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

MICROPROPAGACION DEL CAFETO (Coffea arabica, *Lin.*) MEDIANTE EL CULTIVO DE EMBRIONES "IN VITRO"

NANCY SANTANA, LOURDES IGLESIAS Y MARIA C. GONZALEZ

RESUMEN

En el laboratorio de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, se estudió la micropropagación del cafeto a través del cultivo de embriones in vitro. *Se investigaron diferentes vías de multiplicación, poniéndose de manifiesto algunas potencialidades del cultivo, que permiten reproducir materiales genéticos de interés con una mayor garantía de la estabilidad genética. Como resultado se estableció un esquema de micropagación a partir de embriones, en el cual existen numerosas vías que pueden ser utilizadas con este objetivo.*

INTRODUCCION

El primer cultivo de embriones fue realizado por Hanning en 1904, sin embargo, no fue hasta 1972 cuando se hizo el primer reporte del establecimiento de esta técnica en el cultivo del café (Colonna, 1972). A partir de entonces el cultivo de embriones ha sido empleado con objetivos disímiles por diferentes autores (Mónaco *et al.*, 1977, Silvia Montes, 1982; Sondähl y Martins, 1980 y Arcila, 1986).

Entre las múltiples aplicaciones que puede tener esta técnica, se pueden citar: su utilidad en los estudios sobre viabilidad de las semillas, la multiplicación de híbridos, la conservación de germoplasmas, la solución a problemas

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana.

de incompatibilidad entre especies, los estudios de aspectos de la nutrición, el metabolismo y la recuperación de embriones híbridos; no obstante, los reportes de resultados, en general, aún son escasos.

Este trabajo se realizó con el objetivo de establecer un sistema de multiplicación acelerada del café, mediante el empleo de embriones sexuales cultivados "*in vitro*".

MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se utilizaron semillas maduras de la variedad Isla 5-4, las cuales fueron sometidas, luego de eliminado el pergamino, a un pretratamiento en agua durante 48 - 72 horas para facilitar la extracción del embrión; transcurrido este tiempo fueron lavadas con abundante agua y sumergidas en una solución de lejía (cloro activo al 2,5 %) diluída al 20 % durante 20 minutos. Posteriormente, fueron enjuagadas de 4 a 5 veces con agua destilada y estéril, para eliminar el desinfestante y proceder a la disección de la semilla. Se utilizaron 24 embriones por tratamiento.

Como medio básico se utilizó el recomendado por Murashige y Skoog (1962), con la adición de 4 mg/l de tiamina - HCl, 100 mg/l de inositol, 25 mg/l de cisteína - HCl, 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de Agar Técnico No. 3.

El pH fue ajustado a 5,7 $\pm$ 0,1 con KOH (IN). Los reguladores del crecimiento utilizados se muestran en las Tablas I y II.

El corte de microesquejes se realizó cada 60 días, cuando las plántulas contaban con 5 - 7 pares de hojas. Todo el material vegetal de estas plántulas fue utilizado para inducir los diferentes procesos estudiados.

La formación de callo y la embriogénesis somática fueron inducidas en la oscuridad a 28 $\pm$ 2 ^{0}C y la formación de plántulas, así como el enraizamiento ocurrieron siempre a un fotoperíodo de 12 horas luz con igual temperatura.

Las evaluaciones fueron realizadas siempre por el mismo observador, tomándose en cuenta:

- por ciento de formación de callo
- por ciento de formación de plántulas
- por ciento de formación de raíces
- por ciento de callos formando embriones somáticos
- altura de las plántulas (mm)
- longitud de las raíces (mm)
- inicio del enraizamiento (días)
- por ciento de plantas enraizadas
- número de raíces por planta.

Tabla I. Efecto de diferentes combinaciones hormonales sobre embriones sexuales cultivadas "in vitro".

medio	reguladores del crecimiento mg/l						formación de callos (%)	% de callos formación embriones somáticos	formación de plantas (%)	formación de raíces (%)
	KIN	BAP	2,4-D	ANA	AIA	AIB				
MS_1	0,1	-	-	-	0,5	-	-	-	74,16	65,0
MS_2	0,1	-	-	0,5	-	-	-	90,00	90,83	87,3
MS_3	0,1	-	-	-	-	0,5	-	60,0	100,0	100,0
MS_4	1,0	-	2,0	-	-	-	60,0	50,0 *	-	-
MS_5	1,0	-	3,0	-	-	-	76,6	-	-	-
MS_6	-	1,0	2,0	-	-	-	90,0	-	-	-
MS_7	-	1,0	3,0	-	-	-	100,0	-	-	-
MS_T	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	18,3	-

* embriogénesis directa.

Tabla II. Efecto de diferentes combinaciones hormonales sobre el desarrollo de las plántulas.

medio basal	reguladores del crecimiento (mg/l) ANA	KIN	AIA	AIB	BAP	vit. (mg/l) (tiamina)	altura a los 45 días (mm)	inicio del enraizamiento (días)	longitud de la raíz a los 45 días (mm)	$\bar{x}$ de raíces por planta a los 45 días	% plantas enraizadas a los 45 días
MS_2	0,5	0,1	-	-	-	4,0	28,9	20	20,0	6,00	90
MS_9	0,6	1,0	-	-	-	4,0	24,7	17	12,8	1,00	75
MS_{10}	1,0	0,2	-	-	-	4,0	20,6	25	4,70	2,86	100
MS_{11}	1,0	2,0	-	-	-	4,0	20,9	20	11,3	3,50	100
MS_{12}	1,0	3,0	-	-	-	4,0	25,6	15	19,2	2,20	100
MS_3	-	0,1	-	0,5	-	4,0	21,1	25	6,40	5,00	100
MS_1	-	0,1	0,5	-	-	4,0	20,2	20	1,30	3,00	70
MS_{13}	-	-	0,5	-	0,2	4,0	19,5	20	0,12	1,00	25
MS_{14}	-	-	-	-	1,0	4,0	20,3	60	0,00	0,00	0,0
MS_{15}	-	-	-	-	2,5	4,0	21,7	60	0,00	0,00	00,0
MS_{16}	-	-	-	-	-	*	16,5	20	1,50	1,00	93,1
MS_{17}	-	-	-	-	-	4,0	17,4	10	0,50	1,00	100

* vit. Morell (10 ml/l)

RESULTADOS Y DISCUSION

Formación de callo

La inducción de este proceso ocurrió siempre que se combinó el 2,4-D con BAP o kinetina, sin embargo, la mayor capacidad embriogénica se observó en los callos formados en la combinación de 1,0 mg/l de BAP y 2,0 mg/l de 2,4-D, tanto en los que se formaron directamente del embrión como a partir de hojas, nudos, entrenudos y raíces de plántulas asépticas (Figuras 1, 2 y 3). Cuando la concentración del 2,4-D se elevó a 3 mg/l, la formación de callo registró su valor más alto (100 %), pero se vio afectada la diferenciación del mismo (Tabla I). La interacción 2,4-D kinetina tuvo un efecto débil sobre la callogénesis, observándose no sólo en el número de explante formando callo sino también en su crecimiento lento.

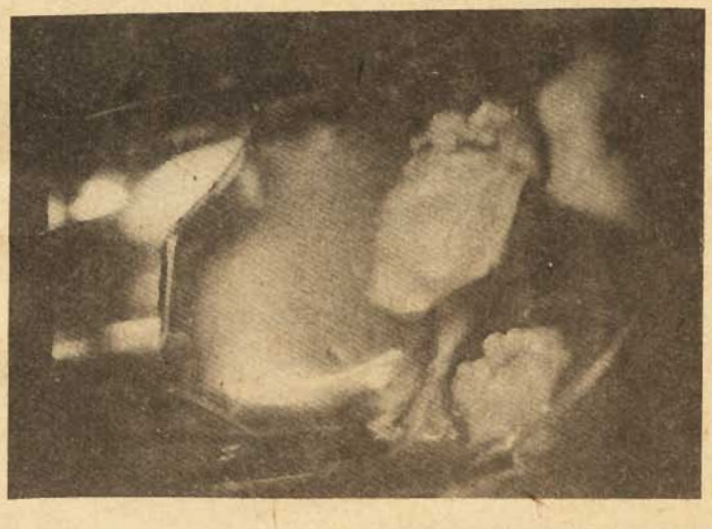

Figura 1

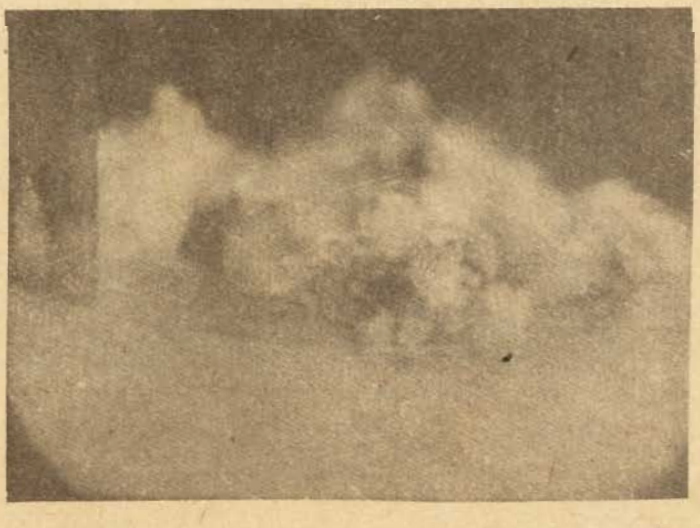

Figura 2

Figura 3

Formación de embriones

La formación de embriones somáticos alcanzó su mayor valor cuando se combinó 0,1 mg/l de kinetina y 0,5 mg/l de ANA, observándose una intensa actividad embriogénica en el callo, sin embargo, no hubo formación de embriones en toda la masa del mismo, aunque una vez iniciado el proceso, al parecer, no fue indispensable la conexión de dichas estructuras con el callo (Figuras 4, 5 y 6); mientras que los callos formados en el medio, cuya composición hormonal fue de 1,0 mg/l de kinetina y 2,0 mg/l de 2,4-D, formaron embriones directamente sobre el callo de cicatrización, sin realizar la transferencia al medio de diferenciación (Figuras 7, 8 y 9). Cuando los embriones fueron sometidos a la combinación de ANA (0,5 mg/l) y kinetina (0,1 mg/l) en condiciones de oscuridad, se produjo la formación de embriones somáticos aún sin previa formación del callo (Figuras 10, 11 y 12).

En todos los casos, la formación de embriones a partir de callos de hojas, nudos, entrenudos y raíces tuvieron una mayor frecuencia que cuando se formaron directamente del embrión, debido, quizás, al tamaño del explante.

Formación de plantas

Este proceso resulta menos exigente a las condiciones del medio, ya que fue posible inducirlo en un amplio rango de combinaciones hormonales, aunque, como se observa en la Tabla II, no todas las plantas crecieron de igual forma. Las plántulas formadas en el medio, cuya composición hormonal fue de 0,1 mg/l de kinetina y 0,5 mg/l de ANA, a los 45 días alcanzaban una altura promedio de 28,9 mm (Figura 13) con un 90,83 % de los embriones sembrados respondiendo al tratamiento. Hubo muy poca diferencia con los que fueron sometidos a 1,0 mg/l de ANA y 3,0 mg/l de kinetina y a 0,5 mg/l de ANA y 1,0 mg/l de kinetina, cuyas alturas promedio fueron de 25,6 y 24,7 mm respectivamente.

Cuando se combinó 0,1 mg/l de kinetina y 0,5 mg/l de AIB, aunque el 100 % de los embriones formó plantas, se observó mayor lentitud en su crecimiento (Figura 14). Sólo las plantas provenientes de los medios MS_2 y MS_9 permitieron realizar el fraccionamiento del tallo con éxito, pues las mismas se caracterizaban por sus entrenudos largos. Una vez seccionado el tallo, las yemas del nudo brotaron con mayor rapidez en el medio MS_3 (0,1 mg/l de kinetina y 0,5 mg/l de AIB) (Figura 15).

Figura 4

Figura 5

Figura 6

Figura 7

Figura 8

Figura 9

Figura 10

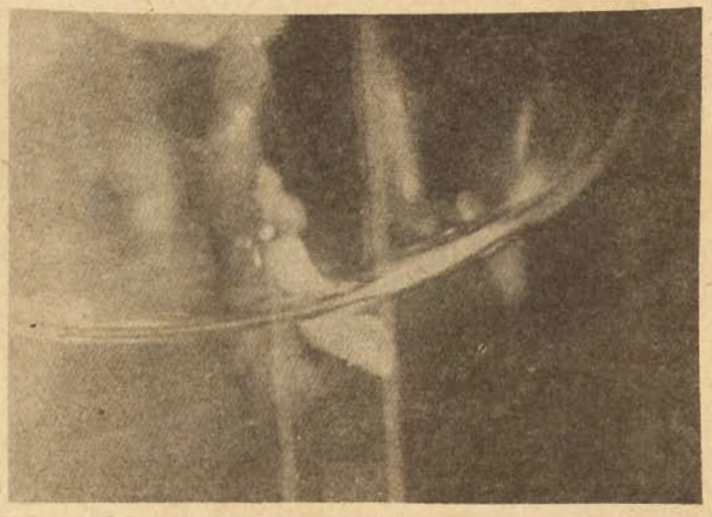

Figura 11

Figura 12

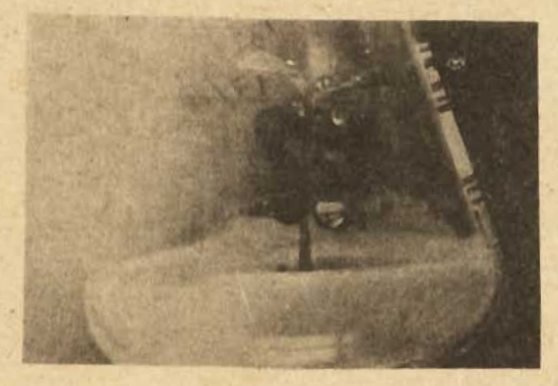

Figura 13

Figura 14

Figura 15

Figura 16

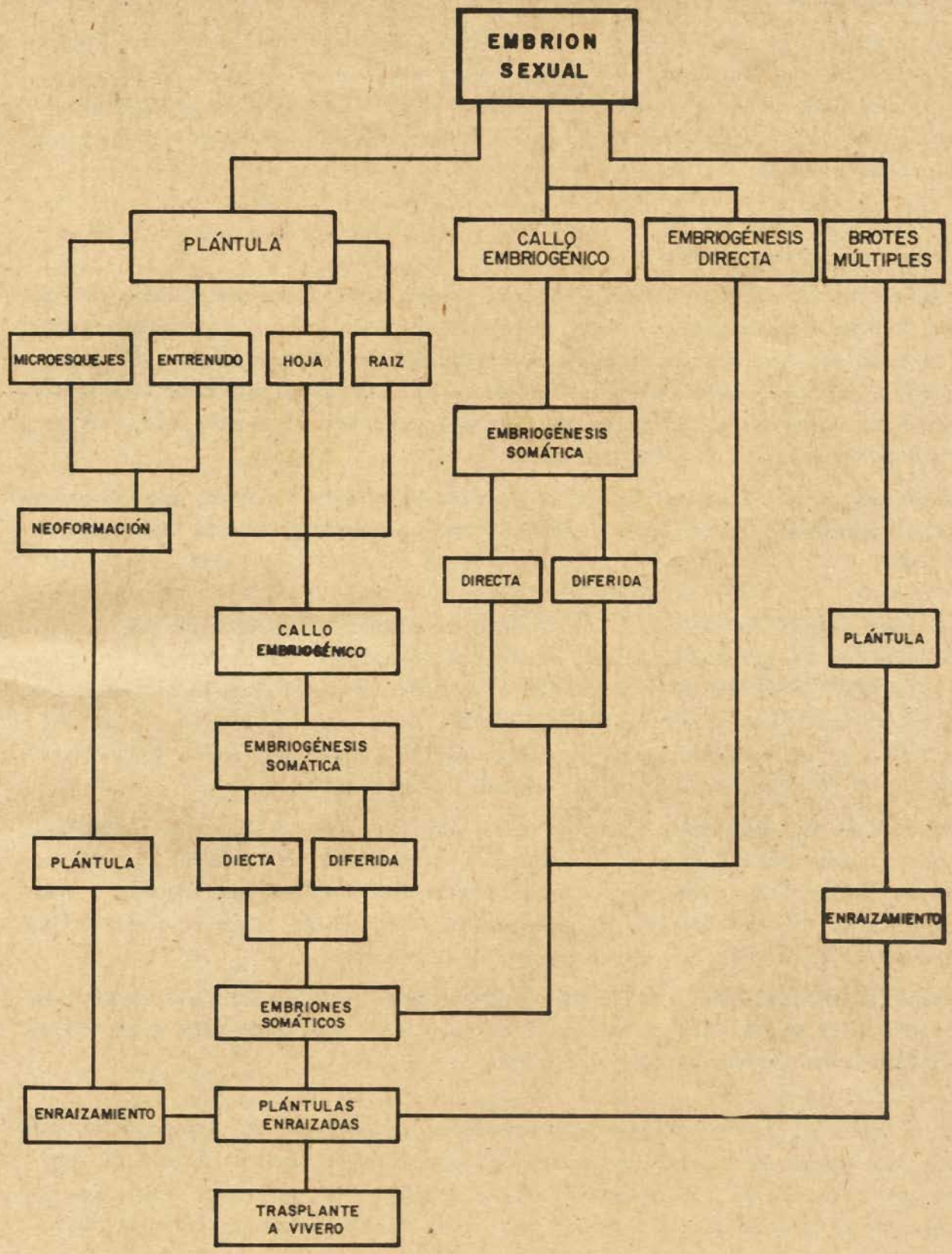

Figura 17. Esquema de propagación del café a partir de embriones *in vitro*.

Enraizamiento de las plantas

La formación de raíces ocurrió en diversos medios, pero un desarrollo adecuado se observó en los medios MS_1, MS_2, MS_9 y MS_{11}, destacándose el medio MS_2 por su influencia en el desarrollo radical (Tabla II). Estos medios permitieron inducir este proceso en las plantas obtenidas por nudo, las cuales carecen de sistema radical.

Formación de brotes múltiples

Cuando los embriones sexuales fueron sometidos al efecto de 1,0 mg/l de ANA y 2,0 mg/l de kinetina, se observó que una vez formada la pequeña plántula, de la base del tallo y en la zona más próxima a esta, comienzan a formarse pequeñas protuberancias que posteriormente se convierten en innumerables brotes. Estos brotes crecieron de forma similar a los brotes múltiples que ocurren en algunas especies (Figura 16).

Este proceso, no aparece en la literatura para este cultivo, por lo que resulta interesante continuar su estudio como una importante vía de propagación del café.

En los cafetos se han realizado numerosos estudios sobre cultivo de explantes muy diversos (meristemos, hojas, segmentos de tallo), con objetivos diferentes, pero la eficiencia de la técnica aún tiene sus limitaciones dados los problemas de contaminación, oxidación y la baja o nula regeneración de plantas, debido a las dificultades para el establecimiento de cultivos asépticos. (Dublin, 1980; Peña, 1983; Sondähl *et al.*, 1984; Mónaco *et al.*, 1977.

Al cultivo de embriones, dada su ubicación en la semilla, no son adjudicables dichas limitaciones y una vez establecido el cultivo, de acuerdo con el manejo del medio nutritivo, es posible inducir, no sólo la embriogénesis somática y la multiplicación por microesquejes, sino además, otros procesos que no han sido observados en otras partes de la planta.

Estas potencialidades permitirían superar a la propagación "*in vitro*" por microesquejes en la tasa de multiplicación y a la embriogénesis somática en la garantía de la estabilidad genética.

El cultivo de embriones permite establecer un esquema de propagación de gran utilidad, cuando se cuenta con un reducido número de semillas de material genético que requiera su rápida distribución (Figura 17), así como explotar la formación de brotes múltiples como una nueva vía de propagación en el cafeto.

REFERENCIAS

APPLICATIONS OF TISSUE CULTURE IN THE IMPROVEMENT OF COFFEE / L. C. Mónaco... /*et al.*/.-- *En:* Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.-- Berlin : Springer - Verlag, 1977.-- p. 109 - 129.

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 /M. I. Arcila P.-- Manizales : Universidad de Caldas, 1986.-- 155 p.

COFFEE / M. R. Sondähl... /*et al.*/.-- *En:* Handbook of plant cell culture.-- New York : Macmillan; London : Collier Macmillan, 1984.-- p. 564 - 590.

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

DUBLIN, P. Multiplication vegetative "*in vitro*" de l'arabusta. *Café Cacao Thé* (París) 24(4):281-290, 1980.

MONTES, SILVIA. Cultivo in vitro de entrenudos de *Coffea arabica* variedad "Caturra". *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Café y Cacao* (La Habana) 4(2):7-10, 1982.

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

PEÑA, M. DE. Somatic embryo indication and plant regeneration from Coffea. /M. de Peña.-- *En:* Simposio sobre ferrugens do cafeiro.-- Oeiras : IICT, 1983.-- p. 493 - 512.

SONDAHL, M. R. Cultura de embriao isolado de café / M. R. Sondähl, I. S. Martins.-- *En:* Congreso Brasileiro de Pesquisas Coffeiras, 8, Campos de Jordao, 1980.-- Río de Janeiro : IBC / GERCA, 1980.-- p. 25 - 28.

ABSTRACT

*MICROPROPAGATION OF COFFEE CROP (*Coffea arabica, *Lin.) THROUGH* "IN VITRO" *EMBRYO CULTURE*

Coffee micropropagation was studied through "in vitro" *embryo culture. Different multiplying approaches were investigated, showing some crop potentialities which enable to reproduce interesting genetical materials with a greater stability. As a result, a micropropagation scheme from embryos was settled, in which there are several ways for this purpose.*

Manuscrito recibido el 12/VII/89