

# EFECTO DEL ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Coffea canephora* P. VAR. ROBUSTA

María E. González, R. Ramos y Nancy Santana

**ABSTRACT.** The somatic embryogenesis of plants, a perfect form of expression of cell totipotency, constitutes an important alternative for a large-scale production of desired individuals, asynchrony being one of the main causes limiting the successful development of this process. The present work was carried out with the objective of evaluating the effect of ABA on embryogenesis regulation in a liquid medium; thus, cell suspensions with a high embryogenic potential were selected in C-R and M-229 clones of *Coffea canephora* P. sp. var. Robusta from 28-day-formed calluses and subcultivated in MIE and MME media, where the following concentrations of ABA were studied: 0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg.L<sup>-1</sup>. After appearing different developing stages of the somatic embryo, Petri dishes containing MDE semisolid medium were inoculated. The total number of somatic embryos (SE), SE number per developing stage and per each clone were evaluated. M-229 clone showed a better performance to form SE. There were significant differences among mean proportions of embryo production on behalf of 1.0 mg.L<sup>-1</sup> ABA concentration, obtaining the biggest embryo number (1115). The lowest values were reached by ABA-lacking treatments and those with the tested concentration of 0.5 mg.L<sup>-1</sup>. The heart-shaped SE state reached values between 20.6 and 36.3, while the figures for the globular state did not surpass 24.8 embryos. The possibility of using ABA to diminish the degree of asynchrony in this crop was verified, as a result of its maturity effect on somatic embryos.

**Key words:** *Coffea canephora*, embryo culture, somatic cells, abscisic acid, totipotency

**RESUMEN.** La embriogénesis somática de plantas, forma perfecta de expresión de la totipotencia celular, constituye una importante alternativa para la producción a gran escala de individuos deseados, siendo la asincronía una de las principales causas que limitan el desarrollo exitoso del proceso. Con el objetivo de evaluar el efecto del ABA en la regulación de la embriogénesis en medio líquido, se realizó el presente trabajo; para ello se seleccionaron suspensiones celulares con alto potencial embriogénico de los clones C-R y M-229 de la var. Robusta especie *Coffea canephora* P. provenientes de callos de 28 días de formados y subcultivadas en los medios MIE y MME, donde se estudiaron las concentraciones de ABA: 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg.L<sup>-1</sup>. Luego de la aparición de los diferentes estadios de desarrollo del embrión somático, se realizó la inoculación en placas Petri conteniendo el medio MDE semisólido. Se evaluó el número total de embriones somáticos (ES), número de ES por estadio de desarrollo y para cada clon. El clon M-229 mostró una mejor aptitud para formar ES. Hubo diferencias significativas entre las proporciones medias de la producción de embriones a favor de la concentración 1.0 mg.L<sup>-1</sup> de ABA, con la que se obtuvo el mayor número de embriones (1115). Los valores más bajos se alcanzaron en los tratamientos carentes de ABA y donde la concentración ensayada fue de 0.5 mg.L<sup>-1</sup>. Los ES en estado acorazonado alcanzaron valores entre 20.6 y 36.3, mientras que las cifras para el estado globular no rebasaron los 24.8 embriones. Se constató la posibilidad de emplear el ABA para disminuir el grado de asincronía en este cultivo, dado su efecto sobre la maduración de los embriones somáticos.

**Palabras clave:** *Coffea canephora*, cultivo de embriones, células somáticas, ácido abscísico, totipotencia

## INTRODUCCIÓN

En Cuba, el cultivo del café constituye un renglón importante para incrementar los ingresos de la economía nacional por concepto de exportación del grano; por esto, existen alrededor de 160 000 ha destinadas a su cultivo (1).

La multiplicación vegetativa juega un papel importante en los programas de mejoramiento genético de este cultivo. El cafeto puede ser propagado vegetativamente por medio de estacas o injertos. La propagación por estacas es la técnica más empleada en *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, especie alógama, debido a la imposibilidad de reproducción uniforme por vía sexual de los genotipos seleccionados (2). Sin embargo, la poca disponibilidad de material básico, el largo tiempo requerido para la multiplicación y las grandes superficies necesarias para la propagación por este método, constituyen factores que limitan la difusión y utilización rápida a gran escala de un nuevo genotipo.

Ms.C. María E. González, Investigador Agregado del departamento de Genética y Ms.C. R. Ramos, Investigador del departamento de Beneficio, Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao y Dra. Nancy Santana, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

En este contexto, la embriogénesis somática constituye una importante alternativa, con el fin de aumentar la tasa de multiplicación y permitir la difusión rápida de plantas seleccionadas, siendo la heterogeneidad de las poblaciones en cuanto a los estadios de desarrollo de los embriones (asincronía) el principal problema que presenta este sistema para su aplicación industrial, teniendo en cuenta que el embrión somático es la base de la semilla artificial (3).

En el modelo de semilla artificial la fase de maduración es una etapa crucial, en la cual el embrión somático debe adquirir capacidad para la germinación y posterior conversión (4). En la actualidad, la investigación se orienta primordialmente hacia la regulación de estos procesos y el estudio de una de sus principales limitaciones, la asincronía.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ABA en la fase de expresión de la embriogénesis somática, a partir de suspensiones celulares de dos clones de Robusta, de tal manera que permita en un futuro la obtención de poblaciones de embriones más homogéneas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el período comprendido entre 1996 y 1998 en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

En el montaje de los experimentos se utilizaron suspensiones celulares con alto potencial embriogénico de los clones C-R y M-229 de la variedad Robusta, especie *Coffea canephora* P. pertenecientes a la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao.

Para la inducción de la callogénesis se tomaron segmentos de hojas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>; se realizaron la desinfección, disección e inoculación (5). Como medio de cultivo para la formación de callos se utilizó el MFC-2, en el cual el Picloram y la kinetina fueron los reguladores del crecimiento (Tabla I). El cultivo se mantuvo en la oscuridad durante 28 días a una temperatura de 28 ± 2°C y humedad relativa del 70-80 %.

Para el establecimiento de las suspensiones celulares, se seleccionaron callos de textura friable color crema y se transfirieron a erlenmeyers de 100 mL de capacidad conteniendo 25 mL del medio de multiplicación celular (Tabla I). Se tomaron cinco erlenmeyers como tamaño de muestra. Se evaluaron densidades de inóculo comprendidas entre 0.2 y 3 g MF.L<sup>-1</sup>.

Los cultivos fueron colocados en una zaranda orbital a 110 rpm, 27 ± 1°C de temperatura y fotoperíodo de 16 horas luz. En todos los casos, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Se realizaron observaciones cualitativas y cuantitativas de la evolución de las suspensiones, atendiendo a la coloración de la suspensión y la concentración de células (número de células x mL<sup>-1</sup>).

**Tabla I. Composición de los medios de cultivo**

Componentes	Unidad de medida	Medios de cultivo				
		MFC-2	MMC	MIE	MME	MDE
Sales MS	mL	10	10	10	10	10
Mesoinositol	mg.L <sup>-1</sup>	100	100	100	100	100
Tiamina-HCL	mg.L <sup>-1</sup>	4	4	4	4	4
Cisteína-HCL	mg.L <sup>-1</sup>	25	25	25	25	25
2,4-D	mg.L <sup>-1</sup>	-	0.2	-	-	-
Kinetina	mg.L <sup>-1</sup>	2	0.5	0.5	-	0.5
ANA	mg.L <sup>-1</sup>	-	-	0.1	-	-
AIA	mg.L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	0.5
ABA	mg.L <sup>-1</sup>	-	-	-	0.5-2	-
Picloram	mg.L <sup>-1</sup>	0.5	-	-	-	-
Caseína Hidroliz.	mg.L <sup>-1</sup>	100	800	-	-	-
Extracto de malta	mg.L <sup>-1</sup>	400	20	-	-	-
Sacarosa	g.L <sup>-1</sup>	30	30	30	30	30
Gelrite	g.L <sup>-1</sup>	2	-	-	-	1
pH		5.6	5.6	5.6	5.6	5.6

Leyenda

MFC-2: Medio de formación de callos - 2

MMC: Medio de multiplicación celular

MIE: Medio de inducción de embriones

MME: Medio de maduración de embriones

MDE: Medio de desarrollo de embriones

Los subcultivos se realizaron cada 21 días, tomando como referencia los resultados obtenidos al evaluar las curvas de crecimiento celular. Durante el cambio de medio, las suspensiones se filtraron por tamiz de 40 µm para contribuir a la homogeneidad de las suspensiones.

Con vistas a evaluar el efecto del ABA sobre la regulación del desarrollo de los embriones somáticos (ES), se tomaron 5 mL de la suspensión de cada uno de los clones en estudio y fueron subcultivados en el medio de inducción de embriones (Tabla I). Pasadas 10 semanas, se realizó un subcultivo en el medio de maduración de embriones (Tabla I), donde se estudiaron las siguientes concentraciones de ABA: 0, 0.5, 1 y 2 mg.L<sup>-1</sup>, teniendo en cuenta los resultados alcanzados en estudios precedentes al emplear esta hormona en el cultivo *in vitro* de los clones C-R y M-229. El ABA fue disuelto en NaHCO<sub>3</sub> al 0.2 %.

La aparición de los diferentes estadios de desarrollo del embrión somático ( globular, acorazonado y torpedo) se determinó mediante la observación al microscopio estereoscopio. Luego de las doce semanas, se procedió a la inoculación de 20 mL del cultivo en placas Petri de 80 mm de diámetro, que contenían el medio para el desarrollo de embriones semisólido (Tabla I) y facilitar el conteo de los embriones.

Se inocularon cinco placas por cada variante y se colocaron en condiciones de iluminación. Las variables evaluadas fueron: número total de ES, número de ES por estadio de desarrollo y número de ES por estadio de desarrollo para cada clon. Para las dos últimas variables se contaron 100 ES por cada tratamiento.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Para determinar las diferencias entre las medias, se aplicó un análisis de varianza con arreglos bi y trifactorial y donde hubo diferencias significativas se usó la prueba de Duncan al 5 % para determinar el orden de mérito.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar los valores de concentración celular obtenidos, se aprecia que los clones C-R y M-229 presentaron un comportamiento similar; sin embargo, la densidad de inóculo resultó determinante para esta variable, observándose que cuando se inoculó de 0.2 a 1.0 g MF.L<sup>-1</sup>, la concentración aumentó en ese mismo sentido, al parecer, el crecimiento se inició a partir de una concentración crítica, o sea, con valores superiores a las 115 x 10<sup>3</sup> cel.mL<sup>-1</sup>. La densidad 3.0 g MF.L<sup>-1</sup> resultó inadecuada para estos fines, presentándose una caída brusca en el indicador analizado (Tabla II).

**Tabla II. Efecto de la densidad de inóculo sobre la concentración celular de las suspensiones**

Clones	Densidad de inóculo (g MF.L <sup>-1</sup> )			
	2.0	0.5	1	3
C-R	116 c	411 b	421 ab	7.72 d
M-229	119 c	411 b	431 a	8.64 d
ES x (±)	3.88***			
C.V. (%)	6.04			

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

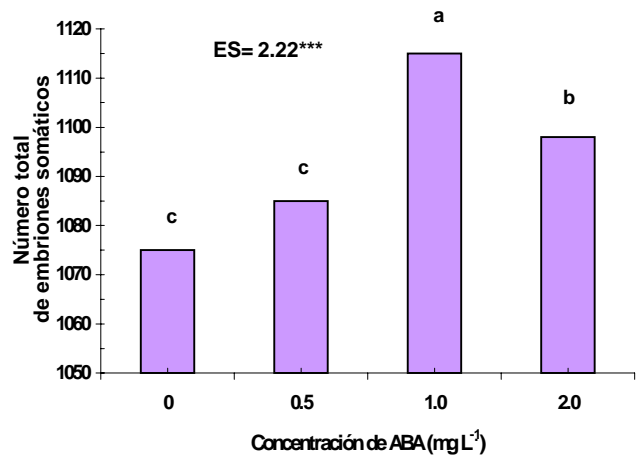
El color de las suspensiones en el clon C-R fue blanco cremoso para las densidades de inóculo evaluadas, excepto cuando se utilizó 0.2 g MF.L<sup>-1</sup>, que varió a blanco cenizo; sin embargo, para el clon M-229 este cambio de coloración se manifestó cuando fueron utilizados 0.5 g MF.L<sup>-1</sup>. Esta respuesta pudiera atribuirse a la existencia de una gran variabilidad de los compuestos fenólicos en la variedad estudiada, así como el grado de oxidación presente en estos.

En relación con la obtención de embriones, se observó que el clon M-229 mostró una mejor aptitud en tal sentido con un total de 1185 embriones somáticos, a diferencia del clon C-R donde se obtuvieron 1001, resultado que coincide con otros (5), al evaluar la producción total de embriones en callos provenientes de este clon, logrando 1020 embriones somáticos.

Al analizar las proporciones medias de la formación de embriones, hubo diferencias significativas para las diferentes concentraciones de ABA, a favor de la concentración 1.0 mg.L<sup>-1</sup>, con la que se obtuvo el mayor número de embriones (1115) (Figura 1). Los valores más bajos se alcanzaron donde no se aplicó ABA y donde la concentración ensayada fue de 0.5 mg.L<sup>-1</sup>; al parecer, esta concentración resulta baja durante la fase de maduración y no permite el incremento del número de embriones. Resultados similares se obtuvieron al emplear niveles de ABA insuficientes en la fase de maduración de embriones somáticos de *Daucos carota*.

Teniendo en cuenta que estos resultados se obtuvieron al aplicar ABA en un medio libre de reguladores del crecimiento, se corrobora lo planteado en relación con el efecto independiente que ejerce este compuesto sobre la maduración de los embriones sin la necesidad

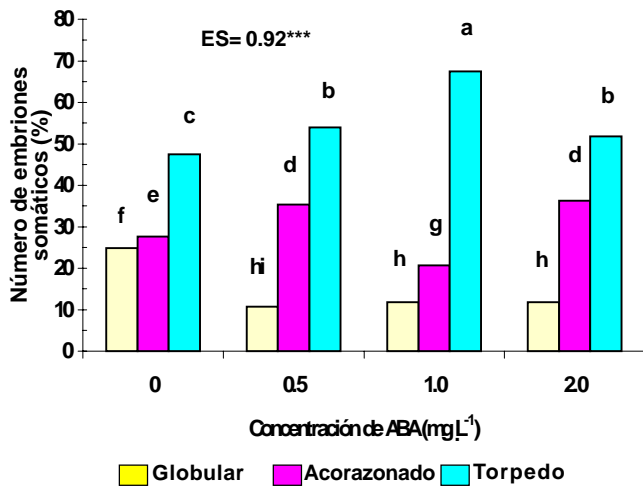
de combinarlo con otras fitohormonas (7). Numerosos autores señalan que una de las posibles causas que provocan la asincronía durante el proceso de embriogénesis somática es la formación de embriones secundarios, cuyo origen puede ser a partir del eje principal del embrión o en la zona del suspensor (8) y que este efecto podría contrarrestarse disminuyendo los niveles de auxinas en los medios de cultivo o suprimiéndolos completamente, ya que estos estimulan la división de las células embriogénicas que permanecen en estado de latencia en las paredes del eje principal o de las células del suspensor (9).



**Figura 1. Efecto del ABA sobre la producción de embriones totales**

Al analizar la cantidad de embriones en los diferentes estadios de desarrollo se observó, en todos los casos, que el valor más alto de embriones somáticos correspondió al estado torpedo, independientemente de la concentración de ABA utilizada, resultando 1 y 0.5 mg. L<sup>-1</sup> los niveles del compuesto que más favorecen este comportamiento con 67.5 y 54 % de ES, respectivamente en dicho estadio (Figura 2), que aunque difieren estadísticamente entre sí superan los valores alcanzados en el tratamiento testigo (47.5 %). Con estos tratamientos se logró mayor calidad del embrión, tanto en sincronía como en morfología, lo que coincide con lo señalado al aplicar diferentes niveles de ABA durante el desarrollo de embriones somáticos de caña de azúcar (10).

Cuando el medio de cultivo es enriquecido con 2 mg. L<sup>-1</sup> de ABA, se evidencia una disminución en el porcentaje de ES para el estado de torpedo, así como un incremento en el estado acorazonado; al parecer, con el empleo de esta dosis comienza a manifestarse una inhibición del proceso de maduración de los embriones, el cual es favorecido con los niveles inferiores (0.5 y 1 mg.L<sup>-1</sup>), lo que sugiere que el decremento de los embriones en estado torpedo puede deberse a un impedimento para su desarrollo en los estadios más tempranos.

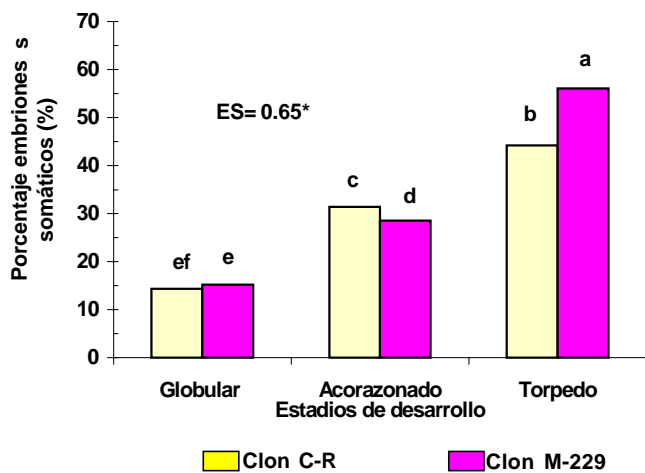


**Figura 2. Efecto del ABA en la producción de ES por estadio de desarrollo**

Se destaca la importancia del empleo del ABA durante el desarrollo del embrión somático, ya que entre otros aspectos desempeña un rol fundamental en la maduración de los embrioides y garantiza la tolerancia a la desecación, paso crítico para soportar los subsecuentes pasos de plantación (6, 11).

Los embriones somáticos en estado acorazonado alcanzaron valores entre 20.6 y 36.3 %, mientras que las cifras para el estado globular no rebasaron el 24.8 % de embriones.

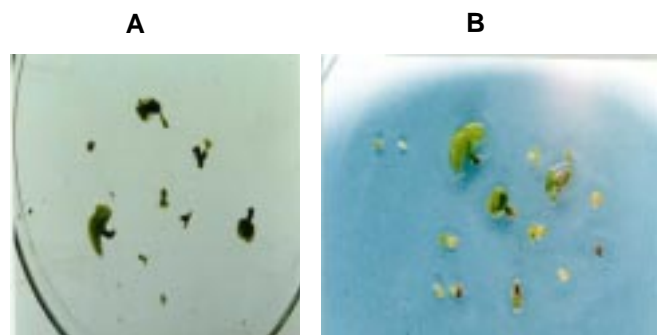
Los resultados alcanzados al estudiar la relación entre clon y estadio de desarrollo del embrión somático, en el medio enriquecido con 1 mg.L<sup>-1</sup> de ABA difieren estadísticamente (Figura 3), siendo estos resultados superiores en el clon M-229 para el estado de torpedo (56.1 %); sin embargo, en el clon C-R el mayor valor (31.4 %) se obtuvo para el estado acorazonado. Estas diferencias entre los clones pudieran atribuirse a la influencia de factores tanto fisiológicos como genéticos involucrados en el sistema.



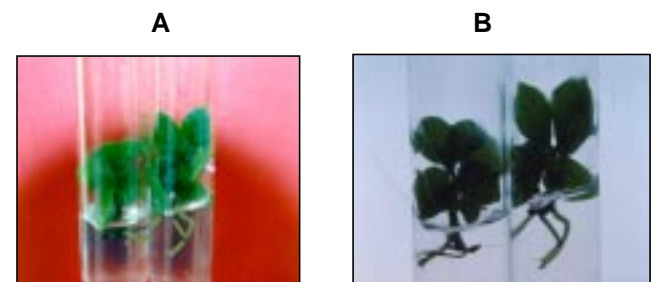
**Figura 3. Influencia del genotipo en la producción de ES por estadio de desarrollo**

La asincronía desde el punto de vista práctico resulta desventajosa por dos razones (12): primero, la no uniformidad inicial en cuanto a la edad de los embriones que podría reflejarse a lo largo de la vida *in vitro* de la población resultante y segundo, por la incertidumbre de dictaminar en un momento determinado si las células no diferenciadas son fallas o presentan retraso en la embriogénesis.

En la Foto 1, se puede apreciar la composición heterogénea de las poblaciones de embriones a partir de los clones C-R y M-229 después de doce semanas de cultivo en el medio MME carente de ABA; sin embargo, en la Foto 2, se observa cómo las vitroplantas procedentes de estos mismos materiales, cultivadas sobre el medio MME enriquecido con 1 mg.L<sup>-1</sup> de ABA y subcultivadas en el medio MDE, después de los tres meses de cultivo, presentan un desarrollo uniforme con cuatro o cinco pares de hojas verdaderas, adecuado vigor y coloración, así como buen desarrollo del sistema radical, sin mostrar diferencias notables entre sí, generalizándose este comportamiento para las vitroplantas evaluadas.



**Foto 1. Embriones somáticos procedentes de los clones C-R (A) y M-229 (B), caracterizados por una elevada asincronía**



**Foto 2. Plántulas obtenidas a partir de embriones somáticos de los clones C-R (A) y M-229 (B), con una adecuada uniformidad en su desarrollo después de ser tratadas con ABA**

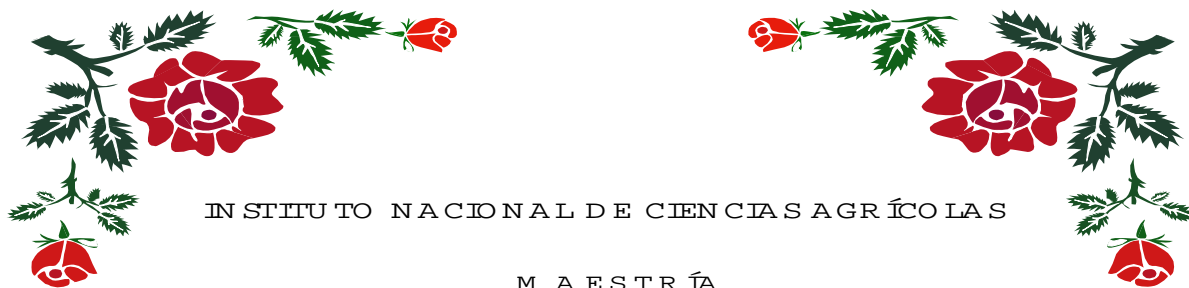
De lo antes expuesto se infiere la posibilidad de emplear el ABA, con el fin de disminuir el fenómeno de la asincronía que se manifiesta durante el proceso de embriogénesis somática en el café, dado su efecto en la inhibición precoz de los embriones somáticos, lo que permite la obtención de poblaciones más uniformes.

## REFERENCIAS

1. MINAGRI. Informe anual sobre el cultivo del café, Dirección Nacional de Café y Cacao, 1998, 19 p.
2. Zamarripa, A. Optimización de la embriogénesis somática de café Arabusta (*Coffea canephora* x *Coffea arabica* L.) a partir de una suspensión celular. *Agricultura Técnica en México*, 1994, vol. 20, no. 1, p. 27-41.
3. Santana, N. Establecimiento de una metodología para la producción de la semilla artificial del café (*Coffea* sp.). [Informe Anual Proyecto INCA-CICY], La Habana, 1998.
4. Nieves, N., et al. Efecto del ABA, el JA y la sacarosa sobre el nivel de compuestos nitrogenados en callos embriogénicos de caña de azúcar. En: Libro de Resúmenes. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal BioVeg-99. Ciego de Avila, 1999, 45 p.
5. Santana, N. Embriogénesis somática en el cultivo del caféto (*Coffea* sp.). [Tesis de Doctorado]. INCA. 1993.
6. Tetteroo, F., Hoekstra, F. y Karssen, C. Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota*) embryoids. *J. Plant Physiol.*, 1995, vol. 145, p. 349-356.
7. Neuenschwander, B. y Bauman, T. W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 1992, vol. 10, no. 12, p. 608-612.
8. Gavish, H.; Vardi, A. y Fluhr, R. Suppression of citrus somatic embryogenesis by glycosylated nucellar proteins. *Planta*, 1992, vol. 186, p. 511-517.
9. Nomura, K. y Komamine, A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 249-265.
10. Nieves, N., et al. Evaluación de la técnica de inmersión temporal en la histodiferenciación y germinación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). En Libro de Reportes Cortos. V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Santa Clara, 1999, 265 p.
11. Gutmann, M., et al. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany*, 1996, vol. 47, no. 305, p. 1905-1917.
12. González, M. Embriogénesis somática y respuesta a diferentes factores de cuatro clones seleccionados de la var. robusta (*Coffea canephora* P.) (Tesis de Maestría en Biología Vegetal), 1999.

Recibido: 29 de octubre de 1999

Aceptado: 10 de febrero del 2000



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

MAESTRÍA

### “Nutrición de plantas y biofertilizantes”

**Duración: 2 años**

**Fecha de comienzo: febrero**

**Precio: 5000.00 USD**

**Coordinador: Dr.C. Ramón Rivera Espinosa**

**Para más información diríjase a:**

**Dr.C. Walfredo Torres de la Noval**  
**Dirección de Educación y Relaciones Públicas**  
**Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas(INCA)**  
**Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,**  
**La Habana, Cuba CP 32700**  
**Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773**  
**Fax: (53)(64) 6-3867**  
**e-mail: posgrado@inca.edu.cu**

