

# EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE CALLOS EN ESPECIES DE CAFE, *Coffea canephora* (variedad Robusta) Y *Coffea arabica* (variedad 9722), EN TRES MEDIOS DE CULTIVO

M. Martínez, Silvia Montes, Nancy Santana y R. Rojas

**ABSTRACT.** This research work was conducted at the laboratory of Crop Genetics and Breeding from the National Institute of Agricultural Sciences. Leaf explants from two coffee species, *C. canephora* (var. Robusta) and *C. arabica* (var. 9722), were seeded in three different media, M1, M2, M3, for evaluating callus outgrowth through fresh matter weight per interval of time. The best results were recorded in M2 (0.5 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L kinetin) for Robusta variety whereas in M3 (3.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BAP) for 9722 variety. Data were processed by means of a bifactorial variance analysis and means compared through Duncan's multiple range test.

**Key words:** calluses, culture medium, somatic embryogenesis, growth, *Coffea*, *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, statistical analysis

**RESUMEN.** El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, donde explantes de hojas de dos especies de café, *C. canephora* (var. Robusta) y *C. arabica* (var. 9722) fueron sembrados en tres medios diferentes, M1, M2, M3, para evaluar el crecimiento de los callos mediante el peso de materia fresca por intervalo de tiempo, dando el mejor resultado para la variedad Robusta el M2 (0.5 mg/L 2,4-D y 0.2 mg/L kinetina) y para la variedad 9722 el M3 (3.0 mg/L 2,4-D y 1.0 mg/L BAP). Los datos obtenidos fueron procesados mediante un análisis de varianza bifactorial y las medias comparadas a través de un análisis de rangos múltiples de Duncan.

**Palabras clave:** callos, medio de cultivo, embriogénesis somática, crecimiento, *Coffea*, *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, análisis estadístico

## INTRODUCCION

El desarrollo alcanzado por las técnicas de cultivo de tejidos y la amplia utilización de las mismas en la investigación, hacen de estas un valioso instrumento, en ocasiones insustituible, cuando se trata de estudios estrictamente controlados, con vistas a producir callos que posteriormente serán utilizados en el establecimiento de suspensiones celulares (Díaz *et al.*, 1991).

Fue Bernard (1878), citado por María T. Cornide (1977), quien formuló los principios teóricos para la creación de un medio artificial, donde los órganos podrían sobrevivir fuera de la influencia del organismo entero. A partir de entonces se han realizado numerosos estudios encaminados al conocimiento de los medios nutrientes (Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, Miller y Ojima, 1968; Gamborg *et al.*, 1976; Fujimora y Komamine, 1975 y 1980; Nancy Santana, 1982 y 1988).

El desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de sustancias químicas, que activan o reprimen determinados procesos fisiológicos, interactuando entre sí. Estas sustancias químicas constituyen las fitohormonas, que en la actualidad se definen como

reguladores producidos por las plantas y que a bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de estas.

El ácido 2,4 diclorofenoxiacético es una auxina sintética, muy conveniente para los cultivos de suspensiones celulares (Barba y Nickell, 1969; Ammirato, 1985). Dentro de las citoquininas la kinetina estimula la formación de los brotes y yemas adventicias, y generalmente favoreciendo la concentración de auxinas sobre las citoquininas se logra la formación de callos, jugando la Bencil amino purina (BAP) un papel importante en la división celular, morfogénesis y callogénesis de cultivos *in vitro* (Ammirato, 1983).

El objetivo de este trabajo fue buscar un callo con una biomasa lo suficientemente grande y en el menor tiempo posible y poder determinar en cada momento evaluado el peso del callo, para establecer la dinámica de crecimiento de este, aspecto no abordado anteriormente en el cultivo y, además, comprobar el desarrollo del callo para ser inoculado en medio líquido, con el fin de establecer suspensiones celulares con potencial embriogénico alto.

M. Martínez y R. Rojas, investigadores, Dra. Nancy Santana, Investigador Agregado y Dra. Silvia Montes, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio fue realizado en el departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, en el período comprendido entre marzo y noviembre de 1992.

Para el mismo se seleccionaron dos especies de café, *C. canephora* (var. Robusta) y *C. arabica* (var. 9722), por tener la primera resistencia a los nemátodos y ser adaptable a bajas altitudes y por ser la segunda resistente a la roya.

Como fuente de inóculo se tomaron los pares de hojas del tercer y cuarto nudos de las ramas plagiotrópicas, de plantas establecidas en el campo (Nancy Santana, Martínez y María C. González, 1989). Para su selección se tuvieron en cuenta el color, el vigor y la limpieza de las hojas. En el laboratorio estas se lavaron con una esponja y solución jabonosa por dos o tres veces y se enjuagaron con abundante agua corriente. Posteriormente, se sumergieron en una solución de cloro comercial al 20 % durante 20 minutos y se colocaron en el flujo laminar. Transcurrido ese tiempo, las hojas se enjuagaron con agua destilada y esteril de tres a cuatro veces. Esta agua utilizada en el enjuague y en la que finalmente se mantienen las hojas durante la siembra, contiene cisteína (25 mg/L) para contrarrestar la oxidación fenólica (Nancy Santana, Martínez y María C. González, 1989).

Luego de la desinfección del material, se procedió a la selección; para ello y con el auxilio de pinzas y tijeras se eliminaron los bordes, la zona basal, la apical y la nervadura central, zonas donde pudiera haber mayor cantidad de contaminantes. La zona restante se dividió en fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, que se colocaron en el medio de cultivo inmediatamente después del corte de cada hoja. Para lograr cultivos asepticos, se realizaron incubaciones de las secciones de hojas durante 72 horas en la oscuridad.

Posteriormente a la incubación, los explantes fueron transferidos a los tres medios en estudio, M1, M2, M3, cuya composición se muestra en la tabla I, con el objetivo de medir el incremento en peso fresco de callo por intervalo de tiempo.

**Tabla I. Composición de los medios de cultivo utilizados en el experimento en (mg/L)**

Composición	Incubación	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>
Macroelementos	1/2 MS	MS	MS	MS
Microelementos	1/2 MS	MS	MS	MS
Na <sub>2</sub> EDTA	—	37.3	37.3	37.3
Mesoinositol	—	100	100	100
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	—	27.8	27.8	27.8
Acido nicotínico	—	1	1	—
Pindoxina HCl	—	1	1	—
Thiamina	—	1	1	10
Biotina	—	0.01	0.01	0.01
Pantotenato de Ca <sup>+</sup>	—	1	1	—
2,4-D	—	0.3	0.5	3
Kinetina	—	1.5	0.2	—
BAP	—	—	—	1
Cisteína	25	20	25	25
Sacarosa	30000	30000	30000	30000
Gelrite	—	4000	4000	4000
Agar No. 3	7000	—	—	—
Ph	5.6	5.6	5.6	5.6

Los medios fueron esterilizados en autoclave con 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

El experimento para determinar el incremento en peso fresco por intervalo de tiempo se realizó de la siguiente manera:

Se seleccionaron siete explantes de cada variedad por medio de cultivo. Se procedió a pesar cada uno de dichos explantes y posteriormente se colocaron en los medios de cultivo antes mencionados (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>). Se evaluó el incremento del peso fresco en intervalos de diez días hasta los 50 días de cultivo en una balanza Sartorius. Con los datos obtenidos se evaluó el incremento mediante un análisis de varianza bifactorial con diseño completamente aleatorizado. Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan (Duncan, 1951 y 1955).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La influencia de las variedades y los medios sobre el incremento en peso de los callos, nos muestra un  $F=23.69^{***}$  para los seis tratamientos estudiados.

Podemos observar que existen diferencias significativas entre los tratamientos, lo que es totalmente lógico, debido a que hay una interacción entre dos variedades diferentes con características genotípicas y fenotípicas distintas y tres medios con componentes específicamente diferentes, haciendo hincapié en la concentración de las hormonas, donde las relaciones auxinas-citoquininas son distintas.

Una  $F=8.81^{***}$  nos muestra que hay diferencias altamente significativas entre las variedades por lo anteriormente expuesto y, en el caso de los medios de cultivo, el balance entre auxinas y citoquininas determina si el crecimiento sucederá de forma desorganizada (callos) o se desarrollarán brotes o raíces en el cultivo. En nuestro caso hemos combinado el 2,4-D en diferentes concentraciones con la kinetina, en unos casos también en diferentes concentraciones y BAP.

En la figura 1 podemos observar la dinámica de crecimiento de callos de la variedad Robusta en los tres medios de cultivo y en el período comprendido entre 10 y 50 días de éste, observándose que el medio 2 (0.5 mg/L 2,4-D y 0.2 mg/L kinetina) fue en el que mejor se desarrollaron los callos, siendo esta combinación de mayor concentración de auxinas y menor de citoquininas la más adecuada para el crecimiento de callos de esta variedad. En esta figura podemos observar, además, cómo hasta los primeros 20 días de cultivo el crecimiento de los callos de Robusta en los tres medios era similar y escaso, lo que indica la presencia de una fase de latencia similar a la que presentan las curvas de crecimiento celular en medio líquido (Zamarripa, 1991).

A partir de los 20 días de cultivo y hasta los 50 el crecimiento del callo fue vertiginoso en el medio 2, mostrándose una marcada fase exponencial hasta los 40 días, a partir de los cuales la fase de crecimiento comenzó a ser lineal, todas coinciden con las fases de las curvas de crecimiento de células en medio líquido.

En cuanto a los medios 1 y 3 podemos decir que en el medio 1 (0.3 mg/L 2,4-D y 1.5 mg/L kinetina) el

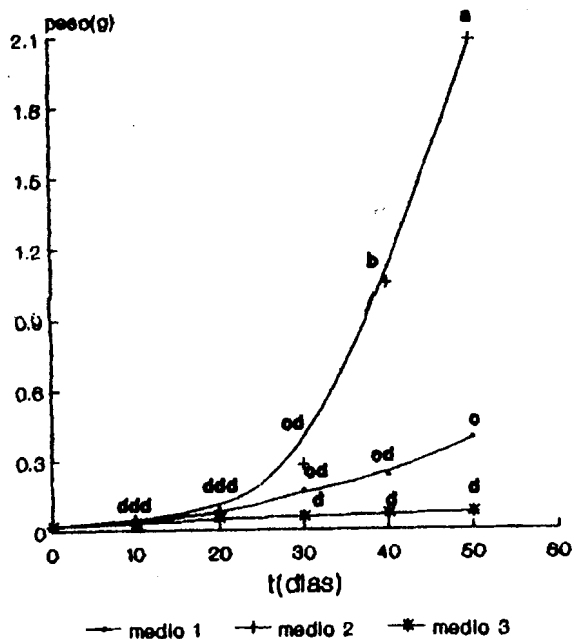


Figura 1. Dinámica de crecimiento de callos de la variedad Robusta en tres medios de cultivo

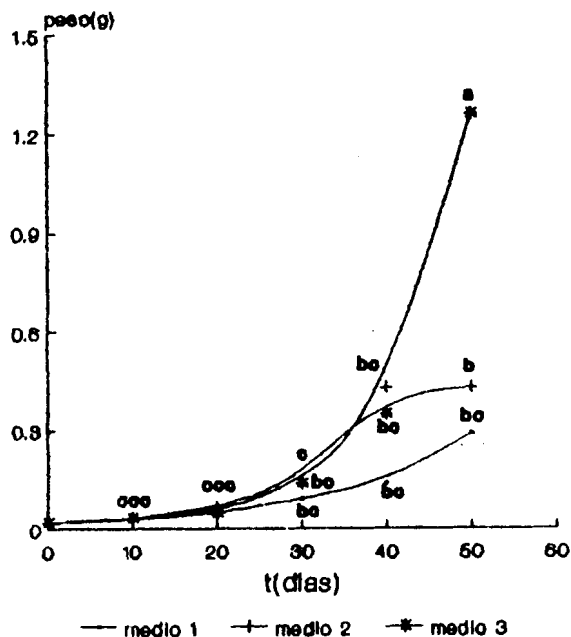


Figura 2. Dinámica de crecimiento de callos de la variedad 9722 en tres medios de cultivo

crecimiento del callo fue lento, observándose una fase exponencial con una menor pendiente, lo que provocó que a los 50 días su tamaño no fuera el adecuado. Esto indica que la menor concentración de auxinas y mayor de citoquininas no favorece el crecimiento del callo en esta variedad.

En cuanto al medio 3, no hubo respuesta con respecto al crecimiento de los callos, indicando que la combinación de una relación mayor de 2.4-D que BAP en altas concentraciones tampoco favorece el crecimiento en esta variedad.

Respecto a los momentos podemos decir que el medio 2 momento 5 es el más favorable a la hora de tomar el callo para inocular en medio líquido, difiriendo éste significativamente de los demás momentos estudiados.

En la figura 2 se muestra también la dinámica de crecimiento de los callos de la variedad 9722 en los tres medios de cultivo estudiados y en el período comprendido entre los 10 y 50 días de cultivo, observándose que el medio 3 (3 mg/L 2.4-D y 1 mg/L BAP) fue en el que mejor se desarrollaron los callos, mostrándose que la combinación de mayor concentración de auxinas y menor de citoquininas en altas dosis era la adecuada para el crecimiento de callos en esta variedad. Aquí como en la figura 1 se puede observar que hasta los primeros 20 días de cultivo, era escaso el crecimiento del callo en los tres medios, lo que indica la presencia de una fase de latencia, mostrándose la poca influencia que ejercen los componentes del medio sobre el crecimiento del callo en esta fase; a partir de estos 20 días hasta los 50 de cultivo, el crecimiento del callo fue rápido en el medio 3, indicándose una marcada fase exponencial hasta los 40 días, a partir de los cuales la fase se torna lineal hasta los 50 días, donde el callo tiene un tamaño y una textura adecuada para servir como inóculo en medio líquido y establecer suspensiones celulares lo suficientemente embriogénicas.

En cuanto a los medios 1 y 2 podemos decir que el medio 1 (0.3 mg/L 2.4-D y 1.5 mg/L kinetina) fue muy lento hasta los 50 días, con una fase exponencial cuya pendiente era pequeña, no teniendo la biomasa adecuada para inocularlo en medio líquido, lo que indica

que bajas concentraciones de auxinas y citoquininas no favorecen el crecimiento del callo de esta variedad.

Con respecto al medio 2 (0.5 mg/L 2.4-D y 0.2 mg/L kinetina), hubo un momento a los 30 días en que el crecimiento del callo era mayor que en el medio 3, pero a partir de este momento comienza a decaer la curva, hasta que a los 50 días la diferencia en el crecimiento del callo en el medio 3 fue significativamente mayor.

Respecto a los momentos, debemos decir que el medio 3 momento 5 fue el mejor a la hora de tomar el callo para inocular el medio líquido, siguiendo en significación el medio 2 momento 5.

Según Michaux-Ferriere, Dublin y Schwendiman (1987), la fase de inducción de callos para su posterior utilización en medio líquido es la fase clave, puesto que ella condiciona la formación de células embriogénicas capaces de evolucionar ulteriormente en embriones organizados; esta fase también tiene un doble impacto tanto cualitativo como cuantitativo.

Podemos concluir en este caso que para la variedad Robusta, el medio adecuado es aquel donde las concentraciones de auxinas-citoquininas sean 0.5 mg/L 2.4-D y 0.2 mg/L kinetina (M2). Similares resultados se obtuvieron por Nancy Santana, Martínez y María C. González (1989) y que a los 50 días el callo posee un tamaño adecuado para ser utilizado como inóculo en el establecimiento de suspensiones celulares, no favoreciendo bajas concentraciones de auxinas y altas de citoquininas y tampoco altas concentraciones de auxinas y bajas de citoquininas, pero en altas dosis.

Michaux-Ferriere, Dublin y Schwendiman (1987) plantean que la naturaleza de las citoquininas no es primordial, pero la concentración de 2.4-D parece ser limitante para la multiplicación de células embriogénicas, debido a que éstas son muy escasas para concentraciones inferiores a 0.3 mg/L cuando se asocian con el BAP y la kinetina.

De García y Menéndez (1987) llegaron a la conclusión de que en ausencia de 2.4-D, la producción de

callos es casi nula o muy baja, encontrándose un incremento en la producción de los mismos al aumentarse la concentración de 2,4-D para el caso de la especie *C. arabica*. Se ha informado que el contenido de auxinas declina con el envejecimiento de los tejidos (Spiegel-Roy y Kochba, 1980), indicando además un posible efecto morfogenético de la auxina.

En el caso de la variedad 9722, el medio adecuado es aquel donde las concentraciones de auxinas-citoquininas sean de 3 mg/L 2,4-D y 1 mg/L BAP (M3). Similares resultados fueron encontrados por Nancy Santana, Martínez y María C. González (1989), teniendo también el callo a los 50 días un crecimiento adecuado, no favoreciendo en este caso bajas concentraciones de auxinas y altas de citoquininas, como tampoco favorecen altas concentraciones de auxinas y bajas de citoquininas pero en bajas dosis.

## BIBLIOGRAFIA

Ammirato, P. V. The Regulation of Somatic Embryo Development in Plant Cell Cultures. Suspension Culture Techniques and Hormone Requirements. *Biotechnology* 1:68-74, 1983.

Ammirato, P. V. Embryogenesis in The Handbook of Plant Cell Culture. / P. V. Ammirato.- New York. MacMillan Publishing Company, 1985.- 123 p.

Barba, R. y L. G. Nickell. Nutrition and Differentiation in Tissue Culture of Sugar Cane, a Monocotyledon. *Planta* (Nueva York)89 299-302, 1969.

Comide, María T. El cultivo *in vitro*, sus principales aplicaciones en la genética y el mejoramiento de plantas. *CIDA. Boletín de Reseñas* (La Habana)4(16), 1977.

Díaz, E. / *et al.* Morfogénesis de suspensiones celulares de caña de azúcar. *Biología Aplicada* (La Habana)8(1) 53-63, 1991.

Duncan, D. B. A Significance Test For Differences Between Ranked Treatment in An Analysis of Variance. *Virginia J. Sci.* (Virginia)2:171-189, 1951.

Duncan, D. B. Multiple Range and Multiple F Test. *Biometrics* (Washington)11:1-42, 1955.

Fujimora, T. y A. Komamine. Effects of Various Growth Regulators on The embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. *Plant Science Lett.* (Limerick)5:359-364, 1975.

Fujimora, T. y A. Komamine. Mode of Action of 2,4-D and Zeatin on Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. *Pflanzenphysiol.* (Berlin)99:1-8, 1980.

Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima. Nutrient Requirement of Suspension Cultures of Soybean Root Cell. *Exp. Cell Res.* 50:151-158, 1968.

Gamborg, O. L. / *et al.* Plant Tissue Culture Media. *In Vitro* (Gaitherburg)12:473, 1976.

García, E. de y A. Menéndez. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del café "Catimor". *Café, Cacao y Thé* (Paris) 31(2):15-21, 1987.

Michaux-Ferrière, N., P. Dubin y J. Schwendiman. Etude histologique de l'embryogénesis somatique a partir d'explants de *Coffea arabica*. *Café, Cacao y Thé* (Paris) 31(2):112-114, 1987.

Murashige, T. y F. Skoog. A Revised Medium For Rapid Growth on Bioassay With Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum* (Copenhagen)15:473-497, 1962.

Santana, Nancy. Determinación de un medio de cultivo para la obtención de callo en variedades de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) *in vitro*. *Cultivos Tropicales* (La Habana)4(3):567-575, 1982.

Santana, Nancy. Efecto de algunos componentes del medio de cultivo sobre embriones de café (*Coffea arabica* Lin.) cultivados *in vitro*. *Cultivos Tropicales* (La Habana)11(4):53-62, 1988.

Santana, Nancy, O. Martínez y María C. González. Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea arabica*). Parte I. *Cultivos Tropicales* (La Habana)10(2):36-43, 1989.

Spiegel-Roy, P. Embryogenesis in *Citrus* Tissue Cultures. / P. Spiegel-Roy, J. Cochba.- En: *Advances in Biochemical Engineering* (Berlin) : Springer-Verlag, 1980.- p. 28-48.

Zamarripa, A. / *et al.* Production d'embryones somatiques de caféier in milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café, Cacao, Thé* (Paris)35(4):233-245, 1991.

Recibido: 17 de marzo de 1994

Aceptado: 18 de marzo de 1994

