel nacional e internacional (FAO, 2008). Desde el punto de vista productivo, Cuba requiere desarrollar programas cafetaleros satisfactorios; los mismos deben prever el comportamiento creciente de la producción nacional, considerando cultivares de alta eficiencia productiva y que presenten características especiales de resistencia a estreses bióticos y abióticos, apariencia física del grano, cualidades organolépticas de la bebida, adaptabilidad a condiciones adversas de clima y suelo, entre otras.

Por ello la necesidad de una mayor disponibilidad, conocimiento y preservación de la diversidad de este importante cultivo. Sin embargo, es conocido que en el Cafeto, las semillas de *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* P., principales especies desde el punto de vista productivo y de comercialización, muestran comportamiento recalcitrante o intermedio (Baskin y Baskin, 1998), y en consecuencia el manejo de estas semillas para el establecimiento de nuevas plantaciones, la conservación de germoplasma y trabajos de mejoramiento genético representa, en ocasiones, una dificultad. De aquí que el presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar el comportamiento de dos genotipos durante su preservación, así como desarrollar un método biotecnológico alternativo para la conservación de germoplasma de *C. arabica* L. a partir de embriones cigóticos.

Materiales y Métodos

Se realizaron diferentes bioensayos con la finalidad de evaluar la respuesta de los genotipos de *Coffea arabica* L. T-8660 y T-9036-21. El proceso de secado y conservación de las semillas de ambos genotipos se efectuó bajo las mismas condiciones, desde el punto de vista medioambiental y período de conservación. Antes de proceder a la conservación de las semillas se realizó un muestreo a cada colección, para lo cual se tomaron 80 semillas por genotipo; 40 semillas fueron sembradas en semillero y 40 embriones cigóticos fueron extraídos y cultivados *in vitro* bajo condiciones de asepsia. La fecha de siembra y extracción del embrión se definió como momento inicial (to).

La germinación, establecimiento y crecimiento de las plántulas por vía tradicional se realizó en condiciones de vivero, con reducción de la radiación solar alrededor del 30 %. Las semillas se sembraron en bolsas de polietileno negro a 1 ó 2 cm de profundidad. Se utilizó un suelo Ferralítico rojo compactado (Hernández *et al.* 1999). La temperatura osciló entre 24- 27 °C y la humedad relativa entre 80 - 90 %.

El método de cultivo *in vitro* fue seleccionado con la finalidad de controlar los factores externos que influyen en el desarrollo del embrión, incluyendo efectos del endospermo posterior al proceso de la conservación. La extracción de embriones cigóticos y el cultivo *in vitro* se realizó según De la Cruz (1990). Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 30 min. Posterior al proceso de desinfección e imbibición, los embriones fueron extraídos bajo un estereomicroscopio. Se empleó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a razón de 15 mL, suplementado con 100 mgL⁻¹ de mioinositol, 4 mgL⁻¹ de tiamina, 25 mgL⁻¹ de cisteína, 20 gL⁻¹ de sacarosa, 0.1 mgL⁻¹ de kinetina, 0.5 mgL⁻¹ de ácido naftalenacético. El pH fue ajustado a 5,7 y como agente gelificante fueron adicionados 2 gL⁻¹ de gelrite. Las siembras fueron incubadas a una iluminación de 54 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y temperatura de 27 \pm 1 °C.

La germinación (%) de la semilla se evaluó 90 días después de la siembra en semillero o en condiciones de cultivo *in vitro*. Durante el aislamiento de los embriones para ser cultivados *in vitro* se evaluó la viabilidad en 40 de ellos, o sea en el 50% de las muestras en diferentes momentos.

Se empleó un diseño completamente aleatorizado. Para estimar el porcentaje de germinación dos condiciones ambientales fueron evaluadas, el método de siembra tradicional en condiciones de semillero y cultivo *in vitro* de embriones cigóticos. Ambos procedimientos fueron aplicados después de diferentes periodos de conservación de las semillas: 2, 3, 6, 12 y 18 meses.

Los embriones germinados *in vitro* fueron transferidos a bolsas de polietileno negro para su crecimiento en vivero, bajo las mismas condiciones que las plantas germinadas en semillero. El crecimiento de las plantas fue evaluado 6 meses después de ser sembradas en el semillero o cultivadas *in vitro*. Se determinó la supervivencia de las plantas (%), altura de la planta (cm) y número de pares de hojas. La calidad de las plantas fue evaluada según su aspecto físico general de acuerdo a una escala de 3 grados:

- 1- planta de nulo o muy pobre crecimiento
- 2- planta de poco crecimiento
- 3- planta con buen crecimiento

La respuesta a la germinación fue dividida en 2 grupos diferentes para el análisis estadístico. El primer grupo consistió en la germinación en semillero y el segundo de la germinación *in vitro*. Los efectos del genotipo y del tiempo de conservación de la semilla en la viabilidad fueron evaluados individualmente para ambas condiciones, a través de un análisis de la varianza con Mínima Diferencia Significativa (5 %), para la posterior comparación de las medias.

Resultados

Al analizar el comportamiento de los genotipos T-8660 y T-9036-21, los embriones se observaron viables y el 100 % de ambas colecciones germinó y creció normalmente, tanto en semillero como *in vitro*. No hubo diferencias estadísticas entre los genotipos, con respecto a los porcentajes de germinación bajo las condiciones *in vitro*, hasta los 6 meses de conservación, donde comenzaron a detectarse las diferencias. Para el periodo entre 6 y 18 meses de conservación se alcanzaron valores entre el 75 y 97,5 % de germinación, similar a lo obtenido por Baumann y Gabriel (1984). Bajo las condiciones de semillero se detectaron diferencias estadísticas entre los genotipos después de 2 meses de conservación de las semillas (Figura 1).

Cuando las semillas de los genotipos T-8660 y T-9036-21 fueron conservadas por un período entre 6 y 18 meses se acentuaron las diferencias en los porcentajes de germinación, siendo mayores bajo las condiciones de semillero. Posterior a los 18 meses de

conservación el porcentaje de germinación decreció a 77.5% en ambos genotipos cultivados *in vitro* y de 32,5 a 42,5 % cuando fueron expuestos a condiciones de semillero (Figura 1).

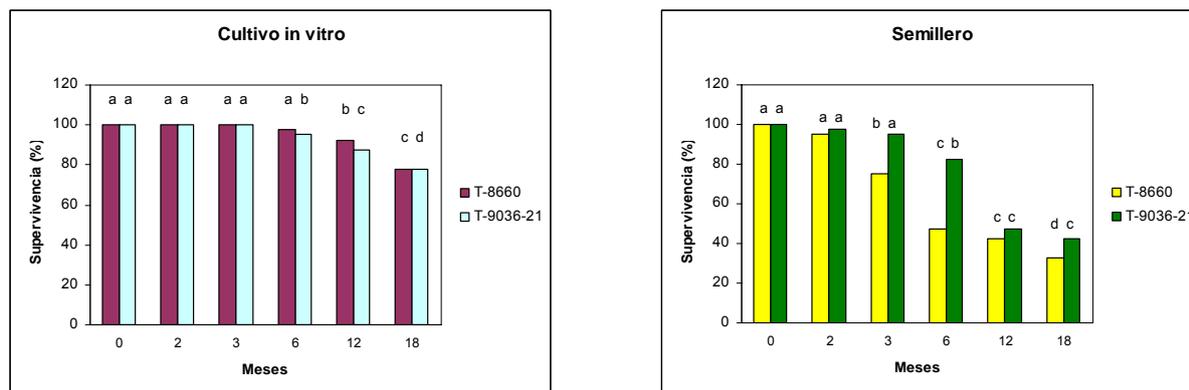


Figura 1. Germinación de los genotipos T-8660 y T-9036-21 por métodos tradicionales y por cultivo *in vitro* de embrión cigótico posterior a diferentes períodos de conservación

En los embriones aislados y cultivados *in vitro* el porcentaje de germinación reflejó que la viabilidad se fue perdiendo lentamente de acuerdo al tiempo de conservación de la semilla. Para T-8660 y T-9036-21 todos los embriones germinados *in vitro* produjeron plantas normales que enraizaron y desarrollaron adecuadamente. Las mismas mostraron alto porcentaje de supervivencia cuando fueron trasplantadas a vivero, superando al obtenido en las plantas procedentes de semillas germinadas en semillero.

En general, los resultados evidenciaron que las plantas procedentes de semillas germinadas *in vitro*, tanto para el genotipo T-8660 como para T-9036-21, fueron estadísticamente superiores para el indicador altura con respecto a las plantas procedentes de semillas germinadas en semillero (Figura 2 y 3).

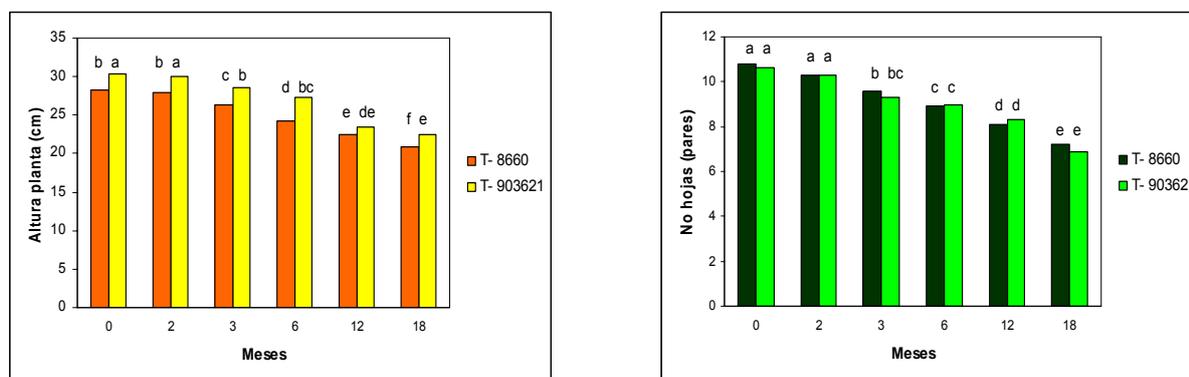


Figura 2. Indicadores del crecimiento de plántulas de los genotipos T-8660 y T-9036-21, obtenidas a partir embriones cigóticos (*in vitro*), después de diferentes períodos de conservación

Es de destacar que se observó un fuerte efecto negativo del tiempo de conservación de la semilla sobre los procesos de germinación y crecimiento de las plantas en los materiales en estudio, además, fue notable que para la casi totalidad de las variables evaluadas existieron diferencias entre los genotipos, aún cuando las condiciones ambientales fueron extremadamente controladas en los tratamientos *in vitro*. Sin embargo, las mismas mostraron alta homogeneidad al evaluar su comportamiento dentro de los genotipos (Figura 2 y 3).

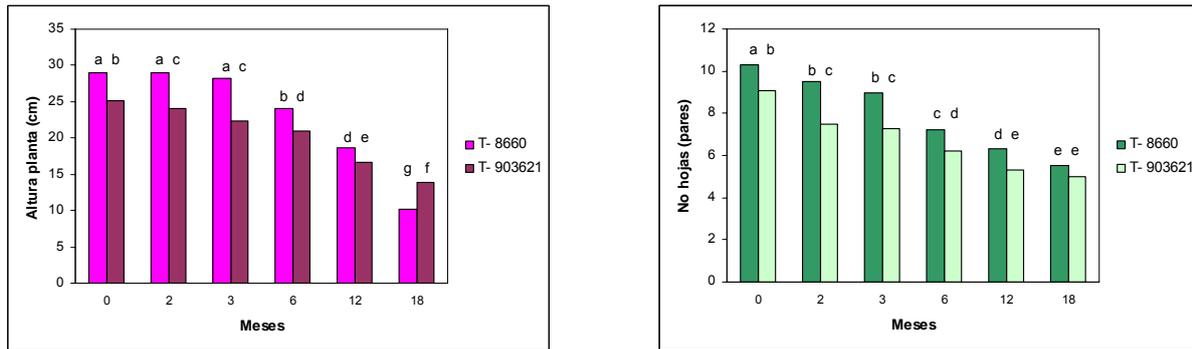


Figura 3. Indicadores del crecimiento de plántulas de los genotipos T-8660 y T-9036-21, obtenidas a partir semillas germinadas en semillero, después de diferentes períodos de conservación

Durante la germinación tradicional en vivero las semillas, generalmente, son expuestas a diferentes condiciones ambientales que pueden resultar adversas y afectar la viabilidad del embrión cigótico, así como otros procesos biológicos de importancia para el ulterior desarrollo de las plantas (Baskin y Baskin, 1998). Además, cuando las semillas son sometidas al proceso de conservación algunos factores internos pueden influir y provocar deterioro, afectando la germinación y como consecuencia interferir en la emergencia de la planta.

La disminución en la velocidad de germinación de las semillas conservadas es principalmente atribuida a la pérdida de la viabilidad del embrión, especialmente en semillas procedentes de especies con cierto grado de recalcitrancia tales como *Coffea arabica*. En este estudio, rara vez cuando los embriones cigóticos fueron aislados de semillas de los genotipos en estudio conservadas por 18 meses y cultivadas *in vitro* (donde los factores externos que podrían afectar la germinación fueron controlados o sea en un ambiente totalmente controlado), la germinación fue del 75 %. Es válido destacar que las semillas frescas germinadas en semillero y los embriones aislados y germinados *in vitro* lograron 100 % de germinación, con más del 92 % de supervivencia en vivero y desarrollaron exitosamente en plantas después de los 6 meses de cultivo.

Para las condiciones evaluadas, el más alto porcentaje de germinación se obtuvo durante el segundo y tercer mes de conservación de la semilla. Después de este periodo, la germinación declinó lentamente lo que se demostró a través de los embriones que fueron aislados y germinados *in vitro*, pues las semillas germinadas bajo condiciones de semillero fallaron en gran medida después de los tres meses de conservación de la semilla.

Los resultados permiten afirmar que la calidad de la semilla es, probablemente, afectada por cambios desfavorables en el endocarpo, testa y/o endospermo, lo cuales inhiben el proceso de germinación y promueven la muerte del embrión. Cuando el proceso de germinación tuvo lugar en presencia de tejidos deteriorados el porcentaje de germinación y el crecimiento de la planta fueron inhibidos, originando plantas muy pequeñas con pocas hojas, similar a las plantas cultivadas en condiciones de semillero procedentes de semillas conservadas por períodos ente 12 y 18 meses.

La diferencia entre los genotipos en estudio, para muchos de los caracteres evaluados, sugiere que la constitución genética del cultivar es un importante factor en la respuesta a las condiciones ambientales durante la fase de conservación de las semillas, y los procesos de germinación y desarrollo de las plántulas. En este caso, atendiendo a que el efecto negativo fue observado en plantas originadas de semillas completas y no en plantas procedentes de

los embriones aislados y cultivados *in vitro*, los resultados indican que la acción negativa de los tejidos dañados se manifiesta sobre el embrión cuando el metabolismo del mismo comienza a funcionar en pos del proceso de germinación.

A partir de estos resultados se infiere que para preservar, rescatar, propagar y utilizar germoplasma de *C. arabica* L. tanto en los programas de mejora genética como para el establecimiento de nuevas plantaciones, los métodos tradicionales de conservación de la semilla deben ser mejorados, en aras de evitar el deterioro del endospermo. Se demuestra como la biotecnología y las técnicas *in vitro*, como vías alternativas, pueden contribuir a una conservación más eficiente del germoplasma evaluado, para las condiciones de estudio, y para el Cafeto en general. Por ello la importancia de que diferentes trabajos de investigación en esta área de la ciencia y que contribuyan a la conservación y multiplicación de genotipos de interés continúen desarrollándose.