

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD**

**REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* cv.  
Caturra y Catuaí) POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA  
A PARTIR DE SEGMENTOS DE HOJA**

**ANDRÉS GATICA ARIAS**

**CARTAGO, 2002**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* cv.  
Caturra y Catuaí) POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA  
A PARTIR DE SEGMENTOS DE HOJA**

**ANDRÉS GATICA ARIAS**

**CARTAGO, 2002**

**REGENERACIÓN DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* cv.  
Caturra y Catuai) POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA  
A PARTIR DE SEGMENTOS DE HOJA**

Informe Final de Práctica de Especialidad sometido a consideración ante la  
Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Andrés  
Gatica Arias como requisito parcial para optar al título de bachiller en  
Ingeniería en Biotecnología.

---

**M. Sc. Dora María Flores Mora**  
**Instituto Tecnológico de Costa Rica**  
**Asesora**

---

**M. Sc. Griselda Arrieta**  
**Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular**  
**Co- asesora**

---

**Dr. Víctor Jiménez García**  
**Centro de Investigación en Granos y Semillas**  
**Miembro del Tribunal**

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo general validar un sistema de inducción y regeneración *in vitro* de embriones utilizando la técnica de embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra y Catuaí) provenientes de vitroplantas y plantas de tres y doce meses de edad.

Las hojas procedentes de invernadero se sometieron a cuatro metodologías de desinfección, en las cuales se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y varios tiempos de inmersión en una solución bactericida (Agri-mycin) y funguicida (Benlate®). Para la inducción de la embriogénesis somática directa los explantes provenientes de las hojas del ápice y de la parte media de las vitroplantas y los explantes provenientes de la parte distal, medial y basal de las hojas procedentes de plantas de tres y doce meses de edad se cultivaron en el medio de inducción de embriones (CATIE descrito por Flores y Abdelnour, 2000), en el medio Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993) y en el medio Hatanaka *et al.* (1991). Los embriones somáticos en estado globular y torpedo de la variedad Caturra se cultivaron en el medio desarrollo de embriones (CATIE descrito por Flores y Abdelnour, 2000), Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993), Hatanaka *et al.* (1991) y el medio de germinación T5 (Solano, 2001).

En cuanto a las metodologías de desinfección evaluadas, el método más adecuado para la desinfección y control de los microorganismos contaminantes en las hojas provenientes de plantas de café mantenidas en el invernadero consistió en: aspersión de las plantas previo a la inoculación *in vitro* con una solución bactericida (Agri-mycin) y funguicida (Benlate®). Luego, los explantes se sumergieron en una solución de Agri-mycin y Benlate® por 60 minutos y por último en una solución de NaOCl al 1.6% y 1% por 30 y 5 minutos respectivamente. Los explantes provenientes de vitroplantas de Caturra y Catuaí y plantas de tres meses de edad de la variedad Caturra resultaron ser los mejores para la inducción de la embriogénesis somática directa. El medio de cultivo Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993) resultó el más indicado para inducir la embriogénesis somática. Los estudios histológicos permitieron evidenciar el proceso de embriogénesis somática directa. De los cuatro medios de cultivo evaluados para la germinación de los embriones, se obtuvo un mayor porcentaje de germinación al utilizar el medio Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993).

**Palabras claves:** café (*Coffea arabica* L.), Caturra, Catuaí, embriogénesis somática, regeneración *in vitro*.

## ABSTRACT

The main purpose of this investigation was to validate a system for *in vitro* embryo induction and regeneration using direct somatic embryogenesis from coffee leaf segments (*Coffea arabica* L. cv. Caturra and Catuaí) coming from vitroplants and three and twelve-month-old plants.

Young leaves from greenhouse plants were treated with four sterilization procedures, in which four different concentrations of sodium hypochlorite (NaOCl) were tested. Different immersion times in an Agri-mycin and Benlate® solution were also evaluated. For direct somatic embryogenesis induction, explants from apical and middle leaves of vitroplants were used. Explants from the distal, middle and basal parts of the three and twelve-month-old leaves were cultivated on the following culture media: CATIE embryo-induction (Flores y Abdelnour, 2000), Yasuda *et al.*, 1985 modified by Bieysse *et al.*, 1993 and Hatanaka *et al.*, 1991. Somatic embryos in globular and torpedo stage of the Caturra variety were cultivated on the following embryo development media: CATIE, Yasuda *et al.*, 1985 modified by Bieysse *et al.*, 1993, Hatanaka *et al.*, 1991 and the germination medium T5 (Solano, 2001).

Concerning to the evaluated disinfections procedures, the method that required atomization with a bactericide (Agri-mycin) and fungicide (Benlate®) solution, 60 minute immersion time of the explants in the bactericide-fungicide solution and 30 and 5 minutes immersion time in a solution of NaOCl 1.6 and 1% respectively resulted most effective for the control of contaminant microorganisms in the leaves from greenhouse coffee plants. The explants from Caturra and Catuaí vitroplants and three-month-old plants of the Caturra variety resulted best for direct somatic embryogenesis induction. The Yasuda *et al.*, (1985) culture media modified by Bieysse *et al.*, (1993) were the best for somatic embryogenesis induction. Histological studies allowed the detection of the process of direct somatic embryogenesis. The best germination percentage was obtained with the Yasuda *et al.*, 1985 medium modified by Bieysse *et al.*, 1993.

**Keywords:** direct somatic embryogenesis, coffee (*Coffea arabica* L.), Caturra, Catuaí, tissue culture.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>COFFEA ARABICA</i> .....</b>	<b>20</b>
<i>Origen y datos históricos.....</i>	<i>20</i>
<i>Botánica.....</i>	<i>20</i>
<b>TIPOS DE PROPAGACIÓN DEL CAFÉ .....</b>	<b>22</b>
<i>Propagación sexual .....</i>	<i>22</i>
<i>Propagación asexual .....</i>	<i>22</i>
<b>CULTIVO DE TEJIDOS EN CAFÉ .....</b>	<b>24</b>
<i>Microestacas .....</i>	<i>25</i>
<i>Embriogénesis somática.....</i>	<i>26</i>
<b>TÉCNICAS DE INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN CAFÉ.....</b>	<b>28</b>
<i>Embriogénesis somática directa descrita por Yasuda et al. (1985).....</i>	<i>28</i>
<i>Embriogénesis somática directa descrita por Hatanaka et al. (1991).....</i>	<i>28</i>
<i>Embriogénesis somática directa descrita en el CATIE .....</i>	<i>29</i>
<b>FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....</b>	<b>29</b>
<i>El explante.....</i>	<i>29</i>
<i>Medio de cultivo.....</i>	<i>30</i>
<i>Reguladores de crecimiento.....</i>	<i>31</i>
<i>Condiciones de cultivo.....</i>	<i>33</i>
<i>Genotipo .....</i>	<i>34</i>
<b>HISTOLOGÍA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CAFÉ .....</b>	<b>35</b>
<b>GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS .....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIAL EXPERIMENTAL .....</b>	<b>38</b>
<b>OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS FOLIARES .....</b>	<b>38</b>
<b>DESINFECCIÓN DE LAS HOJAS DE CAFÉ PROVENIENTES DEL INVERNADERO.....</b>	<b>39</b>
<b>DISECCIÓN DE LOS EXPLANTES .....</b>	<b>42</b>
<b>MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>43</b>
<b>CONDICIONES DE CULTIVO.....</b>	<b>43</b>
<b>TRATAMIENTOS .....</b>	<b>46</b>
<b>GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS .....</b>	<b>48</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>50</b>

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
MÉTODOS DE DESINFECCIÓN PARA PLANTAS DE INVERNADERO .....	51
EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN Y LA OXIDACIÓN EN LOS TRES PROTOCOLOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA .....	52
ESTADÍOS DE DESARROLLO EMBRIOGÉNICO .....	54
RESPUESTA A LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA .....	56
<i>Hojas de vitroplantas</i> .....	56
<i>Hojas provenientes de plantas de invernadero</i> .....	60
ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DEL PROCESO EMBRIOGÉNICO EN CAFÉ .....	65
GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES .....	68
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>70</b>
MÉTODOS DE DESINFECCIÓN PARA PLANTAS DE INVERNADERO .....	70
EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN Y LA OXIDACIÓN EN LOS TRES PROTOCOLOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA .....	71
ESTADÍOS DE DESARROLLO EMBRIOGÉNICO .....	72
RESPUESTA A LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA .....	73
ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL PROCESO EMBRIOGÉNICO EN CAFÉ .....	76
GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS .....	78
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
<b>LITERATURA CONSULTADA .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
ANEXO 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MEDIO BASE MURASHIGE Y SKOOG (1962) .	91
ANEXO 2. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.....	92

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del café. ....	21
Cuadro 2. Metodologías evaluadas para la desinfección de hojas de café ( <i>Coffea arabica</i> L.) provenientes de plantas mantenidas en el invernadero. ....	41
Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento utilizadas para la inducción de la embriogénesis somática directa y la regeneración de plantas a partir de segmentos de hoja de café ( <i>Coffea arabica</i> L.). ....	45
Cuadro 4. Nomenclatura asignada a los tratamientos a los que fueron sometidos los segmentos de hoja de café ( <i>Coffea arabica</i> L. cv. Caturra y Catuai). ....	47
Cuadro 5. Composición del medio de cultivo T5 para la germinación de embriones (Solano, 2001). ....	49
Cuadro 6. Embriones somáticos obtenidos a partir de explantes de vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> cv. Caturra en los tratamiento Ca1 a Ca6. Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a $P \leq 0.05$ (Prueba de Tukey's Studentized Range). ....	57
Cuadro 7. Embriones somáticos obtenidos a partir de explantes de vitroplantas de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai en los tratamiento Cat25 a Cat30. Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a $P \leq 0.05$ (Prueba de Tukey's Studentized Range). ....	59
Cuadro 8. Porcentaje de explantes de <i>Coffea arabica</i> cv. Caturra de doce meses de edad con embriones (Ca7 a Ca15). Las observaciones fueron realizadas después de 12 semanas de cultivo. ....	60
Cuadro 9. Embriones por explante de <i>Coffea arabica</i> cv. Caturra de tres meses de edad por tratamiento (Ca16 a Ca24). Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a $P \leq 0.05$ (Prueba de Tukey's Studentized Range). ....	61

Cuadro 10. Embriones por explante de *Coffea arabica* cv. Caturra de tres meses de edad por tratamiento (Ca16 a Ca24). Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey's Studentized Range). .....62

Cuadro 11. Porcentaje de explantes con embriones en *Coffea arabica* cv. Catuaí de doce meses de edad por tratamientos (Cat31 a Cat39). Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. ....64

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Plantas madres de café: **(a)** Brote de la planta indicando la posición de las hojas utilizadas; **(b)** Catuaí de doce meses de edad; **(c)** Caturra de tres meses de edad y **(d)** Vitroplantas..... 39
- Figura 2. Seccionamiento de la hoja de la primera y/o segunda posición en el brote de las plantas de café de tres y doce meses de edad. Tamaño del segmento de hoja 0.5 cm<sup>2</sup>. (Tomado de Ramírez y Salazar, 1998. Modificado por el autor)..... 42
- Figura 3. Explantes en los medios de cultivo para la inducción de la embriogénesis somática directa. .... 46
- Figura 4. Explantes *Coffea arabica* L. cv. Catuaí contaminados por bacteria, hongos y porcentaje de oxidación en las diferentes pruebas de desinfección al cabo de cinco días de cultivo. .... 53
- Figura 5. Explantes contaminados por bacteria, hongos y porcentaje de oxidación según procedencia al cabo de doce semanas de cultivo: **(a)** *Coffea arabica* cv. Caturra y **(b)** *Coffea arabica* cv. Catuaí..... 53
- Figura 6. Callo de cicatrización: **(a)** Callo de cicatrización en los tratamientos expuestos a la oscuridad (medio de Inducción de Embriones) (CATIE, Flores y Abdelnour, 2000), **(b)** Callo de cicatrización en los tratamientos expuestos a la luz (Medio Hatanaka *et al.*, 1991 y Medio Yasuda *et al.*, 1985) y **(c)** Oscurecimiento del callo de cicatrización y oxidación del explante en el medio de desarrollo de embriones. Las líneas muestran la diferencia en el grosor del callo de cicatrización. .... 55
- Figura 7. Embriogénesis somática directa: **(a)** Segmentos de hoja de café, **(b)** Callo de cicatrización formado en el borde de los explantes, **(c)** Embriones somáticos en estado globular formados en el callo de cicatrización, **(d)** Embriones somáticos en estado globular formados sobre heridas en el segmento de hoja, **(e)** Embriones somáticos en estado de torpedo, **(f)** y **(g)** Plántulas de café y **(h)** Aspecto morfológico de los explantes cultivados en los diferentes medios para la inducción de la embriogénesis somática directa después de doce semanas de cultivo..... 55

Figura 8. Embriones formados por explante en los diferentes tratamientos evaluados después de 12 semanas de cultivo **(a)** Explante: Hoja del ápice (Tratamientos Ca1-Ca2-Ca3) y **(b)** Explante: Hoja de la parte media (Tratamientos Ca4-Ca5- Ca6)..... 57

Figura 9. Embriones formados por explante en los diferentes tratamientos evaluados después de 12 semanas de cultivo: **(a)** Explante: Hoja del ápice (Tratamientos Cat25-Cat26- Cat27) y **(b)** Explante: Hoja de la parte media (Tratamientos Cat28- Cat29- Cat30). ..... 59

Figura 10. Promedio de embriones por explante de *Coffea arabica* cv. Caturra de tres meses de edad por tratamiento después de 12 semanas de cultivo en el medio correspondiente para la embriogénesis somática directa: Tratamientos Ca16-Ca17- Ca18 (Distal); Ca19-Ca20- Ca21 (Media) y Ca22- Ca23- Ca24 (Basal). ..... 63

Figura 11. Representación esquemática de las semanas transcurridas para la aparición de las estructuras embriogénicas en los diferentes tratamientos evaluados..... 65

Figura 12. Aspecto histológico del proceso de embriogénesis somática directa: **(a)** corte longitudinal de hoja de *Coffea arabica*; **(b)** corte longitudinal del callo de cicatrización; **(c)** y **(d)** células embriogénicas presentes en el tejido foliar de café; **(e)** embriones somáticos en estado globular (EG) y **(f)** embriones somáticos en estado de torpedo (ET). ..... 67

Figura 13. Embriones de la variedad Caturra germinados, al cabo de cuatro semanas de cultivo, en el medio de desarrollo de embriones (Flores y Abdelnour, 2000), medio de germinación T5 (Solano, 2001), medio Hatanaka *et al.*,(1991) y medio Yasuda *et al.*,(1985). ..... 69

## **Dedicatoria**

*A mis padres, quienes se preocuparon y me brindaron la valiosa oportunidad de concluir mis estudios universitarios.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor desea expresar su agradecimiento a las siguientes personas por sus aportes en el desarrollo de la presente práctica de especialidad.

A la Ph.D. Ana Mercedes Espinoza del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, por haber confiado en mí, por aceptarme en su grupo de trabajo y por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo.

A la M.Sc. Dora Flores Mora y a la M.Sc. Griselda Arrieta por aceptar ser mis asesoras, por los valiosos consejos que me brindaron durante la ejecución del presente trabajo.

Al Dr. Víctor Jiménez por las valiosas sugerencias al presente trabajo.

A la Técnica en Ciencias Médicas II María del Carmen Obando Jiménez por su colaboración en la realización de los cortes histológicos.

Al Lic. Edgardo Vargas de la Finca Santa Eduvigis por haberme facilitado las plantas de café utilizadas en el presente trabajo.

A todo el personal del Programa de Biotecnología del Arroz por su amistad, apoyo y colaboración.

A toda mi familia por su apoyo y comprensión durante la realización del presente trabajo.

## INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional y uno de los cultivos tropicales perennes con mayor área cultivada en el mundo, la cual comprende  $11.2 \times 10^6$  ha (Berthouly, 1997; Berthouly y Etienne, 1999; Carneiro, 1999). Según el Instituto del Café de Costa Rica (2001), la producción promedio mundial durante el período 2001-2002 fue igual a 114.97 millones de sacos de 60 kilogramos. En Costa Rica, el café ha sido uno de los principales productos agrícolas de exportación y en el año 2001 representó una entrada de divisas por un monto de 162.53 millones de dólares (PROCOMER, 2001).

Existen más de cien especies del género *Coffea*; pero desde el punto de vista comercial solamente *Coffea arabica* y *Coffea canephora* son importantes en el mercado internacional. El 75 % del café consumido en el mundo se obtiene de *Coffea arabica*, cultivada en su mayoría en América Latina, debido a la alta productividad y calidad de la bebida. La especie *Coffea canephora* se cultiva principalmente en Brasil, África y Asia, debido a su resistencia a la roya del cafeto y a su mejor adaptación al clima cálido y húmedo, tiene cierta importancia en el ámbito mundial y hoy en día constituye el 25 % del café exportado (Carneiro, 1997; Girón, 1998).

En Costa Rica predomina la siembra de cultivares de porte bajo y alta productividad, como Caturra y Catuaí, las cuales cubren más del 80 por ciento del área cafetalera nacional (ICAFE, 2001). La variedad Caturra es una mutación de la variedad Bourbon originaria de Minas Gerais, Brasil. Esta variedad se caracteriza por su alta producción y buena calidad de la bebida. La variedad Catuaí, producto del cruce entre Mundo Novo y Caturra, se caracteriza por un alto rendimiento por hectárea (Alvarado y Rojas, 1998;

Coffee Research Institute, 2001). Por otra parte, recientemente, se ha iniciado la siembra de la variedad CR-95 que es la última variedad liberada por el ICAFE (ICAFE, 2001).

La especie *C. arabica* al ser producida por autogamia posee una base genética estrecha y por ende es susceptible a diferentes plagas y enfermedades tales como la roya (*Hemileia vastatrix*), la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum*) y la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), mientras que la especie *C. canephora* es menos susceptible, debido a la gran variabilidad genética que presenta, por ser una especie alógama (Berthouly y Etienne, 1999).

El cultivo del café posee varias limitantes fitosanitarias, sin embargo, la que provoca mayor daño y repercusión económica es la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) (Le Pelley, 1968; Obando, 2002). En nuestro país el insecto apareció por primera vez en el año 2000 y en este momento afecta 60 fincas, ubicadas en el Valle Central.

La broca ataca directamente el fruto del café, en todas las fases del período de maduración (verde, maduro y sobremaduro). Por consiguiente, ocasiona importantes pérdidas en el rendimiento, sobre todo en la calidad del grano, del que se alimenta y utiliza como sitio de reproducción, desarrollo y refugio (Le Pelley, 1968). Debido a la disminución en el peso de los granos, a un aumento la cantidad de frutos vanos y a la caída de los frutos inmaduros, la broca puede dañar hasta un 80 por ciento de la producción y en algunos casos ocasionar pérdidas totales (López, 1994).

Una de las alternativas para el control de la mayoría de insectos plaga es el uso de variedades resistentes. Sin embargo, las variedades de *Coffea arabica* que se siembran en Costa Rica (Caturra, Catuaí y CR-95), así como el germoplasma que se siembra en América Tropical, incluidas las

variedades brasileñas de *Coffea canephora* son susceptibles a *Hypothenemus hampei* Ferrari.

En consecuencia debido al impacto económico que esta plaga ocasiona a la caficultura y a la economía del país, los sectores involucrados en la actividad cafetalera y las instituciones públicas de investigación han enfocado sus esfuerzos a la búsqueda de técnicas no convencionales de mejoramiento genético que permitan incorporar a las variedades comerciales y líneas élites de café genes de resistencia al insecto.

La ingeniería genética de plantas permite el aislamiento de genes de una especie e insertarlos en otra, superando así las barreras para la transferencia de genes entre especies, e inclusive entre reinos (Madriz, 2001; Elizondo, 2002).

Los procesos de transformación genética, ya sea a través de *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística o electroporación, requieren de protocolos de cultivo de tejidos eficientes que permitan obtener tejidos *in vitro* (suspensiones celulares, callos embriogénicos o embriones somáticos) aptos para la transformación genética, así como el mayor número posible de plantas a partir de los explantes transformados.

De ahí, la importancia de poner en práctica técnicas de cultivo de tejidos, como la embriogénesis somática, por medio de la cual se obtienen embriones perfectamente organizados a partir de células somáticas. Estos embriones presentan meristemas apicales y radicales, en polos opuestos en una misma estructura. Sus características morfológicas son idénticas a las encontradas en los embriones cigóticos (Denchev *et al.*, 1992; Abdelnour y Escalant, 1994; Solano, 2001).

## JUSTIFICACIÓN

Desde hace varios años las investigaciones en café se han orientado a la optimización, tanto de la embriogénesis somática directa como de la embriogénesis somática indirecta, como herramientas de micropropagación (Berthouly y Etienne, 1999; Solano, 2001).

En café, la regeneración *in vitro* por embriogénesis somática directa ha sido descrita por varios investigadores: Dublin (1981), Pierson *et al.* (1983), Yasuda *et al.* (1985), Hatanaka *et al.* (1991) y Fuentes-Cerda *et al.* (2001). Estos estudios evidenciaron la capacidad de esta especie para llevar a cabo embriogénesis somática directa y para el desarrollo de plántulas a partir de embriones somáticos; por lo tanto, la embriogénesis somática representa una alternativa interesante y económica para la multiplicación de plantas seleccionadas (Berthouly, 1997).

Por medio de la embriogénesis somática directa la cantidad de embriones obtenidos por explante cultivado es muy reducida, en comparación a la cantidad obtenida a través de la embriogénesis somática indirecta. No obstante, presenta la ventaja de reducir considerablemente la variación somaclonal, obteniéndose una mayor uniformidad genética. Además, permite reducir el tiempo necesario para la obtención de embriones somáticos (Molina y Figueroa, 1996; Vicient y Martínez, 1998; Berthouly y Etienne, 1999)

La inducción de la embriogénesis somática directa en café no solamente depende del genotipo de la especie, sino también de la composición del medio de cultivo y la calidad del explante (Bieysse *et al.*, 1993). Por lo que es necesario evaluar diferentes medios de cultivo, con el fin de determinar el protocolo que mejores resultados brinde.

A la hora de seleccionar una metodología es importante evaluar, no solamente el número de embriones somáticos obtenidos, sino el tiempo requerido para obtenerlos, así como la calidad de los mismos, es decir, la capacidad para germinar y crecer hasta formar una plántula.

Uno de los medios de mayor uso para la inducción de la embriogénesis somática directa en café es el medio Yasuda *et al.* (1985). Estos autores mencionan la obtención de embriones diferenciados 16 semanas después de haber colocado secciones de hojas de *Coffea arabica* en el medio. Posteriormente, Bieysse *et al.* (1993) redujeron ese tiempo a 10 semanas usando segmentos de hoja de vitroplantas de *Coffea arabica* en este mismo medio.

Otro de los protocolos que se han utilizado es el empleado en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (Flores y Abdelnour 2000). El cual consiste en cultivar los explantes en un medio de inducción de embriones por 4 semanas, seguido de un medio de desarrollo de embriones por 12 semanas.

Por otra parte, Hatanaka *et al.* (1991) obtuvieron buenos resultados en embriogénesis somática directa al cultivar secciones de hoja de café (*Coffea canephora* Pierre) en un medio de cultivo que solamente contenía 2-iP (N-isopentenil aminopurina) como regulador de crecimiento.

De acuerdo a lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo general validar el protocolo de inducción y regeneración *in vitro* de embriones utilizando la técnica de embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra y Catuai).

**Los objetivos específicos fueron:**

- Recibir capacitación en la técnica de embriogénesis somática directa en café.
- Establecer una metodología eficiente para la desinfección de hojas de café provenientes de invernadero.
- Determinar el potencial embriogénico de tres tipos de explantes en las variedades Caturra y Catuaí en tres protocolos descritos para la inducción y regeneración *in vitro* de embriones somáticos.
- Evidenciar por medio de estudios histológicos el tipo de embriogénesis somática.
- Determinar el medio de cultivo adecuado para la germinación de los embriones somáticos. Implementar la técnica de embriogénesis somática directa de café en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM, UCR).

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Características generales de *Coffea arabica*

#### Origen y datos históricos

El café arábico (*Coffea arabica* L.) tiene su origen en las tierras altas (de más 1000 m.s.n.m.) de Etiopía y Sudán, en África (León, 2000).

En los años 575 y 890, los invasores persas y árabes lo llevaron a Arabia y a Yemen, mientras que los nativos africanos extendieron su cultivo a Mozambique y Madagascar. De aquí, los holandeses y los portugueses lo trasladaron a Ceylán, posteriormente a Java y a la India, así como a otras regiones de Asia y África (Alvarado y Rojas, 1998). Semillas procedentes de Java y cultivadas en jardines botánicos de Ámsterdam y París proporcionaron el material de siembra para Surinam y las Antillas Francesas, de donde su cultivo se expandió al resto de América Tropical (León, 2000).

En 1727 fue introducido a Sumatra, Brasil, luego pasó a Perú y Paraguay y, en 1825 a Hawai (Alvarado y Rojas, 1998). Luego, se extendió a Puerto Rico y El Salvador en 1740, a Guatemala en 1750, a Bolivia, Ecuador y Panamá en 1784. Se cree que el café llegó a Costa Rica por los años 1796 y 1798 procedente de Cuba y Guatemala (Instituto del Café de Costa Rica, 1998 citado por Solano, 2001).

#### Botánica

El género *Coffea* fue propuesto en 1735 por Linnaeus, quien también describió la especie *Coffea arabica* en 1753 (Sondahl y Lauritis, 1992 citado por Solano, 2001). El café pertenece a la familia *Rubiaceae*, en la cual se

han identificado dos géneros: *Coffea* y *Psilanthus*. El género *Coffea* incluye aproximadamente cien especies, no obstante, cuatro de estas se mencionan como cultivadas comercialmente, destacándose las dos primeras según el siguiente orden: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* y *C. dewevrei* (Alvarado y Rojas, 1998; León, 2000) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del café.

<b>Taxonomía</b>	<b>Nombre</b>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliata</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Especie (s)	<i>arabica, canephora, liberica, dewevrei</i>

Fuente: Alvarado y Rojas (1998).

El café es una planta provista de un eje central, el cual presenta en su extremo una parte meristemática en crecimiento permanente que da lugar a la formación de nudos y entrenudos. El porte del café, caracterizado por el dimorfismo de ejes, consiste de un eje vertical (ortotrópico) del que salen ejes laterales o plagiotrópicos. Las ramas laterales se alargan en forma permanente, lo que, sumado al crecimiento vertical, le dan una apariencia piramidal a la planta. Las ramas primarias o bandolas son aquellas que condicionan el crecimiento lateral del café. En tanto que, las ramas ortotrópicas permiten el crecimiento vertical de las plantas y solamente producen yemas vegetativas, pero nunca flores (Girón, 1998; León, 2000).

## **Tipos de propagación del café**

### **Propagación sexual**

En la naturaleza, el café se reproduce por semillas (Coste, 1968). En *Coffea arabica*, después de un proceso de selección relativamente largo, unos veinte años como mínimo, las variedades comerciales son propagadas por semillas. Esta selección permite obtener una variedad generalmente estable y homocigótica para los caracteres buscados (Etienne *et al.*, 1999).

En *Coffea canephora*, planta alógama, la reproducción por vía sexual, da lugar a una recombinación de genes y por ende individuos diferentes a los dos padres (Etienne *et al.*, 1999).

### **Propagación asexual**

Para multiplicar cultivos con buenas cualidades agronómicas, se han utilizado métodos de multiplicación vegetativa, que permiten la multiplicación idéntica o clonación del material a gran escala (Etienne *et al.*, 1999; Solano, 2001).

La multiplicación vegetativa juega un papel importante en especies perennes como el café, el cual puede ser propagado vegetativamente por medio de estacas o injerto (Coste, 1968; Solano, 2001). El injerto es una práctica utilizada fundamentalmente con miras a mejorar el crecimiento de ciertas especies y de ciertos híbridos o para reducir la duración de las generaciones. El injerto de *Coffea arabica* en *Coffea canephora* es una práctica muy utilizada para controlar nemátodos (Berthouly, 1997).

Las técnicas de injerto utilizadas son muy clásicas: injerto de púa por rajadura e injerto por aproximación (Coste, 1968; Cambrony, 1989). Couturon y Berthaud (1979) establecieron la técnica de injerto de embriones de café,

cuya importancia radica en la recuperación de material que no se hubiera podido salvar en condiciones normales de germinación. Además, esta técnica permite el desarrollo de híbridos entre especies de café genéticamente apartados (Berthouly, 1997).

La reproducción por estacas es una práctica hortícola muy empleada en *Coffea canephora*, especie alógama, debido a la imposibilidad de reproducción uniforme por vía sexual (Solano, 2001). En la multiplicación vegetativa del café por estacas, se pueden utilizar solamente tallos ortotrópicos, esto debido al dimorfismo vegetativo. Si se llegara a utilizar estacas plagiotrópicos se obtendría un cafeto de porte rastrero y compacto, sin interés práctico (Coste, 1968; León, 2000).

El número de estacas ortotrópicas que puede producir una planta de café es limitado y en el caso de una multiplicación a gran escala, esto puede conducir a lapsos de tiempo considerables entre la creación de una variedad y su posterior difusión. Además, la reproducción por estacas exige la instalación de jardines clonales, lo que implica diversos problemas, entre ellos el mantenimiento de las superficies utilizadas (Berthouly, 1997).

En tal sentido, el desarrollo de las técnicas de multiplicación *in vitro* ha revolucionado la multiplicación vegetal, ya que permite obtener plantas genéticamente mejoradas en gran cantidad, con gran rendimiento y se espera que a bajo costo (Solano, 2001).

## **Cultivo de tejidos en café**

El cultivo de tejidos se define como el conjunto de técnicas que permiten cultivar un explante con potencial de diferenciación en un medio de cultivo de composición química definida, bajo condiciones de asepsia y bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991; Abdelnour y Escalant, 1994).

Una buena herramienta para agilizar los trabajos de mejoramiento genético del café es el uso de técnicas de reproducción asexual, tal como el cultivo de tejidos, el cual permite multiplicar genotipos élite en forma masiva y en un tiempo relativamente corto (Solano,2001).

A partir del trabajo pionero de Staritsky (1970), quien indujo con éxito la embriogénesis somática en *Coffea canephora*, se han descrito varias técnicas aplicadas al cultivo *in vitro* del café, tales como el cultivo de meristemos, embriones cigóticos, anteras o polen, suspensiones celulares y el cultivo de protoplastos (Carneiro,1999).

Las técnicas de cultivo de tejidos son utilizadas en café principalmente con dos fines: i) recortar el ciclo de selección para *Coffea arabica* L. por medio de la micropropagación de híbridos y por la utilización de plantas haploides y ii) multiplicar rápidamente los genotipos de *Coffea canephora* en las regiones en donde la multiplicación por esquejes presenta problemas, o bien, para acelerar la instalación de jardines clonales (Berthouly, 1997).

La multiplicación vegetativa del café utilizando las técnicas de cultivo *in vitro* se puede llevar a cabo por dos vías: las microestacas y la embriogénesis somática (Berthouly, 1997).

## Microestacas

La técnica de microestacas del cafeto fue desarrollada separadamente por Dublin en 1980 y en 1984 y por Custer en 1980 (Berthouly, 1997; Etienne *et al.*, 1999). La propagación *in vitro* por microestacas, consiste en el cultivo de un nudo o entrenudo proveniente del vástago de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán, a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas, idénticas, en principio, a la planta madre (García y Rafael, 1989; Solano, 2001).

Según Etienne *et al.* (1999) esta técnica comprende tres fases: i) instalación del material vegetal *in vitro*, seguida de la obtención de microtallos provenientes de la inducción de yemas axilares; ii) multiplicación de los microtallos y iii) enraizamiento *in vitro* de los microtallos y su aclimatación a condiciones de invernadero.

La principal ventaja de esta técnica es la garantía de una propagación genéticamente idéntica a la planta madre (Juma *et al.*, 1994; Solano, 2001). Sin embargo, esta técnica sigue siendo una metodología costosa ya que tiene una manipulación muy alta, además, que ofrece una tasa de multiplicación limitada (Etienne *et al.*, 1999).

La alta contaminación por bacterias y hongos y la oxidación fenólica que se manifiesta mediante la aparición de un color café en el medio de cultivo, en el cual se encuentran sembrados los explantes, representan problemas importantes que se presentan al utilizar la técnica de microestacas como metodología de propagación (Girón, 1998).

Por estos motivos desde hace varios años las investigaciones se orientaron básicamente hacia el uso de la embriogénesis somática como herramienta de micropropagación (Berthouly y Etienne, 1999; Solano, 2001).

## **Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es la más clara expresión del fenómeno de totipotencia celular enunciado por Haberland en 1902 (Etienne *et al.*, 1999; Solano, 2001). La totipotencia, es la capacidad de las células vegetales para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico a la célula madre (Berthouly, 1997)

La embriogénesis somática es un proceso biológico por medio del cual se obtienen embriones perfectamente organizados a partir de células somáticas. Estos embriones somáticos se desarrollan al pasar por las fases (globular, torpedo y cotiledonar en dicotiledóneas) idénticas a las del embrión cigótico (Ammirato, 1983). Los embriones somáticos presentan una estructura bipolar, con meristemas apicales y radicales en extremos de un mismo eje, en los cuales las características morfológicas son idénticas a las encontradas en los embriones cigóticos (Denchev *et al.*, 1992; Abdelnour y Escalant, 1994; Solano, 2001). Además, los embriones somáticos se caracterizan por no presentar conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991).

De manera general, la embriogénesis somática puede obtenerse por medio de dos estrategias: (i) una, denominada embriogénesis somática directa o embriogénesis somática de baja frecuencia y (ii) la otra, conocida como embriogénesis somática indirecta o embriogénesis somática de alta frecuencia.

Por medio de la *embriogénesis somática directa o de baja frecuencia*, se obtienen embriones directamente a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo. Esto ocurre, por ejemplo, con las células epidérmicas del hipocótilo en la zanahoria silvestre y en *Ranunculus sceleratus* (Sondahl *et al.*, 1991; Denchev *et al.*, 1992; Berthouly y Etienne, 1999; Quiroz- Figueroa *et al.*, 2002b).

En la embriogénesis somática directa, las células embriogénicas están presentes y lo único que se requiere para la formación de los embriones somáticos, es la presencia de una sustancia inductora o la eliminación de una sustancia inhibidora, para que estas células reanuden su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico (Sondahl *et al.*, 1991; Quiroz- Figueroa, 2002b).

Esta estrategia se caracteriza por permitir, después de 13-15 semanas de cultivo en el medio de inducción, la obtención rápida de embriones somáticos bien constituidos (Etienne *et al.*, 1999). La cantidad de embriones somáticos obtenidos por explante cultivado, de 1 a 10, es limitada en comparación a la cantidad obtenida a través de la embriogénesis somática indirecta (Berthouly, 1997). No obstante, presenta la ventaja de reducir considerablemente la variación somaclonal, obteniéndose una mayor uniformidad genética (Molina y Figueroa, 1996; Vicient y Martínez, 1998; Berthouly y Etienne, 1999)

*La embriogénesis somática indirecta o de alta frecuencia*, permite la obtención de embriones a partir de callos, mediante el uso de dos medios de cultivo, uno de inducción de un callo embriogénico y otro para la regeneración de los embriones (Denchev *et al.*, 1992; Berthouly y Etienne, 1999).

## **Técnicas de inducción de la embriogénesis somática directa en café**

### **Embriogénesis somática directa descrita por Yasuda *et al.* (1985).**

Uno de los medios de mayor uso para la inducción de la embriogénesis somática directa en café es el medio descrito por Yasuda *et al.* (1985), el cual está complementado con benziladenina (BA) como único regulador de crecimiento. Estos investigadores indican la aparición de un callo blanco friable en el borde de los explantes 16 semanas después de la incubación de los explantes (segmentos de hoja de *Coffea arabica* L.). Cuatro semanas después de la aparición del callo encontraron tejidos globulares y embriones somáticos diferenciados sobre la superficie del callo.

El desarrollo de los embriones somáticos obtenidos se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo o en ausencia de reguladores de crecimiento. Una vez que las plantas alcanzaron una altura de 3 a 5 cm se consideraron listas para su aclimatación.

Sin embargo, Bieysse *et al.* (1993) al sustituir el agar por el gelrite en el medio de cultivo descrito por Yasuda *et al.* (1985), obtuvieron embriones después de 10 semanas de haber colocado segmentos de hoja de vitroplantas de *Coffea arabica* en este medio.

### **Embriogénesis somática directa descrita por Hatanaka *et al.* (1991)**

Hatanaka y colaboradores (1991) reportaron un método simple, fácil y rápido para la inducción de la embriogénesis somática directa en *Coffea canephora* Pierre. Estos investigadores mencionan la obtención de embriones diferenciados, 8 semanas después de cultivar secciones de hoja en un medio de cultivo que solamente contenía 2-iP (N-isopentenil aminopurina) como regulador de crecimiento.

El desarrollo de los embriones somáticos obtenidos en este ensayo se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo y una vez que las plantas alcanzaron una altura de 3 a 4 cm se consideraron listas para su aclimatación.

### **Embriogénesis somática directa descrita en el CATIE**

El personal del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) desarrolló un sistema para la inducción de la embriogénesis somática directa en café. Dicho sistema consiste en el uso de dos medios de cultivo en sucesión, uno de ellos para la inducción de embriones (4 semanas), seguido de un medio para el desarrollo de embriones (12 semanas) (Flores y Abdelnour, 2000).

### **Factores que afectan la embriogénesis somática**

La formación de los embriones somáticos, ya sea mediante embriogénesis somática directa o embriogénesis somática indirecta, parece ser el resultado de una interacción muy estrecha entre diversos factores, dentro de los cuales se pueden mencionar: el explante, el medio de cultivo, las condiciones de cultivo, los reguladores de crecimiento y el genotipo (Berthouly, 1997).

#### **El explante**

Se denomina explante a la parte de un tejido u órgano que se aísla del resto de la planta y que se utiliza como material inicial para el cultivo *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991)

Prácticamente, cualquier parte de la planta puede ser cultivada *in vitro* y ser utilizada para regenerar una planta. Sin embargo, la elección del explante apropiado es de gran importancia para la exitosa regeneración de

plantas. La respuesta morfológica de los explantes cultivados *in vitro* varía notablemente de acuerdo con el estado de desarrollo y edad ontogénica de la planta madre (Mroginsky y Roca, 1991; Tisserat, 1991).

La embriogénesis somática en café puede ser inducida a partir de diferentes partes de la planta, tales como: tallos, hojas, óvulos, anteras y protoplastos (Berthouly, 1997; Etienne *et al.*, 1999). Las hojas, por su gran disponibilidad y fácil desinfección, representan los mejores explantes para la inducción de la embriogénesis somática en café (Dublin, 1991).

### **Medio de cultivo**

La composición del medio de cultivo juega un papel importante en la morfogénesis *in vitro* (Tisserat, 1991). Se han desarrollado una gran cantidad de fórmulas para la regeneración de plantas por medio de la embriogénesis somática, sin embargo, generalmente en café, como en la mayoría de las especies, se ha utilizado el medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog (1962) o las modificaciones de esta formulación (Litz y Jarret, 1991; Tisserat, 1991).

Se ha comprobado que varios componentes del medio de cultivo estimulan la embriogénesis somática. Así, el hierro es esencial para el desarrollo de los embriones somáticos. Por otro lado, el nitrógeno, suministrado como ión

amonio, nitrato, glutamina, alanina, caseína hidrolizada, es esencial para la iniciación y maduración de los embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991; Berthouly, 1997)

Fuentes-Cerda y colaboradores (2001) al modificar la concentración de nitrato/ amonio del medio de cultivo descrito por Yasuda *et al.* (1985) evaluaron el efecto del nitrógeno total en la embriogénesis somática directa en *Coffea arabica*. Estos autores demostraron que al aumentar la concentración total de nitrógeno la respuesta a la embriogénesis somática disminuye, mientras que, al disminuir la concentración total de nitrógeno el potencial embriogénico de *Coffea arabica* incrementa.

Fuentes y colaboradores (2000) estudiaron el efecto del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) sobre la inducción de la embriogénesis somática en cinco genotipos de *Coffea canephora*. Ellos demostraron que a concentraciones de 30-60  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  la producción de embriones se incrementa en los genotipos evaluados, mientras, que concentraciones mayores tienen un efecto negativo sobre la capacidad de regeneración de los embriones.

Dentro de las fuentes de carbono, la sacarosa es la más eficaz para la inducción de la embriogénesis somática, aunque otros azúcares, como la maltosa han mostrado efectos favorables en *Daucus carota* y *Glycine max* (Berthouly, 1997). Fuentes y colaboradores (2000) demostraron que en *Coffea canephora* la respuesta a la inducción de la embriogénesis somática al sustituir sacarosa por maltosa, glucosa y fructuosa difiere según el genotipo utilizado.

### **Reguladores de crecimiento**

El proceso de embriogénesis somática se inicia muy a menudo en un medio de cultivo rico en auxinas, principalmente el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido indolacético (AIA). Otras auxinas como el ácido naftalenacético (ANA), el picloram, el ácido paraclorofenoxiacético y el ácido 2-benzothiazol acético han demostrado ser bastante efectivas (Litz y Jarret, 1991). González y colaboradores (1999) observaron que al adicionar

picloram al medio de cultivo se favoreció notablemente la formación de callo embriogénico de alta frecuencia en *Coffea canephora*. Por el contrario, Hatanaka y colaboradores (1991) demostraron que el ANA, el AIA, el 2,4-D y el ácido indolbutírico (AIB) inhiben la embriogénesis somática en *Coffea canephora*.

Por otra parte, las citocininas juegan un papel importante en la maduración de los embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991; Berthouly, 1997). Dentro de las citocininas, se menciona que la bencilaminopurina (BAP) tiene cierta influencia en la embriogénesis somática de *Coffea arabica* y del híbrido Arabusta (Dublin, 1981; Yasuda *et al.*, 1985). Mientras que la citocinina 2-iP tiene efectos positivos sobre la embriogénesis somática de *Coffea canephora* (Hatanaka *et al.*, 1991)

También, se han utilizado inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA), el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anormalidades en el desarrollo y la germinación precoz (Litz y Jarret, 1991). Aunque el ABA juega un papel importante en la maduración y germinación de los embriones somáticos de especies como *Glycine max*, *Picea abies* y *Hevea brasiliensis* (Berthouly, 1997). También, Girón (1998) observó un efecto positivo del ABA en la germinación y maduración de embriones somáticos de café.

El ácido giberélico se ha incorporado al medio de cultivo, con el fin de ayudar a la maduración y germinación de embriones somáticos de algunas especies, como *Panicum maximun*, *Santalum album* y *Citrus sinensis* (Litz y Jarret, 1991).

Estudios han demostrado que el uso de poliaminas tales como la espermina, la putrescina y la espermidina está relacionado con el control de la embriogénesis somática en *Daucus carota* (Litz y Jarret, 1991).

Calheiros y colaboradores (1994) estudiaron el efecto de la espermina, la putrescina y la espermidina sobre la embriogénesis somática directa de *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Estos autores demostraron que la aplicación de poliaminas exógenas inhiben el proceso de la embriogénesis somática directa en café.

### **Condiciones de cultivo**

Las condiciones de cultivo también juegan un papel importante en la inducción de la embriogénesis somática. El medio gaseoso en los frascos de cultivo ejerce cierta influencia sobre el proceso embriogénico (Rodríguez-Barbon y Preil, 1999).

Así, en especies como *Daucus carota* y *Triticum aestivum* las bajas concentraciones de oxígeno disuelto favorecen la embriogénesis somática (Berthouly, 1997). Mientras, que en *Coffea arabica* cv. Caturra rojo a medida que aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> hasta 5% se favorece la embriogénesis somática. Con una concentración en la mezcla gaseosa de 10% de CO<sub>2</sub> se observa una inhibición del proceso embriogénico (Rodríguez-Barbon y Preil, 1999).

Con frecuencia se menciona el efecto negativo del etileno sobre la embriogénesis somática. En *Citrus reticulata* y *Daucus carota* el etileno inhibe la iniciación de los embriones somáticos (Berthouly, 1997). Por el contrario, Hatanaka y colaboradores (1995) demostraron que al eliminar el etileno por medio de iones Co<sup>2+</sup> y Ag<sup>+</sup> se inhibe la formación de embriones a partir de discos de hoja de *Coffea canephora*.

Factores como la luminosidad y la temperatura también tienen efectos sobre la embriogénesis somática. Una alta intensidad lumínica ha sido esencial para inducir la embriogénesis somática en *Nicotiana tabacum*, aunque en *Daucus carota* y *Carum* sp. fue necesaria la oscuridad para el desarrollo y maduración normal de los embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991).

En café, la embriogénesis somática se obtiene en luz continua, en oscuridad continua o en un régimen de luz-oscuridad. Van Boxtel y Berthouly (1996) demostraron que una alta intensidad lumínica ( $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inhibe el crecimiento del callo embriogénico de *Coffea canephora* clon T3561-2.1 en comparación una baja intensidad lumínica ( $3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Mientras que una disminución en la temperatura de 1 a 2 ° C en la etapa de diferenciación de los embriones somáticos, favorece la embriogénesis somática (Dublin, 1991).

### **Genotipo**

En café y en las demás especies el grado de éxito de la embriogénesis somática varía según los genotipos cultivados (Sondahl *et al*, 1991). Berthouly y Etienne (1999) al inducir callos embriogénicos en café, observaron un efecto del genotipo entre las especies *arabica* y *canephora* y entre las variedades de cada una de estas. Estos mismos autores indican que el efecto es limitado pues las condiciones de cultivo permiten la respuesta de casi la totalidad de los genotipos. Por otro lado, Bieysse y colaboradores (1993) realizaron una investigación para inducir la embriogénesis somática con ocho genotipos de *Coffea arabica*, pero solamente cuatro de ellos respondieron positivamente a la embriogénesis somática.

De igual manera, Etienne *et al* (1997) al evaluar en varias familias de híbridos F1 de *Coffea arabica*, la respuesta a la inducción de callo embriogénico, encontraron que los niveles de reactividad son diferentes entre familias pero son bastantes homogéneos entre los individuos de una misma familia. Torres (2000) obtuvo diferencias importantes en la respuesta embriogénica al comparar híbridos (CR-95 x ET5, T-5296 x ET6, Caturra x E531) y variedades (CR-95, Caturra y T-5296) en cuanto a la frecuencia y al tipo de embriogénesis. Así, las variedades presentan principalmente embriogénesis de alta frecuencia, mientras que los híbridos presentan embriogénesis de alta frecuencia y embriogénesis de baja frecuencia.

### **Histología de la embriogénesis somática en café**

La embriogénesis somática en café puede ocurrir por la vía indirecta como por la vía directa. Según, Torres (2000) y Quiroz- Figueroa *et al.* (2002b), la embriogénesis somática indirecta de *Coffea arabica* ha sido evidenciada histológicamente por Sondahl *et al.* (1979), Michaux- Ferriere *et al.* (1989), Berthouly y Michaux- Ferriere (1996) y Menéndez- Yuffá y García (1996) Mientras que estudios histológicos llevados a cabo por Bieysse *et al.*, (1993), Loyola- Vargas *et al.* (1999) y Quiroz- Figueroa *et al.* (2002b) han evidenciado el desarrollo de embriones somáticos a partir de una sola célula.

Loyola- Vargas *et al* (1999) indican que los proembriones se originan de las células de mesófilo o de las células epidérmicas. Quiroz- Figueroa *et al.* (2002b) observaron que en la embriogénesis somática directa, las regiones embriogénicas se forman a partir de las células más mitóticas de la capa de células subepidérmicas, a través de la rápida división y proliferación celular. Estos autores no observaron la formación de embriones somáticos a partir de la proliferación de células ubicadas en lo más interno del mesófilo. Ellos indican que los embriones somáticos se originan a partir de una célula

pequeña e isodiamétrica con un citoplasma denso, la cual sufre una serie de divisiones organizadas, las cuales son idénticas a las observadas durante la formación de los embriones cigóticos.

## **Germinación de los embriones somáticos**

Las dos últimas fases de la embriogénesis somática comprenden el desarrollo y la germinación de los embriones somáticos en plántulas aptas para el cultivo en el invernadero o en el campo (Berthouly, 1997). Esta fase se lleva a cabo normalmente en medio semisólido, aunque recientemente, ante la necesidad de reducir los costos de producción y obtener un número mayor de embriones somáticos, las investigaciones se han enfocado a la optimización de la germinación en biorreactores con inmersión temporal (Girón, 1998; Solano, 2001).

La densidad de cultivo es un factor muy importante para la producción de embriones, tanto en medio gelificado como en medio líquido (Girón, 1998) Así, Solano (2001) reporta que al utilizar una baja densidad de inoculación (50 ó 200 embriones por biorreactor) la mayoría de los embriones alcanzaron el estado de embrión germinado. Mientras que con la densidad más alta (12 000 embriones por biorreactor) los embriones no progresaron más allá del estado torpedo. Girón (1998) demostró que los embriones que se cultivaron a una densidad promedio de 500 embriones por biorreactor tendieron a germinar en un tiempo menor.

Por otra parte, el tipo de soporte utilizado en biorreactores con inmersión temporal tiene un impacto sobre el éxito de la regeneración de embriones somáticos obtenidos a partir de una suspensión celular (Girón, 1998). Así, Solano (2001) demostró que el soporte utilizado en el biorreactor juega un papel importante en la regeneración de embriones somáticos obtenidos a partir de una suspensión celular de un híbrido F1 de *Coffea*

*arabica* (Caturra x ET 531). Así, este autor obtuvo una mayor cantidad de embriones al emplear una espuma de poliuretano ( $2760 \pm 240$ ), en comparación a la cantidad obtenida al utilizar como soporte una espuma Bulprene 45 ( $400 \pm 100$ ) y una tela de nylon (10). Estos resultados coinciden con los reportados por Girón (1998).

La fase de germinación de los embriones somáticos es la más crítica y lenta, pues Girón (1998) requirió de 12 semanas para la germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de una suspensión celular de un híbrido F1 de *Coffea arabica* (Caturra x E531). Mientras que García y Menéndez (1987) indican que se requirió un mínimo de ocho semanas para obtener un embrión con cotiledones expandidos y raíz. Según Solano (2001) la conversión de 9000 embriones somáticos a plantas con 3- 4 pares de hojas, en el medio de germinación T5 se logró después de  $6 \pm 1$  meses.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se realizó en la Unidad de Transformación Genética del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, Ciudad de la Investigación, Sede Universitaria Rodrigo Facio. La práctica se llevó a cabo a partir de la primera semana de mayo y hasta la última semana de noviembre del 2002.

### **Material experimental**

Se utilizaron segmentos de hoja provenientes de vitroplantas y de plantas de café (*Coffea arabica* L.) de tres y doce meses de edad de la variedad Caturra. Para la variedad Catuaí se utilizaron vitroplantas y plantas de doce meses de edad. Las plantas fueron donadas por la finca Santa Eduvigis, ubicada en San Isidro de Alajuela y se mantuvieron en el invernadero del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM).

### **Obtención de las muestras foliares**

De las plantas de café de tres y doce meses de edad se seleccionaron hojas jóvenes, la primera y/o segunda en sentido descendente desde la parte apical del brote, con un tamaño aproximado de 7 cm de largo y 4 cm de ancho, de color verde claro, planas (sin ondulaciones en los bordes) y sin daños físicos ni manifestaciones de enfermedades (Figuras 1a, 1b y 1c). De las vitroplantas se emplearon hojas del ápice y de la parte media de la planta (Figura 1d)

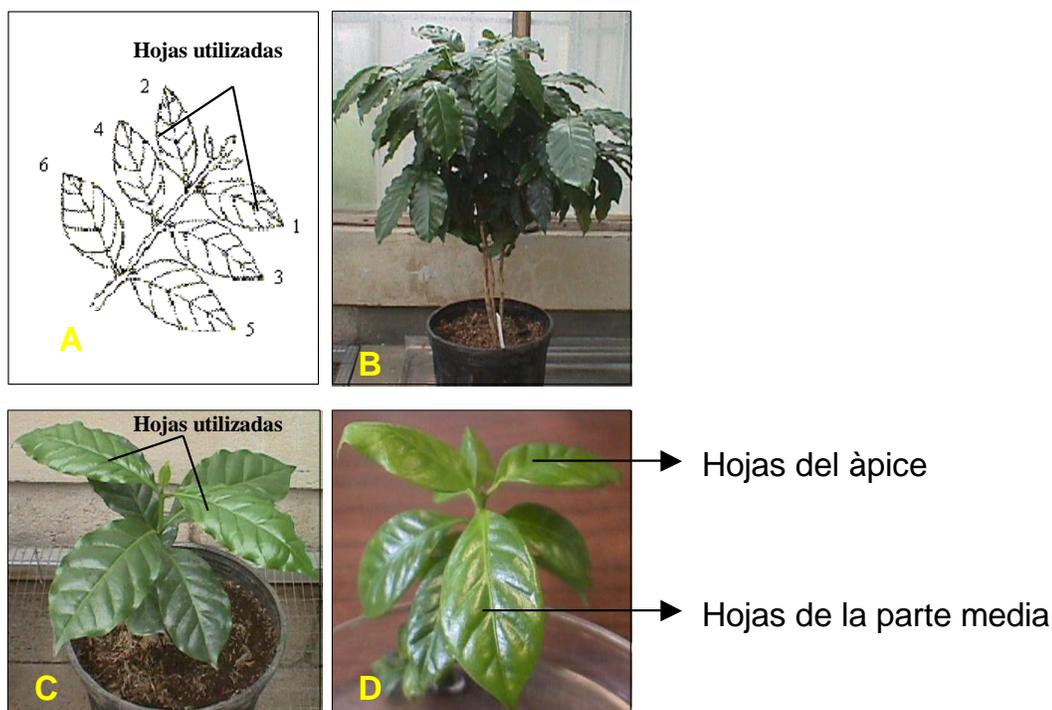


Figura 1. Plantas madres de café: **(a)** Brote de la planta indicando la posición de las hojas utilizadas; **(b)** Catuai de doce meses de edad; **(c)** Caturra de tres meses de edad y **(d)** Vitroplantas.

## Desinfección de las hojas de café provenientes del invernadero

Se evaluaron cuatro métodos de desinfección para las hojas provenientes de plantas de café mantenidas en el invernadero. Dichas metodologías corresponden a modificaciones del protocolo de desinfección descrito por Sondahl (1991) y Molina y Figueroa (1996). En todos los casos, como paso inicial del protocolo, las hojas colectadas se colocaron en un beaker de 1L con 500 ml de agua destilada y 5 gotas de Tween 20 por cinco minutos en agitación constante, con el fin de eliminar contaminantes externos. Luego, las hojas fueron sometidas a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl i.a 4% v/v) así como varios tiempos de inmersión en el bactericida Agri-mycin y en el fungicida Benlate®.

Asimismo, en el último protocolo de desinfección evaluado, las plantas de café mantenidas en el invernadero se asperjaron dos veces por semana una semana antes de la introducción *in vitro* con una solución de Agri- mycin y Benlate ( $5 \text{ gl}^{-1} \text{ c/u}$ ). La metodología utilizada en cada una de las pruebas de desinfección se detalla en el Cuadro 2.

En cada una de las pruebas de desinfección se cultivaron cinco segmentos de hoja de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí de  $0.5 \text{ cm}^2$  por plato Petri con 20 ml del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad ( $\text{MS } \frac{1}{2}$ ) complementado con  $20 \text{ gl}^{-1}$  de sacarosa, pH 5.6.

Los mismos se colocaron en un régimen de luminosidad de 16h luz/ 8h oscuridad a  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se realizaron diez repeticiones cada una con cinco explantes por plato Petri. Se evaluó el porcentaje de contaminación por hongo y bacterias, de oxidación y sobrevivencia al cabo de 5 días.

Cuadro 2. Metodologías evaluadas para la desinfección de hojas de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de plantas mantenidas en el invernadero.

<b>Metodologías de desinfección</b>			
<b>D1<sup>1,2</sup></b>	<b>D2<sup>3</sup></b>	<b>D3<sup>4</sup></b>	<b>D4<sup>5</sup></b>
Agua + Tween 20 por 5 minutos.	Agua + Tween 20 por 5 minutos.	Agua + Tween 20 por 5 minutos.	Asperjar las plantas con Agri-mycin y Benlate (5gl <sup>-1</sup> c/u) dos veces por semana.
NaOCl 1% v/v por 30 minutos.	Agri-mycin y Benlate (1gl <sup>-1</sup> c/u) por 5 minutos.	Agri-mycin y Benlate (1gl <sup>-1</sup> c/u) por 30 minutos.	Agua + Tween 20 por 5 minutos.
Tres lavados con agua destilada estéril.	Tres lavados con agua destilada estéril.	NaOCl 1.6% v/v y 1% v/v por 30 y 5 minutos respectivamente.	Agri-mycin y Benlate (1gl <sup>-1</sup> c/u) por 60 minutos.
	NaOCl 5.25% v/v y 2.6% v/v por 30 minutos cada una.	Tres lavados con agua destilada estéril.	NaOCl 1.6% v/v y 1% v/v por 30 y 5 minutos respectivamente
	Tres lavados con agua destilada estéril.		Tres lavados con agua destilada estéril.

<sup>1</sup> Código asignado a cada una de las metodologías de desinfección.

<sup>2</sup> Modificado del protocolo descrito por Sondahl *et al.*, (1991).

<sup>3</sup> Tomado de Molina y Figueroa, 1996.

<sup>4, 5</sup> Modificado del protocolo descrito por Molina y Figueroa, 1996.

Los pasos resaltados con azul se llevaron a cabo dentro de la cámara de flujo laminar.

## Dissección de los explantes

Las hojas provenientes de vitroplantas y de plantas de tres y doce meses de edad se colocaron sobre un plato Petri con un papel filtro estéril y se disectaron explantes de aproximadamente  $0.5 \text{ cm}^2$  excluyendo la nervadura central y los márgenes. De las hojas provenientes de plantas de café de tres y doce meses de edad se tomaron explantes de la parte distal, media y basal de la hoja (Figura 2). Luego, se cultivaron en cada uno de los medios de cultivo respectivos.

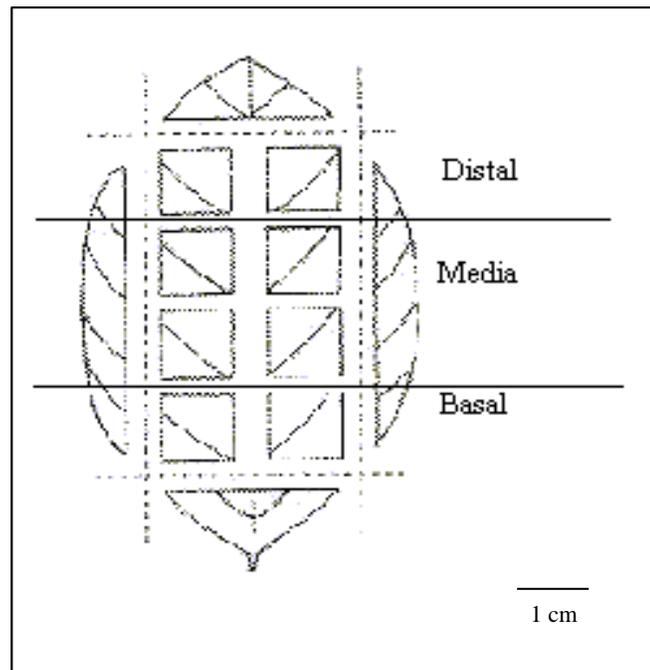


Figura 2. Seccionamiento de la hoja de la primera y/o segunda posición en el brote de las plantas de café de tres y doce meses de edad. Tamaño del segmento de hoja  $0.5 \text{ cm}^2$ . (Tomado de Ramírez y Salazar, 1998. Modificado por el autor)

## **Medios de cultivo**

Se evaluaron dos sistemas de cultivo para la regeneración por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja de café. En el primero se utilizaron dos medios de cultivo en sucesión, uno de ellos para la inducción de embriones (MIE), seguido de un medio para el desarrollo de embriones (MDE), según el protocolo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000) En el segundo sistema se empleó un solo medio de cultivo, en donde se llevó a cabo tanto la inducción como el desarrollo de los embriones. En este último sistema se evaluaron los medios de cultivo descritos por Hatanaka *et al.*,(1991) y Yasuda *et al.*,(1985) modificado por Bieysse *et al.*, (1993).

Todos los medios utilizados tienen como base las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). En el Cuadro 3, se muestra la composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento utilizadas para la inducción de la embriogénesis somática directa y la regeneración de plantas a partir de segmentos de hoja de café.

A los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.6, posteriormente los mismos se esterilizaron en una autoclave durante 21 minutos a 115 lb/ pulg<sup>2</sup> de presión y a 121° C.

## **Condiciones de cultivo**

Los explantes se cultivaron en tubos de ensayo (21 mm de ancho por 150 mm de largo) con 10 ml de medio de cultivo en cada uno. Cada tubo se tapó con papel aluminio. También se cultivaron en platos Petri de 9 cm de diámetro con 20 ml de medio. Las condiciones de cultivo empleadas variaron de acuerdo con el protocolo evaluado (Figura 3). Estos fueron expuestos a

diferentes condiciones ambientales, dependiendo del medio de cultivo. En la fase de inducción de embriones del método descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000), los explantes se colocaron en la oscuridad por un período de 4 semanas a una temperatura de incubación de  $26 \pm 2$  °C. Para la fase de desarrollo de embriones, los explantes fueron transferidos a frascos Gerber® (70 mm de alto por 45 mm de diámetro), con una densidad de siembra de dos explantes por frasco y se expusieron a una intensidad lumínica de 2067 lux, con un fotoperíodo de 16 horas luz por día y a una temperatura de incubación de  $26 \pm 2$  °C.

Para el método Yasuda *et al.*,(1985) y Hatanaka *et al.*,(1991) los explantes fueron incubados a una intensidad lumínica de 2067 lux, con un fotoperíodo de 12 horas luz durante todo el ciclo de cultivo y a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C. El fotoperíodo de 14 h luz/10 h oscuridad descrito por Hatanaka y colaboradores se varió a 12 h luz/ 12 h oscuridad.

Cuadro 3. Composición de los medios<sup>1</sup> de cultivo y las condiciones de crecimiento utilizadas para la inducción de la embriogénesis somática directa y la regeneración de plantas a partir de segmentos de hoja de café (*Coffea arabica* L.).

Componentes	Sistema 1		Sistema 2	
	CATIE		Hatanaka <i>et al</i> (1991)	Yasuda <i>et al</i> (1985)
	Inducción de Embriones MIE	Desarrollo de Embriones MDE	MH	MY
Macroelementos	MS <sup>2</sup> /4	MS	MS/4	MS/4+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (42.5 mg)
Microelementos	MS/4	MS	MS/2	MS/2
Fe-EDTA	MS	MS	MS/2	MS/2
Vitaminas (mg l <sup>-1</sup> )	Piridoxina (1) Ácido nicotínico (1) Tiamina (10) Pantotenato de Calcio (1) Biotina (0.01)	Morel (10 ml l <sup>-1</sup> )	Piridoxina (1) Ácido nicotínico (1) Tiamina (10)	Piridoxina (1) Ácido nicotínico (1) Tiamina (10)
Citocininas (mg l <sup>-1</sup> )	BAP (4)	BAP (0.3)	2-iP (1)	BAP (1)
Sacarosa (gl <sup>-1</sup> )	30	40	30	30
Otros (mg l <sup>-1</sup> )	Myo-Inositol (10)	—	Myo-Inositol (100)	Myo-Inositol (100)
Gelificante (gl <sup>-1</sup> )	Phytigel (3.6)	Phytigel (3.2)	Agar (9)	Gelrite (2)
pH	5.6	5.6	5.6	5.6
<b>Condiciones de crecimiento</b>				
Condición lumínica	Oscuridad	16 h luz: 8 h oscuridad	12 h luz: 12 h oscuridad	12 h luz: 12 h oscuridad
Temperatura (°C)	26 ± 2	26 ± 2	26 ± 2	26 ± 2
Tiempo	4 semanas	12 semanas	12 semanas	12semanas

<sup>1</sup> Para un litro de medio de cultivo

<sup>2</sup> MS: Medio Base Murashige y Skoog (1962) (Anexo 1)



Figura 3. Explantes en los medios de cultivo para la inducción de la embriogénesis somática directa.

## Tratamientos

Se realizaron dos introducciones del material vegetal evaluado, cada una con 15 explantes por tratamiento, por lo que se cultivaron en total 30 explantes por tratamiento. Por lo tanto, se introdujo un total de 270 explantes provenientes de plantas de café de doce y tres meses de edad de las variedades Caturra y Catuaí. Mientras que del material vegetal obtenido a partir de vitroplantas, se introdujo un total de 158 explantes de Caturra y 152 de Catuaí.

El establecimiento, la incubación de los explantes y la formación de los embriones somáticos fue evaluada por un lapso de 12 semanas.

En el Cuadro 4 se resumen los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos los segmentos de hoja de café de las variedades Caturra y Catuaí. En el Anexo 2 se presenta un diagrama de flujo de la metodología que se siguió en el presente trabajo.

Cuadro 4. Nomenclatura asignada a los tratamientos a los que fueron sometidos los segmentos de hoja de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra y Catuaí).

Especie	Variedad	Procedencia del Explante	Hoja	Posición del explante	Medio de embriogénesis		
					CATIE	Hatanaka et al (1991)	Yasuda et al -1985
<i>Coffea arabica</i>	Caturra (Ca)	Vitroplantas	Ápice		1	2	3
			Media		4	5	6
		Invernadero	Doce meses	Distal	7	8	9
				Medial	10	11	12
			Basal	Distal	13	14	15
				Medial	16	17	18
	Tres meses	Medial	19	20	21		
		Basal	22	23	24		
	Catuaí (Cat)	Vitroplantas	Ápice	25	26	27	
			Media	28	29	30	
		Invernadero	Doce meses	Distal	31	32	33
				Medial	34	35	36
Basal			Distal	37	38	39	
			Medial				

## **Análisis histológico del proceso de embriogénesis somática**

El procesamiento histológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología de la Clínica Católica. Para ello, se tomaron muestras de embriones somáticos en estado globular y torpedo, así como también segmentos de hojas de vitroplantas y plantas de invernadero.

Este material vegetal se fijó en formalina al 10% en un buffer de fosfatos por un período de 24 horas. Luego, el material vegetal se deshidrató en una serie ascendente de etanol (30- 50- 70- 95- 100%) a razón de media hora en cada alcohol, a excepción del alcohol de 100% en donde se deshidrató por una hora. El proceso de deshidratación se llevó a cabo en la máquina deshidratadora VIP 4619 de Tissue-Tec. Posteriormente, se impregnó en parafina durante una hora y luego se prepararon los bloques para realizar cortes en el Microtono Leitz, en secciones de 6  $\mu$ m. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina- Eosina.

## **Germinación de los embriones somáticos**

Los embriones somáticos en estado globular y torpedo de la variedad Caturra se separaron del segmento de hoja y se transfirieron al respectivo medio de cultivo utilizado para la inducción de la embriogénesis somática directa para su germinación, a excepción del protocolo del CATIE, en donde se utilizó el medio de desarrollo de embriones. Además, los embriones somáticos en estado globular y torpedo de la variedad Caturra obtenidos en los tres protocolos para la inducción de la embriogénesis somática directa se cultivaron en el medio de cultivo T5 descrito por Solano (2001) (Cuadro 5). Para cada uno de los cuatro medios de germinación evaluados se establecieron 10 repeticiones, en cada una, se cultivaron diez embriones por frasco Gerber® con 20 ml de medio. Los mismos se colocaron en el cuarto de

crecimiento a una intensidad lumínica de 2067 lux, con un fotoperíodo de 16 horas luz por día y a una temperatura de incubación de  $26 \pm 2$  °C

Cuadro 5. Composición del medio de cultivo T5 para la germinación de embriones (Solano, 2001).

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Macroelementos	MS
Microelementos	MS
Fe-EDTA	MS ½
Piridoxina	1 (mg l <sup>-1</sup> )
Ácido nicotínico	1 (mg l <sup>-1</sup> )
Tiamina	1 (mg l <sup>-1</sup> )
Pantotenato de Calcio	1 (mg l <sup>-1</sup> )
Biotina	0.01 (mg l <sup>-1</sup> )
Myo-Inositol	100 (mg l <sup>-1</sup> )
BAP	0.3 (mg l <sup>-1</sup> )
Sacarosa	30 (g l <sup>-1</sup> )
Phytigel	2.2 g l <sup>-1</sup>
pH	5.6

## **Análisis estadístico**

Para cada uno de los tratamientos se determinó la media y la desviación estándar de la cantidad de embriones producidos por explante. Además, con el fin de comparar el potencial embriogénico de los segmentos de hoja provenientes de plantas de invernadero y vitroplantas, se llevó a cabo una prueba de Tukey con los resultados obtenidos para cada una de las variedades (Caturra y Catuaí) en cada uno de los tres medios de cultivo por separado. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Statistix Versión 1.0. Igualmente, se determinó el porcentaje de embriones somáticos germinados con respecto a los embriones totales para cada uno de los medios de cultivo evaluados.

## RESULTADOS

### **Métodos de desinfección para plantas de invernadero**

En la figura 4 se aprecia que hubo diferencias en cuanto al porcentaje de explantes que sobrevivieron y el porcentaje de explantes contaminados con hongos y bacterias entre las metodologías de desinfección evaluadas.

El método de desinfección D1 mostró el mayor porcentaje de explantes contaminados por bacterias y hongos (80%). En el método de desinfección D2, se obtuvo el menor porcentaje de sobrevivencia comparado con los otros métodos evaluados. Esto por cuanto, a pesar que se logró reducir la contaminación por bacteria y hongo a un 52%, el 40% de los explantes presentaron oxidación.

El porcentaje de explantes que no presentaron ningún tipo de contaminación ni oxidación aumentó a un 50% al utilizar el método de desinfección D3, en comparación con las metodologías D1 y D2.

Por medio del método de desinfección D4 se logró que el 70% de los explantes no presentaran ningún tipo de contaminación ni oxidación. Lo que significó una reducción al 30% de los explantes contaminados con bacteria y con hongo. Por lo tanto, D4 resultó ser el más adecuado y efectivo para el control de los microorganismos contaminantes.

## **Evaluación de la contaminación y la oxidación en los tres protocolos para la inducción de la embriogénesis somática directa**

La pérdida de explantes por contaminación y oxidación se presentó a lo largo de todo el período de cultivo en los tres protocolos para la inducción de la embriogénesis somática directa. La tasa de sobrevivencia de los explantes, la cual se refiere al porcentaje de explantes no contaminados ni oxidados difirió considerablemente según la procedencia de los mismos.

Los mayores porcentajes de oxidación se observaron en el material vegetal proveniente de plantas de café de doce meses de edad (Caturra 34% y Catuaí 11%), seguido por el de tres meses de edad (15%) y por último el material vegetal obtenido de vitroplantas (Caturra 8% y Catuaí 4%) (Figura 5). Asimismo, se observó una mayor oxidación de los explantes cuando estos se cultivaron en placas Petri.

Las hojas provenientes de invernadero se desinfectaron con el método de desinfección D4 (Cuadro 2). Las plantas de tres meses y las de doce meses de edad de la variedad Caturra, presentaron porcentajes de contaminación del 16%. Por otro lado, las hojas de Catuaí presentaron 9% de contaminación (Figura 5A y 5B).

En cuanto al tipo de contaminante, se observó una mayor contaminación por hongos en los explantes provenientes de vitroplantas que en los explantes provenientes de invernadero. En estos últimos la contaminación se debió mayoritariamente a bacteria (Figura 5).

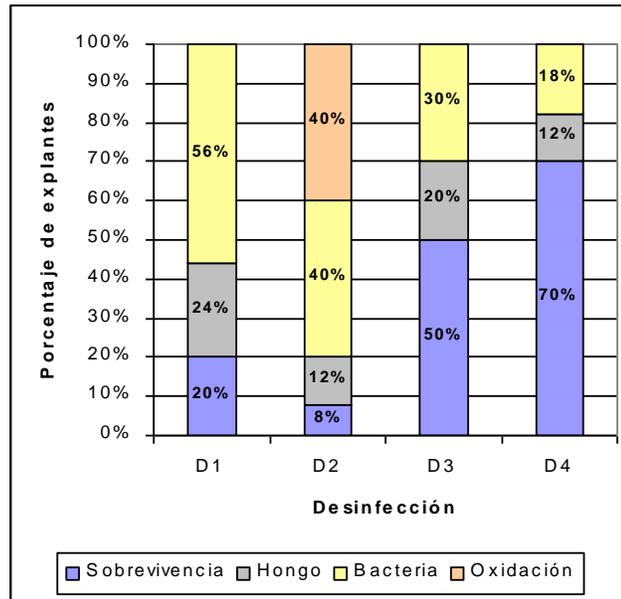


Figura 4. Explantes *Coffea arabica* L. cv. Catuaí contaminados por bacteria, hongos y porcentaje de oxidación en las diferentes pruebas de desinfección al cabo de cinco días de cultivo.

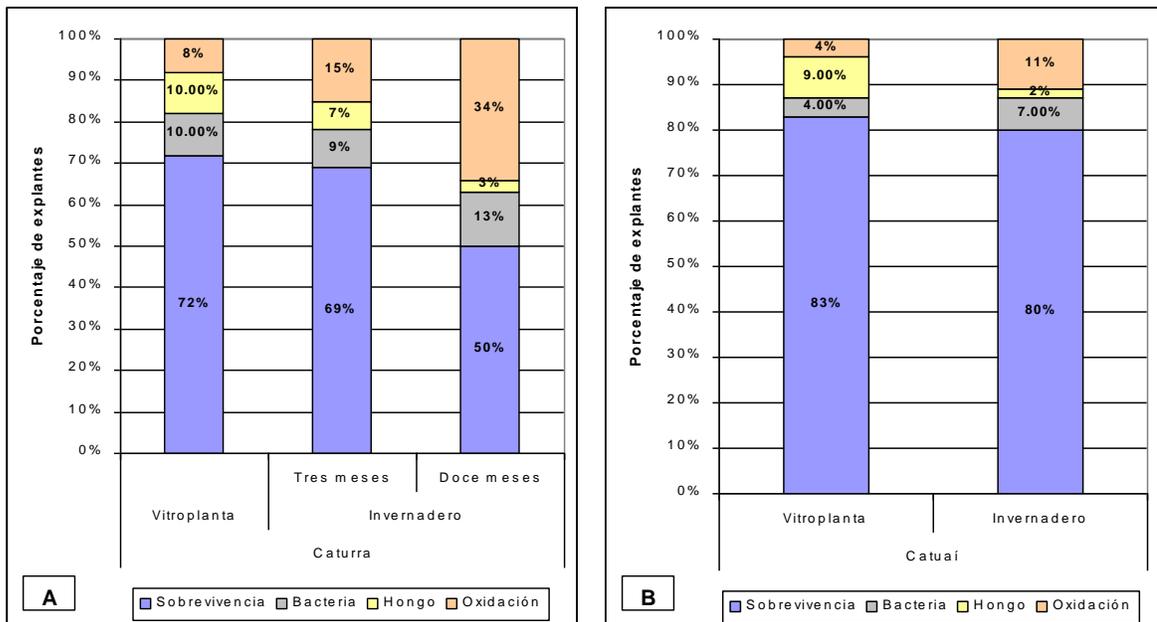


Figura 5. Explantes contaminados por bacteria, hongos y porcentaje de oxidación según procedencia al cabo de doce semanas de cultivo: (a) *Coffea arabica* cv. Caturra y (b) *Coffea arabica* cv. Catuaí.

## Estadíos de desarrollo embriogénico

En los dos sistemas de cultivo utilizados para la regeneración por embriogénesis somática directa, el inicio del desarrollo del callo de cicatrización en los bordes de los explantes se notó a las dos semanas de establecido el cultivo. Durante este período se observó, en los explantes, la proliferación de un callo compacto de color crema sobre la superficie del corte (callo de cicatrización). Este callo fue más voluminoso (aproximadamente 5 mm de grosor) en los tratamientos expuestos a la oscuridad (medio de inducción de embriones, CATIE) que el callo de cicatrización que se observó en los tratamientos expuestos a la luz (medios Yasuda *et al.*, 1985 y Hatanaka *et al.*, 1991). El callo formado en estos dos últimos medios de cultivo permaneció pequeño (aproximadamente 2 mm de grosor) durante las doce semanas de cultivo (Figura 6).

Cuando se utilizó un solo medio de cultivo, protocolos de Yasuda *et al.*,(1985) y Hatanaka *et al.*,(1991), se notó que el callo de cicatrización se volvió marrón oscuro después de cuatro semanas de cultivo. Sin embargo, cuando se emplearon dos medios de cultivo en sucesión, uno de ellos para la inducción de embriones, seguido de un medio para el desarrollo de embriones, el callo de cicatrización se tornó color marrón oscuro después de ser subcultivado en este último medio de cultivo. En el protocolo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000) se observó una mayor oxidación y una menor producción de embriones en comparación con los otros dos protocolos utilizados (Figura 6c).

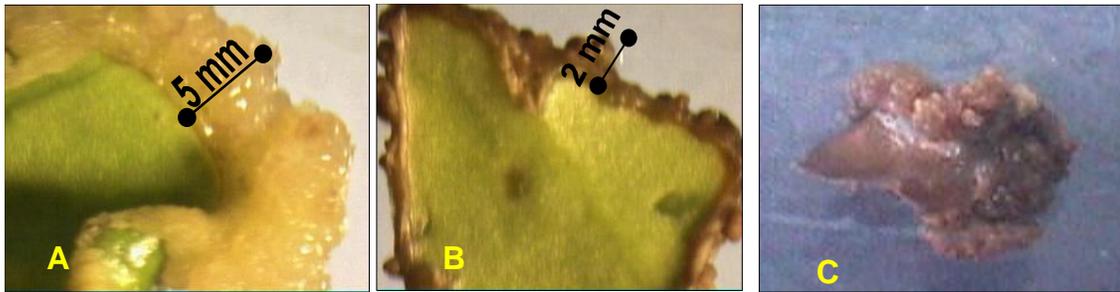


Figura 6. Callo de cicatrización: **(a)** Callo de cicatrización en los tratamientos expuestos a la oscuridad (medio de Inducción de Embriones) (CATIE, Flores y Abdelnour, 2000), **(b)** Callo de cicatrización en los tratamientos expuestos a la luz (Medio Hatanaka *et al.*, 1991 y Medio Yasuda *et al.*, 1985) y **(c)** Oscurecimiento del callo de cicatrización y oxidación del explante en el medio de desarrollo de embriones. Las líneas muestran la diferencia en el grosor del callo de cicatrización.

Los embrioides aparecieron sobre el callo de cicatrización y sobre heridas en el segmento de hoja, como puntos lisos de color blanco brillante y continuaron su desarrollo, pasando por las formas típicas de embrión en estado globular, torpedo y cotiledonar, hasta la formación de la plántula (Figura 7). Con frecuencia en un explante se observaron todas las etapas de desarrollo del embrión (Figura 7h).

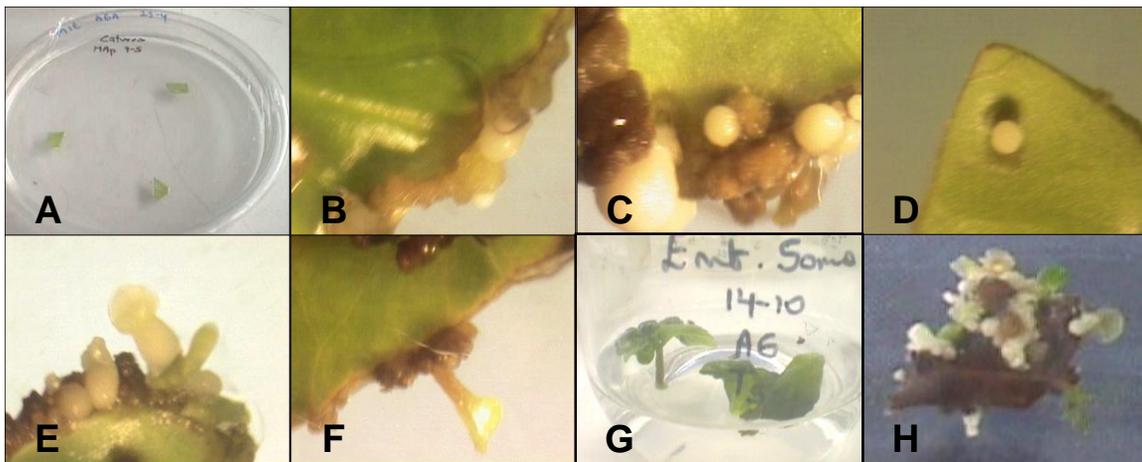


Figura 7. Embriogénesis somática directa: **(a)** Segmentos de hoja de café, **(b)** Callo de cicatrización formado en el borde de los explantes, **(c)** Embriones somáticos en estado globular formados en el callo de cicatrización, **(d)** Embriones somáticos en estado globular formados sobre heridas en el segmento de hoja, **(e)** Embriones somáticos en estado de torpedo, **(f)** y **(g)** Plántulas de café y **(h)** Aspecto morfológico de los explantes cultivados en los diferentes medios para la inducción de la embriogénesis somática directa después de doce semanas de cultivo.

## **Respuesta a la inducción de la embriogénesis somática directa**

### **Hojas de vitroplantas**

La respuesta a la inducción de la embriogénesis somática directa difirió según el tipo de hoja que se empleó como explante. Así, para la variedad Caturra, en el medio de cultivo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000), los explantes tomados de hojas del ápice (Ca1) produjeron un mayor promedio de embriones por explante ( $5.33 \pm 7.50$ ) que aquellos procedentes de las hojas de la parte media (Ca4), en donde se obtuvo un promedio de  $1.60 \pm 1.90$  embriones. Un resultado similar se obtuvo en el medio de cultivo Hatanaka *et al.*, (1991), para los tratamientos Ca2 y Ca5. En este caso, en el tratamiento Ca2 al utilizar hojas del ápice se obtuvo un promedio de  $2.36 \pm 3.37$  embriones, mientras que en el tratamiento Ca5 se obtuvo un promedio de  $0.58 \pm 0.84$  embriones. Entre los tratamientos Ca3 y Ca6, en el medio de cultivo Yasuda *et al.*, (1985) no se determinaron diferencias significativas en el promedio de embriones. Sin embargo, los explantes tomados de hojas de la parte media (Ca6) produjeron en promedio  $4.00 \pm 5.10$  embriones, mientras que aquellos procedentes de las hojas del ápice (Ca3), produjeron en promedio  $2.10 \pm 1.73$  embriones (Cuadro 6).

Con respecto a los medios de cultivo evaluados al utilizar hojas del ápice no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos Ca1, Ca2 y Ca3. Sin embargo, en el protocolo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000) (Ca1) se obtuvo el mayor promedio de embriones por explante (Figura 9a). En cuanto a los tratamientos Ca4, Ca5 y Ca6, en donde se usaron hojas de la parte media, se determinó que existe diferencia significativa, siendo el protocolo descrito por Yasuda *et al.*, (1985) (Ca6) el que presentó el mayor promedio de embriones por explante (Figura 9b).

Los primeros embriones somáticos se observaron a la séptima semana de cultivo en los protocolos Yasuda *et al.*,(1985) (tratamientos Ca3 y Ca6) y Hatanaka *et al.*,(1991) (tratamientos Ca2 y Ca5). Mientras que al utilizar el protocolo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000) (tratamientos Ca1 y Ca4) fue necesario que transcurrieran once semanas para observar las primeras estructuras embriogénicas.

Cuadro 6. Embriones somáticos obtenidos a partir de explantes de vitroplantas de *Coffea arabica* cv. Caturra en los tratamiento Ca1 a Ca6. Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey's Studentized Range)

Protocolo	Tipo de hoja	Número de explantes	Porcentaje de explantes con embriones	Promedio de embriones por explante
Ca1:CATIE	Ápice	33	55%	5.33±7.50 <sup>a</sup>
Ca4:CATIE	Media	27	44%	1.60±1.90 <sup>b</sup>
Ca2:Hatanaka	Ápice	14	36%	2.36±3.37 <sup>a</sup>
Ca5:Hatanaka	Media	19	42%	0.58±0.84 <sup>b</sup>
Ca3:Yasuda	Ápice	10	60%	2.10±1.73 <sup>a</sup>
Ca6:Yasuda	Media	10	60%	4.00±5.10 <sup>a</sup>

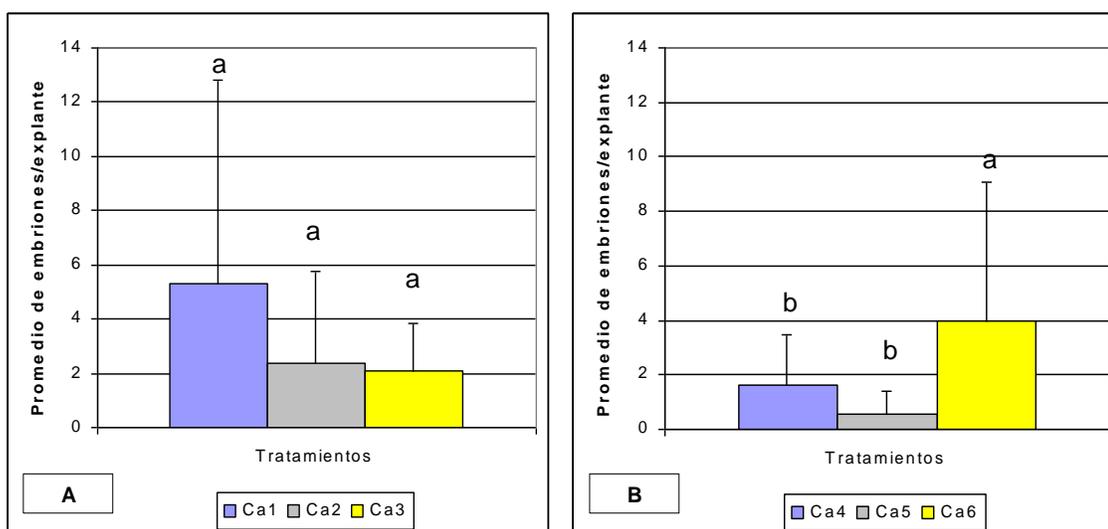


Figura 8. Embriones formados por explante en los diferentes tratamientos evaluados después de 12 semanas de cultivo (a) Explante: Hoja del ápice (Tratamientos Ca1-Ca2-Ca3) y (b) Explante: Hoja de la parte media (Tratamientos Ca4-Ca5- Ca6).

Por otro lado, en la variedad Catuaí en el medio de cultivo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000), no se determinaron diferencias significativas, en cuanto al promedio de embriones por explante, entre los explantes tomados de hojas de vitroplantas del ápice (Cat25) y aquellos procedentes de las hojas de la parte media (Cat28). Sin embargo, los explantes tomados de hojas de la parte media (Cat28) produjeron en promedio  $0.68 \pm 1.31$  embriones, mientras que aquellos procedentes de las hojas del ápice (Cat25), produjeron en promedio  $0.50 \pm 1.15$  embriones. En el medio de cultivo descrito por Hatanaka *et al.*,(1991), para los tratamientos Cat26 y Cat29 no se determinaron diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento Cat26, en el cual se utilizaron hojas del ápice, se obtuvo un promedio de  $2.81 \pm 2.70$  embriones por explante, en comparación al tratamiento Cat29 (hojas de la parte media), en donde se obtuvo un promedio de  $2.42 \pm 2.00$  embriones por explante. En cuanto a los tratamientos Cat27 y Cat30, en el medio de cultivo Yasuda *et al.*,(1985), se determinaron diferencias significativas entre ellos, en donde el mayor porcentaje de embriones por explante se obtuvo en el tratamiento Cat27, en el cual se utilizaron hojas del ápice (Cuadro 7).

A diferencia de la variedad Caturra, con respecto a los medios de cultivo evaluados al utilizar hojas del ápice se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos Cat25, Cat26 y Cat27, en donde el protocolo Hatanaka *et al.*,(1991) (Cat26) fue el que presentó el mayor promedio de embriones por explante y también el mayor porcentaje de explantes con embriones (Cuadro 7). Un resultado similar se obtuvo entre los tratamientos Cat28, Cat29 y Cat30, en donde se usaron hojas de la parte media. Entre estos tratamientos se determinaron diferencias significativas entre ellos, siendo el protocolo Hatanaka *et al.*,(1991) (Cat29) el que presentó el mayor promedio de embriones por explante y además el mayor porcentaje de explantes con embriones (Figura 10)

Al igual que con la variedad Caturra, después de siete semanas de cultivo en el protocolo Hatanaka *et al.*,(1991) (Cat26 y Cat29) y en el protocolo Yasuda *et al.*,(1985) (Cat27 y Cat30) se observaron los primeros embriones somáticos. Mientras que en el protocolo descrito por el CATIE (Flores y Abdelnour, 2000) (tratamientos Cat25 y Cat28) se observaron después de once semanas de cultivo.

Cuadro 7. Embriones somáticos obtenidos a partir de explantes de vitroplantas de *Coffea arabica* cv. Catuai en los tratamiento Cat25 a Cat30. Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey's Studentized Range)

Protocolo	Tipo de hoja	Número de explantes	Porcentaje de explantes con embriones	Promedio de embriones por explante
Cat25:CATIE	Ápice	20	15%	0.50±1.15 <sup>b</sup>
Cat28:CATIE	Media	25	27%	0.68±1.31 <sup>b</sup>
Cat26:Hatanaka	Ápice	26	85%	2.81±2.70 <sup>a</sup>
Cat29:Hatanaka	Media	26	73%	2.42±2.00 <sup>a</sup>
Cat27:Yasuda	Ápice	10	40%	1.00±1.15 <sup>a,b</sup>
Cat30:Yasuda	Media	19	11%	0.16±0.37 <sup>b</sup>

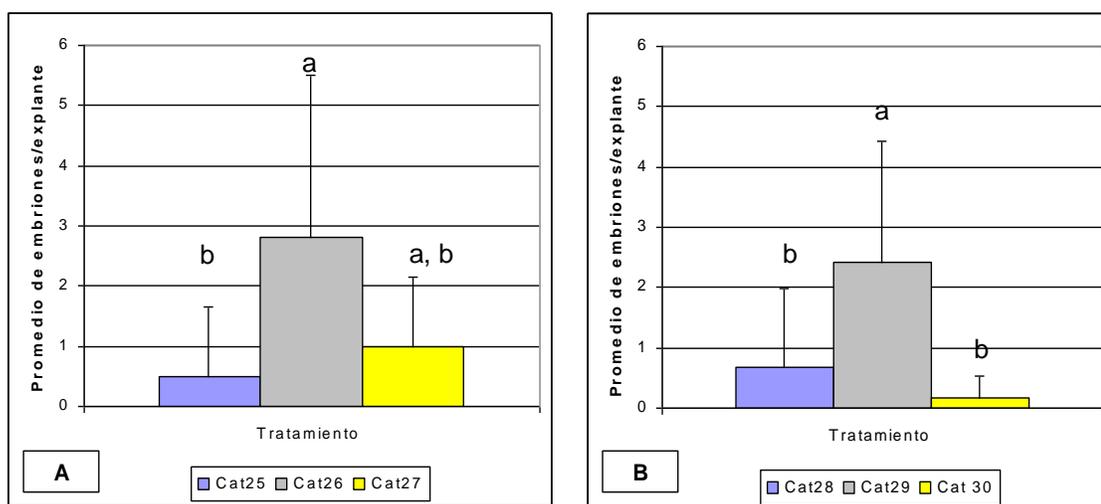


Figura 9. Embriones formados por explante en los diferentes tratamientos evaluados después de 12 semanas de cultivo: **(a)** Explante: Hoja del ápice (Tratamientos Cat25-Cat26- Cat27) y **(b)** Explante: Hoja de la parte media (Tratamientos Cat28-Cat29- Cat30).

## Hojas provenientes de plantas de invernadero

Al cabo de doce semanas de cultivo en el medio descrito por el CATIE (Tratamientos Ca7, Ca10 y Ca13) y Hatanaka *et al.*,(1991) (Tratamientos Ca8, Ca11 y Ca14) no se observaron estructuras embriogénicas en los segmentos de hojas provenientes de *Coffea arabica* L. cv. Caturra de doce meses de edad. Por el contrario, los tratamientos Ca9, Ca12 y Ca15 a la décima semana de cultivo en el medio Yasuda *et al.*,(1985) modificado por Bieysse *et al.*,(1993) se observó un 40%, 20% y 13% respectivamente de explantes con estructuras embriogénicas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de explantes de *Coffea arabica* cv. Caturra de doce meses de edad con embriones (Ca7 a Ca15). Las observaciones fueron realizadas después de 12 semanas de cultivo.

Tratamiento	Número de explantes	Porcentaje de explantes con embriones
Ca7:Distal:CATIE	15	0%
Ca8:Distal:Hatanaka	11	0%
Ca9:Distal:Yasuda	15	40%
Ca10:Medial:CATIE	15	0%
Ca11:Medial:Hatanaka	17	0%
Ca12:Medial:Yasuda	15	20%
Ca13:Basal:CATIE	17	0%
Ca14:Basal:Hatanaka	15	0%
Ca15Basal:Yasuda	15	13%

Los explantes provenientes de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra de tres meses de edad produjeron embriones a la novena semana de cultivo en los diferentes medios para la inducción de la embriogénesis somática. Se observó un efecto del medio de cultivo sobre la respuesta embriogénica ya que entre los tratamientos Ca16-Ca17-Ca18 (explantes provenientes de la parte distal de la hoja) y Ca19-Ca20-Ca21 (explantes provenientes de la parte media de la hoja) se obtuvieron diferencias significativas en el promedio de embriones por explante. Los tratamientos Ca18 y Ca21 fueron los que presentaron los mayores promedios de embriones por explante (Cuadro 9).

Por el contrario, al utilizar explantes provenientes de la parte basal de la hoja, tratamientos Ca22-Ca23-Ca24, no se observó diferencia significativa en el promedio de embriones por explante. Sin embargo, en el tratamiento Ca24 se obtuvo el mayor promedio de embriones por explante ( $3.20 \pm 4.25$ ) (Figura12).

Cuadro 9. Embriones por explante de *Coffea arabica* cv. Caturra de tres meses de edad por tratamiento (Ca16 a Ca24). Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey's Studentized Range).

Tratamiento	Número de explantes	Porcentaje de explantes con embriones	Promedio de embriones por explante
Ca16:Distal:CATIE	22	36%	$2.23 \pm 3.73^b$
Ca17:Distal:Hatanaka	23	48%	$1.70 \pm 2.29^b$
Ca18:Distal:Yasuda	24	75%	$7.41 \pm 8.02^a$
Ca19:Medial:CATIE	21	48%	$1.19 \pm 1.78^b$
Ca20:Medial:Hatanaka	22	41%	$2.27 \pm 3.72^b$
Ca21:Medial:Yasuda	23	65%	$6.48 \pm 8.80^a$
Ca22:Basal:CATIE	18	39%	$1.11 \pm 1.78^a$
Ca23:Basal:Hatanaka	18	47%	$2.23 \pm 2.41^a$
Ca24:Basal:Yasuda	15	67%	$3.20 \pm 4.25^a$

Tal y como se muestra en el Cuadro 10 no existe diferencia significativa, entre las diferentes posiciones del explante en la hoja proveniente de plantas de Caturra de tres meses de edad, por lo tanto no se evidenció el efecto de la posición del explante en la hoja. Sin embargo, independientemente de la posición del explante en la hoja, el mayor porcentaje de explantes con embriones y promedio de embriones por explante se obtuvo al cultivar los segmentos de hoja provenientes de *Coffea arabica* L. cv. Caturra de tres meses de edad en el medio de cultivo descrito por Yasuda *et al.*,(1985) modificado por Bieysse *et al.*,(1993) (Figura 12).

Cuadro 10. Embriones por explante de *Coffea arabica* cv. Caturra de tres meses de edad por tratamiento (Ca16 a Ca24). Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo. Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes a  $P \leq 0.05$  (Prueba de Tukey's Studentized Range).

Protocolo	Posición del explante	Número de explantes	Porcentaje de explantes con embriones	Promedio de embriones por explante
Ca16:CATIE	Distal	22	36%	2.23±3.73 <sup>a</sup>
Ca19:CATIE	Medial	21	48%	1.19±1.78 <sup>a</sup>
Ca22:CATIE	Basal	18	39%	1.11±1.78 <sup>a</sup>
Ca17:Hatanaka <i>et al</i>	Distal	23	48%	1.70±2.29 <sup>a</sup>
Ca20:Hatanaka <i>et al</i>	Medial	22	41%	2.27±3.72 <sup>a</sup>
Ca23:Hatanaka <i>et al</i>	Basal	18	47%	2.23±2.41 <sup>a</sup>
Ca18:Yasuda <i>et al</i>	Distal	24	75%	7.41±8.02 <sup>a</sup>
Ca21:Yasuda <i>et al</i>	Medial	23	65%	6.48±8.80 <sup>a</sup>
Ca24:Yasuda <i>et al</i>	Basal	15	67%	3.20±4.25 <sup>a</sup>

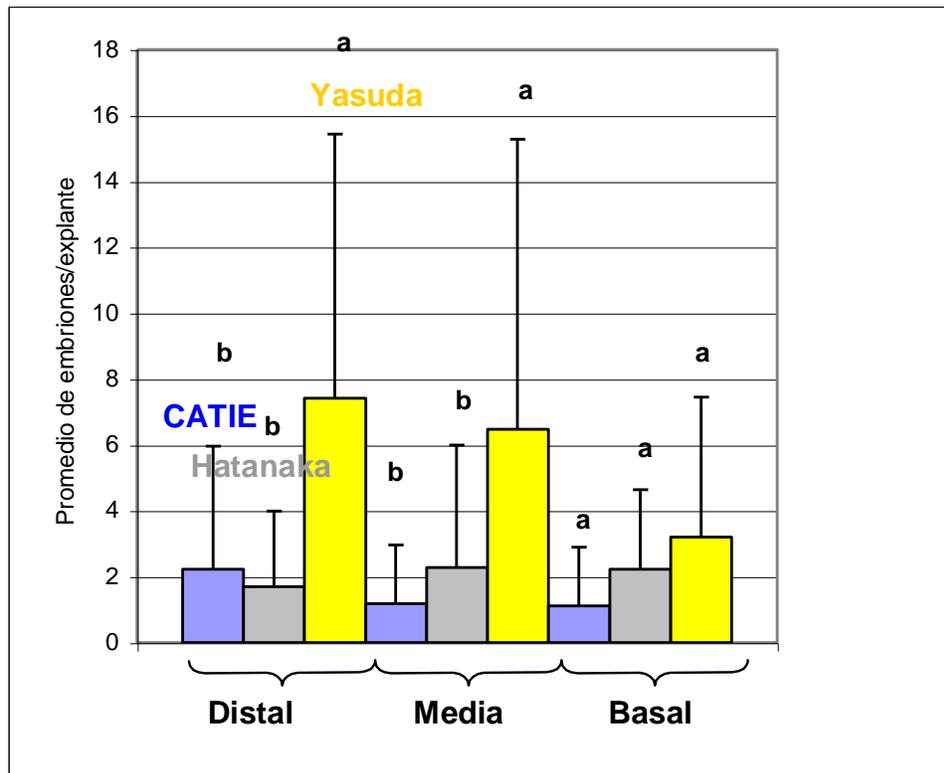


Figura 10. Promedio de embriones por explante de *Coffea arabica* cv. Caturra de tres meses de edad por tratamiento después de 12 semanas de cultivo en el medio correspondiente para la embriogénesis somática directa: Tratamientos Ca16-Ca17-Ca18 (Distal); Ca19-Ca20- Ca21 (Media) y Ca22-Ca23- Ca24 (Basal).

Al cabo de doce semanas de cultivo en los diferentes medios para la inducción de la embriogénesis somática directa no se detectó la presencia de estructuras embriogénicas en ninguno de los segmentos de hoja provenientes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí de doce meses de edad, lo cual corresponde a los tratamientos Cat31 a Cat39 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de explantes con embriones en *Coffea arabica* cv. Catuaí de doce meses de edad por tratamientos (Cat31 a Cat39). Observaciones realizadas después de 12 semanas de cultivo.

<b>Tratamiento</b>	<b>Número de explantes</b>	<b>Porcentaje de explantes con embriones</b>
Cat31	19	0%
Cat32	28	0%
Cat33	21	0%
Cat34	28	0%
Cat35	24	0%
Cat36	27	0%
Cat37	24	0%
Cat38	22	0%
Cat39	24	0%

En general, la respuesta de los segmentos de hoja provenientes de plantas de café mantenidas en el invernadero, tanto de la variedad Caturra como Catuaí, a la embriogénesis somática directa fue más lenta que la respuesta de los segmentos de hoja provenientes de vitroplantas, a excepción de los segmentos de hojas cultivados en el medio descrito por el CATIE (Tratamientos Ca1, Ca4, Cat25 y Cat28). En la figura 13 se muestra una línea del tiempo en la cual se representa esquemáticamente el tiempo transcurrido para la aparición de las primeras estructuras embriogénicas en los tratamientos que respondieron a la embriogénesis somática directa.

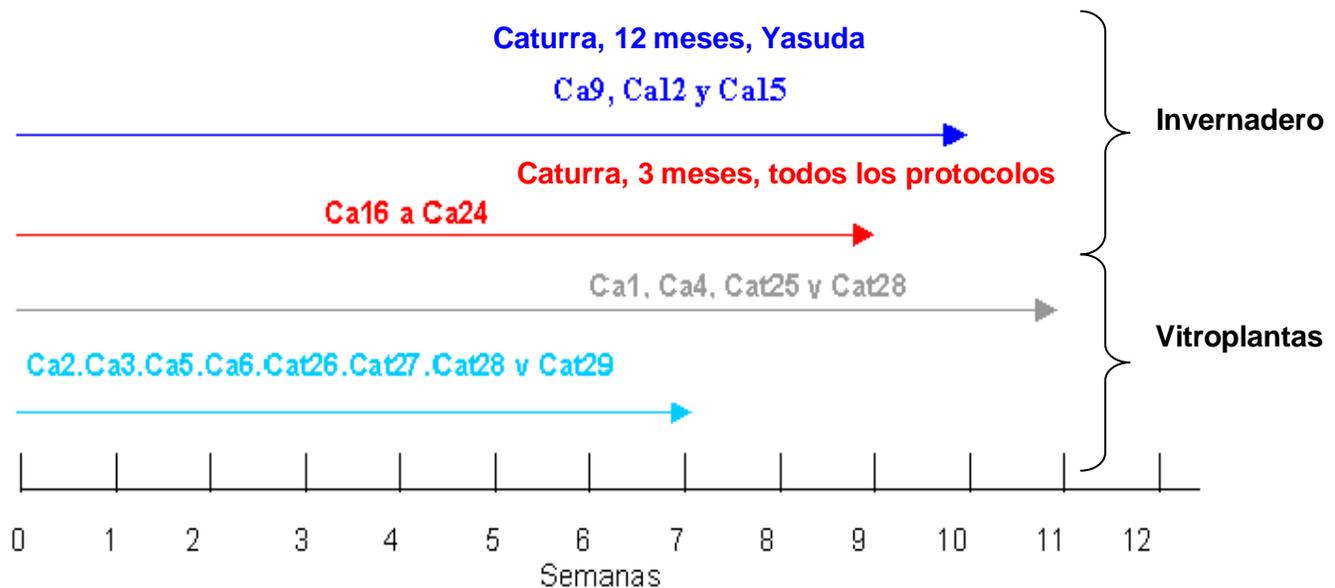


Figura 11. Representación esquemática de las semanas transcurridas para la aparición de las estructuras embriónicas en los diferentes tratamientos evaluados.

### Estudios histológicos del proceso embriogénico en café

El estudio histológico del tejido foliar evidenció que el explante proveniente de las hojas de vitroplantas y de plantas de tres o doce meses de edad eran anatómicamente similares. En las dos variedades estudiadas, independientemente de la procedencia del explante se observaron, en cortes longitudinales, los siguientes tejidos: epidermis adaxial y abaxial, parénquima de empalizada y esponjoso y haces vasculares menores (Figura 12a).

La inducción de la embriogénesis somática a partir del tejido foliar en los protocolos del CATIE descrito por Flores y Abdelnour (2000), Yasuda *et al.*,(1985) y Hatanaka *et al.*,(1991) se inició con la formación de un callo de cicatrización en los bordes del explante. La histología de los callos evidenció la presencia de células grandes, poco densas, con un núcleo no visible y con reservas de almidón (Figuras 12b y 12c). Asimismo, se observaron células pequeñas, densas, compactas y con núcleo prominente adyacentes o dentro del callo de cicatrización (Figura 12b y 12d). Las cuales formaron agregados celulares pro-embriogénicos. En la figura 12e se demostró el proceso de embriogénesis somática por cuanto los embriones globulares no presentaron una conexión vascular con el tejido que les dio origen sino una unión a través de una estructura similar a un suspensor.

Posteriormente, el embrión globular continuo su desarrollo ontogénico al pasar a una fase de torpedo en la cual se observó la polaridad de los ejes apical y radical (Fig. 12f).

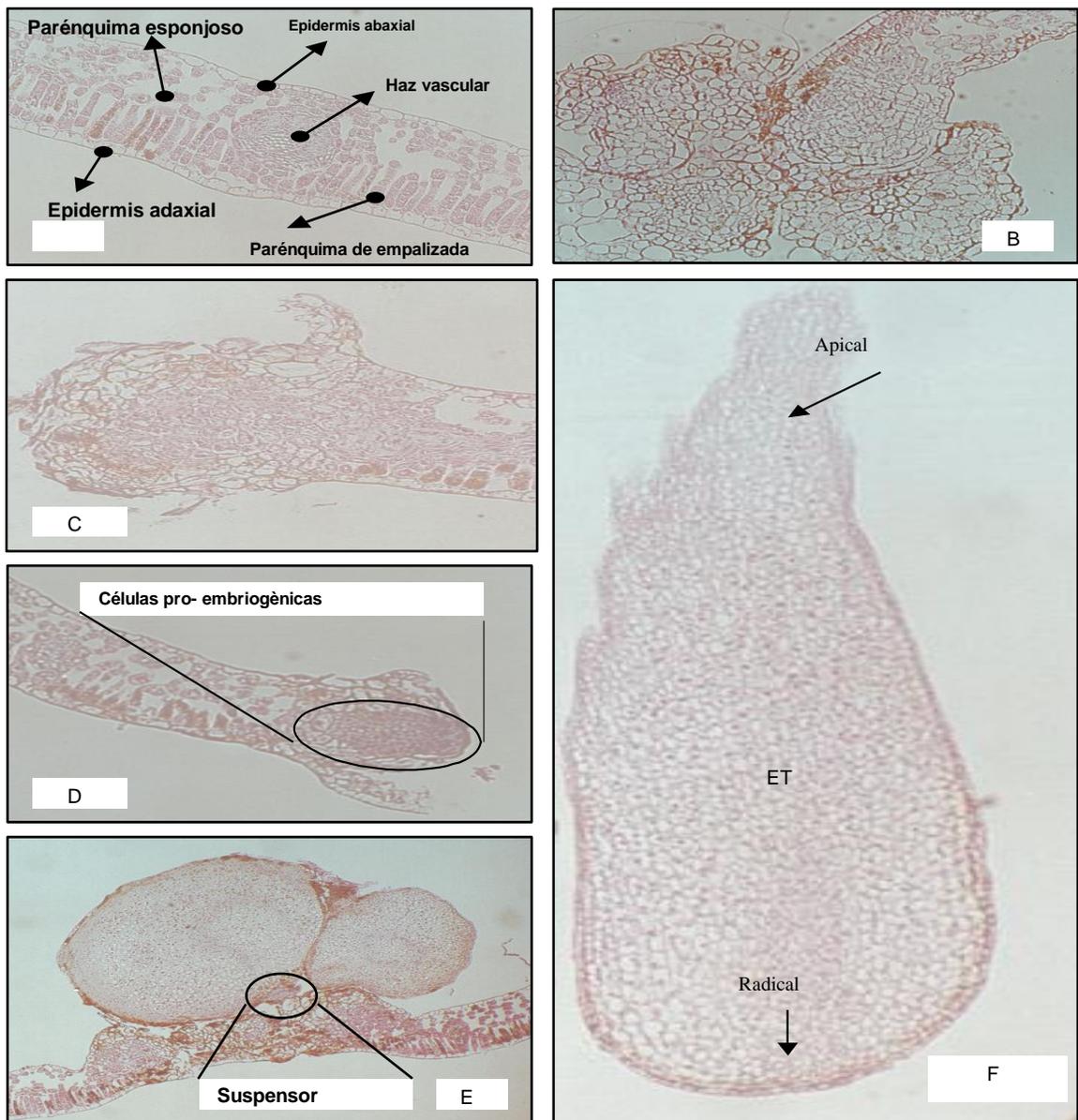


Figura 12. Aspecto histológico del proceso de embriogénesis somática directa: **(a)** corte longitudinal de hoja de *Coffea arabica*; **(b)** corte longitudinal del callo de cicatrización; **(c)** y **(d)** células embriogénicas presentes en el tejido foliar de café; **(e)** embriones somáticos en estado globular (EG) y **(f)** embriones somáticos en estado de torpedo (ET).

## **Germinación de los embriones**

Se consideró como embriones germinados, todos aquellos que presentaron al menos un par de hojas al final de cuatro semanas de cultivo en los distintos medios para la germinación. El mayor porcentaje de germinación se observó en el medio de cultivo Yasuda *et al.*, (1985) modificado por Bieysse *et al.*, (1993), seguido del medio de germinación T5 (Solano, 2001). Mientras que el menor porcentaje de germinación se observó en el medio de cultivo descrito por Hatanaka *et al.*, (1991) (Figura 15).

En ninguno de los medios evaluados para la germinación de embriones se observó el desarrollo de raíces funcionales, pero sí el desarrollo de la parte aérea, la cual se caracterizó por presentar cotiledones grandes y deformados (Figura 16). Además, se observó que la germinación es heterogénea, es decir, que en un frasco de cultivo no todos los embriones germinan a la vez, siendo los embriones en estado de torpedo los que germinaron.

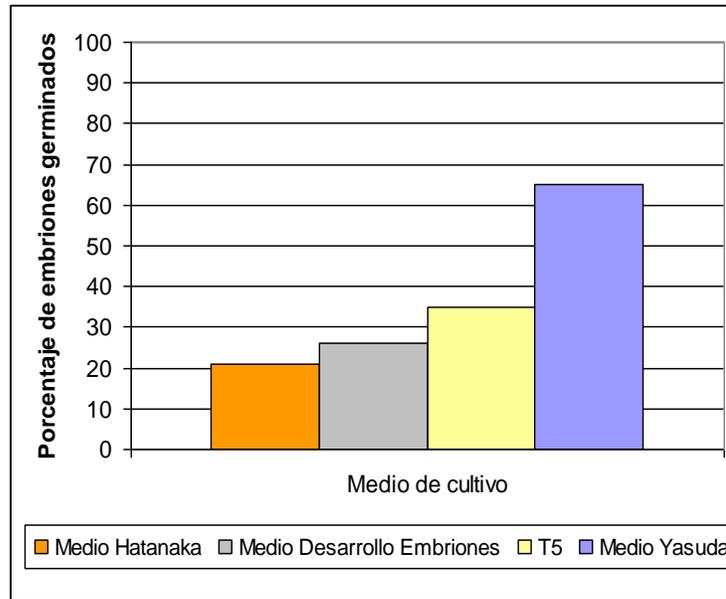


Figura 13. Embriones de la variedad Caturra germinados, al cabo de cuatro semanas de cultivo, en el medio de desarrollo de embriones (Flores y Abdelnour, 2000), medio de germinación T5 (Solano, 2001), medio Hatanaka *et al.*,(1991) y medio Yasuda *et al.*,(1985).

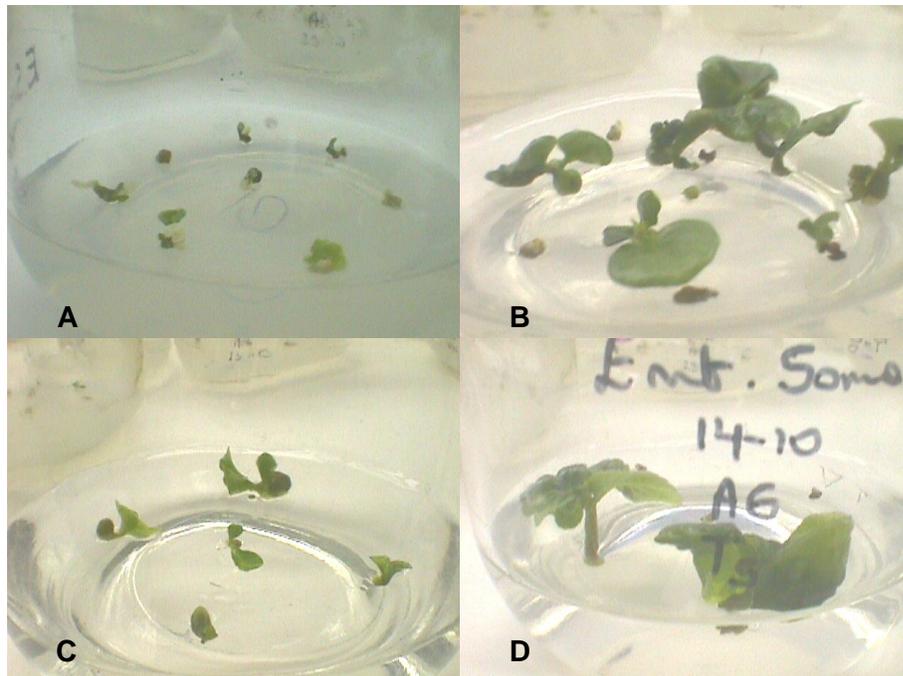


Figura 14. Aspecto morfológico de los embriones somáticos germinados en medio sólido: (a) Medio Hatanaka *et al.*,(1991) (MH); (b) Medio Desarrollo de Embriones (MDE); (c) Medio Yasuda *et al.*,(1985) (MY) y (d) Medio de germinación T5.

## DISCUSIÓN

### Métodos de desinfección para plantas de invernadero

Las condiciones en las cuales se lleva a cabo el cultivo de tejidos favorecen también el crecimiento y la proliferación de microorganismos contaminantes, los cuales interfieren con el crecimiento del explante, al competir por los nutrientes del medio de cultivo, liberar sustancias tóxicas y variar el pH (Mroginski y Roca, 1991; Abdelnour y Escalant, 1994; Leifert y Cassells, 2001). Por lo mencionado anteriormente, se debe tener en cuenta que, una vez seleccionado el explante, la desinfección superficial representa un aspecto básico en el establecimiento de los cultivos *in vitro* (Mroginski y Roca, 1991).

La concentración óptima del desinfectante es aquella con la que se logra la desinfección del explante sin provocarle ningún daño (Abdelnour y Escalant, 1994). En el método de desinfección en el cual se utilizó una concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% v/v (D1) no fue el adecuado para desinfectar los explantes provenientes de invernadero, lo cual explica los altos niveles de contaminación observados.

El procedimiento de desinfección superficial del explante debe eliminar los microorganismos pero a la vez debe causar el menor daño posible al explante (Abdelnour y Escalant, 1994). Al aumentar la concentración de NaOCl a 5.25% v/v y 2.6% v/v y utilizar una solución de bactericida (Agri-mycin) y funguicida (Benlate®) (D2) se logró reducir considerablemente la contaminación en comparación al método anterior. Sin embargo, este proceso de desinfección fue extremo ya que en comparación con el otro método de desinfección, la alta concentración de cloro utilizada oxidó los explantes (40%).

La disminución de la concentración de NaOCl a 1.6% v/v y 1% v/v y el incremento del tiempo de inmersión de los explantes en la solución de Agri-mycin y Benlate®, en los métodos de desinfección D3 y D4, fue óptima para controlar la contaminación y no provocar daño a los explantes. Además, el tratamiento previo de las plantas en el invernadero con una solución de Agri-mycin y Benlate® (D4), disminuyó considerablemente los porcentajes de contaminación en la etapa del establecimiento *in vitro*.

### **Evaluación de la contaminación y la oxidación en los tres protocolos para la inducción de la embriogénesis somática directa**

El método de desinfección D4 resultó ser el más adecuado y efectivo para el control de los microorganismos contaminantes. La oxidación de los explantes influyó sobre la tasa de sobrevivencia de los mismos, así los provenientes de invernadero presentaron una mayor oxidación que los de vitroplantas. El hecho de aislar un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y su balance hormonal. Sin embargo las condiciones experimentales, evidenciaron que la oxidación de los explantes no representa mayores problemas. Por lo que se consideran como buenos explantes, ya que la mayoría sobrevivieron en una alta proporción (Villalobos y Thorpe, 1991).

La contaminación observada, tanto en Caturra como en Catuaí, al utilizar vitroplantas como fuente de explantes fue producto de la manipulación de los mismos en la cámara de flujo laminar.

## Estadíos de desarrollo embriogénico

El oscurecimiento del callo de cicatrización en los tres protocolos para la inducción de la embriogénesis somática directa ha sido observado por otros investigadores, los cuales indican que se debe a la acumulación de sustancias fenólicas (García y Menéndez, 1987; Quiroz- Figueroa *et al.*, 2002a; Quiroz- Figueroa *et al.*, 2001). Quiroz- Figueroa *et al.* (2002a) indican que el oscurecimiento de los tejidos es necesario para la inducción de la embriogénesis somática en café. Quiroz- Figueroa *et al.*, 2001 dicen que los compuestos fenólicos pueden actuar como sustancias inductoras o inactivar sustancias inhibitorias de la embriogénesis somática.

En el sistema para la inducción de la embriogénesis somática directa descrito por el CATIE se observó no sólo el oscurecimiento del callo de cicatrización sino también la oxidación de la lámina foliar del explante. Lo cual coincide con las observaciones realizadas por Yasuda y colaboradores (1985), quienes reportan el oscurecimiento del explante desde el borde hacia el interior del mismo. Además, se observó un mayor crecimiento del callo de cicatrización y una menor cantidad de embriones somáticos por explante, lo cual concuerda con lo descrito por van Boxtel y Berthouly (1996), quienes indican que el crecimiento excesivo del callo de cicatrización tiende a provocar una severa oxidación de los tejidos, lo cual afecta negativamente la respuesta embriogénica.

En esta investigación se observó que el callo de cicatrización es una respuesta al corte de los bordes de la hoja y los embrioides aparecen sobre este callo. Dublin (1981), Peña (1983), García y Menéndez (1987) informan un resultado similar. De ahí la importancia de cortar todos los bordes del explante foliar ya que la proliferación del callo solamente ocurre en los bordes cortados (Sondahl *et al.*, 1991). Asimismo, se observó la aparición de

embriones somáticos sobre heridas en el segmento de hoja, lo que indica que al hacer heridas sobre la lámina foliar, puede incrementar el número de embriones obtenidos por explante. Las respuestas observadas se explican por el hecho de que las regiones cortadas o heridas están en contacto directo con las citocininas, las cuales inducen la embriogénesis somática (Hatanaka *et al.*,1991).

Los diferentes estadios de desarrollo embriogénico observados fueron similares, independientemente de la variedad y el medio de cultivo utilizado. Ello concuerda con los resultados obtenidos por Yasuda *et al.* (1985), García y Menéndez (1987), Hatanaka *et al.* (1991), Bieysse *et al.* (1993) y Quiroz-Figueroa *et al.* (2002b). Por otra parte, la formación de embriones somáticos es un proceso continuo durante el período de incubación de los explantes. En vista que no todas las células se diferencian en embriones somáticos simultáneamente, es posible observar en un mismo explante todas las etapas de desarrollo del embrión (Yasuda *et al.*, 1985; García y Menéndez 1987; Bieysse *et al.*, 1993)

## **Respuesta a la inducción de la embriogénesis somática directa**

Uno de los factores que determina el éxito en los sistemas de micropropagación es el estado fisiológico de la planta donadora del explante. Se observó que los explantes derivados de vitroplantas y plantas de tres meses de edad de la variedad Caturra presentan una mejor respuesta a la embriogénesis somática directa en comparación plantas de doce meses de edad de las variedades Caturra y Catuaí. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bieysse y colaboradores (1993), quienes demostraron una mejor respuesta a la embriogénesis somática en los explantes de *Coffea arabica* provenientes de vitroplantas que aquellos procedentes de plantas de invernadero. Esta diferencia se debe a que los requerimientos nutricionales y

hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Villalobos y Thorpe, 1991). Los explantes provenientes de vitroplantas son menos diferenciados y además, poseen un mayor contenido de potasio, nitrógeno y fósforo, elementos minerales que juegan un papel importante en la embriogénesis somática, en comparación con las hojas de embriones somáticos y de plantas de cuatro meses de edad regeneradas *ex vitro* (Barry- Etienne *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, al cultivar segmentos de hoja de vitroplantas de Caturra y Catuaí y segmentos de hoja provenientes de plantas de café de la variedad Caturra de tres y doce meses de edad en el medio de cultivo Yasuda *et al.*,(1985) difieren con los resultados obtenidos por Torres (2000) quien al cabo de 25 semanas de cultivo no detectó la presencia de estructuras embriogénicas en ninguno de los genotipos introducidos en este medio de cultivo. Lo cual se puede atribuir a una diferencia en los genotipos y que las plantas utilizadas por Torres (2000) eran plantas maduras.

Hatanaka y colaboradores (1991) obtuvieron embriones somáticos al cultivar segmentos de hoja provenientes de plantas de *Coffea canephora* de tres años de edad. Sin embargo, en el presente trabajo, no se obtuvieron embriones al utilizar segmentos de hoja provenientes de plantas de café de doce meses de edad. La estrecha base genética de *Coffea arabica* y su carácter autógeno pueden ser la razón que explique que sus genotipos presenten una menor respuesta a la inducción de la embriogénesis somática que los genotipos de *Coffea canephora* (van Boxtel y Berthouly; 1996; Torres, 2000).

La posición de la hoja en la planta donadora determinó la inducción de la embriogénesis somática. Así, los explantes provenientes de las hojas de la parte apical de las vitroplantas de Caturra y Catuaí produjeron en promedio

el mayor número de embriones somáticos por explante. Lo cual se puede relacionar al hecho que las hojas jóvenes son ricas en citocininas, las cuales inducen el desarrollo embriogénico y además, pueden extraer nutrientes, tales como nitrógeno, potasio y fósforo, de las hojas más viejas, en este caso las de la parte media de las vitroplantas, lo cual disminuye el potencial embriogénico de este último tipo de hojas. (Sondahl *et al*, 1991; Salisbury y Ross, 1994). Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren con los reportados por Quiroz- Figueroa *et al.*, (2002b) quienes observaron que el primer par de hojas de las vitroplantas de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo al utilizar el medio de cultivo descrito por Yasuda *et al.* (1985) no respondieron a la inducción de la embriogénesis somática directa.

Al cabo de doce semanas de cultivo sólo se observaron estructuras embriogénicas al cultivar explantes procedentes de hojas de café de doce meses de edad de la variedad Caturra en el medio descrito por Yasuda *et al.*,(1985). Ello evidencia como la inducción de la embriogénesis somática está determinada por la interacción del genotipo con el medio de cultivo (Bieysse *et al.*, 1993).

Otro de los factores que afecta la inducción de la embriogénesis somática directa es la composición del medio de cultivo. El protocolo descrito por Yasuda *et al.* (1985) fue el que mejores resultados brindó en la presente investigación. Lo anterior se atribuye a la diferencia en las sales minerales y el gelificante con respecto al medio Hatanaka *et al.*, (1991) y el medio de inducción de embriones (CATIE). En el medio de cultivo Yasuda *et al.*, (1985) solidificado con Gelrite, la disponibilidad de agua y nutrientes para el explante en el medio es mayor, lo cual de alguna manera favorece la embriogénesis somática (Bieysse *et al.*, 1993). Asimismo, García y Menéndez (1987) observaron una influencia del agente solidificante sobre la producción de embrioides, la cual fue mayor en el medio solidificado con Gelrite en comparación con la producción de embriones observada en el

medio gelificado con agar. Por otra parte, este medio de cultivo posee una concentración mayor de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El fósforo es uno de los elementos minerales más absorbidos por las células embriogénicas de café (Albarrán, 1999; Solano, 2001). En café se requiere de una alta absorción de fósforo (P), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) para el inicio de la formación de embriones somáticos (Albarrán, 1999). En alfalfa, dependiendo de la concentración de  $\text{K}^+$  presente en el medio de cultivo, se observa una disminución o estimulación de la embriogénesis somática (Shetty y Mckersie, 1993 citado por Albarrán, 1999).

Por otra parte los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en la inducción de la embriogénesis somática. García y Menéndez (1987) lograron la formación de embriones somáticos en forma directa, aunque en muy baja frecuencia, al mantener los explantes foliares del híbrido Catimor en el medio Murashige y Skoog complementado con  $4 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en esta investigación al cultivar segmentos de hojas en el medio para la inducción de la embriogénesis somática directa descrito por el CATIE. Según Dublin (1981), las altas concentraciones de citocininas inducen la diferenciación de embriones somáticos en forma directa, sin la formación previa de callo.

## **Estudio histológico del proceso embriogénico en café**

Los cortes longitudinales de los tres tipos de explante utilizados evidenciaron que no hay diferencia en cuanto a los tejidos que los conforman. Pero, los explantes provenientes de vitroplantas presentaron la mejor respuesta a la inducción de la embriogénesis somática, esto por cuanto, este tipo de tejido está constituido principalmente por células parenquimatosas, las cuales se caracterizan por su bajo nivel de diferenciación (Flores- Vindas, 1998; Barry- Etienne *et al.*, 2002 y Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002b).

Se considera que la embriogénesis somática directa tiene un origen unicelular y que dichas células solamente requieren del estímulo adecuado para que den origen al embrión somático (Quiroz *et al.*, 2002b). A pesar de que en el presente trabajo no se pudo evidenciar, a nivel histológico, el origen unicelular de la embriogénesis somática, si se observó que el proceso se produjo a partir de tejido del parénquima. Loyola- Vargas *et al.* (1999) indican que los proembriones se originan de las células de mesófilo o de las células epidérmicas. Por otro lado, Quiroz- Figueroa *et al.* (2002b) mencionan que las regiones embriogénicas se forman a partir las células más mitóticas de la capa de células subepidérmicas.

Por medio del estudio histológico se pudo evidenciar que se obtuvo un proceso de embriogénesis somática directa, ya que las células que conforman el callo de cicatrización formado como primer paso del proceso no son embriogénicas y se caracterizan por poseer vacuolas grandes, aumentar en tamaño y no dividirse (Emons, 1994). Los embriones somáticos se formaron a partir de un pequeño grupo de células adyacentes a las células que conforman el callo de cicatrización. Estas células presentan las características propias de las células embriogénicas: son pequeñas, permanecen unidas unas con otras, poseen vacuolas pequeñas, un citoplasma denso y no pierden la capacidad de dividirse (Emons, 1994).

Adicionalmente, el proceso de embriogénesis somática directa se corroboró, ya que se observó que no existe una conexión vascular entre los embriones somáticos y el tejido que les dio origen (Quiroz *et al.*, 2002b). Asimismo, se observó una conexión por medio de una estructura similar al suspensor presente en los embriones cigóticos. Al respecto, Emons (1994) señala que células embriogénicas están unidas al tejido madre por medio de una gran célula vacuolada, similar al suspensor presente en el embrión cigótico, y cuya función es la de proveer nutrientes y hormonas al embrión.

Los embriones somáticos, al igual que los embriones cigóticos, al estar unidos por uno de los extremos al tejido madre, desarrollan una polaridad (Emons, 1994). Lo cual coincide con lo observado en los embriones somáticos en estado torpedo obtenidos en el presente trabajo. Esto nos indica que el no haber observado el desarrollo de una raíz funcional se debió al equilibrio hormonal (citocina/ auxina) de los medios de germinación utilizados (Salisbury y Ross, 1994). Pero, si se varía la concentración de reguladores de crecimiento de los medios de cultivo se podría inducir tanto el desarrollo del sistema apical como el radical.

### **Germinación de los embriones somáticos**

El equilibrio hormonal de los medios de germinación incide en el desarrollo ya sea de la zona apical o de la zona radical presente en los embriones somáticos (Dublin, 1991). En la presente investigación se observó un crecimiento predominante de los cotiledones en comparación con el eje radical. Las pocas raíces formadas se caracterizaron por ser gruesas de color verde y carentes de pelos radicales, lo cual se asocia con raíces no funcionales. Debido a que todos los medios de cultivo evaluados para la germinación de los embriones somáticos contenían una citocinina como único regulador de crecimiento, la alta relación citocinina a auxina favoreció el desarrollo de tallos y hojas en detrimento del desarrollo radical (Salisbury y Ross, 1994).

Por otra parte, el resultado anterior se relaciona con el hecho que los recipientes utilizados y la baja densidad de cultivo (10 embriones por frasco Gerber) no representaron una limitante física ni de disponibilidad de los nutrientes para la germinación de los embriones. Girón (1998) y Solano (2001) observaron que los embriones germinados en medio semi-sólido presentan un crecimiento predominante de la parte apical en comparación con los embriones germinados en Recipiente de Inmersión Temporal

Automático (RITA). Esta diferencia en la morfología de los embriones somáticos se debió a una baja densidad de cultivo, en la cual no existen competencias físicas entre los embriones.

El hecho que en ninguno de los medios de cultivo para la germinación de los embriones somáticos se haya observado el desarrollo de raíces probablemente se debió a que para inducir el desarrollo de las raíces se requiere de una relación alta de auxina citocinina o la eliminación de las citocininas exógenas (Villalobos y Thorpe, 1991; Salisbury y Ross, 1994). Contrario a los resultados obtenidos en la presente investigación, Yasuda *et al.* (1985) en *Coffea arabica* cv. Typica y Quiroz- Figueroa *et al.* (2002b) en *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo, lograron la conversión de embriones somáticos en plantas con raíces, en un medio de cultivo que contenía solamente 1 mg l<sup>-1</sup> BAP o en ausencia de este. Posiblemente las diferencias entre los resultados obtenidos por Yasuda *et al.* (1985) y los obtenidos en la presente práctica se deban a los genotipos con los que se trabajó.

El mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos se obtuvo en el medio de cultivo Yasuda *et al.* (1985), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Albarrán (1999), quien reporta que las sales minerales y vitaminas del medio de cultivo Yasuda, utilizando concentraciones de BAP entre 4 y 6 mg l<sup>-1</sup> fueron las más eficientes para estimular la formación de embriones somáticos a partir de una suspensión celular de un híbrido F1 de *Coffea arabica* (Caturra x ET531), así como para la conversión de los embriones en plantas.

En el medio de germinación T5, el 35% de los embriones cultivados germinaron al cabo de cuatro semanas. Solano (2001) reporta con este mismo medio, un porcentaje de germinación del  $97\% \pm 3$ , a partir de una suspensión celular, después de 6 meses de cultivo. Sin embargo, la diferencia entre estos dos resultados podría deberse a que en esta investigación se utilizaron embriones en diferentes estadios de desarrollo. En el caso de los embriones en estado globular, estos aún no habían completado su desarrollo, por lo que, presentaron problemas de germinación. Estas diferencias ontogénicas se reflejaron también en la heterogeneidad de la germinación en todos los tratamientos de germinación.

## CONCLUSIONES

- El método de desinfección en el cual se asperjó con una solución del bactericida (Agri-mycin) y del funguicida (Benlate) ( $5 \text{ gl}^{-1} \text{ c/u}$ ) dos veces por semana una semana antes de la introducción *in vitro*, se empleó un período de 60 minutos de inmersión de los explantes en una solución de Agri-mycin y Benlate ( $1 \text{ gl}^{-1} \text{ c/u}$ ) y se sumergió los explantes en una solución de NaOCl al 1.6% y 1% v/v por 30 y 5 minutos respectivamente, resultó el más adecuado y efectivo para el control de los microorganismos contaminantes en las hojas provenientes de plantas de café mantenidas en el invernadero.
- Se evidenció que la respuesta a la inducción de la embriogénesis somática directa está determinada por la posición de la hoja en las vitroplantas de café, por la edad fisiológica de la planta donadora del explante, por el medio de cultivo y el genotipo.
- Las hojas de vitroplantas, tanto de la variedad Caturra como Catuaí, fueron los mejores explantes para la inducción de la embriogénesis somática directa.
- El medio de cultivo Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993) fue el más eficiente para la inducción de la embriogénesis somática en segmentos de hoja provenientes de plantas de la variedad Caturra de tres y doce meses de edad y para la germinación de los embriones somáticos obtenidos.
- El estudio histológico permitió evidenciar el tipo de embriogénesis somática directa.
- El protocolo Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993) permitió obtener embriones somáticos en forma rápida y simple.

## RECOMENDACIONES

- Se debe asperjar dos veces por semana con una solución bactericida (Agri-mycin) y funguicida (Benlate®) las plantas de café mantenidas en el invernadero, por lo menos una semana antes de la introducción *in vitro* con el fin de reducir las pérdidas por contaminación.
- El medio de cultivo Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993) se recomienda para la inducción de la embriogénesis somática directa en café.
- Se recomienda utilizar material vegetal joven para la inducción de la embriogénesis somática directa en café, pues es el que presenta mayor potencial embriogénico.
- Se debe evaluar la respuesta a la inducción de la embriogénesis somática directa utilizando el medio de cultivo Yasuda *et al.* (1985) modificado por Bieysse *et al.* (1993) en segmentos de hoja de café que hayan sido transformados.
- Para obtener una población homogénea de plántulas se recomienda utilizar en la germinación solamente los embriones somáticos en estado torpedo en el medio de cultivo Yasuda *et al.*(1985) modificado por Bieysse *et al.*,(1993).
- Se debe continuar la investigación en cuanto a la composición del medio de cultivo para la germinación de embriones somáticos de café.

- Se recomienda adaptar el sistema de inmersión temporal automatizado (RITA) para la germinación de los embriones somáticos, pues permite reducir costos y obtener una mayor cantidad de embriones somáticos.

## LITERATURA CONSULTADA

- Abdelnour, A y Escalant, J. V. 1994. Conceptos Básicos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba, C.R. 38 p.
- Albarrán, J. G. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en biorreactor simplificado. Tesis *Magíster Scientiae*. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 100 p.
- Alvarado, M y Rojas, G. 1998. El Cultivo y Beneficiado del Café. San José, C.R. EUNED. 184 p.
- Alvarenga, S. 1999. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. 62 p.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. EN: *Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for propagation and Breeding*. Evans D.A, Sharp W.R., Ammirato P.V. and Yamada Y (eds) Macmillan Publishing Compagny. New York 1: 82-123.
- Barry- Etienne D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H. 2002. Comparison of somatic embryogenesis- derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany* 90: 77-85.
- Berthouly, M. 1997. Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. EN: *Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura*. Heredia, Costa Rica. pp 25-49.
- Berthouly, M y Michaux- Ferriere, N. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*: Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Netherlands)* 44: 169-176.
- Berthouly, M., Etienne, H. 1999. Somatic embryogenesis in coffee. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Gupta, P. and Newton, R.J. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands (In Press)
- Berthouly, M y Michaux-Ferrière N. 1996. High Frecuency Somatic Embryogenesis on *Coffea canephora*: Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell and Organ Culture* 44: 169-176.

- Bieysse D, Gofflot A y Michaux-Ferrière N. 1993. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can. J. Bot.* 71: 1496-502.
- Calheiros M P, Vieira L y Fuentes S. 1994. Effect of Exogenous Polyamines on Direct Somatic Embryogenesis in Coffee. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 6 (2): 109-114
- Cambrony H.R. 1989. Le caféier. En: *Le Technicien d' Agriculture Tropicale*. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T. 166 p.
- Carneiro, M.F. 1997. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica* 96: 167-172.
- Carneiro, M.F. 1999. Advances in Coffee Biotechnology. *AgBiotechNet* 1: 1-7.
- Coffee Research Institute. 2001. Cultivar (en línea). Consultado 11 may. 2002. Disponible en: <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/varietals.htm>
- Coste, R. 1968. Le caféier. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris. 310 p.
- Couturon, E y Berthaud, J. 1979. Le greffage d'embryons de caféiers. *Café Cacao The* 23 (4):267-270.
- Denchev P, Kuklin A y Scragg A. 1992. Somatic embryo production in bioreactor. *Journal of Biotechnology* 26: 99-109.
- Dublin, P. 1981. Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier *arabust*. *Café Cacao The* 25: 237-242.
- Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 578- 619.
- Elizondo, M. 2002. Alimentos Transgénicos: ventajas, oportunidades y riesgos. *Alimentaria* 59: 6-8
- Etienne, H, Solano W, Pereira A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Anthony F, Côte F y Berthouly M. 1997. Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación masal de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. EN: *Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura*. Heredia, Costa Rica. pp. 253-261.
- Etienne H, Barry- Etienne D, Vasqu ez N, Berthouly M. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café. EN: *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA.. San José, Costa Rica. pp 457-495.

- Emons, A. 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspect. *Acta. Bot. Neerl.* 43 (1): 1-14.
- Flores, D y Abdelnour, A. 2000. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. 50 p.
- Flores-Vindas, E. 1998. La Planta: estructura y función. 2ª ed. Cartago, C.R. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 504 p.
- Fuentes-Cerda C.F.J, Monforte-González M, Méndez-Zeel M, Rojas-Herrera R y Loyola-Vargas V.M. 2001. Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by the nitrogen source. *Biotechnology Letters* 23:1341-1343
- Fuentes S, Calheiros M, Manetti-Filho J y Vieira L. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60 (1): 5-13.
- Gamborg OL, Miller RA y Ojima K. 1968. *Exp. Cell. Res* 50: 151-158.
- García, E y Menéndez, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto Catimor. *Café Cacao The* 31(1):15-22.
- García, E y Rafael, M. 1989. Propagación clonal de plantas de café (*Coffea arabica* L. 'catimor') a partir de microesquejes cultivados *in vitro*. (en línea) *Agronomía Tropical* 39(4-6): 249-268. Disponible en: [http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v39\\_4-6/v396a004.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v39_4-6/v396a004.html)
- Girón, I. 1998. Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal. Tesis *Magíster Scientiae*. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 92 p.
- González M, Santana N , Ferrer M y Cabrera M. 1999. Influencia de diferentes factores en embriogénesis somática de *Coffea canephora* P. EN: 5 Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal (1999, Villa Clara, Cuba). 1999. *Biotecnología Vegetal: Libro de reportes cortos*. Villa Clara, Cuba. pp 120-122.
- Hatanaka T, Arakawa O, Yasuda T, Uchida N y Yamaguchi T. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Reports* 10: 179-182.
- Hatanaka T, Sawabe E, Azuma T, Uehida N y Yasuda T. 1995. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Science* 107 (2):199-204.
- ICAFFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2001. Informe de la actividad cafetalera de Costa Rica. Instituto del Café de Costa Rica, San José. 58 p.

- Juma C, Magambo J.M y Monteith H. 1994. Tissue Culture for Coffee: The case of Uganda. *Biotechnology and Development Monitor* 20: 19-20
- Leifert, C y Cassells, C.A. 2001. Microbial hazard in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol- Plant.* 37: 133-138.
- Le Pelley, R. 1968. *Pest of coffee.* London, Longman. 590 p.
- León, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales.* 3ª ed. San José, C. R. IICA. PP 350-364. (colección Libros y Materiales Educativos/ IICA; no. 84)
- Litz, R.E y Jarret, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones.* Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 143-173.
- López M. 1994. *Uso de entomopatógenos y parasitoides como control biológico de plagas y enfermedades en el cultivo del café.* Ministerio de Agricultura y Ganadería. 97p
- Loyola-Vargas-V.M; Fuentes-Cerda-CFJ; Monforte-Gonzalez-M; Mendez-Zeel-M; Rojas-Herrera-R; Mijangos-Cortes-J. 1999. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. 18 Colloque Scientifique Internationale du Café, Helsinki, Finland, 2-8 aout 1999. ASIC (Paris), pp 302-307.
- Madriz, J. 2001. *Plantas Transgénicas: Un Nueva Herramienta para el Mejoramiento Genético Vegetal.* Comité Técnico Nacional de Bioseguridad. San José, C.R. 15 p
- Michaux- Ferriere N, Biéysse D, Alvard D y Dublin P. 1989. Etude histologique de l'embryogenese somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café Cacao Thé* 33: 207-217.
- Menéndez- Yuffá, A y García E. 1996. *Coffea species (Coffee).* EN: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 35. *Trees* 4. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 95- 119.
- Molina, A y Figueroa, P. 1996. Propagación por microestacas y por embriogénesis somática en el cultivo *in vitro* del café. EN: I Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (memorias) (1996, Guatemala) pp 97-102.
- Mroginski L. A y Roca, W. M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones.* Roca, W. M y Mroginski L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 20-40.

- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Obando, A. 2002. Levantamiento de un pie de cría de broca de café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera, Scolytidae) en granos de café y en dieta artificial. Tesis Bachiller en Ingeniería en Agronomía. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 67 p.
- Peña, M. 1983. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. EN: Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras (Portugal) 17-20 Oct 1983. p: 485-507.
- Pierson E, Van Lammeren A, Schel J y Starisky G. 1983. In vitro development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma* 115: 208- 216.
- PROCIMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica). 2001. Informe de Estadísticas Mensual: Principales Productos Exportados por el Sector Agrícola (en línea). San José, C.R. Consultado 14 abr. 2002. Disponible en: <http://www.procomer.com/est/informes/>
- Quiroz-Figueroa F, Méndez-Zeel M, Larqué-Saavedra A y Loyola-Vargas V.M. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep.* 20:679-684.
- Quiroz-Figueroa F.R, Méndez- Zeel M, Sánchez- Teyer F, Rojas-Herrera R y Loyola-Vargas V.M. 2002a. Differential gene expression in embryogenic and non- embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *J. Plant Physiol* 159 (11): 1267- 1270.
- Quiroz-Figueroa F.R., Fuentes-Cerda C.F.J., Rojas-Herrera R y Loyola-Vargas V.M. 2002b. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20:1141–1149.
- Ramírez, M del C y Salazar, E.G. 1998. Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo in vitro de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L (en línea). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 15:162-173. Consultado 21 set. 2002. Disponible en [http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v15\\_2/v15z006.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v15_2/v15z006.html)
- Rodríguez-Barbon, R y Preil, W. 1999. Influencia del gas dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) sobre la embriogénesis somática del café (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo). EN: 5 Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal (1999, Villa Clara, Cuba). 1999. *Biotecnología Vegetal: Libro de reportes cortos*. Villa Clara, Cuba. pp 120-122.

- Salisbury F y Ross C. 1994. Fisiología Vegetal. Traducido por Virgilio González. 4 ed. México D.F, México. Grupo Editorial Iberoamérica de S.A. de C.V. 759 p.
- Solano, W. 2001. Efecto de las Características de Cultivo en Suspensión Celular y en Biorreactor con Inmersión Temporal sobre la Propagación masiva de *Coffea arabica* por Embriogénesis Somática. Tesis Licenciatura en. Ingeniería en. Agronomía con énfasis en Fitotecnia. Turrialba, Costa Rica., Universidad de Costa Rica. 87 p
- Sondahl M.R, Spahlinger D y Sharp W.R. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. Z Pflanzenphysiol 94: 185-188.
- Sondahl M.R, Nakamura T, Sharp W.R. 1991. Propagación *in vitro* del café. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 622- 642.
- Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Botánica Neerlandica 19 (4): 509- 514.
- Tisserat, B. 1991. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. EN: Plant Cell Culture: A Practical Approach. Dixon, R.A (ed). Oxford University Press. Oxford, England. pp 79-105. (Practical Approach Series)
- Torres, M. 2000. Evaluación de la aptitud de genotipos de café (*Coffea arabica*) a la propagación por embriogénesis somática comparando la eficiencia de dos diferentes métodos de cultivo. Tesis Licenciado en Ingeniería en Agronomía. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 67 p.
- van Boxtel, J y Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from Coffee leaves: Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 7-17.
- Vicient, C y Martínez, F. 1998. The potential use of somatic embryogenesis in agro forestry are not limited to synthetic seed technology. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal 10 (1):1-12.
- Villalobos, V.M y Thorpe, T.A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 128- 141.

Yasuda T, Fujii Y y Yamaguchi T. 1985. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explant by Benziladenine. *Plant Cell Physiol* 26:595-597.

## ANEXOS

### Anexo 1. Composición química del medio base Murashige y Skoog (1962)<sup>1</sup>

Macronutrientes	Fórmula	Concentración (mg l <sup>-1</sup> )
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	1900
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
Fosfato diácido de potasio	K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Micronutrientes		
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	Mn SO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
Sulfato de cobre dihidratado	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Na Fe-EDTA		
EDTA de Sodio Férrico	Na Fe -EDTA	43

<sup>1</sup> Tomado de Alvarenga, 1999.

## Anexo 2. Diagrama de flujo de la metodología.

