

Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arabica* L. Variedad Catuaí Amarillo.

Eric Moncada, Maria Vielma y Argenis Mora

Resumen

En el presente trabajo se trató de optimizar la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L. variedad Catuaí Amarillo. Se utilizó el diseño San Cristóbal para establecer los tratamientos, pero no se usó en el análisis de los resultados debido a la diversidad morfológica en la respuesta de los mismos en el medio de inducción de callo y a la escasa respuesta en cuanto a número de tratamientos que produjeron embriones somáticos, en el medio de inducción de embriones somáticos. Se observó que un medio MS con 5.30 mg / l de BAP estimula el desarrollo de embriones somáticos. El BAP y el 2,4-D juntos promueven el desarrollo de callos con raíces y con potencial embriogénico; las concentraciones bajas de estos 2 reguladores de crecimiento inducen un mayor desarrollo de callos embriogénicos, Todos los tratamientos que formaron callos al ser llevados a un medio sin ANA y KNO₃ desarrollaron embriones somáticos pero en muy baja cantidad ; la adición de ANA y KNO₃ en concentraciones de 1 mg / l de ANA + 1.26 mg / l KNO₃, promovieron una mayor formación de embriones somáticos. Adicionalmente se logró la germinación de los embriones somáticos en un valor cercano al 50 % para la mayor parte de los tratamientos. Anormalidades como plántulas con una sola hoja cotiledonar, sin yema apical fue observada.

Introducción

El café es el producto agrícola mas importante en el mercado internacional Dublin (1991), debido a esto, numerosos estudios de cultivos *in vitro* han sido desarrollados con el fin de obtener un mejoramiento genético del mismo. Staritsky (1970) fue el primero en reportar el desarrollo de embriones somáticos en *Coffea canephora* Pierre a partir de tallos ortotrópicos. Posteriormente Sondahl and Sharp (1977) describieron un procedimiento para obtener un callo embriogénico de alta frecuencia a partir de explantes foliares de *Coffea arabica* (cv Bourbon). Sondahl et al (1979) demostraron que los embriones somáticos en café se originan de las células del mesófilo. Posteriores trabajos acerca de la inducción de embriones somáticos en café se han realizado (Dublin 1981, Pierson 1983, Yasuda 1985, García and Menéndez 1987, Hatanaka et al.1991, Neuenschwander and Bauman 1991, Bieysse et al, 1993, Menéndez and Nieto 1994, Menéndez and García 1997), pero los reportes acerca del uso de un diseño estadístico de superficie de respuesta en la optimización de la embriogénesis somática en café, son escasos.

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas estadístico-matemáticas, cuyo objetivo es el de determinar las mejores condiciones en que opera un proceso, para lograr un resultado

óptimo, lo que contribuye a un mayor conocimiento de la naturaleza del sistema de operación de dicho proceso. El objetivo del presente trabajo es determinar mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta y en particular del Diseño San Cristóbal (uno de los diseños incluidos dentro de esta metodología), las concentraciones óptimas de auxina, citokinina y KNO₃ para la inducción de embriones somáticos en *Coffea arabica* L. Variedad Catuaí Amarillo.

Materiales y Métodos

Material vegetal

A partir de plantas en condiciones de invernadero de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Amarillo, de 5 a 7 meses de edad fueron extraídos explantes foliares de 1 centímetro cuadrado de área, de los tres nudos superiores de la planta, los cuales no incluían ni nervadura central, ni lateral; los mismos fueron esterilizados con hipoclorito de sodio al 1 % + tween 20 (2 gotas), durante 20 minutos y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril 4 veces. Luego los explantes (100 por tratamiento y 8-9 por caja de petri) fueron sembrados en un medio de precultivo (medio I) y permanecieron allí durante 72 horas en un medio sólido con sales de Murashige and Skoog (1962) a la mitad de la fuerza ionica, sacarosa 3 % , agar 7,5 g / l.

Medio de inducción de callo

Para inducir la formación de un callo embriogénico (medio II), los explantes que mantuvieron una coloración verdosa en el medio de precultivo, se colocaron en un medio sólido similar al anterior (I), pero suplementado con mioinositol 100 mg/l, tiamina 10 mg/l, cisteína 35 mg/l, y los reguladores de crecimiento 6-benciladenina (BAP) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en las combinaciones y concentraciones indicadas en la tabla 1. El tejido fue transferido a un medio fresco cada 6 semanas.

Medio de inducción de embriones somáticos.

Para inducir la diferenciación de los embriones somáticos (medio III), después de 4 meses de cultivo, el callo fue transferido a un medio similar al de inducción de callo, pero con ANA y KNO₃; las concentraciones de los mismos se indica en la tabla 2. En todos los medios anteriores los tejidos fueron incubados a una temperatura de 26 °C +/- 1°C y en oscuridad.

Germinación de los embriones somáticos.

Los embriones somáticos diferenciados fueron transferidos a un medio de cultivo similar al de inducción de callo, pero con sacarosa 20 g/l y sin reguladores de crecimiento, con 16 horas de fotoperiodo. El pH de todos los medios fue ajustado a 5.6.

Las plántulas obtenidas fueron sembradas en arena estéril y cubiertas con un envase de plástico, el cual fue gradualmente eliminado. Se les suministro una solución hoagland con nitrógeno diluida a un cuarto, una vez por semana.

Diseño Estadístico San Cristóbal.

A partir de los valores codificados establecidos por el diseño estadístico se obtienen los valores de concentración a utilizar, tanto para la etapa de inducción de callo, como para la etapa de inducción de embriones somáticos.

Resultados

Como se observa en la tabla 3, todos los tratamientos formaron callo excepto el control; en términos de porcentaje todos los tratamiento excepto el control fueron iguales (100%), sin embargo los tratamientos III, IV, VI y VII formaron un callo muy vigoroso (Fig 1.a) y el II y V un callo poco vigoroso. El tratamiento V presentó un microcallo a partir del cual se originaron

embriones somáticos, en grupos que variaban de 2 a 5 embriones somáticos por callo y de 9 a 30 embriones por explante. También se originaron en menor cantidad embriones somáticos (no se realizó un conteo de los mismos) directamente del explante, al menos desde una observación externa del explante. En total, en el tratamiento V se formaron embriones somáticos en un 70% de los explantes y aparecieron entre los primeros 40-90 días de cultivo. (Fig 2.a, 2.b, 2.c, 2.d). Se observaron también algunos embriones callificados. Hay que aclarar que el porcentaje de embriones somáticos en el tratamiento V incluye los embriones que se formaron directamente del explante y los que se formaron a partir de callo.

Cultivo en el medio de inducción de embriones somáticos.

En la tabla N°4 se puede observar que el tratamiento III al ser llevado a un medio con 1 mg/l de ANA + 1.26 g/l de KNO₃, originó el mayor porcentaje de callos con embriones somáticos 57.6%, seguido del III - control, VI - control, IV control y VII control. Los restantes tratamientos con concentraciones de ANA menores de 1 mg/l y de KNO₃ mayores a 1.26 g/l no resultaron efectivas en la inducción de embriones somáticos.

Los primeros embriones somáticos aparecen alrededor de las 4-6 semanas de cultivo en el medio de inducción de embriones somáticos, algo similar se observa para el subcultivo (3-6 semanas) de los callos en todos los tratamientos. Los embriones somáticos se presentan como estructuras de aspecto globular de un color blanco, diferenciándose de la masa de callo, la cual presentó un color marrón oscuro.

Los embriones somáticos originados a partir de callos necróticos se formaron de manera sincronizada inicialmente (hasta el estado acorazonado), luego se perdió la sincronización a medida que el cultivo se desarrollaba; estos callos necróticos presentaron un aspecto compacto, estaban distribuidos de manera discontinua en toda la masa de callo (2-7 embriones por callo necrótico), inclusive, cerca de las raíces (Fig 3.e). En el tratamiento III (2.7 mg/l BAP + 0.3 mg/l 2,4-D) llevado a 1 mg/l ANA + 1.26 g/l KNO₃ se produjo después de 7 1/2 meses un número de embriones somáticos entre 145 y 183 embriones somáticos, esto no se presentó en el resto de los tratamientos, incluyendo el V. (Fig 3.f). En los restantes tratamientos que formaron embriones somáticos también se observó la aparición de un callo necrótico y de los embriones callificados. Estos últimos formaron un callo friable de color crema.

El callo necrótico fué el único que logro formar embriones somáticos de manera sincronizada (inicialmente), mientras que los embriones originados por callificación y embriogénesis secundaria lo hicieron de manera asincrónica todo el tiempo.

Discusión y Conclusiones

Medio de Induccion de Callo

Es necesario aclarar que el diseño estadístico San Cristóbal, no fue aplicado en la determinación de la concentración óptima de auxina y citocinina en la etapa de inducción de callo, debido a que en esta etapa se presentaron tratamientos que formaron callos de diferente vigorosidad, además se formaron raíces en 4 tratamientos y en otro tratamiento se observaron embriones somáticos, es decir la respuesta fue muy diversa, además se requiere de un estudio histológico que permita verificar que el callo con mejor desarrollo es el más embriogénico, es decir el diseño estadístico puede indicar que un tratamiento con ciertas concentraciones hormonales es el que produce el callo, de mayor desarrollo o mayor tamaño, pero esto no indica necesariamente que este callo sea el de mayor potencial embriogénico.

En los tratamientos III, IV, VI y VII, se obtuvo una respuesta organogénica (rizogénica) causada posiblemente por la conjunción de los siguientes factores : tipo de explante utilizado (sin nervadura central y lateral), nivel hormonal endógeno, tiempo de subcultivo (cada 6 semanas), la variedad utilizada (Catuaí Amarillo), presencia del 2,4 - D y tipo de citokinina empleada (bencilaminopurina).

Con respecto a estos dos últimos factores las concentración de 2,4-D de 1 mg / l , promueve altamente la formación de raíces, disminuyendo el efecto al disminuir la concentración de 2,4-D. La bencilaminopurina parece ser necesaria para el proceso de formación de raíces, pero no produce un efecto tan marcado como el 2,4 -D.

Aparte de los factores ya mencionados, otros como el estado fisiológico de la planta madre, el ambiente nutricional y el grado de manipulación de la variedad empleada, son parámetros importantes a considerar. Tran Than Van y Trin (1990) hacen énfasis en el hecho, de que el pasado de la planta madre es tan importante, como los componentes nutricionales, fitohormonales o ambientales aplicado al explante.

Por otra parte el tratamiento V requirió de la presencia de solo citokinina en el medio para la formación de embriones somáticos, algo similar a lo observado por

Yasuda et al, (1985), en explantes foliares de *Coffea arabica* L variedad Typica. La citocinina promueve la formación de embriones somáticos posiblemente por la síntesis de una sustancia inductora o por la eliminación de un inhibidor (SÖÖndhal et al, 1991). Yasuda et al, (1985), obtiene un callo que en cuanto a crecimiento y producción de embriones somáticos supera al reportado en este trabajo, esto posiblemente se debe a la concentración hormonal exógena de citocinina y a la endógena de auxina y citocinina, esta última por ejemplo en poaceas determina diferencias en las respuesta embriogénica de distintos genotipos (Wenck et al, 1988).

Inducción de embriones somáticos.

El cultivo de los callos formados en presencia de 2,4-D y BAP en el medio de inducción de embriones somáticos, parece haber afectado (disminuído) la tendencia rizogénica de los mismos y estimuló la formación de embriones somáticos. El tratamiento con menor tendencia organogénica después del segundo subcultivo (tratamiento III), presentó la mayor cantidad de embriones somáticos, en una concentración de 1 mg / l de ANA + 1.26 g / l KNO₃, seguido por el control . La concentración de ANA y KNO₃ que produjo la mejor tasa de embriogénesis somática, es similar a la descrita por Menendez and Nieto, 1994, quienes utilizan 1 mg / l de ANA + 0.95 de KNO₃, pero en el híbrido catimor.

Según lo señalado anteriormente, el callo formado en el tratamiento III es el más embriogénico, favorecido su desarrollo por las concentraciones bajas de 2,4 D y BAP.

La aparición de embriones somáticos en los controles permite inferir que el ANA y el KNO₃ no son necesarios para la producción de embriones somáticos en los tratamientos IV, VI y VII, sin embargo para el tratamiento III, el ANA y KNO₃, en concentraciones de 1 mg / l + 1.26 g / l respectivamente, promueven una mayor formación de embriones somáticos; en su ausencia los embriones también se forman pero en muy poco número. El ANA en concentraciones menores a 1 mg / l no parece favorecer la embriogénesis somática, al igual que el KNO₃ en concentraciones mayores a 1.26 g / l. La determinación de óptimos no se efectuó debido al escaso número de tratamientos que respondieron. En este caso es necesario indicar que el uso de un diseño estadístico con algunos tratamientos más, podría ser de mayor utilidad, ya que permitiría la obtención de un número más grande de tratamientos con respuesta, facilitando así la determinación del óptimo; otra posibilidad es usar un diseño que presente

tratamientos con valores de concentración de ANA y KNO₃, cercanos por ejemplo a 1 mg / l de ANA + 1.26 mg / l KNO₃ (el cual fue el mejor tratamiento), ya que el diseño San Cristóbal no planteó tratamientos, como el utilizado por Menéndez and Garcia, (1997), de 0.7 mg / l ANA + 0.9 g / l de KNO₃ (las sales inorgánicas a la mitad de la fuerza ionica), lo cual es una falla (al menos para este trabajo), propia de la codificación del diseño. Es necesario, entonces, realizar un estudio cuidadoso acerca del rango o intervalo de concentraciones descritas en la bibliografía, de manera de poder ajustar estos valores de concentración con un diseño acorde a los mismos.

La embriogénesis somática observada en los controles se podría catalogar como de baja frecuencia (ESBF) y la que produjo la mayor cantidad de embriones somáticos (la del tratamiento III llevado a 1 mg / l ANA + 1.26 g / l KNO₃), como de alta frecuencia (ESAF), en función del número de embriones por cultivo, ya que la aparición de un tejido embriogénico friable blanco que contiene estructuras globulares, característico de la ESAF (SÖÖndahl et al, 1991), no se observó, solo un callo friable producto de la callificación de los embriones somáticos. En este último caso, la embriogénesis secundaria y la aparición de nuevos callos necróticos, contribuyo a incrementar el número de embriones somáticos. En cuanto al callo necrótico, parece estar asociado con la embriogénesis somática autocontrolada o sincronizada y con procesos de senescencia los cuales no impiden la embriogénesis (Neuenschwander and Bauman, 1991). Con respecto a los embriones somáticos obtenidos en la ESAF del tratamiento III llevado a 1 mg / l ANA + 1.26 g / l KNO₃, el número es mucho menor (entre 145 y 183) en comparación con el descrito por Neuenschwander and Bauman, (1991), el cual es de más de 5000 embriones somáticos; las diferencias posiblemente se deben a las condiciones de cultivo y del medio de cultivo (el uso de kinetina y de un medio líquido para el cultivo de los callos embriogénicos) y a la variedad empleada (Catuai Rojo).

La presencia de embriones somáticos y raíces sobre un mismo callo, plantea una posibilidad interesante, la cual es que en los explantes utilizados presenten poblaciones celulares con "capacidad " para seguir dos vías morfogénicas diferentes; inducidas en un medio de concentraciones hormonales iguales (medio de inducción de callo), por ejemplo, en la masa de callo del tratamiento III se estarían presentando simultáneamente células con un patrón organogénico (rizogénico), las cuales formarían raíces tanto en el medio de inducción de callo como en el medio de inducción de embriones somáticos y

otras con un patrón embriogénico, estas últimas requerirían de el cambio a un medio con 1 mg / l de ANA + 1.26 g / l de KNO₃ para formar los embriones , En la bibliografía no se encontraron referencias de formación de raíces y embriones somáticos sobre un mismo callo en café, sin embargo no es extraño encontrar sistemas altamente regenerativos donde pueden aparecer varios tipos de respuestas (Lindsey and Gallois, 1989).

Germinación de los embriones somáticos.

El porcentaje de germinación obtenido en los tratamientos que produjeron embriones somáticos empleando dos medios diferentes (medio de inducción de callo y medio de inducción de embriones somáticos) y un solo medio fueron estadísticamente iguales.

En cuanto a la comparación con otros trabajos, Ducos, (1993), y Staritsky and Van Hassel, (1980) reportaron el 35 % y 40-60 %, respectivamente, de plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, producidos en medio liquido, resultados similares a los presentados en este trabajo (37 % y 52 % de germinación), pero en medio sólido ; otros autores como Neuenschwander and Bauman (1992) reportan un porcentaje más alto 94.5 % (medio líquido) y otros como Sondahl and Sharp (1977) reportan un menor porcentaje de germinación 29 % .

La ausencia de yema apical en las plantas con una sola hoja cotiledonar observadas en este trabajo (mayormente en el tratamiento V), puede ser debido a la formación de los embriones somáticos en corto tiempo (embriones inmaduros), originando anomalías como la ausencia de yema apical y baja reserva de proteínas (Boxtel and Berthouly , 1996). En especies como *Daucus carota* , el potencial para germinar y producir una planta por parte de un embrión somático, es adquirido cuando los meristemas de la raíz y el vástago se han formado, en otras especies como *Zea mays* , se requiere de la formación del escutelo y de un nivel adecuado de la proteína globulina para alcanzar la madurez embrional o al menos niveles comparables al de los embriones zigóticos maduros (Emons ,1994). Es necesario entonces, no solo la obtención de los embriones somáticos en grandes cantidades, sino además el adecuado estudio acerca de las condiciones que favorecen la germinación y el posterior desarrollo normal de los mismos en plantas.

Tabla 1. Combinación de tratamientos para la etapa de inducción de callo.

Número de Tratamiento	Valores de Concentración		Valores Codificados	
	2,4-D mg/l	BAP mg / l	2,4-D	BAP
I	0	0	0	0
II	0	5.30	0	2
III	0.7	0	2	0
IV	0.7	5.30	2	2
V	0.3	2.7	1	1
VI	0.3	8.0	1	3
VII	1.0	2.7	3	1

Tabla 2. Combinación de tratamientos para la etapa de inducción de embriones somáticos

Valores de concentración		Valores codificados	
ANA mg / l	KNO3 g / l	ANA mg / l	KNO3 g / l
0	0	0	0
0.7	0	2	0
0	2.52	0	2
0.7	2.52	2	2
0.3	1.26	1	1
1	1.26	1	3
0.3	3.8	3	1

Tabla 3. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales en la formación de callos y embriones somáticos a partir de segmentos foliares de *C. arabica* L. variedad Catuai amarillo.

Número de Tratamiento	Relación BAP / 2.4-D mg / l	% de Explantes que formaron callo	% de explantes que formaron embriones somáticos
I	0 / 0	0	0
II	0 / 0.7	*100	0
III	2.7 / 0.3	**100	0
IV	2.7 / 1.0	**100	0
V	5.30 / 0	*100	70***
VI	5.30 / 0.7	**100	0
VII	8 / 0.3	**100	0

* = significa un callo poco vigoroso.

** = callo muy vigoroso.

*** Es la suma de embriones somáticos obtenidos por vía directa e indirecta.

Tabla 4. Resultados del cultivo de callos en el medio de inducción de embriones somáticos.

Relación BAP / 2.4-D mg / l	Relación ANA / KNO2 mg / l / g / l	% de callos con embriones somáticos por tratamiento	Número promedio de embriones somáticos por tratamiento
2.7 / 0.3 (III)	1 / 1.26	57.6 a	109.769 a
2.7 / 0.3 (III)	0 / 0	38.4 b	25.69 b
2.7 / 1 (IV)	0 / 0	17.3 c	9.0 c
8 / 0.3 (VII)	0 / 0	18.2 c	6.30 c
5.3 / 0.7 (VI)	0 / 0	26.9 c	10.61 c

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales, al 95 % de confianza. Las letras entre paréntesis indican el número de tratamiento.

Tabla 5. Resultados del cultivo de embriones somáticos en el medio de germinación

Relación BAP / 2.4-D mg / l	Relación ANA / KNO3 mg / l / g / l	Porcentaje de Germinación
5.30 / 0 (V)	-	52.0
2.7 / 0.3 (III)	1 / 1.26	47.2
2.7 / 0.3 (III)	0 / 0	46.8
8 / 0.3 (VII)	0 / 0	40.3
2.7 / 1 (IV)	0 / 0	40.2
5.3 / 0.7 (VI)	0 / 0	37.5

No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos efectuando un análisis de varianza al 95 % de confianza.

Las letras entre parentesis indican el número de tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

- Bieysse D, Gofflet, A y Michaux -Ferriere N. (1993). Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. Canadian. Journal of Botany, 71 : 1496 - 1502
- Boxtel, J. and Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44 : 7 - 17.
- Dublin, P. (1981). Embryogenesis somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. Café Cacao The, 25 : 237-242.
- Dublin P. (1991). Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En : Roca M, Mroginski L. (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Colombia. pp. 584 - 586.
- Emons, A. M. C. (1994). Somatic embryogenesis : cell biological aspects. Act Bot. Neerl. 43 (1). pp. 1- 14
- Garcia, E. and Menéndez, A. (1987). Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor " . Café Cacao Thé XXXI : 15 - 22.
- Garza, A. (1988). Diseños para estimar superficies de respuesta. En : Diseños Experimentales Trillas, Mexico. pp. 329 - 404.
- Hatanaka T, Arakawa O. (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora* . Plant Cell Reports, 10 : 588 - 589.
- Lindsey, K and P, Gallois. (1989). Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Exp. Bot. 4 : 529- 536 .
- Menéndez, A. and Nieto, M. (1994). Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. Plant Cell Reports, 13 : 197 - 202.
- Menéndez , A. and Garcia, E. (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor ". Protoplasma, 199 : 208 - 214.
- Murashige, T. and Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant.,15 : 473.
- Neuenschwander, B. and Bauman, T. (1991). A novel type of somatic in *Coffea arabica*. Plant Cell Reports, 10 : 608 - 612.
- Pierson, E. S. Van Lammeren, A.M and Staritsky, G.(1983). In vitro development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora* Protoplasma, 115 : 208 - 216.
- Söndahl, M,R and Sharp, W ,R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z Pflanzenphysiol, 81 : 395 - 408.
- Söndahl, M. R , Spahlinger, D. A, and Sharp, W.R (1979). A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol, 94 : 101 - 108.
- Söndahl R , Nakamura T and Sharp R. (1991). Propagación in vitro de café. En : Roca M, Mroginski L. (eds) Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Colombia. pp. 622 - 640.
- Staritsky , G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. Act Bot .Neerl, 19 : 509 - 514.
- Tran Thanh Van, K. M and T, H Trin. 1990. Organogenic Differentiation. En :S. Bhojwani (De). Plant Tissue Culture: applications and limitations. Elsevier Science Publishers.B. V. Amsterdam. pp 44-53.
- Yasuda, T., Fuji, Y and Yamaguchi, T. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol,