ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN Coffeaçanephora VARIEDAD ROBUSTA. I CALLOGÉNESIS

María E. García, Jenny Bravo y Silvia Montes

ABSTRACT. A histological study of callus formation from leaf explants of *Coffea canephora* var. Robusta was conducted, with the aim of knowing all changes undergone within callus initiation and growth stages. Explants were cultured *in vitro* and processed to establish somatic embryogenesis. Samples were periodically taken since the very explant seeding and later processed for paraffin inclusion. 8-μm cuts were coloured with blue toloidine at 0.05 % in water and photographed by means of a Carl Zeiss photomicroscope. Results proved that callus emerges from perivascular cells, which started to get apart four to five days after seeding. At 11 days, an endogenous callus made up of meristematic cells was evident, and it became exogenous, getting a heterogeneous appearance 20 days later. About 24 to 26 days after seeding, there were typical embryogenic cells surrounding callus lobules.

Key words: histology, somatic embryogenesis, *Coffea canephora*, tissue culture

RESUMEN. Se realizó el estudio histológico de la formación del callo a partir de explantes foliares de *Coffea canephora* var. Robusta, con el objetivo de conocer los cambios que ocurren durante el proceso de iniciación y crecimiento del mismo. Los explantes fueron cultivados *in vitro* y procesados para el establecimiento de la embriogénesis somática. Las muestras fueron tomadas a partir de la siembra del explante, y luego periódicamente, procesándose para inclusión en parafina. Los cortes de 8 μm se colorearon con azul de toloidina al 0.05 % en agua y se fotografiaron en un fotomicroscopio de la Carl Zeiss. Los resultados mostraron que el callo se origina a partir de las células perivasculares, las cuales comenzaron a dividirse entre los cuatro a cinco días después de la siembra. A los 11 días fue evidente la presencia de un callo endógeno compuesto de células meristemáticas. Posteriormente este se hizo exógeno, y a los 20 días tomó apariencia heterogénea. Alrededor de los 24 a 26 días después de la siembra, se encontraron células embriogénicas características en la periferia de los lóbulos del callo.

Palabras clave: histología, embriogénesis somática, *Coffea canephora*, cultivo de tejidos

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones somáticos mediante el cultivo de tejidos *in vitro* es una técnica de gran interés, ya que permite la obtención de embriones a gran escala con una elevada tasa de multiplicación y rejuvenecimiento del material vegetal, además de constituir la base de la producción de la semilla artificial (Nancy Santana, 1993).

Se han realizado estudios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos del proceso de embriogénesis somática, pero se desconocen muchos elementos del desarrollo de este fenómeno, a la vez que se dispone de pocos datos desde el punto de vista histológico, que permitan una mayor comprensión del mismo y de los mecanismos que conducen a una célula más o menos diferenciada a readquirir sus potencialidades embriogénicas (Schwendiman *et al.*, 1990).

Dra. María E. García, Investigador Auxiliar y Jenny Bravo, Investigador del Departamento de Fisiología y Biquímica Vegetal; 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.

En nuestro país, los trabajos de embriogénesis somática son relativamente recientes y, de hecho, en el cultivo del cafeto, no se tienen antecedentes de un trabajo similar en nuestras condiciones. De ahí que el objetivo de este trabajo sea realizar el estudio histológico de la primera fase de la embriogénesis somática: -callogénesis- como parte de un estudio que debe culminar con la obtención de embriones en el cultivo del cafeto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con vistas a obtener el material de trabajo, se tomaron explantes foliares provenientes de los pares de hojas del segundo, tercero y cuarto nudos de ramas plagiotrópicas ubicadas en la zona central de la planta de *Coffea canephora* variedad Robusta, teniéndose en consideración el vigor y estado sanitario de las mismas.

El procedimiento seguido para la desinfección del explante, la preparación de la muestra, así como el medio de crecimiento del callo (Murashige y Skoog, 1962), fueron los utilizados en la metodología descrita por Nancy Santana (1989) para el establecimiento de la embriogénesis somática en *Coffea* sp.

El procesamiento histológico se llevó a cabo en el laboratorio de Histología del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Se realizaron dos siembras, tomándose una muestra en cada una de ellas a partir del momento de la siembra y posteriormente a los 4, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 18, 23, 30, 39 y 40 días después de la misma. Las muestras se fijaron en FAA y se procesaron de acuerdo con la técnica de Gamborg y Water (1975) para el cultivo de tejidos de plantas. Los cortes de 8 a 10 μm de espesor se realizaron en un micrótomo de deslizamiento horizontal y se colorearon con azul de toloidina al 0.05 % en agua. Las muestras se fotografiaron en un fotomicroscopio de la Carl Zeiss.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra un corte transversal del explante foliar al momento de la siembra. Se observa la epidermis abaxial y adaxial, el parénquima en empalizada, lagunoso y un haz vascular de tipo colateral.

Entre los cuatro y cinco días después de la siembra del explante, pudo observarse cierta proliferación de células meristemáticas cercana a la zona abaxial. Esto se hizo más notable hacia los siete días después de la siembra (Figura 2).

Cuatro días después el callo es más evidente (Figura 3). El número de células meristemáticas ha aumentado en todas direcciones, pero hasta este momento se encuentran limitadas por ambas epidermis, por lo que se denomina callo endógeno. Casi inmediatamente, por un incremento en el crecimiento se rompe la epidermis abaxial y el callo se proyecta al exterior (Figura 4).

En este momento de intensa división celular, el callo está formado fundamentalmente por células meristemáticas.

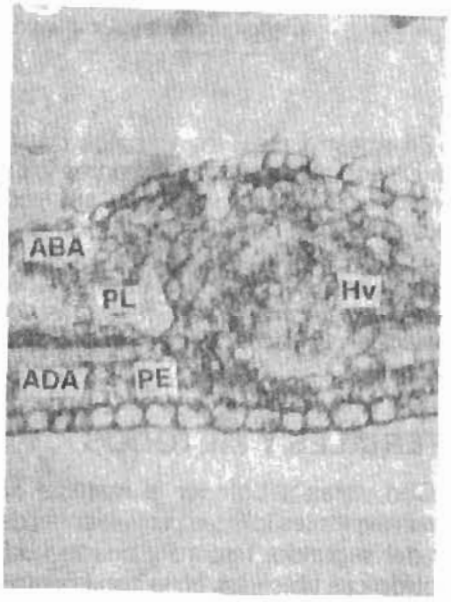

Figura 1. Corte transversal de una hoja de café en el momento de la siembra del explante. Se observa la epidermis adaxial (ADA) y abaxial (ABA), parénquima lagunoso (PL), parénquima en la empalizada (PE), haz vascular de tipo colateral (Hv) (40x)

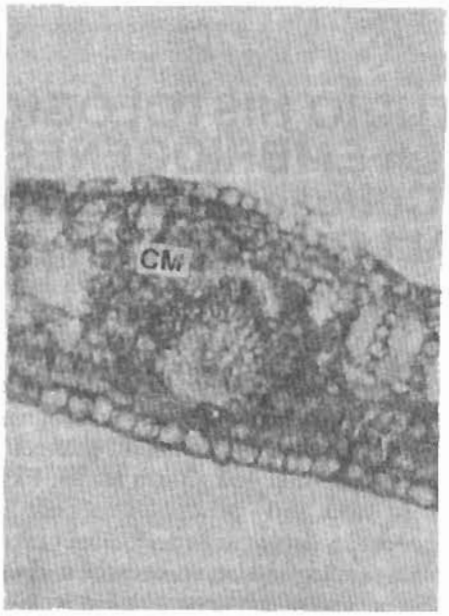

Figura 2. Inicio de la formación del callo. Se observa proliferación de células meristemáticas (CM) a partir de las células perivasculares (40 x)

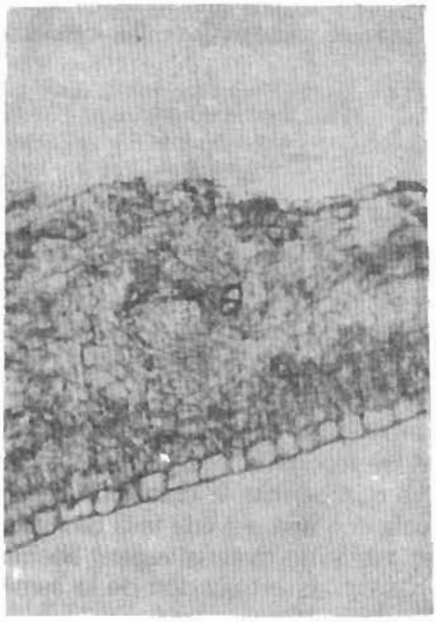

Figura 3. Callo endógeno 11 días después de la siembra (40 x)

El origen de este callo ha sido discutido por diferentes autores (Söndhal y Sharp, 1977; y Pierson *et al.*, 1983), los cuales afirmaron que el mismo proviene de la multiplicación del parénquima aerífero, sin especificar cómo es este proceso.

Michaux-Ferrière, Dublin y Schwendiman (1987) describen el origen a partir de las células perivasculares, lo cual coincide con este trabajo (Figuras 2-4).

Figura 4. Callo formado fundamentalmente por células meristemáticas. Se ha roto la epidermis abaxial (40 x)

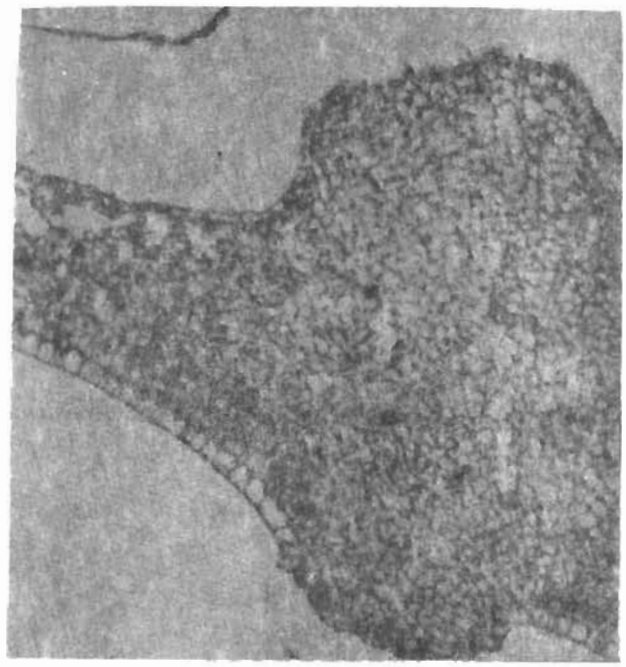

Figura 5. Formación del callo en el extremo del explante, 15 días después de la siembra (40 x)

El callo se forma generalmente en los extremos laterales del explante y se denomina callo de cicatrización (Figura 5). Sin embargo, se encontró en algunos casos que comenzó a formarse alrededor de los haces vasculares situados hacia el centro del explante (Figura 6). En este caso, el crecimiento se realiza horizontalmente al medio de cultivo, se produce la ruptura de la epidermis abaxial y se proyecta al exterior, pero el crecimiento en todas las direcciones se observó posteriormente.

Aproximadamente 20 días después de la siembra, el callo presenta apariencia heterogénea. Próximo a la zona de origen, cercano al haz vascular, continúa la división celular, siendo las células meristemáticas las predominantes. Hacia la zona de expansión se observa cierta diferenciación,con la presencia de lóbulos parenquimáticos (Figura 7). En algunos casos de lóbulos cercanos al haz vascular, pueden encontrarse células meristemáticas.

Entre los 24 y 26 días después de la siembra, se detectó en la periferia de algunos lóbulos parenquimáticos la presencia de un nuevo tipo de células, al parecer producto de la desdiferenciación de estas células parenquimáticas (Figura 8a).

Vistas con aumento mayor (Figura 8b), estas células presentan las características descritas por diversos autores como células embriogénicas: un nucleolo único y voluminoso, intensamente coloreado y paredes gruesas (Michaux-Ferriere, P. Dublin y J. Schwendiman, 1987; y Michaux-Ferriere, *et al.*, 1989). Estas células presentan las características de una célula huevo y es a partir de las mismas que puede originarse el embrión.

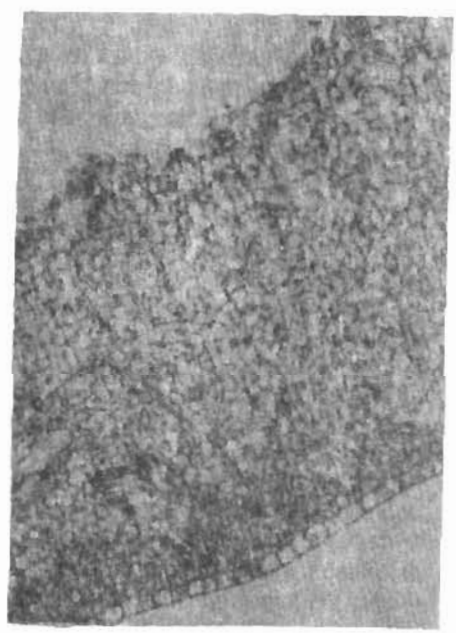

Figura 6. Callo desarrollado a lo largo del explante (40 x)

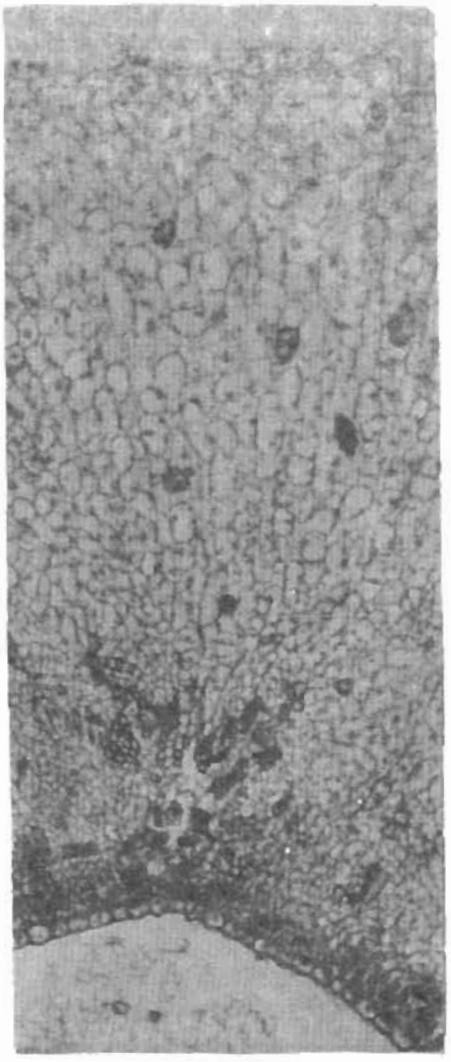

Figura 7. Corte de un callo 20 días después de la siembra. Se observan células meristemáticas cercanas al haz vascular y lóbulos de células parenquimáticas (40 x)

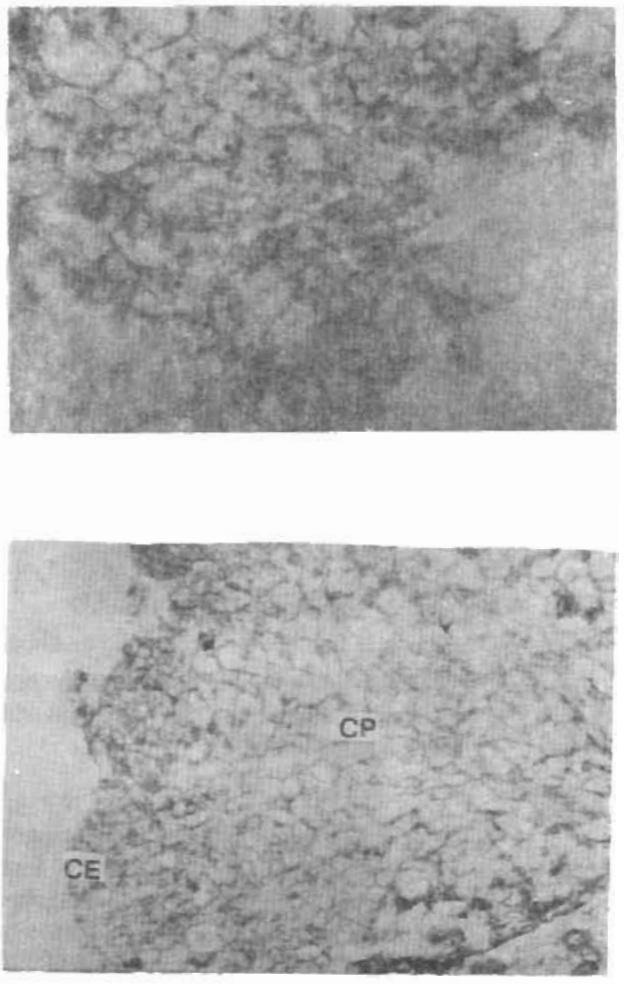

Figura 8a. Desdiferenciación de células parenquimáticas (CP) en células embriogénicas (CE) en los lóbulos de la periferia del callo entre los 24-26 días después de la siembra (64 x) b. Células embriogénicas (160 x)

Entre los 35-38 días después de la siembra, la estructura del callo se hace más compleja, con un número mayor de células embriogénicas (Figura 9a). En éstas células se observan paredes celulares gruesas, así como un citoplasma granuloso (Figura 9b).

Puede decirse que en este momento, desde el punto de vista histológico, el callo en estudio presenta las características que hacen posible la producción de embriones somáticos. El desarrollo de los mismos dependerá de que existan condiciones adecuadas para ello.

BIBLIOGRAFÍA

Apports de l'histologie a la comprehension et la maitrese de l'embryogenese somatique : Conferencia /J. Schwendiman ... /et al./.- París : Laboratoire de Cytogenetique, 1990.

Gamborg, O. L. Plant Tissue Culture Methods./O. L. Gamborg, L. K. Water.- Ottawa : National Research Council of Canada,1975.- 53 p.

Michaux-Ferrière, N. /et al. /. Etude histologique de l'embryogenese somatique chez Coffea arabica, induite par culture sur milieux uniques des fragments foliaires des génotypes différents. Café, Cacao Thé (París)23(4): 207-216, 1989.

Michaux-Ferriere, N., P. Dublin y J. Schwendimam. Histological Study of Somatic Embryogenesis from Foliar Explants of Coffea arabica L. Café, Cacao, Thé (París)21(2):103-111, 1987.

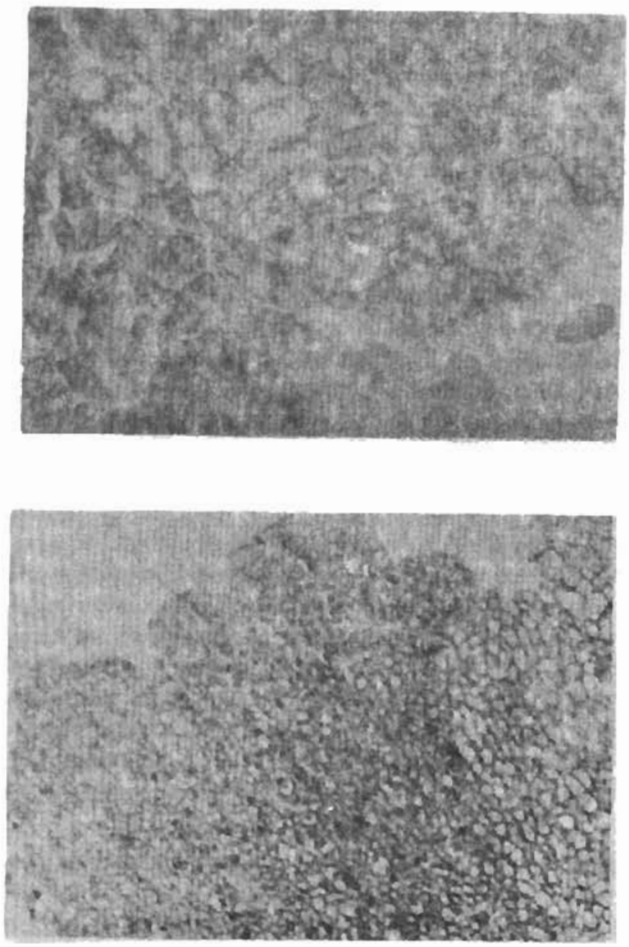

Figura 9a. Corte de un callo entre los 35-38 días después de la siembra. Se observa un aumento en el número de células embriogénicas (40x) b. Células embriogénicas que presentan mayor complejidad en el contenido citoplasmático y un aumento en el grosor de las paredes celulares

Murashige, T, y F. Skoog. A Revised Medium ot Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. (Copenhagen)15:473-497, 1962.

Pierson, E.S. /et al./. In Vitro Development of Embryoids from Punched Leaf Disc of Coffea canephora. Protoplasma 115(2-3):208-216,1983.

Santana, Nancy, Lourdes Iglesias y María C. González. Micropropagación del cafeto (Coffea arábica, Lin.) mediante el cultivo de embriones in vitro. Cultivos Tropicales (La Habana)11(3):31-43, 1989.

Santana, Nancy. Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (Coffea sp.)./Nancy Santana Buzzy; Lourdes Iglesias, tutor.- Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas); INCA, 1993.- 230 h.

Shondal, M. R. y W. R. Sharp. High Frequency Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of Coffea canephora L. Z. Planzenphysiol. 8:395-408, 1977.

Recibido: 7 de abril de 1995
Aceptado: 21 de abril de 1995