

Artículo original

Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (*Coffea arabica*) resistente a roya (*Hemileia vastatrix*)

María Elena Montes-de Godoy^{1,2*}

¹Máster en Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Maule, Chile

²Docente-Investigadora, Facultad de Ingeniería y Arquitectura Universidad Católica de El Salvador, By pass a Metapán y carretera Antigua a San Salvador, El Salvador

* Autor para correspondencia. maria.montes@catolica.edu.sv

RESUMEN

En Santa Ana, Departamento de El Salvador, existe una accesión de café derivada del Bourbon, que ha sido resguardada durante varias generaciones, gozando de resistencia a esta enfermedad y manteniendo la calidad de taza. Los objetivos del trabajo fueron establecer un protocolo de micropropagación para esta variedad, así como realizar la caracterización molecular de las vitroplantas obtenidas. Se utilizaron semillas maduras, se desinfectaron e introdujeron en una solución estéril de ácido bórico y cisteína. El medio de cultivo fue un MS (pH 5,7) con 0,5 mg L⁻¹ de 6- BAP. Para la multiplicación se empleó MS con las macrosales a la mitad de la concentración inicial, suplementado con 1,5 mg L⁻¹ de 6-BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa. Las tasas de multiplicación variaron entre 2,1 y 4,5 con diferencias estadísticas. Para la fase de desarrollo y enraizamiento se utilizó el medio de cultivo MS con dos tratamientos: uno, sin hormona con las macrosales a la mitad de la concentración, y otro, de igual formulación más 2,5 mg L⁻¹ de ANA y 10 g L⁻¹ de sacarosa; ambos mantenidos en oscuridad durante 14 días. Para los indicadores de número y longitud de raíces en la fase de desarrollo y enraizamiento, el medio de formulación MS sin hormona (T1), presentó diferencias estadísticas, por lo que éste se propone para la propagación de esta accesión de café. El análisis estadístico fue Análisis de Varianza, con comparación de medias por Tukey. Para la determinación de la huella genética, se utilizaron los marcadores microsatélite o

secuencias simples repetidas (SSRs); estableciendo que todas las plantas resultantes poseen el mismo perfil genético.

Palabras clave: cambio climático, estabilidad genética, microsatélites, resistencia

Recibido: 22/09/2017

Aceptado: 13/06/2019

INTRODUCCIÓN

El cultivo del café (*Coffea arabica* L.) ha sido tradicionalmente uno de los rubros económicos más importantes de El Salvador por su aportación al Producto Interno Bruto (PIB), así como por la generación de empleo y su contribución a la conservación de la biodiversidad ⁽¹⁾.

En la actualidad, tanto en El Salvador como en el mundo entero, el cambio en las condiciones climáticas está provocando el deterioro de los ecosistemas naturales debido al incremento en la temperatura, la ausencia o exceso de lluvias, etc. ^(2,3), incidiendo directa o indirectamente en la pérdida de flora y fauna silvestre, lo cual puede conllevar a generar resistencia genética de plagas y enfermedades sobre todo en cultivos comerciales. Este es el caso específico de la roya (*Hemileia vastatrix*), un hongo que tiene al cafeto como huésped obligado y crece sobre el envés de las hojas, donde forma círculos de color naranja o amarillo polvoso, provocando lesiones cloróticas con afectación de la función fotosintética, respiración y transpiración y que en los dos últimos años ha afectado de forma devastadora plantaciones comerciales de café en el área Centroamericana ⁽³⁻⁵⁾. En estos países se reportan pérdidas acumuladas por USD \$ 243 millones por causa de la roya en los años 2012 a 2014. En El Salvador las pérdidas han sido alrededor de USD \$ 25.9 millones ⁽⁶⁾. Las variedades más afectadas son las arábigas, que son las que brindan el café con mejor calidad de taza y son las más cultivadas en el país y Latinoamérica; sin embargo, debido a la estrechez genética ocasionada por ser originarias de unas pocas semillas traídas de Etiopía, surgen problemas como la pérdida de resistencia contra algunas enfermedades como la roya ^(6,7).

Otros factores también afectan la producción de café son las fluctuaciones del precio en el mercado internacional; políticas económicas nacionales y reducción de áreas de cultivo. Todo esto ha provocado que la productividad y el volumen de las exportaciones hayan experimentado disminuciones considerables.

Debido a lo antes expuesto, se hace primordial buscar estrategias que permitan reproducir materiales que en campo muestren una resistencia o tolerancia a la roya, manteniendo la calidad de taza, lo cual permitirá mejorar los rendimientos del cultivo. Al respecto, existe una accesión de café derivada de la variedad Bourbon, producida en una finca de la zona cafetalera del Municipio de Santa Ana, Departamento de la zona Occidental de El Salvador; la cual se ha resguardado durante varias generaciones y puede ofrecer una solución a estas eventualidades. A pesar de carecer del perfil genético de esta accesión, la resistencia a la roya se ha mantenido en campo durante mucho tiempo aún durante el apogeo del ataque de la roya, lo cual ha sido corroborado por personal técnico agrícola y por caficultores de la zona. Aunado a este contexto, la técnica de la micropropagación de plantas es una alternativa viable para la reproducción de plantas élite a gran escala y en un corto período de tiempo, garantizando, además, la sanidad del material reproducido. Por otra parte, la caracterización molecular mediante marcadores microsatélite constituye una herramienta útil que permite verificar la estabilidad genética de los materiales vegetales micropropagados.

El café constituye un cultivo muy importante para la economía nacional de El Salvador, y por primera vez se ha trabajado en el establecimiento de un protocolo de micropropagación, que contribuye a la multiplicación rápida de plantas con calidad genética, por lo que los objetivos del trabajo fueron establecer un protocolo de micropropagación para la accesión de café Bourbon en estudio, así como realizar la caracterización molecular de las vitroplantas con marcadores microsatélite o secuencias simples repetidas (SSRs), con vistas a demostrar la afinidad genética entre ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de UNICAES, se utilizaron semillas de café (*Coffea arabica* L.) de una accesión resguardada de la variedad Bourbon, las cuales se introdujeron en alcohol 70 % por 5 minutos. Posteriormente, se sometieron a una desinfección con cloro comercial (5,25 % de NaClO) al 50 % más dos gotas de Tween 80 por 15 minutos. Después se llevaron a flujo laminar para realizar tres enjuagues con agua estéril. Luego de efectuado este proceso, las semillas se introdujeron en una solución estéril de ácido bórico (0,5 %) y cisteína (25 mg L⁻¹) ⁽⁸⁾, y se incubaron durante tres días en condiciones de oscuridad. Pasado este tiempo se retiró la solución, se enjuagaron tres veces

con agua estéril y se procedió a extraer los embriones con mucho cuidado utilizando pinzas y bisturí.

El medio de cultivo utilizado para la fase de establecimiento de los embriones fue un MS ⁽⁹⁾ suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de 6-BAP (6-N-Bencilaminopurina), con un pH de 5,7. Los recipientes utilizados fueron frascos de vidrio con capacidad de 190 mL, aplicando un volumen de 28 mL de medio de cultivo a cada uno. La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión/pulg², durante 15 minutos. Al germinar los embriones que se encontraban en la fase de establecimiento, fueron transferidos a condiciones de luz en el cuarto de crecimiento. El fotoperíodo de incubación fue de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, con 1350 lux de intensidad, con temperatura promedio de 26 °C, la duración de esta etapa fue de 23 días. Para la etapa de multiplicación se empleó el medio MS con macrosales a la mitad, suplementado con 1,5 mg L⁻¹ de 6-BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa. Para esta etapa, las plantas germinadas de aproximadamente un mes fueron cortadas en secciones y colocadas verticalmente en el medio de cultivo; este proceso se continuó realizando aproximadamente una vez cada 25-30 días durante al menos cinco ciclos. Para la fase de desarrollo y enraizamiento se utilizó el medio de cultivo MS con dos tratamientos distintos: uno, que es la misma formulación del medio de multiplicación, pero sin la hormona 6-BAP (T1), y otro, también con macrosales a la mitad, más 2,5 mg L⁻¹ de la auxina ANA (ácido naftalenacético) y 10 g L⁻¹ de sacarosa (T2); permaneciendo en estas condiciones y en oscuridad durante un período de 14 días. Esto se realizó para favorecer el estímulo hormonal de la planta y dar inicio a la formación de raíces. Posterior a este tiempo, estas plantas se colocaron en medio MS de formulación anterior (medio de cultivo MS con macrosales a la mitad y sin hormona 6-BAP).

Cada una de las etapas o fases del proceso de micropropagación, en específico la multiplicación, tuvo una duración aproximada de 30 días, según fue el tiempo que las plantas tenían dos o tres entrenudos listos para el corte. El diseño experimental utilizado fue Completamente al Azar con cinco repeticiones. Las variables evaluadas fueron el número de brotes por explante en la fase de multiplicación; mientras que la altura de las plantas (cm), el número de pares de hojas, el número de plantas que sobrevivieron y el largo de las raíces (cm), fueron evaluadas en la fase de desarrollo y enraizamiento. El análisis estadístico de los datos fue Análisis de Varianza (ANOVA), con comparación de medias por Tukey ($p \leq 0,01$). Se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

La estabilidad de las plantas micropropagadas se valoró mediante la huella de ADN, la cual se obtuvo con marcadores microsatélite o secuencias simples repetidas (SSRs) ⁽¹⁰⁾. Se seleccionó un subconjunto de seis vitroplantas, que fueron liofilizadas y guardadas para mientras se realizaba el análisis. De esas plantas se utilizaron 40 mg de las hojas para extraer el ADN mediante un método basado en CTAB ⁽¹¹⁾. El ADN extraído se visualizó en un gel de agarosa al 1 % y se cuantificó mediante espectrofotometría (NanoDrop, ThermoScientific, USA); el ADN se ajustó a 50 ng μL^{-1} para la PCR de los microsatélites. El ADN de cada una de las seis muestras se amplificó con 10 microsatélites (Tabla 1) que han mostrado polimorfismo para el género *Coffea* ⁽¹¹⁻¹⁶⁾.

Cada reacción de PCR tuvo en concentración final los siguientes componentes: ~100 ng de ADN extraído, 1X de Master Mix Maxima Hot Start PCR (ThermoScientific, USA) el cual contiene la ADN polimerasa, la concentración final a 200 μM de cada dNTP y 2 mM de cloruro de magnesio. Cada cebador tenía una concentración final de 0,2 μM , estando el cebador de adelantamiento fluorocromado. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL . El programa de termociclado fue de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 72 °C durante ocho minutos. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis capilar en un equipo ABI 3130xl (Applied Biosystems, USA) en un capilar de 50 cm y en la matriz POP7. El tamaño de los fragmentos se obtuvo con el programa GeneMapper 4.0, usando como referencia el marcador interno de masa molecular GeneScan LIZ600[®].

Tabla 1. Marcadores microsatélites y cebadores empleados en el análisis de la estabilidad genética del material micropropagado de café (*Coffea arabica*)

Nombre del microsatélite	Secuencia del cebador de adelantamiento (5' - 3')	Secuencia del cebador reverso (5' - 3')	Referencia
SSR04	GGTCGCTCACTCATATCTTCCAG	GCCTGGAAAGCAAACGTCTCA	(12)
SSRCa087	TCACTCTCGCAGACACACTAC	GCAGAGATGATCACAAGTCC	(15)
M753	GGAGACGCAGGTGGTAGAAG	TCGAGAAGTCTTGGGGTGT	(14)
SSRCa088	TACCTCTCCTCCTCCTTCT	ATTCTATGGACCGGCAAC	(16)
CaM16	AAGGCAGCTGAAGCGGGACAAA	TGGGGAGAGCTGCAGTTGGAGG	(14)
M24	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTTAATGGGCATAGGGTCC	(17)

M764	CTGGCATTAGAAAGCACCTTG	GCTTGGCTCACTGTAGGACTG	(18)
M32	AACTCTCCATTCCCGCATTC	CTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	(17)
SSR03	GGACAAAACACCGCCCAAAATA	AGCGAGACAGAGGAAGGGAATATT	(16)
SSR073	GAGGTCTTCCCACCACAACA	GGATACGAGAGTCCCTTCC	(15)

RESULTADOS

La germinación de los embriones comenzó a partir de los 13 días de siembra en la fase de establecimiento y se completó al cumplir un mes, cuando las vitroplantas ya presentaban dos pares de hojas verdaderas. Luego, dio inicio la fase de multiplicación, estudiándose cinco ciclos. Las tasas de multiplicación fluctuaron con un decremento en el ciclo 2, seguido por un aumento en el ciclo 3 (con diferencias estadísticas $p \leq 0,01$, según Tukey), para luego disminuir nuevamente en el número 4, y a partir de ahí, parece estabilizarse con una tendencia a fluctuaciones mayores (Figura 1).

Las vitroplantas siempre estuvieron vigorosas y con coloración verde intensa; cada planta presentaba de cuatro a seis pares de hojas cada mes, permitiendo un nuevo corte. En esta fase también hubo aparición espontánea de raíces en la mayoría las plantas. Se observó además, que en todos los ciclos de multiplicación era necesario cambiar los medios de cultivo cada 25 o 30 días, momento a partir del cual al parecer las plantas agotaban los nutrientes provocando que el follaje comenzara a ponerse necrótico.

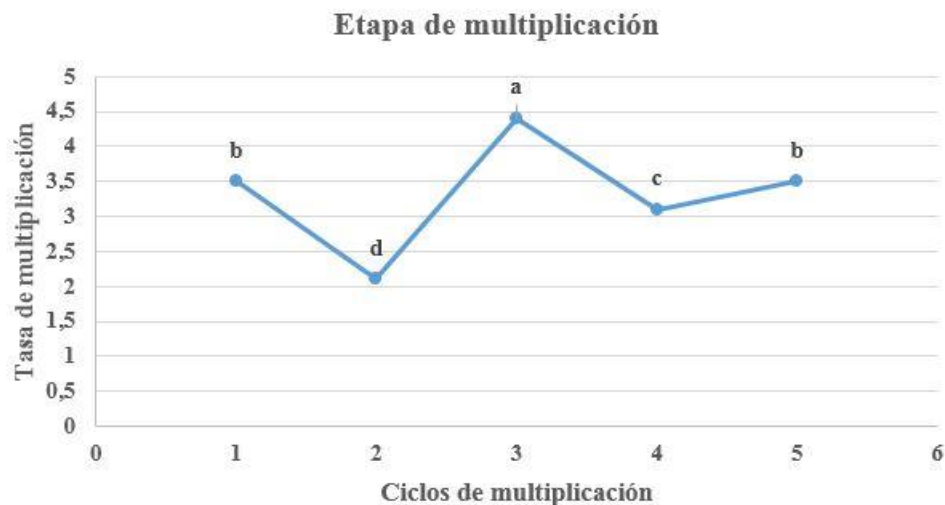
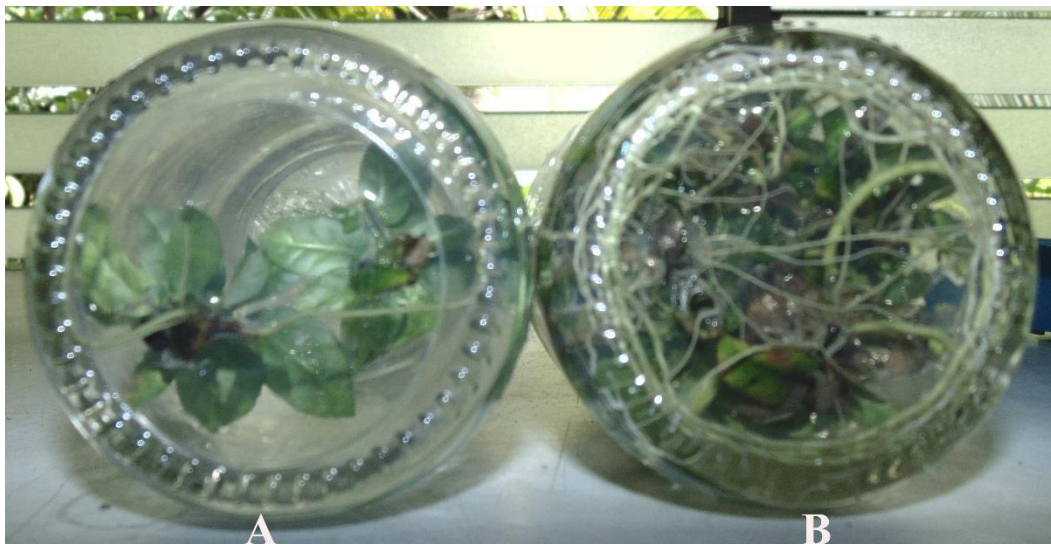


Figura 1. Tasas de multiplicación (o número de brotes por explante) de las plantas de café (*Coffea arabica*) correspondientes a cinco ciclos de multiplicación bajo condiciones *in vitro* ($p \leq 0,01$)

Luego de seis días de comenzar la fase de desarrollo y enraizamiento, se observó que las vitroplantas del tratamiento con ANA y 10 g L^{-1} de sacarosa (T2) comenzaron a formar raíces más robustas que las plantas del tratamiento T1 (Figura 2); no obstante, presentaron formación de callo en la base de la planta. Al cabo de un mes de encontrarse en esta fase de desarrollo, las raíces de esas plantas se encontraban más numerosas y largas en el tratamiento T1, además de haber formado, en algunos casos, brotes alrededor del explante original.



A) Medio MS sin hormona y 30 g L^{-1} de sacarosa

B) Medio MS más $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA y 10 g L^{-1} de sacarosa

Figura 2. Imágenes de la fase final de enraizamiento *in vitro* de una accesión de café (*Coffea arabica*) de la variedad Bourbon, luego de 30 días, bajo dos tratamientos

En la Tabla 2 se presentan las variables evaluadas en esta fase. En general, se observa que la altura de las plantas presentó tendencia a ser mayor en T1, sin diferencias estadísticas. No obstante, el número de raíces y el largo de las mismas fueron mayores en T2; con diferencias estadísticas.

Tabla 2. Resultado de las variables del crecimiento evaluadas al finalizar la fase de desarrollo y enraizamiento de las plantas de café obtenidas *in vitro*, en dos medios de cultivo diferentes: T1- Medio MS sin hormona y 30 g L⁻¹ de sacarosa, T2- Medio MS más 2,5 mg L⁻¹ de ANA y 10 g L⁻¹ de sacarosa

Variables	Tratamiento	Media	Significación(a)
Altura de las plantas (cm)	1	2,52	n.s.
	2	2,35	
No. de pares de hojas	1	3,92	n.s.
	2	4,26	
No. de raíces	1	1,17	**
	2	2,74	
Largo de las raíces (cm)	1	3,19	**
	2	5,97	

^a: n.s. = no significativo; ** = diferencias significativas según la prueba de Tukey (p≤0,01)

Los resultados del estudio molecular de 10 microsatélites en cada una de las muestras de café analizadas revelaron la estabilidad genética del material micropropagado (Figura 3). En este caso se muestran los resultados de los productos de PCR visualizados como perfiles mediante electroforesis capilar.



Figura 3. Perfil de cuatro muestras de café propagadas vegetativamente para los microsatélites a) SSR03, b) SSR073, c) CaM16, d) M774, e) SSRCa87, revelados mediante electroforesis capilar obtenidos con el programa GeneMapper 4.0

DISCUSIÓN

En primer lugar se puede mencionar que si bien la propagación vegetativa es complicada para *Coffea arabica* ⁽¹⁷⁾, este método de obtención del embrión cigótico adaptado del procedimiento realizado en el Laboratorio de Biotecnología del INCA (Cuba) ⁽⁸⁾ para variedades robustas, facilita la reproducción de algunos cultivares arábigos, entre ellos esta accesión derivada de la variedad Bourbon empleada para este ensayo. La utilización de este método de propagación pudiera parecer que conlleva a una variación genética; sin embargo, el estudio realizado con los marcadores moleculares microsátélites demostró que las plantas producidas por esta vía son clones propagados a partir de una sola planta donadora de tejido (Figura 3) y por tanto conservan las mismas características genéticas entre ellas.

Según Armendáriz (19), la función principal de la etapa de multiplicación es incrementar el número de propágulos en cultivo para aumentar la disponibilidad de plantas. En este caso, la multiplicación se realizó durante cinco ciclos y no presentó un comportamiento uniforme; puesto que mientras un ciclo incrementaba la tasa de producción de brotes, al siguiente tendía a disminuir. No obstante, se observó que durante la mitad del ciclo reproductivo ocurrió un incremento de producción, alcanzando una tasa de 4,5 (Figura 1). Esta situación pudiera deberse a que el material ha tenido un mayor vigor en esa etapa; ya que, según mencionó Condori ⁽²⁰⁾, con concentraciones de 6- BAP entre 1 o 2 mg L⁻¹ se obtiene el máximo número de brotes en los materiales juveniles. En este trabajo se obtuvo con dosis de 1,5 mg L⁻¹. A pesar de ello, se considera que la producción de brotes por explante por esta vía es menor que la producida por meristemas ortótropos o plagiótropos ⁽²¹⁾. Además, Lozano (22) recomienda no realizar más allá de un quinto ciclo de multiplicación, debido a la disminución considerable en el número de brotes producidos por explante.

En la fase de desarrollo y enraizamiento, el método de golpe hormonal del tratamiento 2 durante 14 días y luego regresarlas a un medio de carencia hormonal, se utilizó para producir estrés en las plantas, lo cual provoca a su vez una aceleración en el metabolismo y el desarrollo de nuevos tejidos para sobrevivir ⁽²³⁾. Sin embargo, en el caso de T2, se presentó formación de callo en la base de las plantas; no así en T1, que contenía medio MS con macrosales a la mitad, 30 g L⁻¹ de sacarosa y sin hormonas. Precisamente uno de los efectos de las auxinas, además de la elongación de los tejidos, es la formación de callos en la base de los brotes; esto contrarresta el resultado obtenido por Dublin ⁽²⁴⁾.

En T2, la aparición de las raíces demoró más de siete días, pero al final fueron más numerosas y largas que las del T1, con diferencias significativas (Tabla 2). Sobre este aspecto, también se puede hacer notar que la dosis de 6- BAP empleada en el medio no inhibió la formación de raíces en las plantas regeneradas, ya que espontáneamente se producían desde la fase de multiplicación; en parte, porque la dosis empleada no fue tan alta, sino de 1,5 mg L⁻¹.

En general se puede decir que el número y largo de raíces de las plantas regeneradas se favorecieron por la presencia de la auxina ANA en el medio de cultivo, ya que es una hormona excelente en la inducción de elongación de los tejidos ^(8,25).

Se utilizó la técnica de marcadores microsatélite (SSRs) por la ventaja de ser más reproducible que otros sistemas de marcadores moleculares ⁽²⁶⁾. Por lo tanto, es fácil establecer ensayos para validar los datos de la huella genética debido a que la secuencia de los cebadores es invariable y pueden ser fácilmente aplicados en diferentes laboratorios. Se observó que las seis muestras de plantas presentaron el mismo genotipo para el conjunto de 10 microsatélites empleados, lo que indica que estas muestras tienen el mismo perfil genético entre ellas y podría demostrar que son clones propagados a partir de una planta donadora de tejido. Si bien no se cuenta con un perfil genético de la planta donadora, el cultivo muestra estabilidad a nivel de campo.

El análisis en GeneMapper mostró que las muestras analizadas poseen más de dos alelos diferentes para algunos microsatélites, con un máximo de cuatro alelos y un mínimo de dos. Los microsatélites son marcadores codominantes, es decir, para un mismo locus pueden detectar individuos homocigotos y heterocigotos. En el caso de *Coffea arabica*, significa que en cada copia del genoma los individuos pueden tener hasta ocho alelos diferentes, en caso de que cada copia sea heterocigota. O bien si cada copia es homocigota se observarán cuatro alelos.

En el caso de los microsatélites que amplificaron cuatro alelos, no se puede determinar si cada copia del genoma es homocigota ya que los alelos poseen pesos moleculares similares. O bien pudiese ser que dos copias son heterocigotas para un juego de alelos y otras dos copias son heterocigotas para otro juego de alelos.

CONCLUSIONES

Finalmente se puede decir que con base a la metodología empleada en este ensayo, es factible la micropropagación de café arábigo, en especial de esta accesión de café Bourbon, que ha sido propagada por el embrión sexual a partir de semilla, y que su estabilidad genética se mantiene entre las plantas resultantes, lo cual se evidenció mediante los microsatélites utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonilla, T. Estadísticas | Consejo Salvadoreño Del Café [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 25]. Available from: <http://www.csc.gob.sv/estadisticas/>
2. Virginio Filho E de M, Astorga Domian C. Prevención y control de la roya del café: manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Turrialba, Costa Rica: CATIE; 2015.
3. Flores M, Bratescu A, Martínez JO, Oviedo JA, Acosta A. Centroamérica: El impacto de la caída de los precios del café. CEPAL. Serie estudios y perspectivas. Sede Subregional México. 2002;(9):81.
4. Cano-Sánz CG, Vallejo-Mejía F-C, Caicedo-García E, Amador-Torres JS, Tique-Calderón EY. El mercado mundial del café y su impacto en Colombia. Borradores de Economía. 2012;(710):56.
5. SENASICA. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome) [Internet]. México, D.F.: Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria; 2016 [cited 2019 Sep 30] p. 23. Report No.: 40. Available from: <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/perdidas-por-roya-del-cafe-ascienden-us243m-en-centroamerica>
6. Xinhua. Pérdidas por roya del café ascienden a US\$243M en Centroamérica [Internet]. Available from: <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/perdidas-por-roya-del-cafe-ascienden-us243m-en-centroamerica>
7. Anzueto, Francisco. Variedades resistentes a roya [Internet]. Asociación Nacional del Café (Anacafé). Available from: https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Variedades_resistentes_a_roya
8. Castilla Valdés Y. Conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. Cultivos Tropicales. 2012;33(4):29–39.
9. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473–97.

10. Azofeifa-Delgado Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*. 2006;221–42.
11. Araya E, Murillo O, Aguilar G, Rocha O. A DNA extraction protocol and initial primers screening in hieronima alchorneoides Fr. All. for aflp applications. *Foresta Veracruzana*. 2005;7(1):1–4.
12. Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK, Bhat PR, Krishnakumar V, Singh L. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007;114(2):359.
13. Poncet V, Hamon P, Minier J, Carasco C, Hamon S, Noirot M. SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome*. 2004;47(6):1071–81.
14. Hendre PS, Phanindranath R, Annapurna V, Lalremruata A, Aggarwal RK. Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. *BMC plant biology*. 2008;8(1):51.
15. Missio RF, Caixeta ET, Zambolim EM, Zambolim L, Sakiyama NS. Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. *Embrapa Café-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. 2009;
16. Missio RF, Caixeta ET, Zambolim EM, Pena GF, Ribeiro AP, Zambolim L, et al. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. *Bragantia*. 2009;68(3):573–81.
17. Etienne H, Dechamp E, Barry-Etienne D, Bertrand B. Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2006;18(1):45–54.
18. Sefc KM, Lopes MS, Mendonça D, Santos MRD, Machado MLDC, Machado ADC. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*. 2000;9(8):1171–3.
19. Armendáriz Hidalgo KC. Establecimiento de un protocolo de desinfección, introducción y multiplicación in vitro a partir de yemas apicales de plantas juveniles de magnolia (*magnolia grandiflora*) para la producción masiva, repoblación en el Distrito Metropolitano de Quito [Ingeniería en Biotecnología]. [Sangolquí. Ecuador]: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.; 2014. 128 p.
20. Condori Laurente K. Efectos de dosis de bencill amino purina (BAP) y el ácido naftalem acético (ANA) en la producción in vitro de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) en Acobamba [Ingeniero Agrónomo]. [Acobamba-Huancavelica]: Universidad Nacional de Huancavelica; 2013. 79 p.

21. TefyPaho Ayala. Yemas de café [Internet]. 2013 [cited 2019 Sep 30]. Available from: https://es.slideshare.net/pahola_estefy/yemas-de-caf
22. Lozano Kretzschmar, Guillermo Andrés. Propagación in vitro de café (*Coffea arabica*)-variedad Lempira-a partir de meristemas [Internet] [Ingeniero Agrónomo]. [Zamorano, Honduras]: Escuela Agrícola Panamericana; 2014. 31 p. Available from: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3482/1/CPA-2014-050.pdf>
23. Pincay Bajaña VJ. Multiplicación in vitro de café caturra rojo *Coffea arabica* L. con la interacción de dos fitohormonas [Internet] [Ingeniera Agrónoma]. [Guayaquil-Ecuador]: Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil; 2017. 69 p. Available from: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18266/1/Picay%20Baja%c3%b1a%20Vanessa%20Juliana.pdf>
24. Dublin P. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. In: Roca W, Mroginski L, editors. Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT; 1991. p. 577–96.
25. Alvarenga S. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos I. Cartago, Costa Rica: Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica; 1999.
26. Roa Delgado S, Fernández González H, Angulo Graterol L, Useche Carrillo N, De Faría Muñoz Y. Caracterización molecular de genotipos de Rubís mediante marcadores microsatélites. *Agronomía Tropical*. 2014;64(1–2):61–72.

Original Article

Micropropagation and molecular characterization of a coffee variety (*Coffea arabica*) resistant to rust (*Hemileia vastatrix*)

María Elena Montes-de Godoy^{1,2*}

¹Máster en Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Maule, Chile

²Docente-Investigadora, Facultad de Ingeniería y Arquitectura Universidad Católica de El Salvador, By pass a Metapán y carretera Antigua a San Salvador, El Salvador

* Author for correspondence. maria.montes@catolica.edu.sv

ABSTRACT

In Santa Ana, Department of El Salvador, there is an accession of coffee derived from Bourbon, which has been sheltered for several generations, enjoying resistance to this disease and maintaining cup quality. The objectives of the work were to establish a micropropagation protocol for this variety, as well as to perform the molecular characterization of the vitroplants obtained. Mature seeds were used, disinfected and introduced into a sterile solution of boric acid and cysteine. The culture medium was an MS (pH 5.7) with 0.5 mg L⁻¹ of 6- BAP. For multiplication, MS was used with the macrosalts at half the initial concentration, supplemented with 1.5 mg L⁻¹ of 6-BAP and 30 g L⁻¹ of sucrose. The multiplication rates varied between 2.1 and 4.5 with statistical differences. For the phase of development and rooting the MS culture medium was used with two treatments: one, without hormone with the macrosalts at half the concentration, and another, of the same formulation plus 2.5 mg L⁻¹ of ANA and 10 g L⁻¹ of sucrose; both kept in darkness for 14 days. For the indicators of number and length of roots in the phase of development and rooting, the formulation medium MS without hormone (T1), presented statistical differences, so it is proposed for the propagation of this accession of coffee. The statistical analysis was Analysis of Variance, with comparison of means by Tukey. For the determination of the genetic fingerprint, microsatellite markers or repeated simple sequences (SSRs) were used; establishing that all the resulting plants have the same genetic profile.

Key words: climate change, genetic stability, microsatellites, resistance

INTRODUCTION

Coffee cultivation (*Coffea arabica* L.) has traditionally been one of the most important economic items in El Salvador for its contribution to the Gross Domestic Product (GDP), as well as for the generation of employment and its contribution to the conservation of biodiversity ⁽¹⁾.

Currently, both in El Salvador and throughout the world, the change in climatic conditions is causing the deterioration of natural ecosystems due to the increase in temperature, the absence or excess of rainfall, etc. ^(2,3), directly or indirectly affecting the loss of wild flora and fauna, which may lead to the generation of genetic resistance to pests and diseases, especially in commercial crops. This is the specific case of rust (*Hemileia vastatrix*), a fungus that has coffee as an obligatory host and grows on the underside of the leaves, where it forms circles of orange or dusty yellow, causing chlorotic lesions affecting the photosynthetic function, breathing and perspiration and that in the last two years has devastatingly affected commercial coffee plantations in the Central American area ⁽³⁻⁵⁾. In these countries, accumulated losses of USD \$ 243 million are reported due to rust in the years 2012 to 2014. In El Salvador the losses have been around USD \$ 25.9 million ⁽⁶⁾. The most affected varieties are Arabic, which are those that provide coffee with the best cup quality and are the most cultivated in the country and Latin America; However, due to the genetic narrowness caused by originating from a few seeds brought from Ethiopia, problems such as loss of resistance against some diseases such as rust arise ^(6,7).

Other factors also affect coffee production are price fluctuations in the international market; National economic policies and reduction of crop areas. All this has caused that the productivity and volume of exports have experienced considerable decreases.

Due to the aforementioned, it is essential to look for strategies that allow reproducing materials that show resistance or tolerance to rust in the field, maintaining cup quality, which will improve crop yields. In this regard, there is an accession of coffee derived from the Bourbon variety, produced on a farm in the coffee zone of Santa Ana municipality from the Department of the Western Zone of El Salvador; which has been protected for several generations and can offer a solution to these eventualities. Despite lacking the genetic profile of this accession, rust resistance has remained in the field for a long time even during the

height of the rust attack, which has been corroborated by agricultural technical personnel and coffee growers in the area.

In addition to this context, the technique of plant micropropagation is a viable alternative for the reproduction of elite plants on a large scale and in a short period of time, also guaranteeing the health of the reproduced material. On the other hand, molecular characterization by microsatellite markers is a useful tool that allows to verify the genetic stability of micropropagated plant materials.

Coffee is a very important crop for the national economy of El Salvador, and for the first time we have worked on the establishment of a micropropagation protocol, which contributes to the rapid multiplication of plants with genetic quality, so that the objectives of the work were to establish a micropropagation protocol for the accession of Bourbon coffee under study, as well as to perform the molecular characterization of the vitroplants with microsatellite markers or repeated simple sequences (SSRs), with a view to demonstrating the genetic affinity between them.

MATERIALS AND METHODS

In the UNICAES Plant Tissue Cultivation laboratory, coffee seeds (*Coffea arabica* L.) of a protected accession of the Bourbon variety were used, which were introduced in 70 % alcohol for 5 minutes. Subsequently, they were subjected to 50 % commercial chlorine disinfection (5.25 % NaClO) plus two drops of Tween 80 for 15 minutes. Then they were taken to laminar flow to perform three rinses with sterile water. After this process, the seeds were introduced into a sterile solution of boric acid (0.5 %) and cysteine (25 mg L⁻¹)⁽⁸⁾, and incubated for three days in dark conditions. After this time the solution was removed, rinsed three times with sterile water and the embryos were carefully removed using tweezers and scalpel.

The culture medium used for the embryo establishment phase was an MS⁽⁹⁾ supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of 6-BAP (6-N-Benzylaminopurine), with a pH of 5.7. The containers used were glass bottles with a capacity of 190 mL, applying a volume of 28 mL of culture medium to each. Sterilization was performed in autoclave at 121 °C and 15 pounds of pressure/in², for 15 minutes. When the embryos that were in the establishment phase germinated, they were transferred to light conditions in the growth room. The photoperiod of incubation was 16 hours of light and 8 hours of darkness, with 1350 lux intensity, with an average

temperature of 26 °C, the duration of this stage was 23 days. For the multiplication stage, the MS medium was used with half macrosalt, supplemented with 1.5 mg L⁻¹ of 6-BAP and 30 g L⁻¹ of sucrose. For this stage, the germinated plants of approximately one month were cut into sections and placed vertically in the culture medium; this process was continued approximately once every 25-30 days for at least five cycles. For the development and rooting phase, the MS culture medium was used with two different treatments: one, which is the same formulation of the multiplication medium, but without the hormone 6-BAP (T1), and another, also with macrosalt at half plus 2.5 mg L⁻¹ of auxin ANA (naphthalenacetic acid) and 10 g L⁻¹ sucrose (T2); remaining in these conditions and in darkness for a period of 14 days. This was done to favor the hormonal stimulation of the plant and start root formation. After this time, these plants were placed in MS medium of previous formulation (MS culture medium with macrosalts in half and without 6-BAP hormone).

Each of the stages or phases of the micropropagation process, specifically the multiplication, lasted approximately 30 days, depending on how long the plants had two or three internodes ready for cutting. The experimental design used was Completely Random with five repetitions. The variables evaluated were the number of shoots per explant in the multiplication phase; while the height of the plants (cm), the number of leaf pairs, and the number of plants that survived and the length of the roots (cm), were evaluated in the development and rooting phase. The statistical analysis of the data was Analysis of Variance (ANOVA), with comparison of means by Tukey ($p \leq 0.01$). The statistical program Statgraphics Centurion XVI.I.

The stability of the micropropagated plants was assessed by means of the DNA fingerprint, which was obtained with microsatellite markers or repeated simple sequences (SSRs)⁽¹⁰⁾. A subset of six vitroplants was selected, which were lyophilized and stored for the duration of the analysis. Of these plants, 40 mg of the leaves were used to extract the DNA using a CTAB-based method⁽¹¹⁾. The extracted DNA was visualized on a 1 % agarose gel and quantified by spectrophotometry (NanoDrop, ThermoScientific, USA); DNA was adjusted to 50 ng μL^{-1} for microsatellite PCR. The DNA of each of the six samples was amplified with 10 microsatellites (Table 1) that have shown polymorphism for the genus *Coffea*⁽¹¹⁻¹⁶⁾.

Each PCR reaction had the following components in final concentration: ~ 100 ng of DNA extracted, 1X of Master Mix Maxima Hot Start PCR (ThermoScientific, USA) which contains the DNA polymerase, the final concentration at 200 μM of each dNTP and 2 mM

of magnesium chloride. Each primer had a final concentration of 0.2 μ M, the fluorochromic overtaking primer being. The PCR reaction was carried out in a final volume of 25 μ L. The thermocycling program was initially denatured at 95 °C for 5 min; 35 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, with a final extension of 72 °C for eight minutes. The PCR products were visualized by capillary electrophoresis in an ABI 3130xl device (Applied Biosystems, USA) in a 50 cm capillary and in the POP7 matrix. The fragment size was obtained with the GeneMapper 4.0 program, using the GeneScan LIZ600[®] internal molecular mass marker as a reference.

Tabla 1. Microsatellite markers and primers used in the analysis of the genetic stability of the micropropagated coffee material (*Coffea arabica*)

Name of microsatellite	Sequence of the overtaking primer (5' - 3')	Reverse primer sequence (5' - 3')	Reference
SSR04	GGTCGCTCACTCATATCTTCCAG	GCCTGGAAAGCAAACGTCTCA	(12)
SSRCa087	TCACTCTCGCAGACACACTAC	GCAGAGATGATCACAAGTCC	(15)
M753	GGAGACGCAGGTGGTAGAAG	TCGAGAAGTCTTGGGGTGTT	(14)
SSRCa088	TACCTCTCCTCCTCCTCCT	ATTTCTATGGACCGCAAC	(16)
CaM16	AAGGCAGCTGAAGCGGGACAAA	TGGGGAGAGCTGCAGTTGGAGG	(14)
M24	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTTAATGGGCATAGGGTCC	(17)
M764	CTGGCATTAGAAAGCACCTTG	GCTTGGCTCACTGTAGGACTG	(18)
M32	AACTCTCCATCCCCGCATTC	CTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	(17)
SSR03	GGACAAAACACCGCCAAAATA	AGCGAGACAGAGGAAGGGAATATT	(16)
SSR073	GAGGTCTTCCACCACAACA	GGATACGAGAGTCCCTTCC	(15)

RESULTS

The germination of the embryos began after 13 days of sowing in the establishment phase and was completed after one month, when the vitroplants already had two pairs of true leaves. Then, the multiplication phase began, studying five cycles. The multiplication rates fluctuated with a decrease in cycle 2, followed by an increase in cycle 3 (with statistical differences $p \leq 0.01$, according to Tukey), to then decrease again in number 4, and from there, it seems stabilize with a tendency to greater fluctuations (Figure 1).

The vitroplants were always vigorous and with intense green coloration; each plant had four to six pairs of leaves each month, allowing a new cut. In this phase there was also spontaneous appearance of roots in most plants. It was also observed that in all the multiplication cycles

it was necessary to change the culture media every 25 or 30 days, at which point the plants apparently depleted the nutrients causing the foliage to begin to become necrotic.

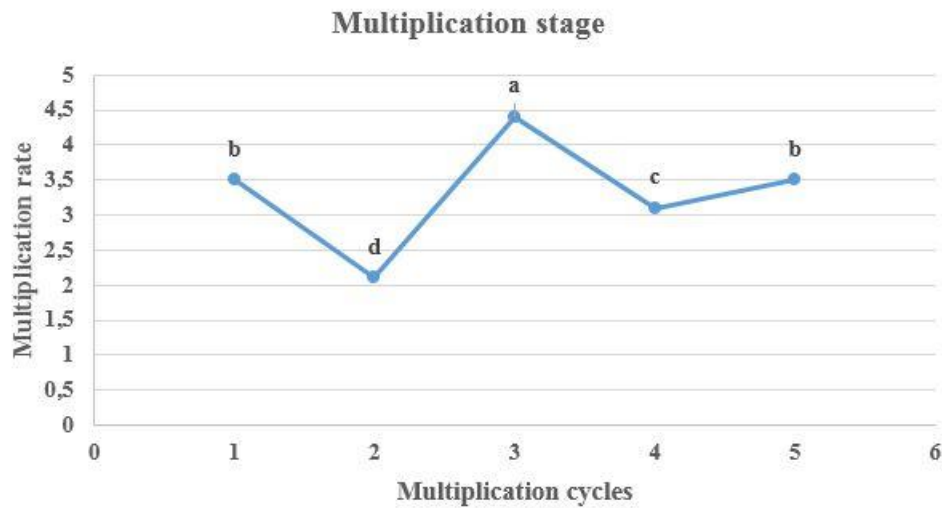
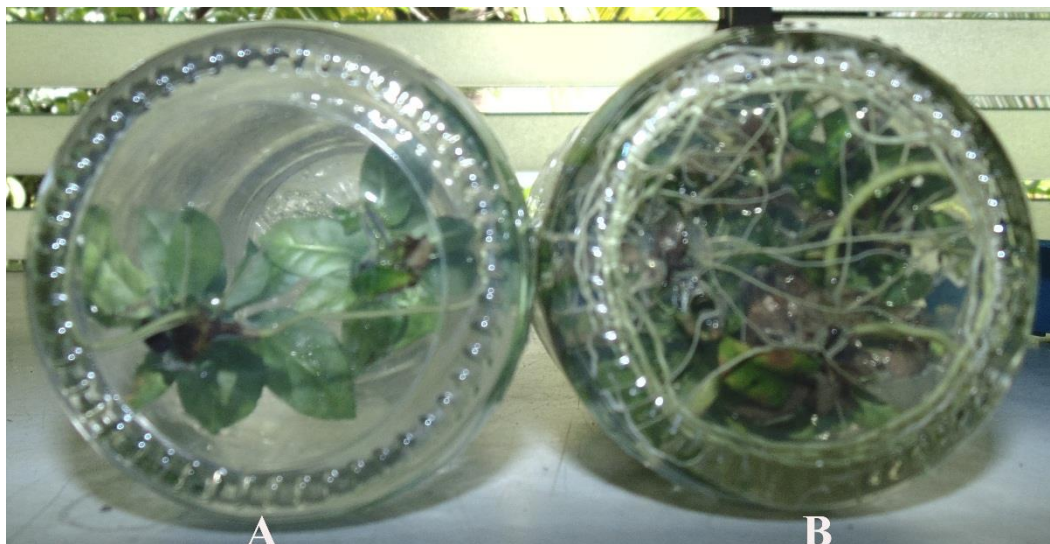


Figure 1. Multiplication rates (or number of shoots per explant) of coffee plants (*Coffea arabica*) corresponding to five cycles of multiplication under in vitro conditions ($p \leq 0.01$)

After six days of beginning the development and rooting phase, it was observed that the vitroplants of the ANA treatment and 10 g L^{-1} sucrose (T2) began to form more robust roots than the T1 treatment plants (Figure 2); however, they presented callus formation at the base of the plant. After a month of being in this development phase, the roots of these plants were more numerous and longer in the T1 treatment, in addition to having formed, in some cases, buds around the original explant.



A) MS medium without hormone and 30 g L⁻¹ sucrose

B) MS medium plus 2.5 mg L⁻¹ of ANA and 10 g L⁻¹ of sucrose

Figure 2. Images of the final phase of in vitro rooting of a coffee accession (*Coffea arabica*) of the Bourbon variety, after 30 days, under two treatments

Table 2 shows the variables evaluated in this phase. In general, it is observed that the height of the plants showed a tendency to be greater in T1, without statistical differences. However, the number of roots and their length were greater in T2; with statistical differences.

Table 2. Result of the growth variables evaluated at the end of the development and rooting phase of coffee plants obtained *in vitro*, in two different culture media: T1- MS medium without hormone and 30 g L⁻¹ sucrose, T2 - MS medium plus 2.5 mg L⁻¹ of ANA and 10 g L⁻¹ of sucrose

Variables	Treatments	Mean	Signification(a)
Plant height (cm)	1	2.52	n.s.
	2	2.35	
Nu. of pairs of leaves	1	3.92	n.s.
	2	4.26	
No. Of roots	1	1.17	**
	2	2.74	
Root length (cm)	1	3.19	**
	2	5.97	

^a: n.s. = not significant; ** = significant differences according to the Tukey test (p≤0.01)

The results of the molecular study of 10 microsatellites in each of the coffee samples analyzed revealed the genetic stability of the micropropagated material (Figure 3). In this case, the results of the PCR products displayed as profiles by capillary electrophoresis are shown.

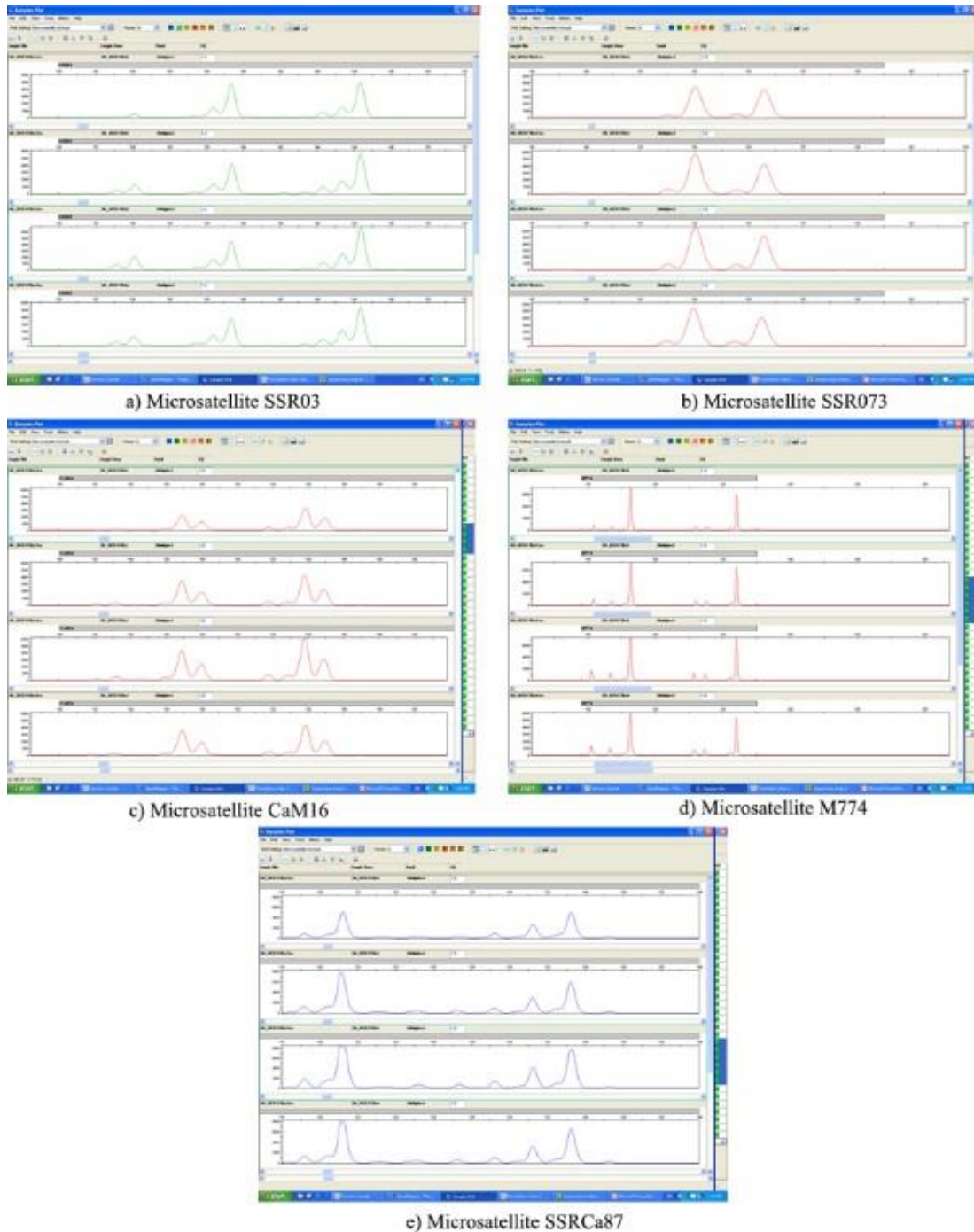


Figure 3. Profile of four vegetatively propagated coffee samples for microsatellites a) SSR03, b) SSR073, c) CaM16, d) M774, e) SSRCa87, revealed by capillary electrophoresis obtained with the GeneMapper 4.0 program

DISCUSSION

In the first place it can be mentioned that although vegetative propagation is complicated for *Coffea arabica* ⁽¹⁷⁾, this method of obtaining the zygotic embryo adapted from the procedure performed at the INCA Biotechnology Laboratory (Cuba) ⁽⁸⁾ for robust varieties, facilitates the reproduction of some Arabic cultivars, including this accession derived from the Bourbon variety used for this trial. The use of this method of propagation might seem to lead to genetic variation; however, the study carried out with microsatellite molecular markers showed that the plants produced by this route are clones propagated from a single tissue donor plant (Figure 3) and therefore retain the same genetic characteristics between them.

According to Armendáriz ⁽¹⁹⁾, the main function of the multiplication stage is to increase the number of propagules in culture to increase the availability of plants. In this case, the multiplication was performed during five cycles and did not show a uniform behavior; since while one cycle increased the rate of sprout production, the next tended to decrease. However, it was observed that during the middle of the reproductive cycle there was an increase in production, reaching a rate of 4.5 (Figure 1). This situation could be due to the fact that the material has had greater vigor at that stage; since, according to Condori ⁽²⁰⁾, with concentrations of 6- BAP between 1 or 2 mg L⁻¹, the maximum number of outbreaks in juvenile materials is obtained. In this work it was obtained with a dose of 1.5 mg L⁻¹. In spite of this, it is considered that the production of buds by explant in this way is lower than that produced by orthotropic or plagotropic meristems ⁽²¹⁾. In addition, some authors ⁽²²⁾ recommends not carrying out beyond a fifth multiplication cycle, due to the considerable decrease in the number of outbreaks produced by explant.

In the development and rooting phase, the hormonal stroke method of treatment 2 for 14 days and then returning them to a means of hormonal deficiency, was used to produce stress in the plants, which in turn causes an acceleration in the metabolism and the development of new tissues to survive ⁽²³⁾. However, in the case of T2, callus formation occurred at the base of the plants; not so in T1, which contained MS medium with half macrosalt, 30 g L⁻¹ sucrose and no hormones. Precisely one of the effects of auxins, in addition to tissue elongation, is the formation of calluses at the base of the buds; this counteracts the result obtained by Dublin ⁽²⁴⁾.

In T2, the appearance of the roots took more than seven days, but in the end they were more numerous and longer than those of T1, with significant differences (Table 2). On this aspect, it can also be noted that the dose of 6- BAP used in the medium did not inhibit the formation of roots in regenerated plants, since they spontaneously occurred from the multiplication phase; partly because the dose used was not so high, but 1.5 mg L⁻¹.

In general, it can be said that the number and length of roots of the regenerated plants were favored by the presence of auxin ANA in the culture medium, since it is an excellent hormone in the induction of tissue elongation ^(8,25).

The microsatellite marker (SSRs) technique was used because of the advantage of being more reproducible than other molecular marker systems ⁽²⁶⁾. Therefore, it is easy to establish assays to validate the genetic fingerprint data because the sequence of the primers is invariable and can be easily applied in different laboratories. It was observed that the six plant samples presented the same genotype for the set of 10 microsatellites used, which indicates that these samples have the same genetic profile between them and could show that they are clones propagated from a tissue donor plant. Although there is no genetic profile of the donor plant, the crop shows stability at the field level.

The analysis in GeneMapper showed that the analyzed samples have more than two different alleles for some microsatellites, with a maximum of four alleles and a minimum of two. The microsatellites are codominant markers, that is, for the same locus they can detect homozygous and heterozygous individuals. In the case of *Coffea arabica*, it means that in each copy of the genome individuals can have up to eight different alleles, in case each copy is heterozygous. Or if each copy is homozygous, four alleles will be observed.

In the case of microsatellites that amplified four alleles, it cannot be determined whether each copy of the genome is homozygous since the alleles have similar molecular weights. Or it could be that two copies are heterozygous for one set of alleles and another two copies are heterozygous for another set of alleles.

CONCLUSIONS

Finally, it can be said that based on the methodology used in this trial, the micropropagation of *Arabic coffee* is feasible, especially this accession of Bourbon coffee, which has been propagated by the sexual embryo from seed, and that its genetic stability it remains among the resulting plants, which was evidenced by the microsatellites used.