ESTABLECIMIENTO DE LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE HORMONAS PARA EL CULTIVO In Vitro DE ÁPICES DE Coffea arabica L.

María E. González, R. Morejón y Maira Portilla

ABSTRACT. This research study was performed at the Genetics Laboratory from the Central Research Station of Coffee and Cocoa, Santiago de Cuba province, with the objective of evaluating the effect of exogenous plant hormones on the reactivation and further apical development in *Coffea arabica* L. cv "Catuai". Thus, BAP and kinetine concentrations from 0 to 10 mg.L^{-1} were tested. The effect of four levels of BAP -1, 3.5, 5.5 and 8 mg.L^{-1}- associated to two levels of AIA -0.05 and 0.1 mg.L^{-1}- was studied at the multiplication rate. The effect of ABA (0-0.02 mg.L^{-1}) on apical development was evaluated in a medium supplemented by BAP; tryptophan concentrations of 0.2, 0.5, 1 and 3 mg.L^{-1} were also tested. Results showed significant differences with the check regarding apical reactivation percentage and average leaf pairs per stem. Tryptophan concentrations between 0.2 and 0.5 proved to be appropriate in an auxin-free medium; moreover, the use of ABA and BAP-AIA association does not have a positive effect upon the multiplication rate.

Key words: tips, *Coffea arabica*, plant hormones

RESUMEN. El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Genética de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, provincia de Santiago de Cuba, con el objetivo de evaluar el efecto de fitohormonas exógenas en la reactivación y el posterior desarrollo de ápices de *Coffea arabica* L. variedad 'Catuai'. Para ello se probaron concentraciones de BAP y Kinetina que oscilaron entre 0 y 10 mg.L^{-1}. Se estudió el efecto de cuatro niveles de BAP -1, 3.5, 5.5 y 8 mg.L^{-1}- asociados a dos niveles de AIA -0.05 y 0.1 mg L^{-1}- en la tasa de multiplicación. En un medio con el suplemento de BAP, se evaluó el efecto de ABA (0-0.2 mg.L^{-1}) en el desarrollo de los ápices; también se probaron concentraciones de triptofano equivalentes a 0.2, 0.5, 1 y 3 mg.L^{-1}. En los resultados se encontraron diferencias significativas con el testigo en relación con el porcentaje de reactivación y promedio de pares de hojas por tallo. Se comprobó que concentraciones entre 0.2 y 0.5 de triptofano resultan favorables en un medio libre de auxinas y que el empleo del ABA así como de la asociación BAP-AIA, no causa efecto positivo sobre la tasa de multiplicación.

Palabras clave: ápices, *Coffea arabica*, fitohormonas

1041

INTRODUCCIÓN

El cultivo del café reviste gran importancia económica a nivel mundial; entre las especies más explotadas están *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex Fr. (Spiral *et al.*, 1993). El mejoramiento tradicional para la introducción de nuevos caracteres agronómicos en estas especies leñosas, es un proceso que requiere de muchos años; es por esto que la propagación vegetativa constituye un paso indispensable dentro de los programas de mejoramiento genético (Sreenath *et al.*, 1995; Bieysse, Gafflot y Michaux-Ferriere, 1993).

Las técnicas de micropropagación son utilizadas en algunos países de forma rutinaria para la reproducción de genotipos híbridos heterocigóticos, la multiplicación de clones resistentes a plagas y enfermedades así como para la creación de bancos de germoplasma (Mari Tahara *et al.*, 1994; Boxtel y Berthouly, 1996).

María E. González, Investigadora, Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, Finca La Mandarina, Cruce de los Baños, III Frente, Santiago de Cuba; R. Morejón, Investigador de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Maira Portilla, Directora del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Isla de la Juventud.

La aptitud para la multiplicación vegetativa es considerada como una potencialidad fundamental de los vegetales y es estrechamente tributaria de los meristemos (Margara, 1988). La técnica sobre cultivo de meristemos o de ápices de tallo es la única que asegura en la mayor parte de los casos la reconstitución de clones homogéneos. Tiene, además, el mérito de asociar eventualmente la lucha fitosanitaria a la multiplicación.

En 1980, Kartha y Sondahl describieron una técnica para el cultivo de meristemos apicales en *Coffea arabica* L. aplicada por Aponte de Londoño (1981), en un híbrido F_2 interespecífico entre *Coffea arabica* variedad Caturra y *Coffea canephora* Pierre ex Fr. obteniendo resultados alentadores.

Margara (1988) destaca que el cultivo de meristemos o de ápices de tallo es un microestaquillado que necesita de la puesta a punto de medios apropiados a cada caso particular. Zok y Dublín (1991) plantean que entre los elementos más importantes a considerar se encuentran los reguladores de crecimiento y los elementos minerales.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado y que en la actualidad existen pocos informes sobre la aplicación de esta técnica en cafeto, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de fitohormonas exógenas sobre la reactivación y el posterior desarrollo de ápices de *Coffea arabica* variedad Catuai, cultivados *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao en Tercer Frente, provincia de Santiago de Cuba, en el período comprendido desde agosto de 1995 a febrero de 1996, con el objetivo de evaluar el efecto de fitohormonas exógenas en la reactivación y el posterior desarrollo de ápices de cafeto.

Para la inoculación se utilizaron ápices de 2 a 3 mm de longitud acompañados de uno o dos primordios foliares, aislados de vitroplántulas, de seis meses de edad, de *Coffea arabica* variedad Catuai. La excisión de los ápices se realizó en la cámara de flujo laminar.

El medio basal (MB) estuvo constituido por los macronutrientes de Schenk e Hildebrandt, los micronutrientes de Dutcher y Powell modificado, la solución de Fe-Na_2 EDTA de Murashige y Skoog, las vitaminas de Morel y Wetmore y el suplemento con cisteína de 25 mg.L^{-1}, Caseína hidrolizada 50 mg.L^{-1}, sacarosa 30 g.L^{-1} y el Agar Técnico no. 3 (7 mg.L^{-1}). El pH se ajustó a 5.6 y la esterilización se realizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para estudiar el efecto de citoquininas se utilizó el medio MB (libre de citoquininas) como testigo y se ensayaron cuatro dosis de Bencilamino purina (BAP) y Kinetina: 2, 4, 8 y 10 mg.L^{-1}. Se inocularon 15 explantes por tratamiento.

Se estudiaron cuatro dosis de ácido abscísico (ABA): 0, 0.002, 0.02 y 0.2 en presencia de 8 mg.L^{-1} de BAP, con la finalidad de determinar la influencia de esta hormona en el desarrollo de los ápices.

Se utilizaron cuatro niveles de triptofano (0.2, 0.5, 1 y 3 mg.L^{-1}) para estudiar su efecto en un medio libre de auxinas.

Para evaluar el efecto de la combinación citoquinina-auxina en la tasa de multiplicación, se ensayaron dos concentraciones de ácido indolacético (AIA): 0.05 y 0.1 mg.L^{-1} asociadas a cuatro dosis de BAP (1, 3.5, 5.5, y 8 mg.L^{-1}). Se inocularon 23 explantes por tratamiento.

Los explantes inoculados en tubos de ensayos de 25 x 150 mm conteniendo 10 mL del medio de cultivo, fueron sometidos a un fotoperíodo de 12 horas y a una temperatura de 27±1°C. A los 30 y 90 días de cultivo, se evaluaron el número de explantes vivos, los ápices con un par de hojas, el total de brotes emitidos y el total de pares de hojas. Con el resultado de estas evaluaciones se calculó el porcentaje de reactivación de los ápices, el promedio de brotes por explante, el promedio de pares de hojas por tallo y el coeficiente de multiplicación, según Zok y Dublin (1991).

Para el procesamiento estadístico de los datos, a los 30 días de cultivo se realizó la transformación de estos a través de la fórmula $x+0.375$ y se utilizó la prueba X^2. Los datos correspondientes a los 90 días fueron analizados mediante un ANOVA bajo un Diseño Completamente Aleatorizado (desbalanceado).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar la respuesta de los meristemos a los 30 días de cultivo, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. En ausencia de reguladores del crecimiento exógenos, el porcentaje de reactivación fue muy bajo (46.1 %); sin embargo, cuando los niveles de citoquininas se incrementaron a 4 y 8 mg.L^{-1} de BAP y 8 mg.L^{-1} de Kinetina, se observó un 100 % de reactivación (Tabla I). Esto implica que se requieren ambas citoquininas en el medio de cultivo para lograr la reactivación de los ápices, lo que corrobora lo planteado por Grimblat (1972) acerca de la eficiencia de estas hormonas, para promover la formación de hojas tanto por vía indirecta como directa. Los niveles de BAP y Kinetina superiores a 8 mg.L^{-1} comienzan a provocar una disminución en el porcentaje de reactivación, lo que indica que altos niveles de citoquininas reprimen la formación de ciertas estructuras organizadas.

El comportamiento de los brotes está muy relacionado con la presencia de BAP en el medio de cultivo (Tabla II). Se observa que el mayor valor promedio de tallos emitidos (3.75) se obtuvo con 8 mg.L^{-1} de BAP; este tratamiento difiere estadísticamente de los restantes y supera en gran medida al testigo, evidenciándose que el BAP aisladamente ejerce efecto positivo sobre el número de brotes. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zok y Dublin (1991) y Darlan *et al.* (1996), quienes encontraron incrementos significativos del número de brotes con esta fitohormona, al estudiar el efecto de varias citoquininas en el género *Coffea* y *Citrus*, respectivamente.

Con respecto al valor promedio de pares de hojas, se obtuvo que en general es favorecido con el incremento de los niveles de las citoquininas en estudio (Tabla II); sin embargo, concentraciones por encima de 8 mg.L^{-1} comienzan a provocar una ligera disminución en este indicador. La inclusión de 8 mg.L^{-1} de BAP permitió obtener el mayor valor del coeficiente de multiplicación (11.5), siendo esta dosis inferior a la utilizada por Zok y Dublin (1991) (10 mg.L^{-1}) para obtener efectos similares al cultivar ápices de *Coffea arabica* var. 'Caturra' y 'Bourbon'. Este valor del coeficiente de multiplicación difiere del obtenido con igual concentración de Kinetina.

Al evaluar el efecto del ABA en la reactivación de los ápices se obtuvo que este fue negativo, causando la muerte de los explantes antes de los 30 días de cultivo al utilizar una concentración igual a 0.2 mg.L^{-1} (Figura 1); sin embargo, en los ápices inoculados en el medio testigo se alcanzó un porcentaje de reactivación igual al 93.3 %. Este resultado negativo observado en los ápices tratados con ABA puede estar relacionado con sus efectos inhibitorios sobre el metabolismo de los carbohidratos y el proceso de respiración en plantas (Tetteroo *et al.*, 1994a y b).

Con respecto a los niveles de triptofano estudiados, se observó que con dosis equivalentes a 0.2 y 0.5 mg.L^{-1} se alcanza un buen desarrollo de los ápices y se obtienen valores superiores al testigo (Figura 2). Esto evidencia el efecto beneficioso de este aminoácido exógeno precursor del AIA. Al emplear niveles superiores a los señalados anteriormente, no se logró la supervivencia de los ápices, lo que puede atribuirse a un incremento de la concentración endógena de auxina AIA hasta convertirse en tóxica, debido a la ausencia de un mecanismo enzimático en el explante capaz de neutralizar y evitar la concentración de este compuesto (Chaussat *et al.*, 1980).

Tabla I. Efecto de diferentes concentraciones de citoquininas en la reactivación de los ápices a los 30 días de cultivo

Medios de cultivo (tratamientos)	Ápices sembrados (A)	Ápices vivos (B)	Ápices con un par de hojas (C)	% de reactivación (C/Bx100)
1. MB(testigo)	15	13	6	46.1 e
2. MB + KIN 2 mg.L^{-1}	15	14	13	98.8 b
3. MB|KIN 4 mg.L^{-1}	15	11	8	72.7 d
4. MB + KIN 8 mg.L^{-1}	15	15	15	100.0 a
5. MB + KIN 10 mg.L^{-1}	15	14	13	98.8 b
6. MB + BAP 2 mg.L^{-1}	15	14	13	92.8 b
7. MB + BAP 4 mg.L^{-1}	15	14	14	100.0 a
8. MB + BAP 8 mg.L^{-1}	15	15	15	100.0 a
9. MB + BAP 10 mg.L^{-1}	15	12	10	83.3 c

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente (α = 5 %)

Tabla II. Efecto de diferentes concentraciones de citoquininas en el desarrollo de los ápices a los 90 días de cultivo

Tratamientos	Explantes vivos (N)	Total de brotes emitidos (T)	Promedio de brotes por ápice inicial (T/N)	Total de pares de hojas (H)	Promedio de pares de hojas por tallo (H/T)	Coeficiente de multiplicación (H/N)
1	11	11	1.00 e	22	2.00 d	2.0
2	14	16	1.14 e	40	2.50 cd	2.8
3	7	10	1.42 d	31	3.10 ab	4.4
4	15	29	1.93 c	98	3.37 a	6.5
5	13	39	3.00 b	91	2.53 bc	7.0
6	14	28	2.00 c	70	2.50 cd	5.0
7	14	28	2.00 c	73	2.60 cd	5.2
8	12	45	3.75 a	139	3.08 abc	11.5
9	7	20	2.85 b	49	2.45 cd	7.0

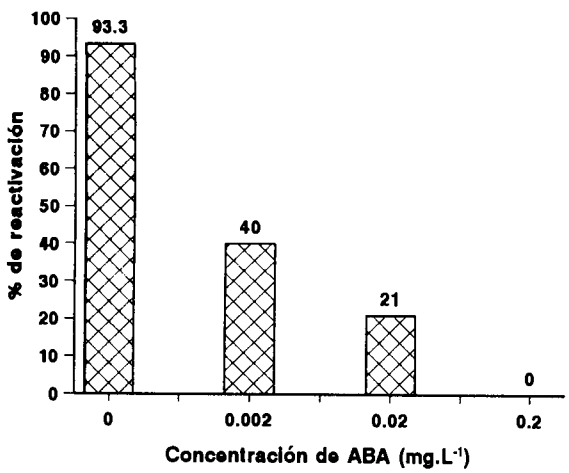

Figura 1. Efecto del ABA en la reactivación de los ápices

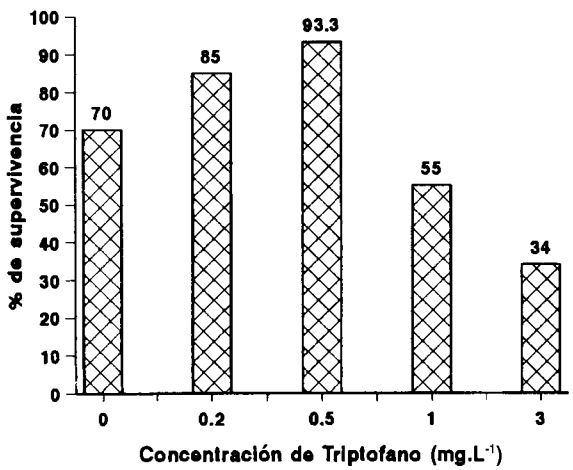

Figura 2. Efecto del triptofano en el desarrollo de los ápices

Los resultados de la asociación BAP-AIA reflejan que no existen diferencias significativas entre los tratamientos en relación con el porcentaje de reactivación de los ápices, a pesar de ser en el tratamiento testigo donde mayor valor se alcanza (Tabla III).

El desarrollo de brotes secundarios a los 90 días después de realizada la siembra, difiere solamente en el tratamiento con 8 mg.L^{-1} de BAP y en el testigo, por lo que no parece estar influido por los diferentes niveles de la fitohormona AIA (Tabla IV). Esto sugiere que las células del meristemo sintetizan niveles de auxinas suficientes para desencadenar este proceso, ya que el potencial genético para la biosíntesis de auxinas endógenas radica en estas células (Smith y Murashige, 1982; Sasaki *et al.*, 1994); El comportamiento del tratamiento con 8 mg.L^{-1} de BAP puede deberse a que altos niveles de citoquininas contrarrestan el efecto inhibitorio del AIA exógeno.

Al utilizar concentraciones del AIA iguales a 0.1 mg.L^{-1}, se observó una disminución en la formación de pares de hojas y en ninguno de los casos se logra superar al testigo (2.22). Resultados similares obtuvieron Smith y Murashige (1982) al evaluar el efecto de esta auxina en meristemos de *Coleus blumei* Benth. El coeficiente de multiplicación es bajo para todas las concentraciones estudiadas.

Tabla III. Efecto de diferentes combinaciones de BAP-AIA en la reactivación de los ápices a los 30 días de cultivo

	Tratamientos BAP	AIA	Ápices sembrados (A)	Ápices vivos (B)	Ápices con un par de hojas (C)	% de reactivación (C/Bx100)
1	1.0	0.00	23	23	21	91.3
2	1.0	0.05	23	23	15	65.2
3	3.5	0.05	23	23	15	65.2
4	5.5	0.05	23	23	19	82.6
5	8.0	0.05	23	23	16	72.7
6	1.0	0.10	23	23	15	65.2
7	3.5	0.10	23	23	13	56.5
8	5.5	0.10	23	23	13	56.5
9	8.0	0.10	23	23	16	72.7

Tabla IV. Efecto de diferentes combinaciones de BAP-AIA en el desarrollo de los ápices a los 90 días de cultivo

Tratamientos	Explantes vivos (N)	Total de brotes emitidos (T)	Promedio de brotes por ápice inicial (T/N)	Total de pares de hojas (H)	Promedio de pares de hojas por tallo (H/T)	Coeficiente de multiplicación (H/N)
1	16	24	1.36 a	49	2.22 a	3.0
2	19	19	1.47 b	38	2.00 ab	2.0
3	14	14	1.17 b	24	1.71 bc	1.7
4	19	20	1.19 b	40	2.03 ab	2.1
5	15	20	1.29 a	40	2.17 a	2.6
6	16	16	1.17 b	21	1.31 d	1.3
7	13	13	1.17 b	16	1.23 d	1.2
8	14	14	1.17 b	19	1.46 cd	1.3
9	14	14	1.17 b	18	1.29 d	1.2

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente ($\alpha = 5$ %)

CONCLUSIONES

- La emisión de brotes secundarios requiere de altas concentraciones de citoquininas.
- El mayor número de brotes secundarios por ápice inicial y el coeficiente de multiplicación más elevado se obtiene con 8 $mg.L^{-1}$ de BAP.
- El empleo de ABA no es recomendable para la reactivación de los ápices.
- El triptofano en dosis de 0.2-0.5 $mg.L^{-1}$ y en presencia de 8 $mg.L^{-1}$ de BAP resulta favorable al desarrollo de los ápices.
- La asociación citoquinina-auxina (BAP-AIA) no ejerce efecto positivo en la tasa de multiplicación de los ápices.

REFERENCIAS

Aponte de Londoño, M. E. Cultivo de meristemos de Café. Cenicafé 32(3):106-111, 1981.

Bleysse, D., A. Gafflot y N. Michaux-Ferriere. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in Coffea arabica. Can. J. Bot. 71:1496-1502, 1993.

Boxtel, J. y M. Berthouly. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell, Tissuue and Organ Culture 44:7-17, 1996.

Chaussat, R. /et al./. La multiplication vegétativé des plantes supérieures. Gauthier-Villars 277 p., 1980.

Darlan, J. R. /et al./. Efeito de Triadimenol e da Benzilaminopurina naMultiplicacao de Brotos in vitro do Porta -Exerto Sunki (Citrus sunki Hot, ex Tan). Ceres 246(53): 147, 1996.

Grimblat, V. Differentiation of citrus stem in vitro. Journal of American Society for Horticultural Science 97:550-603, 1972.

Margara, J. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogenesis. /J. Margara.- Versalles Mundi Prensa, 1988.- 232 p.

Sasaki, K. /et al./. IAA metabolism in embryogenic and no-embryogenic carrot cells. Plant Cell Physiol. 35(8):1159-1164, 1994.

Smith, R. y T. Murashige. Primordial leaf and phytohormone effects on excised shoot apical meristem of Coleus blumei Benth. American Journal of Botany 69(88):1334-1339, 1982.

Spiral, J. /et al./. Obtention de plantules de Coffea canephora Pierre (Robusta) transformees par Agrobacterium rhizogenes. C. R. CAcad. Sci. 316(3):1-6, 1993.

Sreenath, H. L. /et al./. Somatic embryogenesis from integument (perisperm) cultures of coffee. Plant Cell Reports 14:670-673, 1995.

Tahara, Mari /et al./. Formation of somatic embryos from protoplast of Coffea arabica L. Hort Science 29(3):172-174, 1994.

Tetteroo, F. A. /et al./. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (Daucus carota L.) and alfalfa (Medicago sativa L.) Seed Science Research 4:203-210, 1994a.

Tetteroo, F. A. /et al./. ABA reduces respiration and sugar metabolism in developing carrot (Daucus carota L.) embryoids. J. Plant Physiol 145:477-482, 1994b.

Zok, S. y P. Dublin. Multiplication vegetative in vitro par culture d'apex chez Coffea arabica L.:action solutions minerales et de regulateurs de croinssance. Cafe, Cacao, The 4(35):245-256, 1991.

Recibido: 27 de marzo de 1998
Aceptado: 14 de mayo de 1998