CULTIVOS TROPICALES. VOL. 11, No. 3/SEPTIEMBRE 1989
© INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS

# ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y LA EDAD EN EL COMPORTAMIENTO DE EMBRIONES DE CAFE (Coffea *sp.*) CULTIVADOS "IN VITRO"

NANCY SANTANA

## RESUMEN

*Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para la realización del mismo, se estudiaron seis edades de los embriones y seis medios de cultivo en las variedades de café Isla 5-4 y Caturra. Los resultados permitieron conocer el comportamiento de los distintos estadios de desarrollo en cada medio de cultivo, observándose una mayor uniformidad de la respuesta en los embriones de 22 a 26 semanas de desarrollo. El proceso de enraizamiento se comportó menos exigente a las condiciones del medio de cultivo, lográndose la inducción de dicho sistema en un amplio rango de combinaciones e independientemente de la edad del embrión con que se trabajará.*

## INTRODUCCION

El cultivo *in vitro* de células y tejidos del cafeto ha abierto posibilidades, tanto para el mejoramiento como para la propagación y conservación de materiales promisorios híbridos o cultivares heterocigóticos, con características de resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades como el minador y la roya (Londoño y Orozco, 1986).

El cultivo de embriones, entre sus diversas aplicaciones, permite la multiplicación de híbridos (estudios de aspectos de nutrición y metabolismo), estudiar la viabilidad de la semilla, obtener nuevas fuentes de variación genética, así como la conservación de embriones híbridos, cuyo desarrollo se dificulta por la formación de endospermos defectuosos o letales.

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana.

De ahí la importancia de profundizar en los estudios sobre el cultivo de embriones en el café; sin embargo, los pocos reportes hasta ahora logrados están relacionados con el cultivo de embriones desarrollados y el único reporte registrado del cultivo de embriones inmaduros de café fue realizado por Arcila en 1986.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento de embriones en distintos estadios, en dos variedades de café, con el fin de conocer el momento óptimo para su desarrollo *in vitro*.

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

El experimento se desarrolló durante el período 1986-1988. Como material de siembra fueron utilizados 20 frutos de café de 16, 18, 20, 22, 24 y 26 semanas después de la floración de las variedades Caturra e Isla 5-4, para el aislamiento y cultivo *in vitro* de los embriones.

Los frutos provenían de la segunda floración de las plantas.

Para la consecución de los objetivos, el trabajo se desarrolló en dos etapas:

primera: selección y seguimiento de las plantas para la obtención de los embriones en las diferentes edades a estudiar. Para ello se tomaron varias ramas al azar durante el período de floración; de cada rama seleccionada se eliminaron todos los frutos de floraciones anteriores y yemas florales que aparecieron posteriormente y se hizo un seguimiento de las flores seleccionadas para establecer las edades en semanas.

segunda: manipulación del material en condiciones de laboratorio, así como desinfección de las semillas y aislamiento de los embriones para su cultivo *in vitro*.

### Preparación de medios de cultivo

En la preparación de medios se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (1962), ligeramente modificado, el cual fue recomendado por Huang y Murashige (1977).

El medio basal fue preparado usando las mezclas de sales minerales. A este medio se le adicionó Tiamina (4 mg/l), sacarosa (30 g/l), Mio-inositol (100 mg/l); se probaron 6 medios de cultivo utilizando dos reguladores del crecimiento: el BAP (Bencil amino purina) en dos concentraciones (1,0 y 2,0 mg/l) y el IAA (ácido indolacético) en tres concentraciones (0,0; 0,2 y 0,4 mg/l) los cuales se combinaron como aparece en la Tabla I.

El Ph fue ajustado a 5,7 con KOH y solidificados los medios con 8 g/l de Agar Técnico número 3.

Una vez preparados los medios, fueron distribuidos 10 ml en cada tubo de ensayo y esterilizados en autoclave a una temperatura de 120 °C con una presión de 15 libras durante 20 minutos.

Tabla I. Reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo (mg/l).

| medio de cultivo | AIA | BAP |
|---|---|---|
| 1 | 0,0 | 1,0 |
| 2 | 0,2 | 1,0 |
| 3 | 0,4 | 1,0 |
| 4 | 0,0 | 2,0 |
| 5 | 0,2 | 2,0 |
| 6 | 0,4 | 2,0 |

El aislamiento de embriones comprendió dos fases: la primera consistió en la desinfección de frutos y la segunda en la extracción de los embriones.

Para la desinfección de las semillas se siguió la metodología propuesta por Colonna (1972) y la de Sondähl *et al.* (1981).

El aislamiento de los embriones fue realizado de la forma que se explica a continuación, antes de su siembra *in vitro*:

1. eliminación del endocarpio o pergamino
2. pretratamiento en agua destilada durante 72 - 96 horas antes de la extracción del embrión
3. desinfección con lejía durante 40 minutos y posteriormente enjuagado de 4 a 5 veces con agua destilada y estéril
4. extracción del embrión en una placa petri con un papel de filtro, ambos esterilizados previamente y con el auxilio de un estereoscopio, pinzas finas y bisturí.

Una vez extraídos los embriones, estos fueron colocados sobre el medio de cultivo. Las siembras fueron ubicadas en el cuarto de crecimiento en la oscuridad durante 10 días a una temperatura de 26 ± 2 °C y una humedad relativa de 60 - 70 %. Transcurrido este período de incubación en la oscuridad, las siembras fueron sometidas a un fotoperíodo de 12 horas luz y temperaturas de 27 ± 1 °C a una intensidad lumínica de 4 000 luces.

Para las evaluaciones se tuvieron en cuenta las siguientes mediciones a los 70 días del aislamiento del embrión.

- porcentaje de supervivencia
- altura de la plántula (mm)
- diámetro del caulículo (mm)
- ancho de las hojas cotiledonares (mm)
- porcentaje de plántulas con raíces.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Porcentaje de supervivencia

Como se observa en la Figura 1, tanto la edad como la variedad y el medio de cultivo jugaron un papel determinante en la supervivencia de los embriones, observándose diferencias en el comportamiento de ambas variedades, haciéndose más evidente el comportamiento desigual de las mismas en algunos medios de cultivo en dependencia de su desarrollo.

La variedad Isla 5-4 se destacó en los medios 4 y 6, cuya composición fue de 2,0 mg/l de BAP sin AIA y 0,4 mg/l de AIA con 2,0 mg/l de BAP respectivamente, para 20 semanas de los embriones, obteniéndose valores de supervivencia de 92,0 y 90,0 % en dichos medios, mientras que la variedad Caturra alcanzó para esta edad (20 semanas) su valor más alto (78,5 %) en el medio 2, observándose una marcada disminución en los valores de supervivencia, en contraste con la variedad Isla 5-4, la cual alcanzó su menor valor en el medio 5 (18,4 %).

En estadios posteriores a las 20 semanas, se observó un comportamiento más uniforme de ambas variedades en relación con los valores de supervivencia, sobresaliendo notablemente, como se aprecia en la Figura 1, la respuesta de la variedad Isla 5-4 en los medios 2, 4 y 5 a las 24 semanas de edad de los embriones y en el medio 1 a las 26 semanas de edad. La variedad Caturra mostró su mejor comportamiento en los medios 2, 4 y 5 para las 24 semanas de edad y el medio 3 para las 26 semanas. Sin embargo, es bueno destacar que los embriones más maduros (26 semanas) fueron los que mostraron un mejor desarrollo, aunque a las 24 semanas se observó una mayor uniformidad en sentido general.

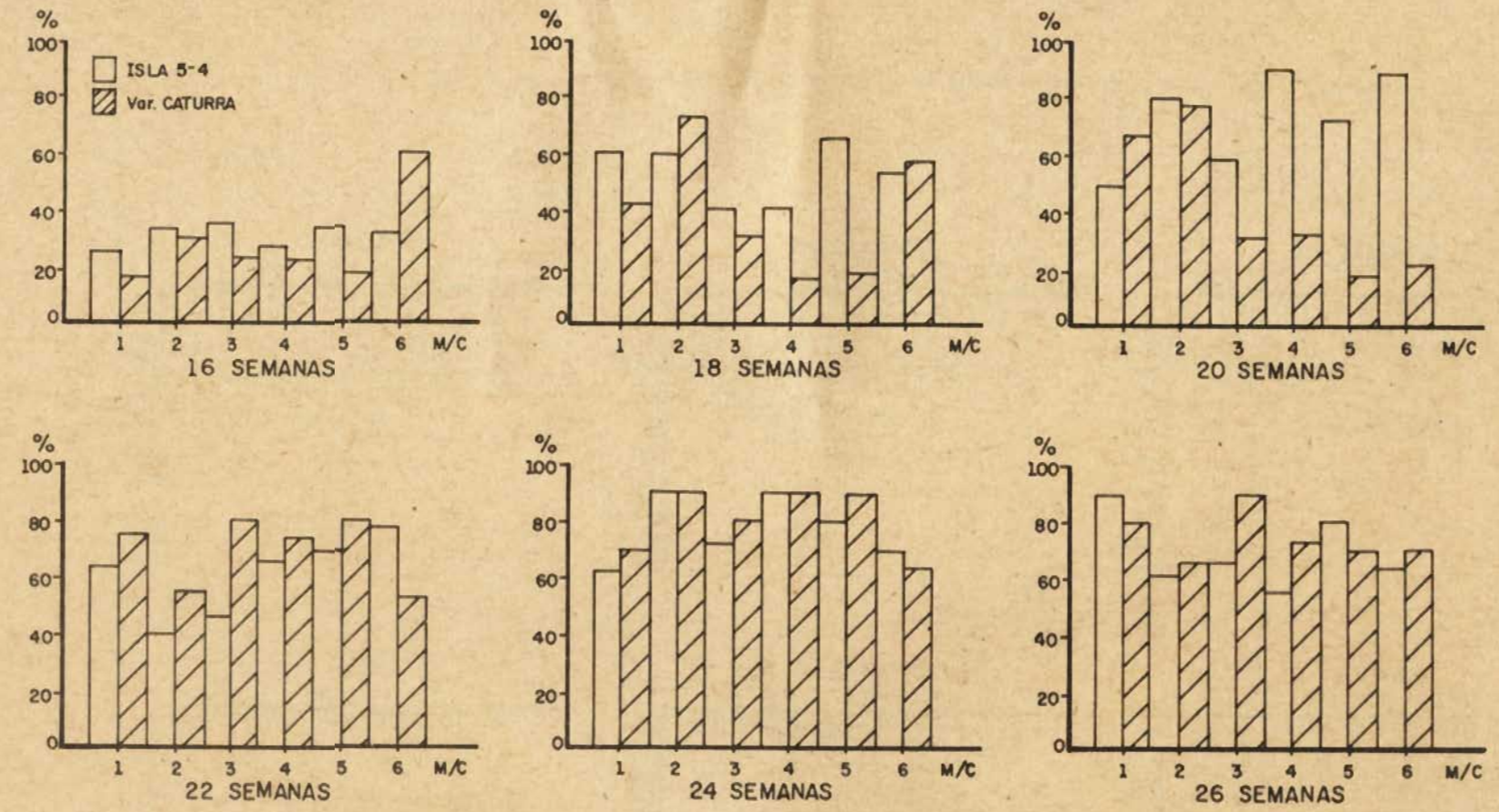


Figura 1. Por ciento de supervivencia de los embriones en las diferentes edades. 6 medios de cultivo.

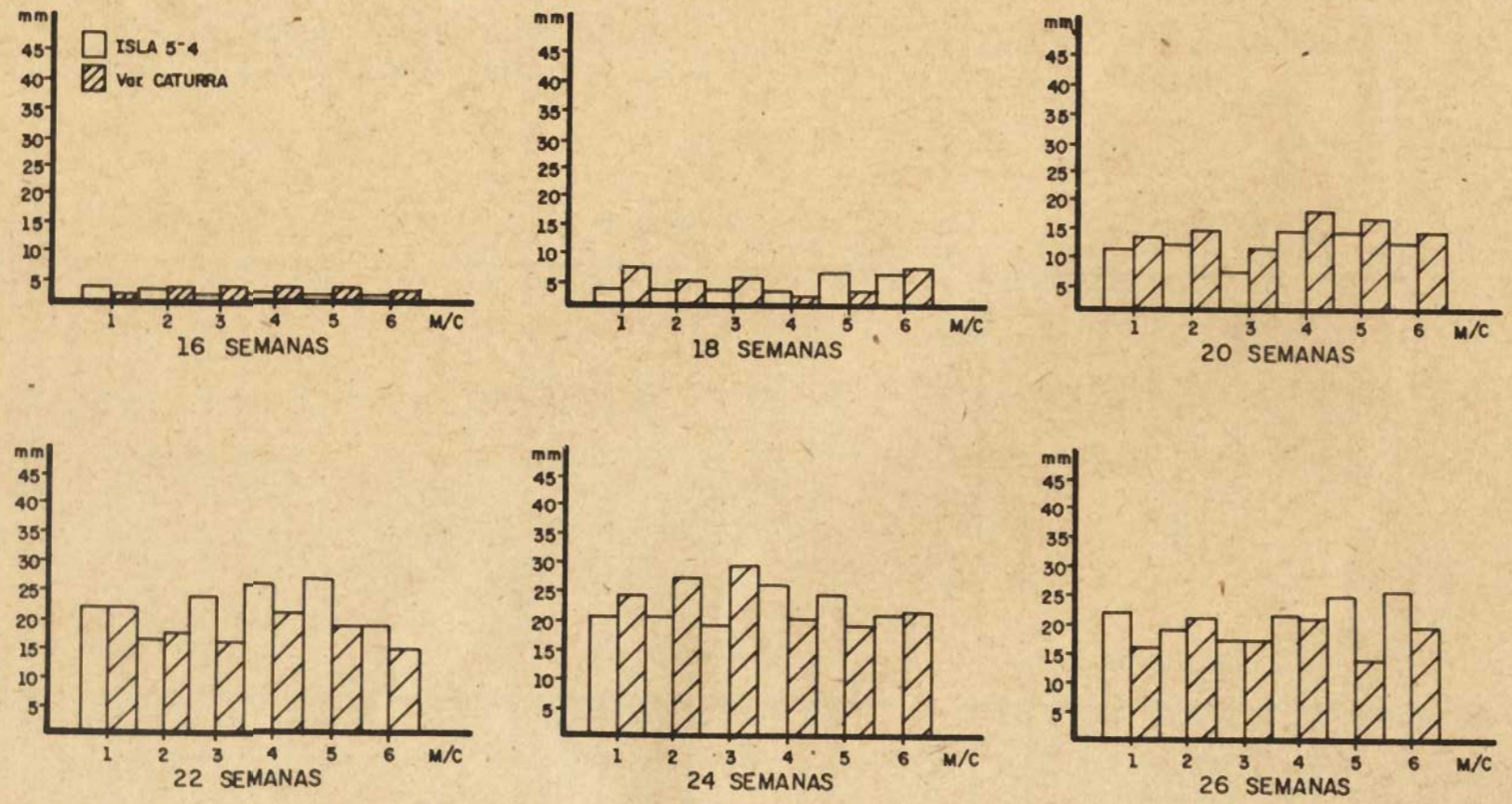


Figura 2. Altura de las plántulas (mm) en las diferentes edades. 6 medios de cultivo.

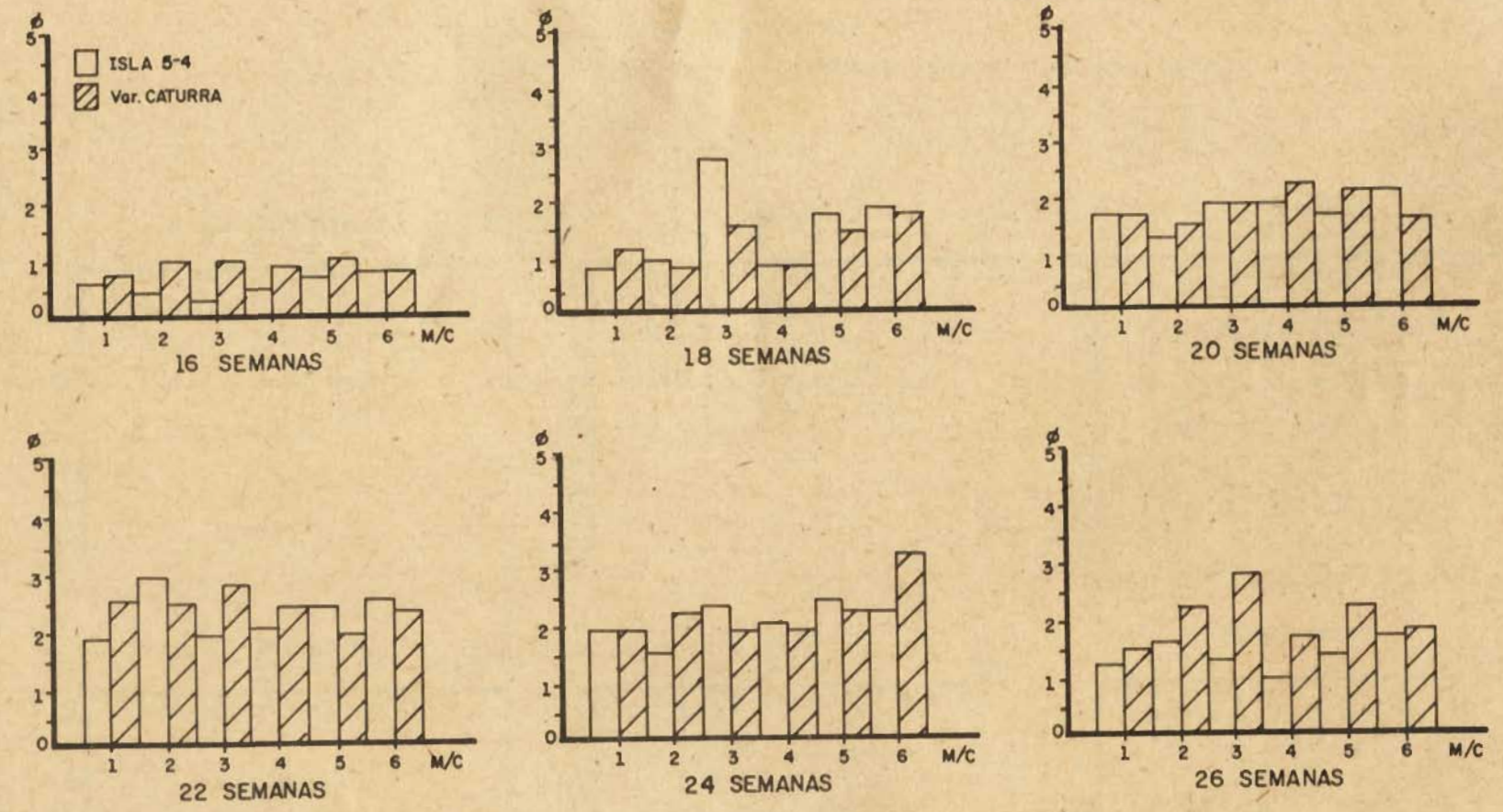


Figura 3. Diámetro de cauliculo en las diferentes edades. 6 medios de cultivo.

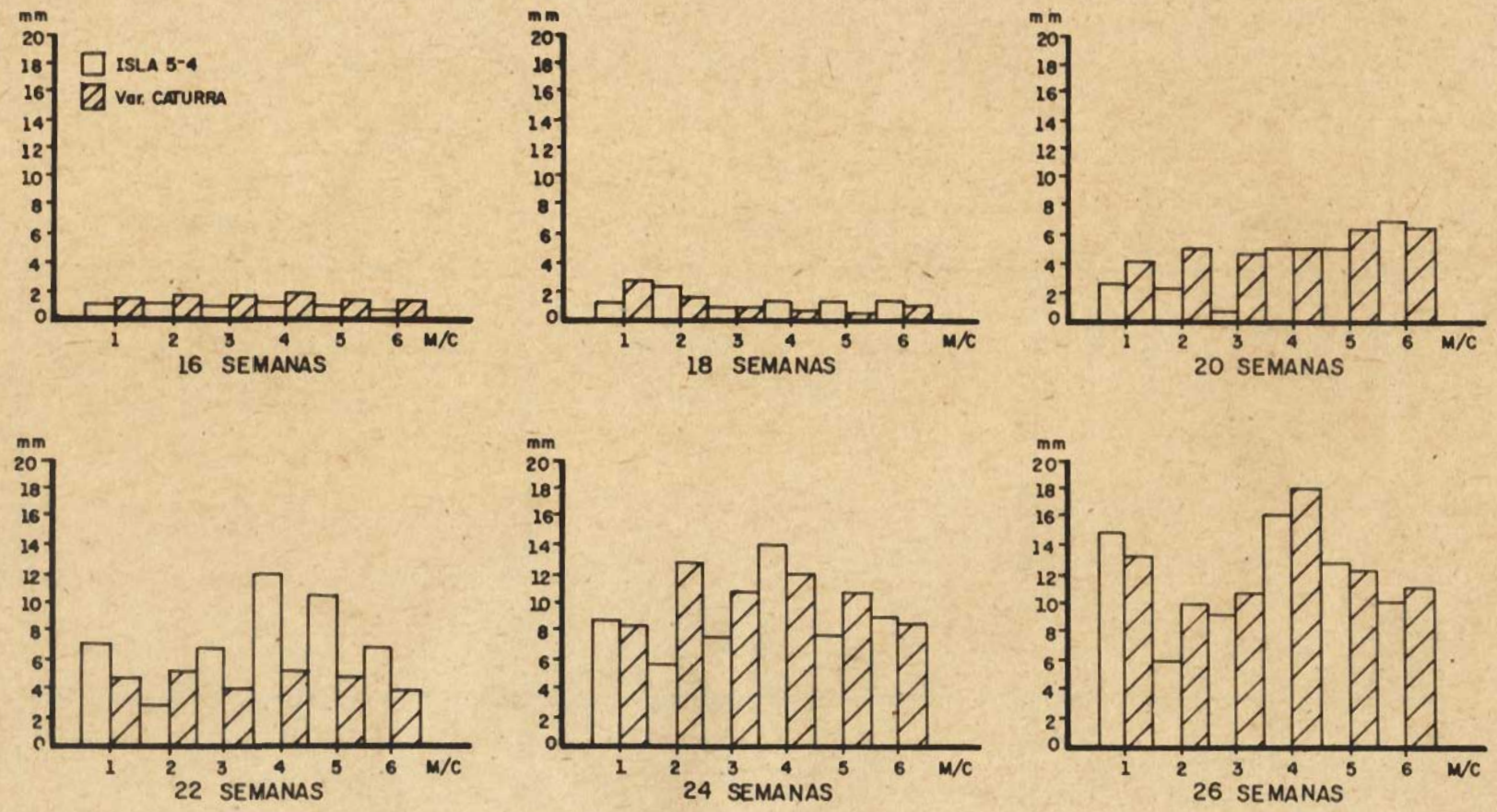


Figura 4. Ancho de las hojas cotiledóneas (mm) en las diferentes edades. 6 medios de cultivo.

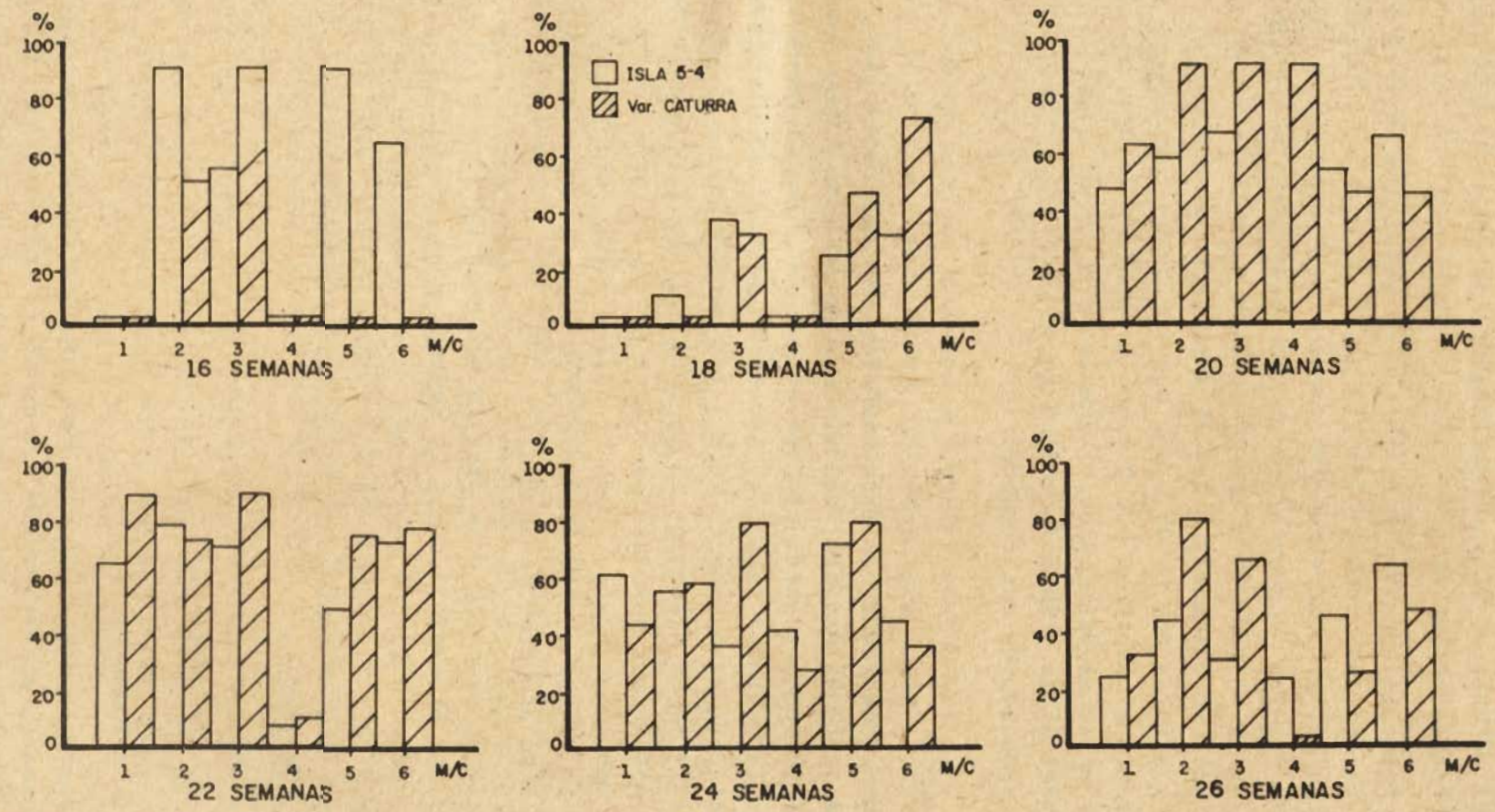


Figura 5. Por ciento de enraizamiento en las diferentes edades. 6 medios de cultivo.

### Altura de la plántula

Como se observa en la Figura 2, la utilización de embriones en estadios muy tempranos de su desarrollo influye negativamente en el crecimiento de las plántulas formadas por ellos.

Las plántulas formadas a partir de las 16 y 18 semanas mostraron valores muy bajos en la altura, sin rebasar los 8,0 mm, mientras que a partir de las 20 semanas de madurez, se observó un incremento notable de estos valores, resultando el medio 3 a las 24 semanas el más adecuado para la variedad Caturra con 29 mm de altura y el medio 5 a las 22 semanas para la variedad Isla 5-4 con 26 mm de altura; no obstante, a las 26 semanas en el medio 6 la altura promedio de las plántulas fue de 25,9 mm, seguido de un buen número de medios que influyeron favorablemente en los últimos 3 estadios de desarrollo (22, 24 y 26 semanas) en ambas variedades. Debemos señalar que a partir de las 22 semanas se observó una gran uniformidad en el crecimiento de las plántulas y un desarrollo armónico de sus órganos.

### Diámetro del caulículo

Como se observa en la Figura 3, este carácter se manifestó generalmente bastante uniforme en cada estadio, con algunas excepciones, como ocurrió en los embriones de 18 semanas cultivados en el medio 3, cuyo diámetro promedio fue de 2,7 mm en la variedad Isla 5-4, mientras que la Caturra osciló dentro del rango general para este estadio (0,8 - 1,5 mm de diámetro). Si relacionamos este valor (2,7 mm de diámetro) en la Isla 5-4 con la supervivencia y la altura de estas plántulas, nos daremos cuenta de que el balance hormonal no favoreció estos embriones, ya que solo el 39,3 % quedó establecido y el valor promedio de la altura fue de 4,9 mm con un crecimiento extremadamente lento, por lo que su aspecto fue anormal.

Los mayores valores se obtuvieron para la variedad Caturra en el medio 3 a las 22 semanas, en el medio 6 a las 24 semanas y en el medio 3 a las 26 semanas, mientras que la Isla 5-4 mostró sus mayores valores en los medios 5 y 6 a las 22 semanas (2,4 - 2,5 mm), en los medios 3 y 5 a las 24 semanas (2,3 - 2,4 mm) y a las 26 semanas su comportamiento fue inferior a los estadios de 20, 22 y 24 semanas.

En general, se observó bastante uniformidad en las poblaciones a las 20, 22 y 24 semanas de los embriones.

### Ancho de las hojas cotiledonales

Como se muestra en la Figura 4, para los primeros estadios de los embriones (16, 18 y 20 semanas), el desarrollo de las hojas cotiledonales fue poco, manifestándose similitud en el comportamiento de ambas variedades; en los estadios

posteriores se observó un incremento en este carácter, manteniéndose cierta uniformidad en el comportamiento varietal, con excepción del estadio de las 22 semanas, en el cual se apreció una notable diferencia entre la Isla 5-4 y la Caturra en el medio 4 y 5 con 12,1 mm y 4,9 mm de ancho de las hojas respectivamente.

El mayor desarrollo de las hojas fue observado en el medio 4 a las 26 semanas para ambas variedades, con 16,0 mm la Isla 5-4 y la Caturra 18,3 mm, seguido del medio 1 con 15,0 mm para la Isla 5-4.

Enraizamiento de las plántulas

El enraizamiento fue el carácter que mostró mayor independencia de la edad de los embriones. Como se observa en la Figura 5, este estuvo más ligado a la variedad y a la composición del medio.

Se observaron valores elevados en los diferentes estadios y, de forma general, la variedad Caturra mostró mayor capacidad para enraizar que la Isla 5-4. Se observó que el medio 4 no favorece el proceso, al parecer por contener 2,0 mg/l de BAP sin adición de auxina, así como el medio 1 en los estadios de 16, 18 y 26 semanas con valores muy bajos de plántulas enraizadas. En el medio 2 a las 18 semanas también tuvo un efecto negativo.

La variedad Caturra tuvo buen comportamiento en un amplio rango de combinaciones y la Isla 5-4 alcanzó sus mayores valores en los medios 2 y 5 a la semana 16.

La excisión de embriones provenientes de semillas y su cultivo, en un medio nutritivo químicamente definido, permite investigar los factores que influyen en el crecimiento embrionario en condiciones controladas y, además, definir el momento más adecuado para un desarrollo normal de las plántulas, una vez colocado el embrión en estas condiciones.

La transición progresiva y ordenada del cigoto, a través de estados bien definidos de embriogénesis, puede estar relacionada con ciertos cambios en el medio ambiente químico, acompañado de un balance nutricional y hormonal (Cristina López-Peralta, 1985).

Aunque, en realidad, existe una gran variedad de medios nutritivos empleados en el cultivo de embriones (Raghavan y Torrey, 1964), parece ser que para embriones muy jóvenes los requerimientos nutricionales son más complejos que para embriones maduros. Estudios similares han sido realizados por Norstog (1979) en cereales, quien encontró que en una mezcla de sales inorgánicas, azúcar, vitaminas, aminoácidos y ácido málico, los embriones crecieron sin dificultades nutricionales, sin embargo, se ha comprobado que la aplicación exógena de re-

guladores del crecimiento, así como la interacción de auxinas y citoquininas promueven la germinación y aceleran el crecimiento de las mismas (Norstog, 1979, Veen, 1963; Ammirato, 1973 y 1977). Podría discutirse la presencia de una predisposición para el desarrollo completo, cuando los embriones prematuros son extirpados, aún cuando se colocan en un medio bien complementado que permita la expresión del desarrollo del embrión. La dependencia heterotrófica del embrión inmaduro, sobre todas las sustancias nutritivas que contiene el endospermo, sugiere que las necesidades nutricionales para su desarrollo en cultivo deben ser más exactas.

## REFERENCIAS


AMMIRATO, P. V. Some effects as abscisic acid on the development of embryos from caraway cells in suspension culture. *Am. J. Bot.* (New York) 60:22-23, 1973.

——————— Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway : Interactions of abscisic acid, Zeatin and gibberellic acid. *Plant Physiol.* (Maryland) 59:579-586, 1977.

ARCILA, P. M. I. Morfología e histología del embrión de café en diferentes estados de desarrollo y su cultivo "in vitro" : Tesis de ingeniero agrónomo / P. M. I. Arcila.-- Manizales : Universidad de Caldas, 1986.-- 155 p.

COLONNA, J. P. Contribution a e'étude de la culture in vitro d'embryons de coféiers. *Café Cacao Thé* (París) 16(3) :193-203, 1972..

HUANG, L. C. Plant tissue culture media : Major constituents / L. C. Chuang .-- Riverside : University of California, 1977.

LONDOÑO, R. L. C. Y C. OROZCO. Methods of propagation through *in vitro* culture. *Cenicafé* (Caldas) 37(4):119-1333, 1986.

LOPEZ-PERALTA, CRISTINA. Cultivo de embriones y óvulos : Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales / Cristina López-Peralta.-- Ciudad México : FAO, 1985.

MURASHIGE, T. AND F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (Copenhagen) 15(3):473-497, 1962.

NORSTOG, K. Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology / K. Norstog *En:* Plant Tissue Culture. Principles and applications , 1979,-- p. 179-202.

RAGHAVAN, V. Y J. G. TORREY. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of inmature embryos of Capsella in culture. *Plant Physiol.* (Maryland) 39(4):691-699, 1964.

SONDAHL, M. R. *In vitro* methods applied to coffee. / M. R. Sondähl, L. C. Monaco, W. R. Sharp. *En:* Thospe, T. A. Ed. Plant tissue culture. Methods and applications in Agriculture.-- New York : Academic Press, 1981.-- p. 325-347.

VEEN, H. The effect of various growth regulators on embryos of Capsella bursa-pastoris growing *in vitro*. *Acta Bot.* (Budapest) 12:129-171, 1963.

## ABSTRACT

*PERFORMANCE OF "IN VITRO" COFFEE (*Coffea sp.*) EMBRYOS AS AFFECTED BY ITS AGE AND CULTURE MEDIUM*

*This research study was conducted at the department of Plant Genetics and Breeding from the National Institute of Agricultural Sciences. Six embryo ages and culture media were studied on Caturra and Isla 5-4 cultivars. Results enabled to know the performance of different developing stages under each culture medium, the embryos from 22 to 26 weeks of development showed a more uniform response. The rooting process demanded less under these cultural conditions; thus, such system was induced under a wide range of combinations and independently of embryo age.*

Manuscrito recibido el 29/VI/89