

EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL GENOTIPO EN LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CLONES DE *Coffea canephora* P. VAR. ROBUSTA

María E. González[✉], Nancy Santana y Catalina López

ABSTRACT. The investigation was developed in the Laboratory of Crop Genetics and Breeding from the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) in the period between 1997 and 1998, with the objective of studying the influence of some factors during the process of somatic embryogenesis, among them the culture medium composition and genotype. Thus, vegetable material coming from the clones C-R, M-229, K-234 and M-28 of Robusta variety, *Coffea canephora* P., from the Central Research Station of Coffee and Cocoa was used. In order to study the effect of the culture medium, several hormonal combinations between Picloram 2,4-D and 6-BAP were tested. The variables evaluated were fresh weight (g), coloration, growth rate, consistency and total proteins in the calluses, as well as explants with high frequency embryogenic calluses. Significant differences for the studied treatments were obtained, the clone M-229 being the best answer and M-28 the most recalcitrant for the studied indicators. It was determined that Picloram at the concentrations of 0.5 and 1 mg.L⁻¹ and combined with 2 mg.L⁻¹ of 6 BAP enhances embryogenic callus formation in the materials evaluated.

RESUMEN. El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) en el período comprendido entre 1997 y 1998, con el objetivo de estudiar la influencia que ejercen algunos factores durante la ocurrencia del proceso de embriogénesis somática, entre ellos la composición del medio de cultivo y el genotipo. Para ello se utilizó material vegetal procedente de los clones C-R, M-229, K-234 y M-28 de la variedad Robusta, especie *Coffea canephora* P., pertenecientes a la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao. Para estudiar el efecto del medio de cultivo se probaron diferentes combinaciones hormonales entre el Piclorám, 2,4-D y 6-BAP. Se evaluaron las variables peso fresco (g), coloración, velocidad de crecimiento, consistencia y proteínas totales en los callos, así como los explantes con callos de alta frecuencia y la frecuencia de formación de embriones. Se obtuvieron diferencias significativas para los tratamientos estudiados, resultando el clon M-229 el de mayor capacidad de respuesta y el M-28 el más recalcitrante para los indicadores estudiados. Se determinó que el Picloram en concentraciones de 0.5 y 1 mg.L⁻¹ y combinado con 2 mg.L⁻¹ de 6-BAP favorece la formación del callo embriogénico en los materiales evaluados.

Key words: *Coffea canephora*, robusta coffee, somatic embryo, callus, picloram

Palabras clave: *Coffea canephora*, café robusta, embrión somático, callo, piclorám

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional, existiendo 39 países en cuatro regiones del mundo (Norte-Centro América, Sudamérica, Asia y África) con un fuerte impacto en su producción mundial (1).

En Cuba, el café es considerado como renglón importante para incrementar los ingresos de la economía nacional por concepto de exportación del grano (2).

Asimismo, la necesidad de propagar la especie *Coffea canephora* P. vegetativamente, mediante esquejes, por su característica de polinización alógama es una de las razones que hace imperiosa la necesidad de emplear métodos mucho más eficientes para su mejoramiento y multiplicación, a fin no sólo de ampliar la base genética del género, sino también de lograr la introducción y generalización de los materiales genéticamente mejorados en la práctica productiva. La Biotecnología con sus bondades constituye una valiosa herramienta para vencer algunas de esas limitaciones (3).

En general, durante los últimos años se ha puesto especial atención a los diversos factores que afectan el proceso de embriogénesis somática, pero aún quedan muchos aspectos por estudiar; es por ello que este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la constitución genética en la respuesta morfogenética de algunos

Ms.C. María E. González, Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas; Dra.C. Nancy Santana, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Catalina López, Investigador Auxiliar del Departamento de Genética de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, III Frente, Santiago de Cuba, Cuba.

✉ esther@inca.edu.cu

clones seleccionados, así como determinar la influencia de la composición del medio de cultivo sobre ellos, a fin de lograr una mayor comprensión y control de este importante proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el período comprendido entre 1997 y 1998 en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento del INCA.

En el montaje de los ensayos se utilizaron explantes foliares procedentes de los clones C-R, M-229, K-234 y M-28 de la variedad Robusta, especie *Coffea canephora* P., pertenecientes a la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao.

La desinfección, disección e inoculación se realizó según la metodología establecida para este cultivo (4). La composición química del medio basal utilizado en los experimentos fue la siguiente: sales MS (10 mL), Mesoinositol (100 mg.L⁻¹), Tiamina (4 mg.L⁻¹), Cisteína (25 mg.L⁻¹), Sacarosa (30 g.L⁻¹) y Gelrite (2 g.L⁻¹), utilizándose el BAP, el 2,4-D y el Piclorám como reguladores del crecimiento. El pH siempre se ajustó a 5.6.

El cultivo se mantuvo en la oscuridad durante tres meses a una temperatura de 28 ± 2°C y humedad relativa del 70-80 %.

Para evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre el proceso de formación de callos, se probaron diferentes combinaciones hormonales entre la auxina Piclorám y la citoquinina 6-BAP; en los clones C-R y M-229, como medio testigo se utilizó el que contenía los reguladores del crecimiento 2,4-D y 6-BAP (Tabla I).

Tabla I. Reguladores del crecimiento y concentraciones estudiadas en el experimento

Combinación hormonal	Concentración (mg L ⁻¹)		
	BAP	2,4-D	Picloram
1	2	0.5	-
2	2	-	0.1
3	2	-	0.5
4	2	-	1.0
5	-	-	0.1
6	-	-	0.5
7	-	-	1.0

Para el estudio de la influencia del genotipo, las hojas, fuente de los explantes, se colectaron a partir de los clones C-R, M-229, K-234 y M-28, en el mes de julio, teniendo en cuenta los resultados alcanzados para esta época del año en estudios precedentes y fueron cultivados sobre los medios de formación de callos con la combinación hormonal 1 y 3 (Tabla I), a los cuales se les denominó MFC-1 y MFC-2.

En todos los casos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Se realizaron evaluaciones cualitativas y cuantitativas del desarrollo de los callos, cada 10 días hasta la fase final de cultivo. Las variables analizadas fueron:

- peso fresco (g), utilizando para ello una balanza Sartorius de 0.1 mg de precisión
- coloración del callo (de blanco cremoso a carmelita)
- velocidad de crecimiento (de lenta a rápida)
- consistencia del callo (friable a esponjoso)
- niveles de proteínas totales: para esto se tomó un callo por cada réplica (≈ 0.5-1 g) y se maceró en un mortero con sílice a 0°C, luego:
 - ☞ se añadió 1 mL de buffer tris-125 Mm; pH 6.8; NaCl-50 Mm
 - ☞ se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos
 - ☞ se tomó el sobrenadante y se guardó a -20°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad hasta el momento del análisis.

La cuantificación del contenido de proteínas totales se realizó por el método de Braddford (5).

Para evaluar la influencia del genotipo se inocularon 15 explantes por cada variante y se realizaron observaciones semanales. Se evaluó el número de explantes con callos de alta frecuencia de formación de embriones; para el cálculo del porcentaje de callos con estas características se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{ de callos altamente embriogénicos} = \frac{\text{número callos altamente embriogénicos}}{\text{número callos cultivados}} \times 100$$

Se evaluó, además, la formación de embriones por tratamiento utilizando una escala de tres niveles, la cual se describe a continuación (Escala I):

- + Baja frecuencia de formación de embriones somáticos (menos de 50/callos).
- ++ Formación media de embriones somáticos (de 50-100/callos).
- +++ Alta frecuencia de formación de embriones somáticos (más de 100 ES).

En el montaje de los experimentos se aplicó un diseño completamente aleatorizado con arreglo bifactorial. Los factores analizados fueron clon y combinación hormonal. Los datos se procesaron estadísticamente, realizándose un ANOVA en el caso de las variables cuantitativas y docimándose las medias según Duncan en caso de significación al 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de peso fresco obtenidos en cada uno de los tratamientos difieren significativamente para las combinaciones hormonales evaluadas (Tabla II).

Tabla II. Efecto de la combinación hormonal sobre el peso fresco del callo embriogénico (g)

Tratamiento	C-R	M-229
1	1.21 c	1.16 d
2	0.97 f	1.11 e
3	1.40 b	1.50 a
4	0.90 g	1.15 d
5	0.47 l	0.58 j
6	0.64 i	0.72 h
7	0.40 m	0.54 k
Es \bar{x} (\pm)	0.01***	
CV (%)	5.01	

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

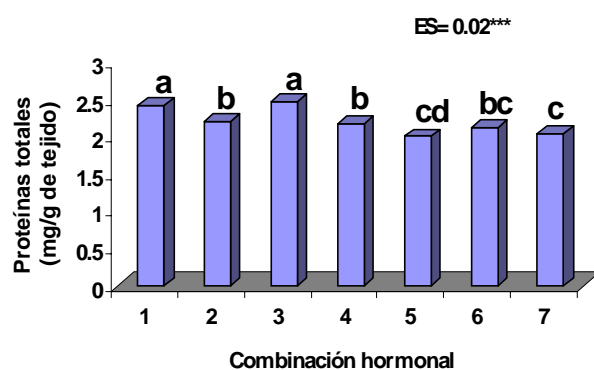
Se observó que la combinación hormonal 3 que contenía 2 mg.L⁻¹ de BAP y 0.5 mg.L⁻¹ de Piclorám fue la de mayor efecto, permitiendo obtener valores de 1.5 g de peso fresco del callo para el clon M-229; un comportamiento similar se obtuvo en el clon C-R (1.40 g), con igual combinación hormonal, resultados que aunque difieren significativamente entre sí superaron notablemente al testigo, donde sólo se obtuvo 1.21g de peso fresco del callo, mientras que los menores valores correspondieron a las combinaciones 5 y 7 (0.1 y 1.0 mg.L⁻¹ de Piclorám, respectivamente) con 0.47 y 0.40 g de peso fresco del callo. Estos resultados coinciden con diversos informes realizados en diferentes especies, empleando el Piclorám como inductor de la callogénesis (6,7). Resulta además interesante la posibilidad de contar con nuevas alternativas en la composición hormonal del medio de inducción de callos embriogénicos en el café y especialmente tratándose de la sustitución del 2, 4-D en dicho balance, conociéndose su efecto como agente desestabilizador de la conformidad genética del material generado en el proceso de morfogénesis de numerosas especies vegetales (8).

De forma general, se pudo observar que existió una mayor capacidad de respuesta a la formación de callo embriogénico en el clon M-229 al comparar los valores obtenidos, evidenciándose la relación entre el efecto genotipo y el balance de los reguladores del crecimiento en el peso fresco de los callos. Resultados similares fueron obtenidos en diferentes genotipos de *Coffea arabica* al informarse variaciones en el peso fresco de los callos en estudio (9).

Asimismo, se ha presentado en cultivares de yuca (*Manihot esculenta* (runtz)) diferencias notables en el peso fresco de los callos procedentes de un mismo tipo de explante cultivados en idénticas condiciones de medio y ambiente, pero pertenecientes a diferentes variedades dentro de una misma especie. Similares resultados fueron encontrados en pimiento (*Capsicum annun*) (4).

Se observó además que las dosis de 0.1, 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ de Piclorám, en ausencia de la citoquinina 6-BAP, no favorecieron el inicio y posterior desarrollo del callo en los clones C-R y M-229, lo que permite inferir que, si bien es factible el empleo del Piclorám para inducir la callogénesis en café, parece ser necesaria la adición de una citoquinina al balance hormonal, lo que se corrobora al evaluar los resultados alcanzados cuando son empleadas ambas fitohormonas.

La determinación de las proteínas totales existentes en los callos mostró que es una variable que depende de la combinación hormonal del medio de cultivo (Figura I). Como resultado además, se pudo observar que el tratamiento con 0.5 mg.L⁻¹ de Piclorám en presencia de 2 mg.L⁻¹ de 6-BAP indujo niveles proteicos elevados en el callo, los cuales no difieren significativamente de los obtenidos con 0.5 mg.L⁻¹ de 2,4 -D (2.47 y 2.42 mg.g⁻¹ de tejido (bmf), respectivamente) a los 40 días de cultivados (fase de crecimiento exponencial), coincidiendo estos resultados con los informados para otras variedades de café (10).

**Figura I. Efecto de la combinación hormonal sobre los niveles proteicos de los callos**

Los niveles más bajos de proteínas (2.00 y 2.05 mg.g⁻¹ de tejido) se obtuvieron en los tratamientos 5 y 7 (libres de citoquininas), los cuales contenían 0.1 y 1.0 mg.L⁻¹ de Piclorám.

Por otro lado, la evaluación del comportamiento de las variables coloración, velocidad de crecimiento y consistencia del callo (Tabla III), muestran una acentuada diferencia, dada al parecer más por la composición del medio de cultivo que por el genotipo, destacándose los tratamientos con 0.5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 2 mg.L⁻¹ de BAP para los clones C-R y M-229, así como un buen comportamiento del clon C-R en presencia de Piclorám (0.5 mg.L⁻¹) y BAP (2 mg.L⁻¹) y del clon M-229 frente a la misma dosis BAP y 1.0 mg.L⁻¹ de Piclorám. Los callos que fueron tratados con estas combinaciones hormonales presentaron características superiores al resto de los tratamientos, o sea, coloración blanco cremoso, crecimiento rápido y consistencia friable.

Tabla III. Influencia de las diferentes combinaciones hormonales sobre las variables cualitativas

Combinación hormonal	Coloración		Velocidad de crecimiento		Consistencia	
	C-R	M-229	C-R	M-229	C-R	M-229
1	BC	B	L	R	F	F
2	B	BC	R	R	F	FN
3	BC	CC	R	R	F	F
4	CC	CO	R	L	FN	F
5	B	B	R	R	E	E
6	BC	BC	R	L	E	FN
7	CO	CO	L	L	FN	E

B: Blanco

BC: Blanco cremoso

CC: Carmelita claro

CO: Carmelita oscuro

L: Callos formados después de los 30 días y hasta los 40 días

R: Callos formados antes de los 30 días

E: Esponjoso

F: Friable

FN: Friable nodular

Desde el punto de vista morfológico, ambos clones (C-R y M-229) mostraron características similares cuando se cultivaron en una misma combinación hormonal. El empleo del Piclorám en el cultivo del café no ha sido informado aún; su efecto ha sido evaluado en otros cultivares, particularmente para la inducción de la callogénesis, obteniéndose resultados alentadores (6,7).

De manera general, se pudo observar que la incorporación del Piclorám en el medio de cultivo favoreció notablemente la formación de callo embriogénico de alta frecuencia; sin embargo, el comportamiento de los clones en los medios evaluados (MFC-1 y MFC-2) difirió significativamente, como se observa en la Tabla IV, siendo el clon M-229 el que mostró mayor capacidad de formación de callos en ambos medios, superando al clon C-R. Sin embargo, el clon M-28 resultó el más recalcitrante a la inducción del callo para ambas variantes de medio de cultivo con 46.0 y 20.5 %, respectivamente.

Tabla IV. Efecto del genotipo en la formación de callo embriogénico de alta frecuencia (%)

Medio de cultivo	Clones			
	C-R	M-229	K-234	M-28
MFC-1	37.30 e	89.00 b	80.30 c	20.50 f
MFC-2	88.23 b	98.79 a	81.60 c	46.00 d
Es \bar{x} (\pm)		1.98***		
CV (%)		5.08		

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

El clon K-234 resultó el más estable a las variaciones del medio de cultivo, al no mostrar diferencias significativas en su respuesta en los dos medios estudiados,

y tanto para el clon M-229 como para el K-234, los dos medios evaluados pueden constituir variantes a utilizar como alternativas de medios de cultivo, a pesar de diferir significativamente para el caso del primer clon (M-229).

El clon C-R se ajustó de manera notable al medio MFC-2, observándose una marcada disminución en la formación de callo embriogénico (de 88.23 a 37.30 %) en el medio MFC-1.

Se puede constatar de los resultados analizados el marcado efecto del genotipo en la formación del callo embriogénico, aspecto que ha sido observado por otros autores (4, 11), lo que a su vez parece implicar la existencia de controles genéticos sobre el comportamiento *in vitro* de los clones estudiados.

El clon M-229 mostró una alta frecuencia de formación de embriones somáticos en ambos medios de cultivo (MFC-1 y MFC-2), seguido por el clon C-R que mantuvo un comportamiento similar sólo cuando los explantes fueron inoculados sobre el medio MFC-2 siendo, sin embargo, la frecuencia de formación de embriones somáticos baja en el medio MFC-1 (Tabla V). Los clones K-234 y M-28 mostraron un comportamiento más estable a las variaciones del medio de cultivo, siendo de manera general la frecuencia de formación de embriones somáticos para K-234, media (50 -100/callos), mientras que para el M-28 fue baja (menos de 50/callos). Estos datos corroboran el elevado potencial embriogénico del clon M-229, mientras que el clon M-28 resultó el más recalcitrante a la formación de embriones somáticos.

Tabla V. Comportamiento de la formación de ES en relación con el clon y medio de cultivo estudiado (Escala 1)

Clones	MFC-1	MFC-2
C-R	+	+++
M-229	+++	+++
K-234	++	++
M-28	+	+

A partir de los resultados anteriormente expuestos, se corrobora la marcada influencia que ejercen factores, tales como la composición química del medio de cultivo y las características genéticas del material vegetal a evaluar, en la respuesta morfogénica del material cultivado *in vitro*.

REFERENCIAS

1. FAO. Boletín Trimestral de Estadísticas. Roma. Italia, 1997, no. 10 p.126.
2. Cuba. MINAGRI. Informe anual sobre el cultivo del café. La Habana. Dirección Nacional de Café y Cacao. 1998. 19 p.

3. González, María E. /et al./ Use of the bacterial compound BC-1 in the micropropagation of *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no.3, p. 21.
4. Santana, Nancy. Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.). [Tesis de grado]. INCA, 1993. 230 p.
5. Braddford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, no.12, p. 248.
6. García, Magaly; Rodríguez, S.; Medero, V.; López, J. y Cabrera, M. Desarrollo de la embriogénesis somática en malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasis esculenta*). En: Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO-98 (3:1998:La Habana).
7. Curvetto, N.; Desh, J. y Marinangeli, P. Inducción de callos y regeneración en *Lilium longiflorum*. En: Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO-98. (3:1998:La Habana).
8. Xiqués Xonia y González, S. Curso de Biotecnología vegetal. Conferencias. La Habana. Universidad de la Habana, 1997.
9. Vázquez, N.; Salazar, K.; Solano, W. y Peseira, A. Embriogénesis de alta frecuencia en híbridos F1 seleccionados de *Coffea arabica* a partir de explantes de hoja; reactividad y eventos histológicos. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO-98 (3:1998:La Habana).
10. Cevallos, M. Embriogénesis somática en *Coffea arabica* L. var.9723: Estudio morfobioquímico de la calogénesis en medio sólido. Caracterización de suspensiones celulares. [Tesis de Diploma]. ISCAH, 1995, 67 h.
11. Berthouly, M. y Michaux-Ferriere, N. M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell Tiss Org. Cult.*, 1996, no. 44, p.169.

Recibido: 5 de mayo del 2000

Aceptado: 5 de marzo del 2001