

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE TASAS DE SIEMBRA DE CALLOS
EMBRIOGÉNICOS DE "CAFÉ" (*Coffea arabica*) UTILIZANDO
TRES TAMAÑOS DE RECIPIENTE PARA DESARROLLAR
SUSPENSIONES CELULARES

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

ANA MARICELA MEJÍA VILLACORTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, DICIEMBRE DE 2004.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE TASAS DE SIEMBRA DE CALLOS
EMBRIOGÉNICOS DE "CAFÉ" (*Coffea arabica*) UTILIZANDO
TRES TAMAÑOS DE RECIPIENTE PARA DESARROLLAR
SUSPENSIONES CELULARES

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

ANA MARICELA MEJÍA VILLACORTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORAS:

M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA
LICDA. MARTHA LIDIA DE AMAYA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, DICIEMBRE DE 2004.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE TASAS DE SIEMBRA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS
DE "CAFÉ" (*Coffea arabica*) UTILIZANDO TRES TAMAÑOS DE
RECIPIENTE PARA DESARROLLAR SUSPENSIONES CELULARES"

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

ANA MARICELA MEJÍA VILLACORTA

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORA: M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ_____

ASESORA: Licda. MARTHA LIDIA DE AMAYA_____

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, DICIEMBRE DE 2004.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTORA

Dra. MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ

SECRETARIA GENERAL

Licda. ALICIA MARGARITA RIVAS DE RECINOS

FISCAL GENERAL

Lic. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

M.Sc. JOSÉ HÉCTOR ELÍAS

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, DICIEMBRE DE 2004.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Contenidos	5
Índice de Tablas.....	9
Índice de Gráficos.....	10
Agradecimientos.....	11
Dedicatoria.....	13
Resumen	14
Introducción.....	15
1. Fundamento Teórico	16
1.1 Antecedentes del cultivo del café	16
1.2 Origen y Distribución Geográfica.....	16
1.3. Botánica del cafeto	17
1.3.1 Raíz.....	17
1.3.2 Tallo.....	18
1.3.3 Hojas.....	18
1.3.4 Inflorescencias	18
1.3.5 Fruto	19
1.3.6 Fitosanidad	19
1.3.7 Plagas	19
1.4. Aplicación de Biotécnicas.....	20
1.4.1 Cultivo de Órganos Vegetales.....	21
1.4.2 Cultivo de Callos.....	21
1.4.3 Cultivo de Células en Suspensión.....	23
1.4.4 Características de las células en suspensión	24
1.4.5 Problemas presentes en las suspensiones celulares	25
1.4.6 Métodos y agentes contra espumas.....	26
1.4.7 Características generales del crecimiento de las células en suspensión	27
1.4.8 Fases del crecimiento	27

1.4.9 Cuantificación del crecimiento	28
1.4.10 Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal	30
1.4.11 Medios de Cultivo	33
1.4.4.1 Consistencia de los Medios de Cultivo	35
1.4.4.1.1 Medio Semisólido	35
1.4.4.1.2 Medios Líquidos	35
1.5. Cultivo de Tejidos en Café	36
1.5.1 Microesquejes	37
1.5.2 Embriogénesis Somática	39
1.5.2.1 Embriogénesis Somática de Baja Frecuencia	41
1.5.2.2 Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia	41
1.5.3 Etapas que Comprende la Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (HFSE)	42
1.5.3.1 Inducción	42
1.5.3.2 Proliferación del Callo Embriogénico en Suspensión Celular	43
1.5.3.3 Regeneración o Desarrollo de los Embriones Somáticos	44
1.5.3.4 Maduración	44
1.5.3.5 Embriogénesis somática en cultivos en suspensión	44
1.5.4 Efecto de los Reguladores de Crecimiento Sobre la Embriogénesis Somática	45
2. Objetivos	46
2.1 Objetivo General	46
2.2 Objetivos Específicos	46
3. Planteamiento de Hipótesis	47
3.1 Hipótesis Nula 1 (H_01)	47
3.2 Hipótesis Experimental 1 (H_E1)	47

3.3 Hipótesis Nula 2 (H_02)	47
3.4 Hipótesis Experimental 2 (H_E2).....	47
4. Materiales y Métodos	48
4.1 Ubicación del Área de Estudio.....	48
4.2 Material Experimental.....	48
4.2.1 Material Vegetativo.....	48
4.3 Medios de Cultivo Utilizados.....	48
4.4 Etapa Experimental	49
4.4.1 Suspensión Celular (Proliferación del Callo)	49
4.5 Observaciones	51
4.6 Prueba Estadística.....	51
5. Resultados	53
5.1 Crecimiento de la Suspensión Celular Durante Subcultivo 1.....	53
5.2 ANDEVA y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente aplicado a subcultivo 1 de Suspensiones	54
5.2.1 Interacción entre Tasas de Siembra y Tamaño de Recipiente en subcultivo 1.	54
5.3 Crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 2.	54
5.3.1 ANDEVA y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente aplicado a subcultivo 2 de Suspensiones	56
5.3.2 Interacción entre Tasas de Siembra y Tamaño de Recipiente en subcultivo 2.....	56
5.4 Crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 3.	56
5.4.1 ANDEVA y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente aplicado a subcultivo 3 de Suspensiones.....	58

5.4.2 Interacción entre Tasas de Siembra y Tamaño de Recipiente en subcultivo 3	58
6. Discusión y Análisis de Resultados	61
6.1 Tamaño de los Recipientes	61
6.2 Tasa de Siembra	64
6.3 Variación Somaclonal	65
6.4 Reducción de Contaminación	66
6.5 Regeneración y Germinación de Embriones	66
7. Conclusiones	68
8. Recomendaciones	69
9. Literatura Citada	70
Apéndices.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°.	Página
Tabla N°. 1. Diferentes Tratamientos Utilizados para Iniciar Suspensiones Celulares.	49
	Apéndice
Tabla N°. 2. ANDEVA Aplicado a Subcultivo 1 de Suspensiones.....	12
Tabla N°. 3. Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y Tamaño Del Recipiente en Subcultivo 1.....	12
Tabla N°. 4. ANDEVA Aplicado a Subcultivo 2 de Suspensiones.....	13
Tabla N°. 5. Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y Tamaño Del Recipiente en Subcultivo 2.....	13
Tabla N°. 6. ANDEVA Aplicado a Subcultivo 3 de Suspensiones.....	14
Tabla No. 7. Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y Tamaño Del Recipiente en Subcultivo 3.....	14
Tabla N°. 8. Prueba de Tukey Aplicada a los Tamaños de los Tamaños de los Recipientes en Subcultivo 115
Tabla N°. 9. Prueba de Tukey Aplicada a las Tasas de Siembra en Subcultivo 115
Tabla N°. 10. Prueba de Tukey Aplicada a los Tamaños de los Tamaños de los Recipientes en Subcultivo 216
Tabla N°. 11. Prueba de Tukey Aplicada a las Tasas de Siembra en Subcultivo 216
Tabla N°. 12. Prueba de Tukey Aplicada a los Tamaños de los Tamaños de los Recipientes en Subcultivo 317
Tabla N°. 13. Prueba de Tukey Aplicada a las Tasas de Siembra en Subcultivo 317

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°. 1. Volúmenes de Células en μ l/Tratamiento y Crecimiento de La Suspensión Celular de "café" (<i>Coffea arabica</i>) Durante Subcultivo 1.	53
Gráfico N°. 2. Interacción entre Tasas de Siembra de callo (0.5 g, 1.0 g, 1.5 g) y Tamaño de Erlenmeyers (50 ml, 125 ml y 250 ml) en Subcultivo 1 de "café" (<i>Coffea arabica</i>) para Observar el Volumen en Microlitros de Células Resultantes Según el Tamaño del Recipiente.	55
Gráfico N°. 3. Volúmenes de Células en μ l/Tratamiento y Crecimiento de La Suspensión Celular de "café" (<i>Coffea arabica</i>) Durante Subcultivo 2.	55
Gráfico N°. 4. Interacción entre Tasas de Siembra de callo (0.5 g, 1.0 g, 1.5 g) y Tamaño de Erlenmeyers (50 ml, 125 ml y 250 ml) en Subcultivo 2 de "café" (<i>Coffea arabica</i>) para Observar el Volumen en Microlitros de Células Resultantes Según el Tamaño del Recipiente.	57
Gráfico N°. 5. Volúmenes de Células en μ l/Tratamiento y Crecimiento de La Suspensión Celular de "café" (<i>Coffea arabica</i>) Durante Subcultivo 2.	57
Gráfico N°. 6. Interacción entre Tasas de Siembra de callo (0.5 g, 1.0 g, 1.5 g) y Tamaño de Erlenmeyers (50 ml, 125 ml y 250 ml) en Subcultivo 2 de "café" (<i>Coffea arabica</i>) para Observar el Volumen en Microlitros de Células Resultantes Según el Tamaño del Recipiente.	59

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso

Por haberme dado fortaleza y confianza en mi para lograr una de mis metas más importantes en la vida.

A mi madre Ana Villacorta de Mejía

Por darme la vida y ser mi inspiración y mi ejemplo como mujer.

A mis asesoras de tesis:

M.Sc. Yanira Elizabet López Ventura

Por ser más que mi asesora, mi amiga y por haber estado a mi lado en cada momento de este proceso.

Licda. Martha Lidia de Amaya

Por haberme apoyado durante mi estancia en PROCAFE y haber estado siempre pendiente en el desarrollo de esta investigación.

M.Sc. Mario Antonio Orellana Núñez

Porque sus observaciones fueron muy objetivas y ayudaron a enriquecer este trabajo.

A Yukako Gamaike, Voluntaria de JICA-JOCV

Por toda su ayuda y disposición al brindarme su apoyo.

Licda. Sonia Edith Solórzano

Por su valiosa ayuda incondicional y disposición en cada momento que le busqué.

A mis amigas, Carito, Geral, Lily y Rhina.

Porque sin su apoyo moral y siempre incondicional, no habría logrado culminar con éxito esta meta.

A mis amigos Manuel y Jeremías Yanes

Porque sin su ayuda incondicional la realización de este documento no hubiera sido posible.

A La Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE)

Por abrirme las puertas y tratarme como a un miembro más de ustedes.

M.Sc. José Rafael Vega López

Por haberme dado la oportunidad de conocer el maravilloso mundo de la Biotecnología Vegetal.

Al Doctor Bernard Pierre Dufour

Por creer en mi capacidad como biotecnóloga, además de brindarme su amistad desinteresada.

DEDICATORIA

A mi madre

Ana Villacorta de Mejía
Por su apoyo en todo momento de mi vida.

RESUMEN

Como una medida para obtener plantas de "café" (*Coffea arabica*) con características especiales, se ha empleado la técnica de reproducción asexual utilizando trozos de hojas. En ese contexto, se utilizaron callos embriogénicos obtenidos de fragmentos de hojas de plantas seleccionados de un ensayo cuyo material son Híbridos F1 que se validan en El Salvador. Los medios utilizados fueron de tipo MS Basal (1962), suplementado con 2,4-D (1mgL^{-1}) para la etapa de las suspensiones, y con BAP (Benzilaminopurina, 4mgL^{-1}) y Adenina (40mg L^{-1}) solidificado con 2.0 gL^{-1} de Phytigel para la regeneración de los embriones. Las suspensiones embriogénicas fueron multiplicadas en un medio de cultivo líquido utilizando un agitador a 110 revoluciones por minuto, con luz indirecta durante periodos de 1 mes realizando cambios de medio cada 2 semanas y diferentes cantidades de callos en Erlenmeyer graduados de diferentes tamaños. Las pruebas de germinación se desarrollaron con el fin de determinar la Viabilidad de las Células Embriogénicas después de ser sometidas a la multiplicación por suspensiones celulares. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 3×3 con 27 repeticiones. La interacción que existió entre el tamaño del recipiente y la cantidad de inóculo para iniciar las suspensiones celulares, se evidenció al utilizar el recipiente de 125 ml con una tasa de siembra de 0.5 gL^{-1} . La interacción que existe entre el tamaño del recipiente y la cantidad de callo embriogénico para desarrollar suspensiones celulares reveló un mayor crecimiento cuando se utilizó el recipiente de 125 ml con una tasa de siembra de 1.5 gL^{-1} . Al determinar la interacción que existía entre el tamaño del recipiente y la cantidad de inóculo para desarrollar suspensiones celulares, se pudo evidenciar un mayor crecimiento cuando se utiliza el recipiente de 250 ml siendo independiente de la tasa de siembra inicial.

INTRODUCCIÓN

A través de los años se han realizado numerosas investigaciones utilizando las dos especies más cultivadas a nivel mundial (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*) cuyos fines han sido obtener plantas resistentes (Híbridos) a las enfermedades que más afectan a los cafetos, cuidando la calidad de la bebida y producción. El Salvador es un país que presenta un enorme potencial en la producción de café, gran parte del territorio nacional se caracteriza por disponer de zonas ecológicas y climáticas apropiadas para dicho cultivo (Apéndice 1). En la actualidad existe interés de propagar variedades de "café" que presentan características especiales, tales como: una excelente producción, la cual se expresa en buen aroma y calidad de la bebida (FUNDE, 2003).

A pesar de la crisis económica que atraviesa, el cultivo, en El Salvador continúa siendo una actividad de importancia para la sostenibilidad de la economía y el medio ambiente, en ese contexto, la Embriogénesis Somática ha sido reconocida como una importante vía de regeneración a partir de sistemas de cultivos celulares.

Esto surge como respuesta a la necesidad del caficultor de disponer de alternativas en sus sistemas de producción que le permitan fortalecer su economía, obtener estabilidad económica a corto plazo y una mayor rentabilidad a largo plazo, lo que a su vez constituye un recurso importante ya que con esta técnica se logran obtener las cantidades necesarias de material para regenerar una mayor cantidad de plantas y así suplir las necesidades de los caficultores (Anthony, 1999).

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 Antecedentes del cultivo de Café

El "café" (*Coffea arabica*) es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado nacional e internacional. De este cultivo depende la economía de más de 50 países productores. Se cultiva en 11.2×10^6 hectáreas, con una producción de 5.6×10^6 toneladas de "café oro" en 1990.

A pesar de la crisis económica que atraviesa el cultivo, en El Salvador continúa siendo una actividad de importancia para la sostenibilidad de la economía y el medio ambiente, este rubro genera 132,000 empleos directos, y en el año 2000 representó el 10% del total de exportaciones del país.

La creación y desarrollo de variedades por métodos convencionales lleva 35 años, para la selección de un material con las características buscadas. Hoy en día este cultivo enfrenta muchas dificultades, por lo cual es más difícil para los caficultores darle el manejo adecuado a los cafetales por los altos costos de control de plagas y enfermedades, fertilización y manejo agronómico (CNC¹, s. a.).

1.2 Origen y Distribución Geográfica

El género *Coffea* fue propuesto en 1735 por Linné, quien más tarde en 1753 describió la especie *C. arabica*, pertenece a la familia *Rubiaceae*, que incluye más de 500 géneros y cerca de 8000 especies, Herrier & Barthaud en 1985. Los árboles de café silvestres son componentes naturales de los bosques tropicales de África.

¹ Consejo Salvadoreño del Café.

Todos los botánicos que han explorado los bosques de las tierras altas del sur de Etiopía, sur de Sudán y Norte de Kenia, coinciden con la observación que éste es el centro de diversidad de *C. arabica* y se considera a Yemen como el centro secundario de origen, en ésta región existe un número de variantes, que fueron consideradas para dar lugar a las subespecies (Albarrán, 1999).

1.3 Botánica del Cafeto

El árbol desarrollado normalmente tiene sólo un tallo vertical, que a partir del doceavo nudo emite ramas horizontales. El ápice del árbol crece y las ramas se alargan constantemente.

Por esta forma de desarrollo, al cabo de unos pocos años la planta toma una forma cónica (Ospina- Machado, 1995). Las ramas primarias son aquellas que condicionan el crecimiento lateral de los cafetos, conociéndose también con el nombre de "BANDOLAS", mientras que las ramas ortotrópicas permiten el crecimiento vertical y solo producen yemas vegetativas y nunca flores (Sotomayor & Ducela, 1993. Citado por Girón, 1998).

El *Coffea arabica* es un árbol pequeño, con un crecimiento normal que puede llegar hasta los 15 metros de altura; comercialmente el crecimiento es restringido por la poda.

1.3.1 Raíz

El cafeto tiene una raíz pivotante cónica, que rara vez llega a los 45 centímetros de profundidad. De esta salen otras axiales y crecen verticalmente hacia abajo hasta 3 metros de profundidad; también nacen las raíces secundarias que se extienden horizontalmente y producen las raicillas y pelos absorbentes.

1.3.2 Tallo

Es cilíndrico y de tono oscuro en la base, en el extremo es verde y triangular. En los nudos produce yemas foliares, en cuyas axilas brotan ramas laterales, las ramas crecen constantemente, y producen ramificaciones, nudos con hojas y brotes foliares.

El brote foliar no produce más inflorescencias en la cosecha posterior; por esto la cosecha subsiguiente provendrá principalmente de las zonas nuevas de crecimiento.

1.3.3 Hojas

Son opuestas cruzadas, con estípulas en la base. Tienen una nervadura central o raquis y nervaduras laterales paralelas. La lámina foliar es ondulada y mide hasta 20 centímetros de largo y 10 cm. de ancho. Es elíptica o lanceolada, con un color verde brillante en la parte superior y un color mate en el inferior.

1.3.4 Inflorescencias

Los tallos florales nacen en el ángulo formado por las ramificaciones y las hojas, consta de tres a cuatro tallos, cada uno con dos brácteas de donde salen de uno a cuatro botones; por esto de una inflorescencia puede tener hasta dieciséis flores, que tienen cinco sépalos; la corola es un tubo blanco que se abre en cinco pétalos. Los estambres van unidos al tubo de la corola, las anteras son alargadas y se abren longitudinalmente. La especie arábica es predominantemente autógena, con polinización cruzada no mayor del 10%.

1.3.5 Fruto

Es una drupa elipsoidal ligeramente aplanada, con dos semillas planoconvexas. Es verde al principio, luego cambia al amarillo y al madurar es rojo. Al endocarpio se le llama pergamino, y está constituido por una capa dura y coriácea. A la semilla la forman el endospermo y el embrión.

El endospermo contiene azúcares y alcaloides, uno de ellos es la cafeína. Al tostarse y molerse los granos de café, quedan libres otros compuestos aromáticos, parte de estos salen al ambiente, y otros le dan el aroma y sabor característicos de la bebida.

El embrión consta de un hipocótilo y dos cotiledones superpuestos, al germinar aparece la radícula que se curva hacia abajo y emite raicillas laterales.

1.3.6 Fitosanidad

Es importante conocer los organismos que atacan los cafetos debido que no sólo afectan la sanidad de las plantas, sino, a nivel económico los cultivos son afectados por las pérdidas económicas que generan por el bajo rendimiento de las cosechas y aun más por la calidad del producto final.

1.3.7 Plagas

Dentro de éstas, las más conocidas tenemos: "palomillas" (*Pseudococcus citri*), "escamas ovals" (*Coccus viridis green*), "pulgonos o piojos" (*Toxoptera aurantii B defons*), "minador de las hojas" (*Leucoptera coffeella Guerin-Meneville*), "hormiga" (*Atta sp.*), "perforador o broca de las cerezas del café" (*Stephanoides hypotenemus hampei ferrari*) (*Coleoptera: scolytidae*).

Enfermedades: las más comunes son "la gotera o mancha de las hojas" (*Mycena citricolor*), "mancha de hierro" (*Cercospora coffeicola*), "antracnosis" (*Colletotrichum coffeanum*), "roya" (*Hemileia vastatrix* Berk).

1.4 Aplicación de Biotécnicas

El surgimiento de la Biotecnología Vegetal y su contribución e introducción en cultivares nuevos, incluso para poder prescindir de la planta en su conjunto, ha traído como consecuencia los avances de la técnica de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales y de la Biología Molecular.

En 1902, el alemán Haberlandt, estableció el primer concepto de la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales, afirmando que los resultados de cultivar células vegetales aisladas de plantas superiores en soluciones nutritivas simples, conducían a una importante visión del conjunto de propiedades y potencialidades que presenta la célula como organismo elemental, además de proporcionar información acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células de un organismo multicelular completo (Lindsey & Jones, 1992).

La aplicación de Biotécnicas en la agricultura se puede enmarcar en el mejoramiento de la calidad de las plantas, mediante el enriquecimiento de sus condiciones nutritivas, forma, color, textura entre otros (Kuan & Ospina, 1990), lo mismo que en el desarrollo de la capacidad genética de las plantas para conferirles resistencia a plagas y enfermedades; así también, en el desarrollo de plantas en condiciones adversas de la naturaleza (Mendoza de Gyves, 1994).

Estas técnicas deben permitir al explante sortear frecuentes dificultades como la oxidación, la heterogeneidad de respuestas, la reversión al estado juvenil, la presencia de inhibidores de enraizamiento y sobre todo, la sobrevivencia al trasplante en condiciones autótrofas (Roca & Mroginski, 1991).

El cultivo *in vitro* es realizado partiendo de fragmentos de la planta seleccionada, éstos pedazos de tejido son conocidos como "explantes", el tipo de explante que se utilice dependerá de la especie con la que se trabaje y el número de plantas que se deseen obtener al final.

1.4.1 Cultivo de Órganos Vegetales

En 1990, Hanning obtuvo plántulas de crucíferáceas por medio del cultivo de embriones obtenidos de frutos inmaduros, los cultivos de órganos tuvieron mayor importancia alrededor de los cuarentas y a mediados de los sesentas. Hoy en día ésta técnica es aplicada más que todo para la obtención de plantas libres de patógenos (cultivo de meristemas), es por eso que el cultivo de órganos es de gran utilidad para muchos procesos, tales como la embriogénesis, se ha producido el cultivo *in vitro* de órganos muy inmaduros como son las secciones de hojas; Steves y Sunex fueron primeros en realizar el cultivo de primordio de hoja (Merino, 1994)(a).

1.4.2 Cultivo de Callos

Los callos corresponden a un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido, tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas, pero que conservan el poder de dividirse (Abdelnour-Esquivel & Escalant, 1994).

La formación de callos se inicia cerca de una herida o lesión del explante que es colocado en un medio suplementado con vitaminas y reguladores de crecimiento, un pequeño grupo de células inician la división celular y forman el callo (Lindsey & Jones, 1992).

En 1939, los investigadores Europeos Nobecourt y Gautheret, y el norteamericano White, hicieron las primeras observaciones sobre la proliferación de grandes masas de tejido desorganizado (callos), derivados de raíces de "zanahoria" (*Daucus carota*) y del procambium del tallo de "tabaco" (*Nicotiana tabacum*), colocados en un medio nutritivo artificial adicionado con vitaminas y sacarosa (Butcher & Ingram 1974). Estos callos se mantuvieron por tiempo indefinido por medio de la fragmentación y subcultivo constante o medio de cultivo nuevo (Barba - Álvarez, 1994)

Según el mismo autor en los últimos veinte años se aprendió a utilizar el cultivo de callos en la investigación en fisiología vegetal (Savidige en 1983), embriogénesis (Turnham & Northcote en 1982), genética (Ashmore & Gould en 1981), así como también en la propagación de plantas (Abbott en 1978).

La textura de los callos varía según la planta, algunos son duros ó compactos, otros son frágiles y friables (Perea & Álvarez, 1988). El término friable se emplea para describir la capacidad de separación de las células, es decir, que éstas se disgreguen fácilmente después de una división celular (Luna, 1994).

Actualmente se conocen un gran número de especies en las cuales se pueden multiplicar a partir de callos; aunque este último puede traer como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados. Sin embargo un factor muy importante en estas variaciones es el llamado fenómeno de habituación; al respecto se sabe que los callos que se mantienen en condiciones indiferenciadas por mucho tiempo limitan su capacidad morfogenética (Villalobos & Thorpe, 1993).

1.4.3 Cultivo de Células en Suspensión

Las suspensiones celulares consisten de células libres y microagregados de células en medio líquido en movimiento, tales suspensiones pueden ser viables durante un largo período de tiempo a través del suministro continuo de nutrientes. Los cultivos en suspensiones celulares se inician transfiriendo por lo general callos friables a un medio líquido que se agita normalmente con un agitador orbital (Apéndice 2), la agitación sirve para airear el cultivo y para dispersar las células, el ritmo de crecimiento de éstas células es acelerado pero no tanto como las células bacterianas, la cantidad de células con que se inicia el cultivo es importante, ya que se ha comprobado que si se transfieren un número bajo de células, éstas pueden ser incapaces de dividirse; por el contrario si es una cantidad mayor el cultivo podrá proliferar rápidamente en el mismo medio, por lo que en esta etapa es necesario controlar la "densidad celular inicial crítica" que puede definirse como la cantidad mínima de inóculo por unidad de volumen de medio (Lindsey & Jones, 1992). Con *Acer pseudoplatanus* es aproximadamente 9 a 15^{03} células por mililitro (Tulecke & Nickell, 1959; Street, 1977 citado por Endress, 1994).

En su iniciación, las suspensiones celulares constan de grandes agregados y células libres, alargadas y enormes, pero cuando realizan los subcultivos es factible obtener una suspensión celular finamente dispuesta con alto ritmo de crecimiento (Sábados *et al.*, 1993).

Las suspensiones celulares son usualmente inoculadas con la ayuda de un fragmento de callo colocándolo en medio de cultivo líquido, si bien el periodo de incubación es bastante largo, la incubación puede ser con la diferenciación de partes de planta, como piezas de hipocótilo y cotiledones (Tulecke & Nickell, 1959; Street, 1977; citado por Endress 1994).

1.4.4 Características de las células en suspensión

En su fase de iniciación las células constan de varios tipos de células:

- Células diferenciadas sin capacidad de división: Son células alargadas con una vacuola enorme, citoplasma reducido y un núcleo pequeño.
- Células meristemáticas: Son mucho más pequeñas con un citoplasma denso ocupando todo el espacio intracelular.
- Células embriogénicas: Citoplasma ocupando todo el espacio intracelular, sustancias de reserva como almidón, proteínas y lípidos.

Las células en suspensión pueden caracterizarse por:

1. La membrana circundante de celulosa.
2. Un diámetro de 20 a 50 μm y una longitud de 100 a 200 μm .
3. Un tamaño de 10 a 100X más grande que las bacterias y hongos.
4. Mayor densidad y estructuras no uniformes en la fase de crecimiento logarítmica, al inicio del cultivo, éstas son pequeñas y en la fase estacionaria, tienen un tamaño característico y el citoplasma está localizado en la periferia con una vacuola grande (Endress, 1994).

Muy pocas suspensiones celulares consisten solamente de células libres. Cultivos de *Morinda cetrifolia* por ejemplo, contienen un 40% de masas de células de diferentes tamaños, dichos agregados celulares aparecen a través de:

- Una incompleta separación después de la división, específicamente durante la fase de crecimiento logarítmico.
- Cuando la masa es causada por la superficie pegajosa de las células, usualmente aquellas de la fase de crecimiento logarítmico tardío. Estas condiciones se dan en forma distinta en los diferentes cultivos.

En resumen, durante el periodo de iniciación las suspensiones celulares constan de varios tipos de células así como de agregados de diferentes tamaños y en ciertos casos de proembriones y embriones somáticos (Endress, 1994).

El desarrollo de las suspensiones celulares está relacionado con varios factores:

- Tipo de explante inicial: el mejor inóculo para iniciar es el callo friable con alto ritmo de división celular.
- Calidad del medio de cultivo: Reguladores de crecimiento, compuestos orgánicos y minerales.
- Condiciones ambientales. Relación oxígeno/dióxido de carbono, luz, oscuridad.
- Velocidad de agitación: revoluciones por minuto.
- Densidad en materia celular: relación volumen de células / volumen de medio (Endress, 1994).

1.4.5 Problemas presentes en las suspensiones celulares

Uno de los principales problemas es la viscosidad del medio el cual si no es controlado puede afectar grandemente al cultivo en suspensión por la formación de las llamadas espumas.

La viscosidad de un cultivo está determinada por su densidad, excreciones características y la composición del medio. Ésta incrementa exponencialmente cuando aumenta la masa celular y por lo tanto las excreciones. Las células se vuelven pegajosas y están en peligro de formar una masa, mezclando los polisacáridos con proteínas excretadas, ocasionalmente forman masas céntricas principalmente por el mantenimiento deficiente de los cultivos (Hcuptee & Tam, 1988). Primero se acumularon en la superficie del cultivo y las células se aglutinaron. Esto hace imposible obtener mezclas

homogéneas. Prevenir las espumas es posible por cambios de medio o usando aditivos específicos "antiespúmicos" (Endress, 1994).

1.4.6 Métodos y Agentes contra Espumas

1. Variación o cambios de medio:

- Clase y cantidad de carbohidrato usado.
- Concentración de Ca^{+2}

2. Antiespumantes

- Grasas derivadas de animales y plantas.
- Alcoholes altos, polietilenglicol.
- Aceites sintéticos, polimetilsiloxan.
- Tributil fosfato

Los alcoholes rompen la capa de líquido por reducción de la tensión superficial, mientras que los silicones, aceites naturales y otros ésteres moleculares altos adsorben la espuma en las fases gas-líquido. Los inhibidores de espumas más caros son más eficientes en concentraciones pequeñas (0.1%). Sin embargo, la adición de estos detergentes disminuye la transferencia de oxígeno y por lo tanto la cantidad de aire requerida por las células, el incremento de la viscosidad debido a la espuma usualmente disminuye con un incremento de la velocidad de agitación, pero los efectos en los tamaños de los agregados y la viabilidad de los cultivos son negativos aunque este aumento en velocidad en lo que se refiere a suministro de oxígeno y crecimiento son positivos (Cleland & Enforst 1987, citado por Endress, 1994).

1.4.7 Características Generales del Crecimiento de Células en Suspensión

En el crecimiento biológico el mecanismo es mucho más complejo, el ser vivo, en nuestro caso la planta, toma del medio una serie de sustancias que tiene que transformar y convertir en sus propios constituyentes, moléculas de estructuras complejas y al principio muy diferentes de las que toma del medio. Estas transformaciones pueden ser resultado del crecimiento y como consecuencia se crea un orden a partir del desorden, es decir aumenta la energía libre, la entropía se reduce localmente de tal forma que no puede compararse el crecimiento inorgánico al del ser vivo (Barceló, 1995).

Otra definición de crecimiento mucho más preciso y con mayor significación biológica es: el crecimiento es la síntesis de protoplasma que normalmente viene acompañado de un cambio de forma y un aumento irreversible de la masa de un organismo vivo, órgano y célula. Debemos hacer constar que puede darse el crecimiento sin que aumente el tamaño, pero si el número de células (Barceló, 1995).

1.4.8 Fases del Crecimiento

Al iniciar o establecer un cultivo en suspensión el tipo de crecimiento que presentan las células es típicamente sigmoide (Sábados *et al.*, 1993; Luna-Rosales, 1994), el cual según Szabados *et al.*, (1993) comprende tres fases principales, (1) Fase de retraso: Cuando las células son transferidas a un medio fresco se inicia una serie de procesos metabólicos que preparan las células para la mitosis. (2) Fase Exponencial: la tasa específica de crecimiento es constante y medible matemáticamente, (3) Fase Lineal: La tasa específica de crecimiento declina uniformemente con el tiempo y (4) Fase estacionaria: no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células (Apéndice 3).

1.4.9 Cuantificación del Crecimiento

En el caso de que se trate de medir crecimiento en un cultivo de células en suspensión habrá que recurrir al volumen de empaquetamiento, el nitrógeno proteico o la actividad respiratoria (Barceló, 1995).

En contraste con procesos más especializados, también existe interés en las tasas volumétricas de crecimiento las cuales se expresan en cantidad de masa celular generada por volumen de reactor por tiempo, como puede observarse el crecimiento es directamente proporcional a la concentración de las células y por lo tanto también aumenta el volumen de la tasa de crecimiento.

El promedio de tiempo puede ser usado para describir el crecimiento de las células vegetales, estos promedios de tiempo son calculados basándose en alguna concentración inicial y alguna concentración celular final y puede incluir fases estacionarias. Las tasas de crecimiento al igual que con otras tasas metabólicas generalmente dependen del ambiente nutricional al cual las células se enfrentan. Es común que la dependencia del sustrato del metabolismo celular es aproximadamente descrito por modelos matemáticos originalmente derivados de la cinética de la enzima, tasas de crecimiento, captación de nutrientes, respiración y formación de metabolitos (Payne, 1992).

Mediante cualquiera de los procesos antes descritos, se tiene una medida de la variación que se expresa en función del tiempo, esto dará la tasa de crecimiento. Al representar el crecimiento en función del tiempo se obtiene una curva sigmoide denominada "Gran Curva de Crecimiento", el peso fresco puede ser solo ganancia de agua y el peso seco cúmulos de una sustancia (Barceló, 1995).

Existen otros métodos para evaluar el crecimiento de una suspensión celular, los cuales son:

1. Número de células: Es necesario tener en este caso una suspensión sin agregados grandes, de lo contrario se hará necesario un tratamiento con enzimas tipo peptinasa, el conteo se realiza utilizando un microscopio.
2. Número de células por unidad de volumen o volúmenes celulares: Se toma una fracción de la suspensión celular y se transfiere a un tubo de centrifugación, luego de ser centrifugado, el material sedimenta y es observado el volumen celular que se expresa en mililitros de células por mililitro de medio.
3. Peso fresco: sobre un papel filtro se colocan las células lavadas y se pesan. Este método no es recomendable para cantidades pequeñas de células.
4. Peso seco: Se determina de manera similar al peso fresco, pero antes de pesar las células, estas se secan a 60°C durante 12 horas como mínimo.
5. Turbidez: Usando un fotocolorímetro con filtro azul (400-465 nm).
6. Índice metabólico: Consiste en la evaluación del número de células en estado de mitosis, el cual se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{Células en mitosis}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Se deben analizar por lo menos 1000 células para aplicar la ecuación (Szabados *et. al.* 1993; Lunas-Rosales, 1994; Esquivel-Escalant, 1994).

1.4.10 Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de las células vegetales

Los factores que afectan el crecimiento y desarrollo de las células vegetales son: pH, Intercambio gaseoso, humedad, luz y temperatura.

pH: el grado de acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de planta, al igual que ocurre en el suelo por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado está en un rango de 4.5 a 7.0 para las plantas (Esquivel-Escalant, 1994).

Humedad: En condiciones *in vitro*, la humedad dentro del frasco es casi 100%, por eso la planta en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como: cera, estomas, cutícula, etc. (Esquivel-Escalant, 1994).

Intercambio gaseoso: los gases más conocidos son el oxígeno, dióxido de carbono y el etileno (Esquivel-Escalant, 1994).

El Oxígeno: El nivel de oxígeno en cultivo de tejidos depende de los gases presentes alrededor del recipiente del cultivo y de su proporción. El nivel de oxígeno dependerá entonces de la manera en que se cierre el frasco de cultivo, de la frecuencia de los subcultivos y del metabolismo de los tejidos que rodean al tejido embriogénico. En trigo, Carman (1989) demostró que bajas dosis de oxígeno favorecían la embriogénesis somática. Por otro lado Engelman (1990), trabajando con palma africana encontró que la conservación de cultivos embriogénicos se favoreció en presencia de una atmósfera de 1% y un 99% de nitrógeno ya que este desplaza rápidamente el oxígeno (Esquivel-Escalant, 1994).

El oxígeno es importante para el metabolismo celular, es el electrón terminal aceptor en una fotofosforilación oxidativa y como un resultado, juega un papel crítico en el metabolismo de las células (Payne *et al.*, 1992).

En muchas células vegetales o tejidos bajos niveles de oxígeno pueden ser relacionados con la reducción de niveles de ATP y una reducción de carga energética (Saglio *et al.*, 1983), en muchos casos esta reducción de energía puede ser relacionada con alteraciones o cambios morfológicos (Payne *et al.*, 1992).

Kessell *et al.*, (1972-1977) reportaron que la embriogénesis de zanahoria ocurrió en altos niveles de oxígeno, este comportamiento se examinó en términos de ATP dentro del tejido (Payne *et al.*, 1992).

Requerimientos Biológicos de Oxígeno: la tasa con la que el oxígeno es consumido depende de la concentración en la cual se encuentre disponible (O_2 disuelto). Esta dependencia de oxígeno puede ser descrita por la saturación tipo cinética, de donde la tasa de respiración (CO_2) es la concentración de oxígeno disuelto (Payne *et al.*, 1992).

Se ha considerado el requerimiento de oxígeno de los cultivos en términos de afinidad por este gas, prácticamente este es importante porque los valores críticos de este es usado de funcionalidad de los biorreactores, para asegurar que la actividad metabólica de los cultivos no es suprimida por condiciones limitadas de oxígeno. Por lo tanto muchos biorreactores son diseñados para garantizar que el cultivo nunca experimentará niveles bajos del valor crítico (Payne *et al.*, 1992).

Transferencia de Oxígeno en los Frascos: esta puede ser limitada por cualquier material utilizado que separa el interior del exterior, se ha observado que el tipo de cierre puede restringir significativamente la transferencia de oxígeno al cultivo (Apéndice 4).

La proporción del líquido con el volumen del frasco, también es importante; cuando la cantidad de líquido por frasco es incrementada, el área de la superficie, gas líquido por unidad de volumen es reducida (Kobayashi *et al.*, 1989, Snape *et al.*, 1989, citados por Payne *et al.*, 1992).

Dióxido de Carbono: está presente en grandes concentraciones en los cultivos de varias especies asociados generalmente con el etileno, estas altas concentraciones tienen efecto sobre la respiración, la fotosíntesis y por lo tanto en el crecimiento del tejido vegetal. En el cultivo de meristemos la producción de brotes es promovida por la presencia de CO₂, seguramente por la acción en la fotosíntesis, sin embargo, en callos heterotróficos y cultivos celulares las altas concentraciones de CO₂ a menudo inhiben la proliferación de brotes, tal como se evidenció en experimentos con *Daucus* y *Catharantes* (Adkins, 1992).

Se ha observado que el crecimiento de las plantas se reduce en condiciones de aireación vigorosa, es sugerible que en altos niveles de aireación, el CO₂ puede ser desprendido del medio. Si bien el CO₂ es requerido para el cultivo, entonces el desprendimiento excesivo puede tener un efecto adverso (Payne *et al.*, 1992).

La luz: en condiciones *in vitro* clásica, la intensidad de la luz es muy baja (10 w/m²), en comparación de condiciones naturales, la luz puede representar hasta 900 w/m². La calidad de la luz también es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nm. Dos

fenómenos importantes dependientes de la luz son la fotosíntesis y la fotomorfogénesis (Esquivel-Escalant, 1994).

Temperatura: actúa estimulando el crecimiento hasta un cierto límite, el papel regulador de ésta sobre el crecimiento se realiza a través de la regulación de reacciones enzimáticas que de manera directa o indirecta regulan el proceso de crecimiento (Barceló, 1995).

El crecimiento está en estrecha relación con la nutrición, todo lo que suponga mejora de esto, se traducirá en mayor crecimiento. Existe una energética del crecimiento en estrecho contacto con la respiración y más concretamente un aumento de temperatura estimulando fenómenos (Barceló, 1995).

1.4.11 Medios de Cultivo

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, y calidad de reactivos, usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Los componentes del medio de cultivo se pueden clasificar en: Sales Inorgánicas (Mezcla de sales), Compuestos Orgánicos, Complejos Naturales y Materiales Inertes de Soporte (Merino, 1994b).

Murashige & Skoog (1962), al estudiar los requerimientos nutritivos en tejidos de tabaco, propusieron una fórmula que está caracterizada por la presencia de altas concentraciones de Amonio (NH_4) y Nitratos (NO_3), que permitían un crecimiento de cinco a siete veces mayor que con los medios

utilizados anteriormente. Esta fórmula conocida como MS, ha sido la base para la creación de medios de cultivos modificados (Gautheret, 1992).

El MS incluye macroelementos (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg) y microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) en concentraciones adecuadas. Varios de éstos tienen diferentes formas de ser asimilados por el tejido explante, dado que pueden surgir problemas de toxicidad para éste, debe controlarse la concentración de los elementos por ajustes de pH (Kuan & Ospina, 1990 y Krikorian, 1991).

Los carbohidratos utilizados en los medios de cultivo como fuente de carbono para la célula vegetal son sacarosa, dextrosa (glucosa) y fructosa. En algunos casos, el uso de sorbitol y de manitol es para mantener la presión osmótica del medio. Las vitaminas son parte del complejo de nutrientes requeridos en el medio de cultivo y favorecen el crecimiento celular, entre ellas están: Tiamina (B₁), Piridoxina (B₆), Ácido Nicotínico (B₃), Ácido Pantotéico complementado con Calcio (B₅), Cobalamina (B₁₂). Los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo son determinantes para el metabolismo de las células vegetales, ya que en poca cantidad pueden inducir, inhibir o cambiar la fisiología y morfología de las plantas (Dixon, 1987).

Monnier (1974), estudiando diversos factores observó que la fuente principal de carbohidratos era la sacarosa, cuyas concentraciones varían de acuerdo a la fisiología de la planta subcultivada, notó la supresión en el crecimiento de la raíz con el uso de la Kinetina, y la formación de embriones al usar giberelinas en los medios nutritivos.

1.4.4.1 Consistencia de los Medios de Cultivo

Los medios de cultivo pueden clasificarse en semisólidos y líquidos, la utilización de cada uno de ellos dependerá del cultivo que se realice (Merino, 1994b).

1.4.4.1.1 Medio Semisólido

Se utilizan agentes solidificantes como "Soporte", el más utilizado es el agar, las ventajas que presenta son:

- a) Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C, por lo que es estable a todas las temperaturas de incubación.
- b) El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- c) No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Además del agar se utilizan otros gelificantes como son:

El "Gelrite", "Silicagel poliacrilamida", y "Phytigel", la elección de cualquiera de estos dependerá en gran medida del costo y disponibilidad de recursos económicos de cada laboratorio (Merino, 1994b).

1.4.4.1.2 Medios líquidos

Este puede utilizarse para un cultivo estacionario, este se recomienda para los tejidos que se decoloran rápidamente después del corte, se recomienda vaciar el medio nutritivo en una capa delgada dentro de los frascos, esto con el fin de evitar la asfixia de los explantes por la falta de aire. Estos medios son ideales para los cultivos en agitación constante, como es el caso de las suspensiones celulares, y últimamente para los cultivos por inmersión temporal (Merino, 1994).

1.5 Cultivo de Tejidos en Café

El primer trabajo en café fue hecho por Staritsky en 1970, quien logró cultivar con éxito tres especies de *coffea* utilizando tejido de tallo en el medio de Linsmaier & Skoog (1965); de las tres especies sólo *C. canephora* logró formar embrioides a partir de callos de la primera hasta la cuarta generación.

Sharp *et al.*, en 1973 usando el mismo medio de cultivo que Startsky pero incrementando algunos de los compuestos orgánicos, lograron también establecer cultivo de tejidos de café. Crocomo *et al.*, en 1975 publicaron la ocurrencia de cinco variaciones fenotípicas de células de *C. arabica* obtenidas del cultivo *in vitro* de brotes ortotrópicos y hojas en el mismo medio que Starisky en 1970, pero suplementado con caseína hidrolizada, mientras que para el desarrollo de brotes en unos pocos explantes fueron necesarias las vitaminas de White en 1963, cinetina (0.05 mg/l) y sin 2, 4-D.

Herman y Haas (1975) trabajando con *C. arabica* cultivaron segmentos de hojas de tallos plagiotrópicos en un medio Lismaier y Skoog (1965), suplementado con cinetina y 2, 4- D, logrando inducir la formación de embrioides los cuales obtuvieron un desarrollo normal después de dos meses en el medio Gresshoff & Doy (1972), adicionado de Ácido Naftalenacético (ANA), sin embargo hubo malformación de las hojas, crecimiento muy pobre de raíces y sin pelos absorbentes.

Posteriormente con la misma especie, Sondahl y Sharp en 1977 lograron la inducción de embriones y plantas completas utilizando el medio básico de Murashige y Skoog (1962) suplementado con diferentes dosis de cinetina y 2,4-D y a diferentes concentraciones en su formulación de sales minerales (Mejía & Villegas, 1990).

Dublin (1993), desarrolló la técnica de multiplicación vegetativa por microestacas de un híbrido producto del cruzamiento entre *C. arabica* y *C. canephora*, conocido con el nombre común de Arabusta. En 1981, logró la formación de yemas adventicias y embriones somáticos de entrenudos de tallos de Arabusta.

En ese mismo año, Lanaud, usando óvulos de *C. canephora* en investigaciones sobre ginogénesis, obtuvo varios embriones somáticos que probablemente se iniciaron de los tegumentos (Girón, 1998).

Berthouly (1989), utilizó la técnica de cultivo de microestacas en la multiplicación de híbridos F1 producto de cruces intervarietales.

El cultivo *in vitro* ha permitido la aplicación de diferentes metodologías, para la micropropagación de genotipos de café, especialmente aquellos que no pueden reproducirse por semilla, (Etienne *et al.*, 1997) y las descendencias de cruces interespecíficos de *C. arabica* y *C. canephora* (Dublin en 1984; Zok en 1986). Estas técnicas permiten disminuir el tiempo de análisis y selección de el material vegetal en estudio (Girón, 1998).

En el caso del café las técnicas de cultivo *in vitro* que se pueden aplicar son:

1.5.1 Microesquejes

Se denomina propagación por microesquejes al método que se basa en el cultivo de una sección proveniente de la planta (nudo o entrenudo), con el fin de obtener nuevos vástagos por medio del desarrollo de yemas preexistentes o neoformadas, las cuales podrán proporcionar nuevos esquejes obteniéndose múltiples plantas, idénticas a la planta madre (García & Rafael, 1989).

Esta técnica comprende tres fases:

1. Introducción del material vegetal *in vitro* y obtención de microtallos provenientes de la inducción de las yemas axilares.
2. La multiplicación de los microtallos.
3. El enraizamiento *in vitro* de los microtallos y de su aclimatación a condiciones de almácigo y de vivero (Apéndice 5).

Los primeros cultivos fueron realizados por Custers, 1980, partiendo de tallos ortótopos y plagiótopos de *C. arabica* provistos de yemas y tomados de cafetos jóvenes, de uno a dos años obtenidos de semillas. Una vez se obtiene el primer tallo ortótropo este se cortará en microesquejes, cada uno de ellos, tendrá un par de hojas con sus láminas reducidas a la mitad y un fragmento de entrenudo. Con un medio adecuado para el desarrollo de las yemas latentes se obtienen nuevos tallos artótopos que una vez desarrollados se cortarán nuevamente en microesquejes y así sucesivamente hasta obtener un número de plantas suficientes de tallos de cuatro a cinco pares de hojas aptas para la etapa final de desarrollo y enraizamiento (Dublin,1993).

La ventaja de esta multiplicación es una conformidad genética de las plantas producidas *in vitro* provenientes de la planta madre, lo cual ha sido comprobado por experimentos en campo (Berthouly *et al.*, 1987; Berthouly, 1989; citado por Anthony *et al.*, 1999), sin embargo esta técnica ofrece una tasa de multiplicación limitada, entre siete a nueve microtallos por explante cada tres meses. Esta técnica utilizada a temperaturas bastante bajas representa un método de conservación seguro que permite el intercambio entre los países de material exento de enfermedades (Anthony *et al.*, 1999).

La habilidad de un vegetal para producir yemas neoformadas es una característica relacionada con su genotipo; las condiciones *in vitro* solo permiten la expresión de este carácter ya existente. En el género *Coffea* la habilidad para neoformación de yemas varía de una especie a otra; existe en *Coffea arabica*, en *Coffea canephora*, en el híbrido interespecífico de la primera generación de *Coffea arabusta*. Ciertos compuestos como la sacarosa y la citocinina tienen un efecto positivo en la formación de yemas. El efecto del recipiente se manifiesta en el crecimiento y el grado de miniaturización de los microtallos. Los cálculos muestran que en las condiciones mencionadas un solo microesqueje puede suministrar al final de un año aproximadamente 20,000 plantas. A título de comparación, en condiciones hortícolas, un solo microesqueje puede producir de 100 a 200 esquejes, 24 meses después de su colocación en recipiente de "desqueje" (Dublin, 1993).

1.5.2 Embriogénesis Somática

Es un proceso biológico en el cual se pueden obtener embriones perfectamente organizados, partiendo de células somáticas de cualquier parte de la planta o tejido seleccionado. Estos embriones poseen características morfológicas idénticas a las de los embriones cigóticos (sexuales).

La embriogénesis somática puede ocurrir por medio de la llamada ruta directa, pero con menor frecuencia que por la ruta indirecta; en el primer caso, las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos sin que halla una etapa de callo. Este hecho se podría describir mejor como una formación accidental del embrión (Apéndice 6), ya que evoca situaciones similares que ocurren en el cuerpo intacto de la planta *in situ*, como es el caso de la formación de un embrión nucelar en los cítricos (Dublín, 1993).

Los primeros casos conocidos de embriogénesis somática en el género *Coffea* fueron obtenidos por Staritsky en 1970, con explantes de ramas ortótropas jóvenes de *Coffea canephora*, sin embargo la mayor parte de los trabajos se han realizado con *Coffea arabica* (Hernann *et al.*, 1975; Soundhal 1977) obtuvieron embriones somáticos con fragmentos de hojas de *coffea arabica*.

En un medio de diferenciación generalmente los embriones somáticos aparecen al final de los tres meses de haber iniciado el cultivo, en tejidos que envejecen. El embrión se desarrolla pasando por todas las etapas clásicas (globular, corazón, torpedo, cotiledonal, etc) (Apéndice 7).

Su color blanco nacarado contrasta fuertemente con el del explante de origen que presenta un color marrón oscuro, sin embargo, la embriogénesis somática precoz en callos recién diferenciados fue observada por Pierson *et al.*, (1983) en fragmentos de *Coffea canephora*. Los primeros embriones diferenciados dan origen a embriones secundarios que producen una tercera generación de embriones y así sucesivamente. Esta multiplicación produce un número impresionante de embriones de tamaños diferentes derivados de un solo explante; al final de la diferenciación el embrión tendrá una zona radicular con un hipocótilo y una zona cauliforme y con dos hojas cotiledonales (Dublin, 1993).

Esta técnica se caracteriza por producir mayor número de plantas a bajo costo y menor tiempo, permitiendo al mismo tiempo utilizar las recientes técnicas como la ingeniería genética, además constituye una alternativa para la propagación de los híbridos F₁ producto del mejoramiento genético para la difusión rápida de estos genotipos. Zamarripa, (1995) citado por Girón, (1998). En café es posible obtener dos tipos de embriogénesis somática: de baja frecuencia (LFSE) y de alta frecuencia (HFSE).

1.5.2.1 Embriogénesis Somática de Baja Frecuencia (LFSE)

En éste caso las células de el explante primario son las que dan origen a los embriones somáticos evitando la etapa de callo. Este echo se puede describir como una formación accidental del embrión, ya que se produce en situaciones a las observadas en plantas in situ, como en el caso de la formación del embrión nucelar en cítricos Roca & Mroginski, 1993 citado por Girón, (1998).

1.5.2.2 Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (HFSE)

Fue descrita por Sondahl y más tarde por Berthouly (1989), esta embriogénesis se basa en la producción o formación de un callo secundario, llamado callo embriogénico de alta frecuencia, porque permite la formación de una gran cantidad de embriones somáticos, otra característica de este tipo de embriogénesis es que este callo puede facilitar el establecimiento de suspensiones celulares que puedan ser mantenidas a largo plazo, y obtener una tasa de multiplicación elevada, con una mano de obra limitada. Una vez que se logra obtener el embrión somático, cuando éste se diferencia posee una zona radicular con dos hojas cotiledonales. Cuando éstos se diferencian completamente pueden colocarse en un medio de regeneración donde se desarrollaran las raíces y tallos, hasta la formación de plántulas de 4 a 5 pares de hojas, listos para la etapa de aclimatación (Berthouly, 1999)

En todos los sistemas, las células embriogénicas presentan una serie de características similares a las células meristemáticas de rápida división, lo que incluye, un tamaño pequeño, contenido citoplasmático denso, núcleo alargado con nucleolo prominente, pequeñas vacuolas y presencia de gránulos de almidón; sus propiedades histoquímicas y ultraestructurales indican una síntesis intensiva de ADN y gran actividad metabólica.

Para la embriogénesis indirecta se crea un grupo compacto de células conocido como el complejo proembrional, del cual se desarrollan los embriones (Willians & Maheswaran en 1986).

Los autores antes mencionados, al igual que Zimmerman en 1993, demostraron que los embriones somáticos mantienen una similitud en varios aspectos con los de origen cigótico. En general estos son morfológicamente idénticos, desde el estado globular del embrión en adelante, pueden presentarse diferencias en el número de células o en el grado de expansión de los mismos en diferentes estadios. Los embriones somáticos pueden presentar patrones de segmentación temprana, también pueden presentarse algunas anormalidades como son la fasciación y la fusión de cotiledones.

1.5.3 Etapas que Comprende la Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (HFSE)

1.5.3.1 Inducción

Es la etapa en la cual se da la transición de las células somáticas en células embriogénicas capaces de producir embriones somáticos. Es la fase más difícil e importante dentro de todo el proceso, ya que incluye dos etapas dentro de ella, la primera, es la desdiferenciación de la célula especializada en una célula no diferenciada de tipo meristemático. Si el tejido utilizado es joven será más fácil detener e invertir el proceso de diferenciación de la célula y convertirla en célula embriogénica. Debido a que la respuesta del tejido dependerá en gran parte de la especie con la que se trabaje o incluso dentro de esta misma, las variedades pueden reaccionar diferente en esta etapa, es por ello que es la más difícil de todas las etapas. Por lo tanto no se puede determinar un método que pueda ser aplicado a todas las especies vegetales. Para la inducción de las células embriogénicas se requieren de ciertas condiciones especiales para que el

tejido responda adecuadamente, tal es el caso de la presencia de sustancias esenciales para su desarrollo y cambios fisiológicos, otro factor es la ausencia de luz para evitar la diferenciación que se opone a la formación de células juveniles (Dublin, 1993).

Hay varias interpretaciones acerca de la naturaleza de la diferenciación que da como resultado la embriogénesis somática. Se cree que dentro de un explante ciertas células están precondicionadas para los eventos morfogenéticos que llevan a esta embriogénesis (Thorpe, 1980).

Por esta razón la presencia de reguladores de crecimiento usualmente 2, 4 - D, no solamente inicia el desarrollo de los embriones somáticos, también estimula la multiplicación clonal de las células predeterminadas.

Evans *et al.*, en 1981, plantearon que la embriogénesis puede derivarse de tipos diferenciados de células por medio de la predeterminación, este patrón de desarrollo induce la embriogénesis en determinadas células, y se basa en la suposición de que ciertas células que conducen a la embriogénesis somática han sido reproducidas *in vitro*.

1.5.3.2 Proliferación del Callo Embriogénico en Suspensión Celular

En esta etapa se cultivan células libres y agregados celulares en un medio líquido en constante movimiento, esto aumenta fuertemente las potencialidades del proceso de embriogénesis somática, los agregados y células libres se pueden multiplicar a largo plazo lo que permite de alguna manera homogenizar el desarrollo del material vegetal, es decir, que se puede sincronizar el crecimiento de los embriones y optimizar las etapas siguientes (Etiennie *et al.*, 1997).

1. 5.3.3 Regeneración o Desarrollo de los Embriones Somáticos

Consiste en desarrollar las masas proembriogénicas en embriones somáticos viables, estos se manifiestan siguiendo todos los estadíos por los cuales pasa un embrión independientemente de su naturaleza; iniciando con el estado globular, estado corazón y finalmente el estado torpedo incluyendo las etapas intermedias (Girón, 1998).

1.5.3.4 Maduración

En esta fase se da la acumulación de reservas de proteínas, glúcidos, lípidos y se realiza la desecación, por esto es considerada como una etapa de transición entre las fases de desarrollo y germinación (Etienne *et al.*, 1993; citado por Girón, 1998).

Algunos factores como el Ácido Absísico (ABA), la concentración de sacarosa, el tipo y concentración de carbohidratos y el nitrato de amonio, promueven la eficiencia en los pasos de maduración.

1.5.3.5 Embriogénesis somática en cultivos en suspensión

La embriogénesis indirecta a partir de suspensiones celulares líquidas resulta particularmente atrayente para la micropropagación, ya que permite mantener la estabilidad genética debido a que puede producirse un número potencialmente elevado de embriones somáticos en menor tiempo en volúmenes pequeños de medios de cultivo (10^5 embriones/1 gramo de tejido) y esto permite la mecanización parcial lo que reduce los costos laborales. Cuando se realiza un cultivo de células en suspensión, células y embriones están expuestos uniformemente a nutrientes y hormonas, etc. Los componentes del medio pueden controlarse de manera precisa para inducir el desarrollo de los

embriones de modo uniforme. En un cultivo líquido los agrupamientos de células proembrionarias y los embriones somáticos suelen desarrollarse como estructuras separadas suspendidas en el medio. Por lo que las células pueden cribarse, centrifugarse, subcultivarse y manipularse fácilmente según se requiera (Apéndice 8).

Independientemente del sistema se observó, que a nivel de germinación y conversión en planta se presentaron comportamientos similares. Sin embargo, las cantidades producidas fueron considerablemente diferentes, variando desde miles de embriones por biorreactor, hasta una decena por frasco con medio gelificado. Tomando como la cantidad de medio de cultivo necesaria, la comparación también es favorable al bioreactor: 2000 embriones/200 ml medio por biorreactor y 120 embriones/200 ml de medio gelificado. Haciendo la conversión a un litro de medio, se estaría obteniendo 10000 embriones/l de medio líquido en 5 biorreactores y solamente 600 embriones/l de medio gelificado en 60 frascos (Girón, 1998).

1.5.4 Efecto de los Reguladores de Crecimiento Sobre la Embriogénesis Somática

Según Merkle *et al.*, (1995), citados por Albarrán (1999), la auxina es el regulador que más se asocia con la proliferación de células embriogénicas. Esta es esencial para la inducción del estado embriogénico, sin embargo la exposición continua de las células a la auxina puede ser inhibitoria del proceso, también depende de la especie con la que se esté trabajando se puede generar ciclos repetidos de embriones.

La presencia de concentraciones muy altas o larga exposición a las auxinas puede provocar anomalías en el desarrollo de los embriones somáticos de soya (Parrott *et al.*, 1998; citados por Albarrán, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Evaluar la multiplicación de células embriogénicas de café (*Coffea arabica*) en medios líquidos.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar el tamaño adecuado de recipiente utilizado en las suspensiones celulares para la multiplicación de células embriogénicas usando tres tamaños diferentes.
2. Determinar la tasa óptima de siembra en suspensiones celulares para la multiplicación de células embriogénicas.

3. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis Nula 1 (H_01):

El tamaño del recipiente en suspensiones celulares no influyen en la multiplicación de callos embriogénicos.

3.2 Hipótesis Experimental 1 (H_E1):

El tamaño del recipiente en suspensiones celulares influyen en la multiplicación de callos embriogénicos.

3.3 Hipótesis Nula 2 (H_02):

La tasa de siembra en las suspensiones celulares no influye en la multiplicación de callos embriogénicos.

3.4 Hipótesis Experimental 2 (H_E2):

La tasa de siembra en las suspensiones celulares influye en la multiplicación de callos embriogénicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del Área de Estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales propiedad de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ), ubicada, en final Avenida Manuel Gallardo, Ciudad de Santa Tecla, Departamento de La Libertad, cuyas coordenadas son X=468908.27, Y=282635.87, y Z=952.21.

4.2 Material Experimental

4.2.1 Material Vegetativo

Se utilizaron callos embriogénicos obtenidos de fragmentos de hojas de plantas cuidadosamente seleccionados por sus características especiales, de un ensayo cuyo material son Híbridos F1 que se están validando en El Salvador por el Proyecto Regional de Mejoramiento Genético de Café en Centroamérica por PROCAFÉ. Específicamente el material correspondió al *Híbrido F1 L5A26* que es el descendiente de un "Caturra Rojo 7" y "Etiópe 531".

4.3 Medios de Cultivo Utilizados

Los medios utilizados fueron los sugeridos por el Centro de Cooperación Internacional en Investigaciones Agronómicas para el Desarrollo (CIRAD), el cual estuvo compuesto de un MS Basal (1962) suplementado con 2,4-D (1 mgL^{-1}) para la etapa de las suspensiones, y con (Benzilaminopurina, 4 mgL^{-1}), y Adenina (40 mg L^{-1}) solidificado con 2.0 gL^{-1} de Phytigel para la regeneración de los embriones; a todos los medios se les adicionó 30 y 40 g L^{-1} de sacarosa respectivamente con un pH de 5.6, fueron esterilizados por 20 minutos a una

temperatura de 121°C con 15 Lb/pulg² dispensados en frascos tipo gerber solamente para la regeneración (Apéndice 9).

4.4 ETAPA EXPERIMENTAL

4.4.1 Suspensión Celular (Proliferación o Multiplicación del Callo)

Los callos embriogénicos de alta frecuencia fueron multiplicados en un medio de cultivo líquido, éstos se agitaron constantemente utilizando un agitador para cultivos en suspensión a 110 rpm** (Apéndice 10). Con luz indirecta durante periodos de 1 mes, en donde los cambios de medio se realizaron cada 2 semanas y fueron inoculadas diferentes cantidades de callos en Erlenmeyer graduados de diferentes tamaños (Tabla N°. 1), además se utilizaron 10 ml de medio de cultivo para cada tratamiento (Apéndice 10).

Tabla N°. 1. Diferentes tratamientos empleados para iniciar Suspensiones Celulares.

Cantidad (g) de Callos Embriogénicos Inoculados L⁻¹	ERLENMEYER (10 ml de medio c/u)		
	50 ml	125 ml	250 ml
0.5	T1	T2	T3
1.0	T4	T5	T6
1.5	T7	T8	T9

Una vez iniciadas las suspensiones, se realizaron los subcultivos utilizando pipetas descartables de 5 ml. con las cuales se tomaron de las suspensiones ya existentes y se depositaron en el medio nuevo contenido en los Erlenmeyer con los tratamientos antes mencionados, para tomar una mayor cantidad de células en suspensión, se inclinó el Erlenmeyer durante unos minutos y lograr así, una mayor concentración de material celular (Apéndice 10).

** rpm: Revoluciones por minuto.

Para evaluar la tasa de crecimiento de las suspensiones celulares se consideraron los factores: (1) Cantidad de Inóculo y (2) Tamaño del Recipiente; cada semana se tomó una fracción de las suspensiones de los diferentes tratamientos y fue transferida a un tubo graduado de 3 ml para centrifugarlo durante un periodo de tres minutos a 2,500 rpm. y obtener el volumen de las células. Este último se expresó en mililitros de células por mililitros de suspensión (Apéndice 10).

PRUEBA DE GERMINACIÓN: esta prueba se desarrolló con el fin de determinar la Viabilidad de las Células Embriogénicas después de ser sometidas a los tratamientos antes descritos. Se colocaron pequeñas porciones de las suspensiones en medio de Regeneración (T4B) utilizando el precipitado de las células para tomarlas con una pipeta y dispersarlas en cada frasco con el medio de regeneración, éstos permanecieron en este medio durante cinco semanas durante las cuales se observó la formación de paquetes de embriones color blanco crema.

Luego se trasladaron con la ayuda de una pequeña espátula y una pinza a un frasco con el medio de germinación (T5B) en el que se observó un cambio de color en los embriones, de blanco a un verde claro que fue intensificándose en los diferentes estadios o etapas de los embriones (Apéndice 10).

El conteo de los embriones fue muy difícil debido a la dispersión de éstos en el medio y porque eran pequeños, así como también por la falta de experiencia en la identificación de las diferentes etapas embrionarias.

4.5 Observaciones

Las observaciones se realizaron cada semana durante tres meses y medio, con un total de 15 evaluaciones, las cuales fueron registradas en hojas de datos especialmente diseñadas para recolectar datos del desarrollo *in vitro* de las suspensiones celulares (Apéndice 11).

4.6 Prueba Estadística

El diseño experimental utilizado fue un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 3x3 con 27 repeticiones. Los datos utilizados para el análisis fueron los obtenidos en los tres subcultivos realizados en las suspensiones.

Se utilizó la prueba de homogeneidad de las varianzas con el fin de verificar la necesidad de transformar o no los datos. Sin embargo dicha transformación solo fue necesaria para los datos obtenidos en el tercer subcultivo.

Para el análisis de varianza se utilizó el programa MSTAT (MS Statistix Versión 1991) con el cual se determinó que existían diferencias significativas en el uso de recipientes de diferentes tamaños y la cantidad de inóculo utilizados para iniciar las suspensiones celulares. Para ello fue necesaria la transformación de los datos, de mililitros a microlitros debido a que los valores eran demasiado pequeños para ser analizados mediante este programa.

Las variables en estudio fueron:

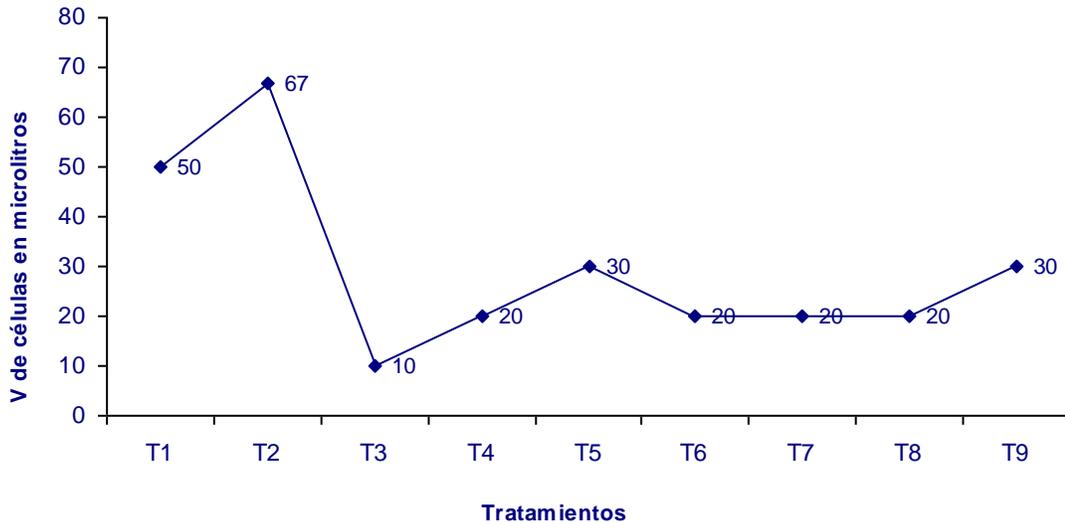
1. Repetición: Tres por cada tratamiento.
2. Recipiente: Tres tamaños de erlenmeyer (50 ml, 125 ml y 250 ml).

3. Tasa de siembra: Tres por cada tratamiento (0.5 g, 1.0 g. y 1.5 g. de callo embriogénico).
4. Número de células en subcultivo uno: El crecimiento de las células en el subcultivo 1.
5. Número de células en subcultivo dos: El crecimiento de las células en el subcultivo 2.
6. Número de células en subcultivo tres: El crecimiento de las células en el subcultivo 3.

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento de la Suspensión Celular Durante Subcultivo 1

En el Gráfico Número 1, se muestra el Crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 1 en los diferentes tratamientos, el volumen más alto de células se observó en el tratamiento No. 2 el cual corresponde al recipiente de 125 ml con la tasa de siembra de 0.5 gL^{-1} . Mientras que el volumen más bajo se observó en el tratamiento No. 3 el cual corresponde al recipiente de 50 ml con la tasa de siembra de 1.5 gL^{-1} .



T1 : 0.5 g/ 50 ml T4 : 1.0 g/ 50 ml T7 : 1.5 g/ 50 ml
T2 : 0.5 g/ 125 ml T5 : 1.0 g/ 125 ml T8 : 1.5 g/ 125 ml
T3 : 0.5 g/ 250 ml T6 : 1.0 g/ 250 ml T9 : 1.5 g/ 250 ml

Gráfico N^o. 1. Volúmenes de células en μl /Tratamiento y Crecimiento de la Suspensión Celular de "café" (*Coffea arabica*) Durante Subcultivo 1. (Tesis de Licenciatura UES-PROCAFÉ, 2004).

5.2 ANDEVA y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente aplicado a subcultivo 1 de Suspensiones Celulares

En las tablas N°. 2 y N°. 3 del apéndice 12, se presentan los datos del ANDEVA aplicado al primer subcultivo y el grado de interacción entre el tamaño del recipiente y la cantidad de callo embriogénico para iniciar las suspensiones, en éstas se observa que todos los valores de F son significativos, lo que demuestra que existe una diferencia en el aumento del volumen de las células en suspensión, y que éste depende del tamaño del recipiente y de la cantidad de inóculo con la que se inicia una suspensión celular.

5.2.1 Interacción entre Tasas de Siembra y Tamaño de Recipiente en subcultivo 1.

En el gráfico N°. 2. se presenta la interacción que existe entre el tamaño del recipiente y la cantidad de inóculo para iniciar las suspensiones celulares, en éste se aprecia un mayor crecimiento en el volumen de suspensión celular cuando se utiliza el recipiente de 125 ml con una tasa de siembra de 0.5 gL^{-1} .

5.3 Crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 2.

En el gráfico número 3, se muestra el crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 2 en los diferentes tratamientos, el volumen más alto de células se observó en el tratamiento No. 8 el cual corresponde al recipiente de 125 ml con la tasa de siembra de 1.5 gL^{-1} , mientras que el volumen más bajo se observó en el tratamiento No. 7 el cual corresponde al recipiente de 50 ml con la tasa de siembra de 1.5 gL^{-1} .

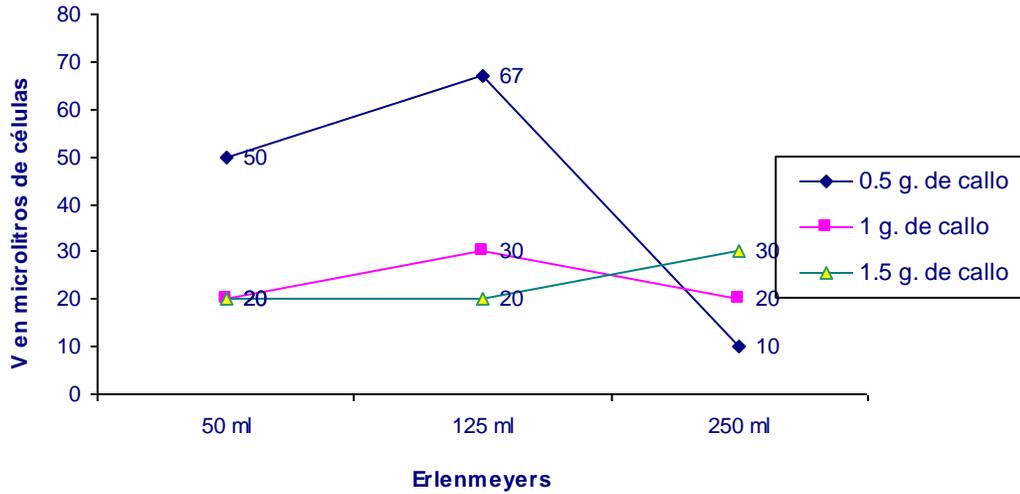
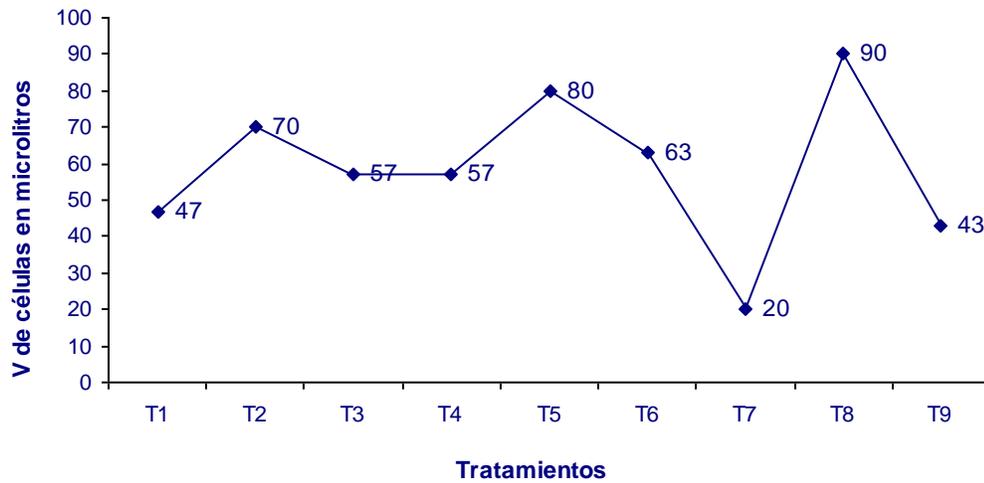


Gráfico N^o. 2. Interacción entre Tasas de Siembra de callo (0.5 g, 1.0 g y 1.5 g) y Tamaño de Erlenmeyers (50 ml, 125 ml y 250 ml) en subcultivo 1 de "café" (*Coffea arabica*) para observar el volumen en microlitros de células resultantes según el tamaño del recipiente. (Tesis de Licenciatura UES-PROCAFÉ, 2004).



T1 : 0.5 g/ 50 ml T4 : 1.0 g/ 50 ml T7 : 1.5 g/ 50 ml
 T2 : 0.5 g/ 125 ml T5 : 1.0 g/ 125 ml T8 : 1.5 g/ 125 ml
 T3 : 0.5 g/ 250 ml T6 : 1.0 g/ 250 ml T9 : 1.5 g/ 250 ml

Gráfico N^o. 3. Volúmenes de células en μ l/ Tratamiento y Crecimiento de la Suspensión Celular de "café" (*Coffea arabica*) Durante Subcultivo 2. (Tesis de Licenciatura UES-PROCAFÉ, 2004).

5.3.1 ANDEVA y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente aplicado a subcultivo 2 de Suspensiones Celulares

En las tablas N°. 4 y N°. 5 del apéndice 13, se presentan los datos del ANDEVA aplicado al segundo subcultivo y el grado de interacción entre el tamaño del recipiente y la cantidad de callo embriogénico para desarrollar suspensiones, en éstas se observa que todos los valores de F son significativos, lo que demuestra que existe una diferencia altamente significativa en el aumento del volumen de las células en suspensión, y este depende del tamaño del recipiente y la cantidad de callo embriogénico con el que se desarrolló la suspensión celular.

5.3.2 Interacción entre Tasas de Siembra y Tamaño de Recipiente en subcultivo 2.

En el gráfico N°. 4. se presenta la interacción que existe entre el tamaño del recipiente y la cantidad de callo embriogénico para desarrollar suspensiones celulares, en éste se aprecia un mayor crecimiento cuando se utiliza el recipiente de 125 ml con una tasa de siembra de 1.5 gL^{-1} , lo que corresponde al tratamiento 8 (T8).

5.4 Crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 3.

En el Gráfico Número 5, se muestra el crecimiento de la Suspensión Celular durante Subcultivo 3 en los diferentes tratamientos, el volumen más alto de células se observó en el tratamiento No. 6 el cual corresponde al recipiente de 250 ml con la tasa de siembra de 1.0 gL^{-1} . Mientras que el volumen más bajo se observó en los tratamientos T1 y T4, los que corresponden al recipiente de 50 ml con la tasa de siembra de 0.5 gL^{-1} para el primero y 1.0 gL^{-1} para el segundo.

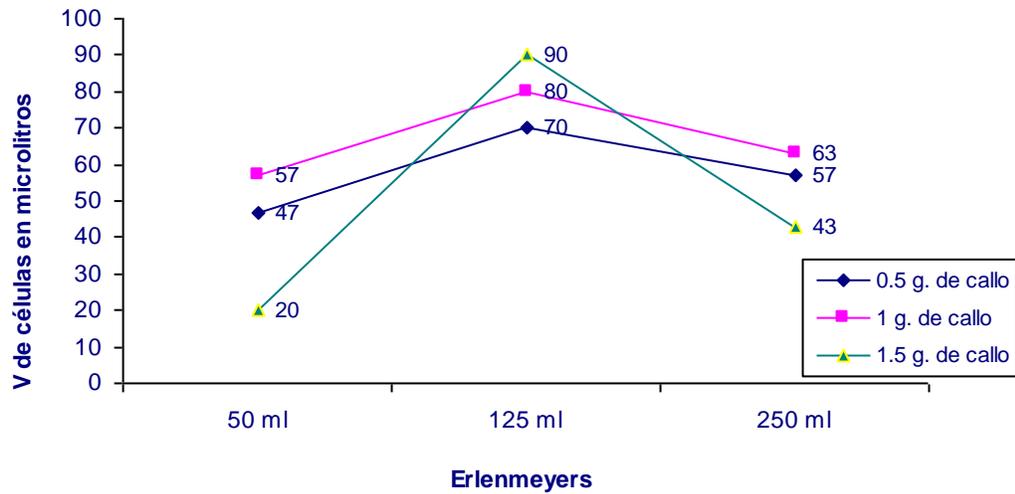
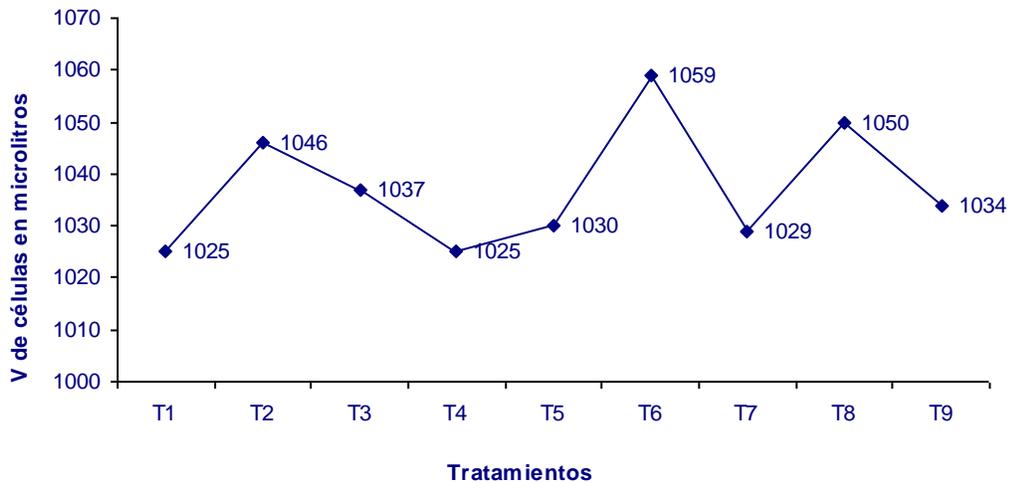


Gráfico N^o. 4. Interacción entre Tasas de Siembra de callo (0.5 g, 1.0 g y 1.5 g) y Tamaño de Erlenmeyers (50 ml, 125 ml y 250 ml) en subcultivo 2 de "café" (*Coffea arabica*) para observar el volumen en microlitros de células resultantes según el tamaño del recipiente. (Tesis de Licenciatura UES-PROCAFÉ, 2004).



T1 : 0.5 g/ 50 ml T4 : 1.0 g/ 50 ml T7 : 1.5 g/ 50 ml
 T2 : 0.5 g/ 125 ml T5 : 1.0 g/ 125 ml T8 : 1.5 g/ 125 ml
 T3 : 0.5 g/ 250 ml T6 : 1.0 g/ 250 ml T9 : 1.5 g/ 250 ml

Gráfico N^o. 5. Volúmenes de células en µl/ Tratamiento y Crecimiento de la Suspensión Celular de "café" (*Coffea arabica*) Durante Subcultivo 3. (Tesis de Licenciatura UES-PROCAFÉ, 2004).

5.4.1 ANDEVA y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente aplicado a subcultivo 3 de Suspensiones Celulares

En las tablas N°. 6 y N°. 7 del apéndice 14, se presentan los datos del ANDEVA aplicado al tercer subcultivo y el grado de interacción entre el tamaño del recipiente y la cantidad de callo embriogénico para desarrollar suspensiones, en estas se observa que todos los valores de F son significativos, sin embargo durante la interacción de los factores evaluados en la etapa en la que se encontraba fue más evidente un crecimiento exponencial, el cual no depende directamente del inóculo inicial, sino del grado de desarrollo alcanzado en los subcultivos anteriores y del tamaño de recipiente debido a que las células experimentan un proceso de división acelerado y para ello requieren de mayor espacio físico, el cual lo proporcionó el recipiente de 250 ml.

5.4.2 Interacción entre Tasas de Siembra y Tamaño de Recipiente en subcultivo 3.

En el gráfico N°. 6. se presenta la interacción que existe entre el tamaño del recipiente y la cantidad de inóculo para desarrollar suspensiones celulares, en este se aprecia un mayor crecimiento cuando se utiliza el recipiente de 250 ml con una tasa de siembra de 1.5 gL^{-1} .

Para el análisis de Post Varianza aplicado al subcultivo 1 se utilizó el programa MSTAT (MS Statistix Versión 1991), específicamente la prueba de Tukey con la cual se determinó la diferencia entre el tamaño de recipiente y las tasas de siembra para iniciar las suspensiones celulares. Para ello se presenta la Tabla No. 8 y 9 del apéndice 15, aplicada al tamaño de recipiente y tasas de siembra.

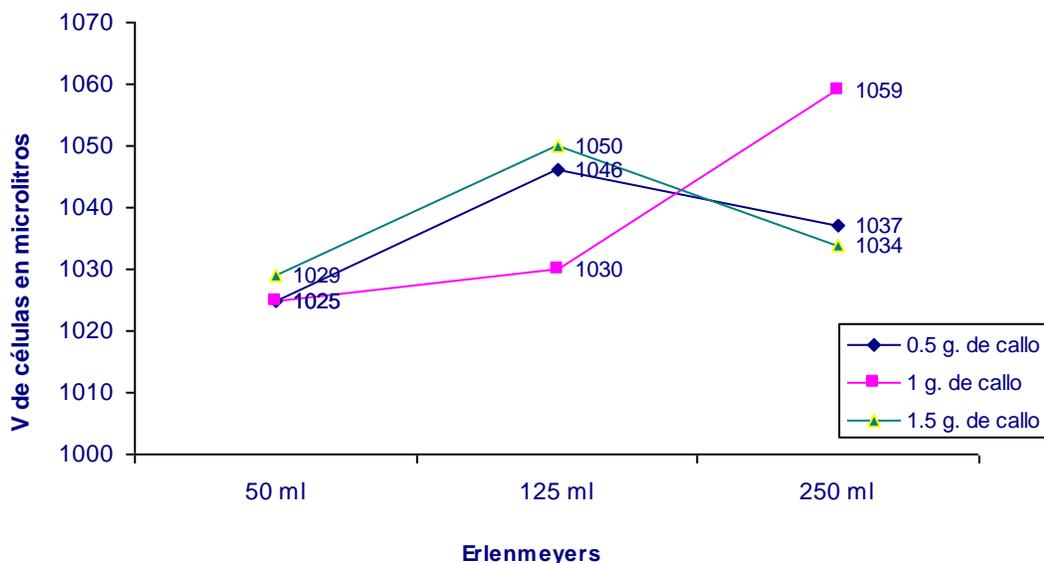


Gráfico N^o 6. Interacción entre Tasas de Siembra de callo (0.5 g, 1.0 g y 1.5 g) y Tamaño de Erlenmeyers (50 ml, 125 ml y 250 ml) en subcultivo 3 de "café" (*Coffea arabica*) para observar el volumen en microlitros de células resultantes según el tamaño del recipiente. (Tesis de Licenciatura UES-PROCAFÉ, 2004).

En el caso del tamaño de los recipientes, el de 125 ml provee mejores condiciones para iniciar un cultivo en suspensión, superando las condiciones ofrecidas por los recipientes de 50 y 250 ml. Estos últimos presentan diferencias entre ellos.

En cuanto a las tasas de siembra, la de 0.5 gL⁻¹ supera a las de 1.0 y 1.5 gL⁻¹ al inicio del cultivo en suspensión, al comparar las dos últimas, se observa que estas no presentan diferencias entre ellas.

Para el subcultivo 2 se utilizaron las tablas 10 y 11 (Apéndice 16) aplicadas al tamaño de recipiente y tasas de siembra.

En el caso del tamaño de los recipientes, el de 125 ml provee mejores condiciones para desarrollar un cultivo en suspensión, superando las condiciones ofrecidas por los recipientes de 50 y 250 ml.

En cuanto a las tasas de siembra, la más apropiada para desarrollar el cultivo en suspensión es la de 1.0 gramo.

Para el subcultivo 3 se utilizaron las tablas 12 y 13 (Apéndice 17) aplicadas al tamaño de recipiente y tasas de siembra.

En el caso del tamaño de los recipientes, el de 125 ml y 250 ml proveen mejores condiciones para desarrollar un cultivo en suspensión, superando las condiciones ofrecidas por los recipientes de 50 ml.

En cuanto a las tasas de siembra, las tres son óptimas para desarrollar el cultivo en suspensión, ya que éstas no presentan diferencias entre ellas.

6. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Tamaño de los Recipientes

En la presente investigación, de los tres tamaños evaluados, el recipiente más adecuado para iniciar suspensiones celulares fue el Erlenmeyer de 125 ml, debido a que este proporciona las condiciones necesarias para que los callos embriogénicos se disgreguen con mayor facilidad debido al espacio y movimiento del medio de cultivo dentro del frasco.

Los movimientos de estos son lo suficientemente fuertes para separar las células y no causarles un gran daño por estrés debido al choque entre ellas o con las paredes del Erlenmeyer, de igual manera provee la cantidad adecuada de intercambio gaseoso (CO_2/O_2) para aumentar el crecimiento celular.

De acuerdo a Esquivel-Escalant (1994), el nivel de oxígeno en cultivo de tejidos depende de los gases presentes alrededor del recipiente del cultivo y de su proporción. El nivel de oxígeno dependerá entonces de la manera en que se cierre el frasco de cultivo, de la frecuencia de los subcultivos y del metabolismo de los tejidos que rodean al tejido embriogénico.

De acuerdo a Payne *et al.*, (1992), la tasa con la que el oxígeno es consumido depende de la concentración en éste se encuentre disponible (O_2 disuelto). Ésta dependencia de oxígeno puede ser descrita por la saturación tipo cinética, de donde la tasa de respiración (CO_2) es la concentración de oxígeno disuelto.

Se ha considerado el requerimiento de oxígeno de los cultivos en términos de afinidad, prácticamente éste es importante porque los valores críticos con que es usado determina la funcionalidad de los biorreactores, y así permite asegurar que la actividad metabólica de los cultivos no es suprimida por

condiciones limitadas de oxígeno. Por lo tanto muchos biorreactores son diseñados para garantizar que el cultivo nunca experimentará niveles bajos del valor crítico, asimismo la transferencia de oxígeno en los frascos puede ser limitada por cualquier material utilizado que separa el interior del exterior, se ha observado que el tipo de cierre puede restringir significativamente la transferencia de oxígeno al cultivo (Payne *et al.*, 1992).

Los erlenmeyer de 50 ml no proveen el suficiente movimiento para separar las células, ya que los niveles de oxigenación se ven afectados por la proporción de líquidos en este frasco pequeño; caso contrario el erlenmeyer de 250 ml ocasiona un movimiento muy fuerte por lo que las células no responden tan rápido a pesar que se disgregan con mayor facilidad. La proporción del líquido con el volumen del frasco también es importante cuando la cantidad de líquido por frasco es incrementada, el área de la superficie, gas y líquido por unidad de volumen es reducida (Kobayashi *et al.*, 1989, Snape *et al.*, 1989, citados por Payne *et al.*, 1992).

Según Payne (1992), se ha observado que el crecimiento de las plantas se reduce en condiciones de aireación vigorosa, es sugerible que en altos niveles de aireación, el CO₂ puede ser desprendido del medio. Si bien el CO₂ es requerido para el cultivo, entonces el desprendimiento excesivo puede tener un efecto adverso.

Esto contrasta con los resultados obtenidos por Etienne *et al.*, (1997) quienes desarrollaron suspensiones celulares de *Coffea arabica* exitosamente, primero colocando en frascos pequeños multiwells y luego transfiriéndolos a un Erlenmeyer de 125 ml durante la fase de iniciación.

De acuerdo a los planteamientos hechos por Adkins (1992), el dióxido de carbono en altas concentraciones tiene efecto sobre la respiración, la fotosíntesis y por lo tanto en el crecimiento del tejido vegetal. En el cultivo de meristemas la producción de brotes es promovida por la presencia de CO₂, seguramente por la acción en la fotosíntesis, sin embargo, en callos heterotróficos y cultivos celulares las altas concentraciones de CO₂ a menudo inhiben la proliferación de brotes.

Según Robert *et al.*, (1993), uno de los problemas que presentan las suspensiones es la viscosidad, por lo que deben tener un movimiento adecuado. La agitación no se puede hacer con sistemas que produzcan demasiada turbulencia debido a la presencia de vacuolas y a la baja resistencia que las paredes de las células vegetales ofrecen.

La viscosidad de un cultivo está determinada por su densidad, excreciones características y la composición del medio. Esta incrementa exponencialmente cuando aumenta la masa celular y por lo tanto las excreciones. Las células se vuelven pegajosas y están en peligro de formar una masa, mezclando los polisacáridos con proteínas excretadas, ocasionalmente forman masas céntricas principalmente por el mantenimiento deficiente de los cultivos (Hcuptee & Tam, 1988).

Este problema de viscosidad fue observado en el cultivo de suspensión desarrollado en frascos pequeños (Erlenmeyer de 50 ml), estos presentaban abundante viscosidad debido al poco movimiento, lo que provocaba el asentamiento de las células y esta tomaban una apariencia oscura y algunas veces completamente necróticas lo que indicaba la asfixia del material por falta de oxigenación y la formación de espumas.

En ese contexto, Endress (1994), sostiene que si este fenómeno en el medio no es controlado puede afectar grandemente al cultivo en suspensión debido a la formación de estas espumas antes referidas.

Robert (1993) afirma que las células vegetales son de 10 a 100 veces más grandes que las células microbianas por lo que tienden a sedimentarse con rapidez, esto hace que se produzcan zonas de maduración y de necrosis que afectan la población de células que se mantienen en suspensión dando como resultado cultivo polifásicos.

Sin embargo no se debe descartar la posibilidad que Erlenmeyer de 50 ml sea utilizado siempre y cuando éstos sean sustituidos por otros más grandes durante el crecimiento y desarrollo de las suspensiones, ya que es necesario porque a medida que las suspensiones aumentan en tiempo, necesitan más espacio debido a que el ritmo del crecimiento de las célula aumenta una vez que éstas han sobrepasado la fase de reposo y entran a la fase exponencial.

Barbón *et al.*, (1994), establecieron suspensiones celulares de café en Erlenmeyer de 50 ml de capacidad y 10 ml de medio de cultivo, y éstas fueron escalonadas hasta Erlenmeyer de 300 ml de capacidad con 100 ml de medio.

6.2 Tasa de Siembra

La tasa de éxito de la iniciación de una suspensión de una célula embriogénica, de buena calidad depende de la calidad y el volumen del callo embriogénico que se cultive (Szabados *et al.*, 1993).

Lindsey y Jones (1992), afirman que al transferir un número relativamente bajo de células a un medio nuevo, éstas pueden ser incapaces de dividirse, por el contrario, si se transfiere una cantidad mayor podrán proliferar rápidamente. Esto nos conduce al concepto de densidad celular inicial crítica

que puede definirse como la cantidad mínima de inóculo por unidad de volumen de medio a partir del cual puede crecer un nuevo cultivo o desarrollar una suspensión celular.

Por estas razones, se estudiaron tres densidades de siembra de callos embriogénicos, resultando el más adecuado para iniciar una suspensión el inóculo de 1.5 gL^{-1} , este resultado solo se refiere a la etapa de inicio, pues se observó un disgregamiento total del callo y las células sobrepasaron la fase de letargo más rápidamente sin que se observaran células muertas o de color oscuro.

Al segundo cambio de medio de cultivo, se observaron células nuevas que se identificaron por su color crema y eran de menor tamaño y siempre se mantenían en el centro del recipiente. Sin embargo, para los subcultivos realizados (2 y 3), fue más favorable la cantidad de un gramo por litro debido a que al momento de subcultivarlos había una mayor cantidad de células que eran transferidas a los frascos con medio nuevo.

Szabados *et al.*, (1993), sostienen que el uso de bajas densidades de células en la iniciación de cultivos puede prolongar la fase exponencial.

6.3 Variación Somaclonal

En la investigación sólo se realizaron tres subcultivos cada cuatro semanas, con el fin de disminuir el riesgo de variación somaclonal al momento de diferenciar y germinar los embriones provenientes de las suspensiones celulares. Etienne (2001), evaluó árboles derivados de suspensiones embriogénicas, demostrando que no existen diferencias significativas al compararlos con árboles provenientes de microestacas porque las frecuencias de las variaciones somaclonales son limitadas.

Estas variaciones suelen presentarse conforme avanza la edad de la suspensión, es por esto que Etienne (2002), evaluó estas variaciones en suspensiones de diferentes edades sugiriendo que el número de ciclos apropiados para reducir las variaciones es de seis meses como máximo.

6.4 Reducción de Contaminación

Ochoa (1990), sostiene que las células en suspensión pueden ser manipuladas de manera semejante a los microorganismos. Este sistema facilita la adición o remoción del medio de cultivo lo que permite un mejor control de las condiciones ambientales.

Durante el tiempo en que se desarrollaron las suspensiones celulares, la contaminación se logró controlar hasta en un 90%, lo que indica una gran ventaja debido a que el material no se expone a la contacto con el exterior del frasco, es fácil de manipular, hay menor riesgo de pérdidas de material.

6.5 Regeneración y Germinación de Embriones

Los primeros casos conocidos de embriogénesis somática en el género *Coffea arabica* fueron obtenidos por Staritsky (1970), con explantes de ramas ortótropas jóvenes de *Coffea canephora*, sin embargo la mayor parte de trabajos se han realizado con *Coffea arabica*. Hermann *et al.*, (1975) y Sondhal *et al.*, (1977) obtuvieron embriones somáticos con fragmentos de hojas de *Coffea arabica*.

La obtención de embriones somáticos de café a partir de suspensiones celulares es un fenómeno novedoso a nivel mundial dentro del campo de la biotecnología solo logrado en países desarrollados (Montes *et al.*, 1995 citado por Albarrán, 1999)

Los primeros embriones diferenciados dan origen a embriones secundarios que producen una tercera generación de embriones y así sucesivamente, esta multiplicación produce rápidamente un número impresionante de embriones de diferentes tamaños derivados de un solo explante (Dublín, 1993).

En los embriones diferenciados en el medio sólido se observó la formación de embriones secundarios, ya que se formaron racimos de embriones de diferentes tamaños.

Al final de la diferenciación, el embrión presenta una zona radicular con hipocótilo y una zona cauliforme con dos hojas cotiledonares según el equilibrio hermanal de los medios de cultivo, estos embriones pueden presentar un desarrollo privilegiado de una u otra forma.

Un medio rico en citosina favorece el desarrollo caulinar, entonces la zona hepicotiledonar se transforma en tallo rápidamente (Dublín, 1993).

Una vez pasados cuatro meses de haberse colocado en el medio sólido, fue posible observar el inicio de la formación de lo que serían las primeras hojas provenientes del embrión el cual fue tomando una coloración verde que fue intensificándose en el extremo que se transformaría en estas primeras hojas.

Se lograron regenerar y germinar algunos embriones, éstos no se pudieron evaluar debido a que en la transición del medio líquido a sólido, algunas células morían al quedar sumergidas en el medio sólido de regeneración, y era difícil transferir los paquetes de embriones formados al medio de germinación, debido a que éstos estaban demasiado sueltos entre sí y algunas veces eran dañados al transferirlos al frasco con el medio de germinación.

7. CONCLUSIONES

1. Es posible multiplicar masivamente callos embriogénicos de "café" (*Coffea arabica*) en suspensiones celulares.
2. Para el inicio de suspensiones celulares en la multiplicación de callos embriogénicos de "café" (*Coffea arabica*), el recipiente con un tamaño equivalente a 125 ml es el más apropiado.
3. En la etapa de multiplicación de suspensiones celulares de callos embriogénicos de "café" (*Coffea arabica*), el recipiente con un tamaño equivalente a 250 ml es el más apropiado.
4. Para iniciar las suspensiones celulares en la multiplicación de callos embriogénicos de "café" (*Coffea arabica*), la tasa de siembra óptima es 0.5 g/litro.
5. Durante la etapa de multiplicación, las tasas de siembra no influyen en la obtención masiva de callos embriogénicos de "café" (*Coffea arabica*)
6. Existe una interacción entre la tasa de siembra y el tamaño del recipiente al iniciar las suspensiones celulares de callos embriogénicos de "café" (*Coffea arabica*).

8. RECOMENDACIONES

1. Utilizar las suspensiones celulares como una alternativa para multiplicar material vegetativo de variedades de "café" (*Coffea arabica*) promisorias en El Salvador.
2. Realizar estudios más completos en suspensiones celulares de "café" (*Coffea arabica*) tomando como factor principal la cantidad de medio de cultivo utilizada.
3. Realizar investigaciones que contemplen metodologías de regeneración y germinación de embriones somáticos de "café" (*Coffea arabica*) utilizando biorreactores, así también considerar los procesos de adaptación y desarrollo en la etapa de vivero de las plántulas obtenidas a partir de embriones somáticos de "café".

9. LITERATURA CITADA

- Abdelnour-Esquivel A. & J. V. Escalant. 1994. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica, 38 pp.
- Adkins, S. W. 1992. Cereal Callus Cultures. Control of Headspace Gases cans Optimize The Conditions of Callus Proliferation. Aust. J. Bot. 40: 434-449.
- Albarrán R., J. G. 1999. Influencia de Los Factores Químicos y Físicos Sobre la Regeneración de Embriones Somáticos de *Coffea arabica* en Biorreactor Simplificado. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica. Centro Tropical de Investigación y Enseñanza. 100 pp.
- Barba-Álvarez, A. 1994. Cultivo de Callos. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México DF, México, Cap. VII: pp 93-100.
- Barbón, R. & Alina Capote; E. Jiménez. 1994. Optimización de la Embriogénesis Somática del café (*Coffea arabica* Var. Catimor) en Medios Líquidos. Cultivos Tropicales 15 (3). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, República de Cuba (INCA). Seminario Científico.
- Barceló, J. Coll. 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Omega, España, 662 pp.
- Berthouly, M. 1989. Micropropagación del Café I Seminario Internacional Sobre Biotecnología en la Agricultura Cafetalera. Xalapa, Ver., México del 12 al 15 de Abril de 1989. p.17-28.
- Berthouly, M.; H Etienne., 1999. Somatic Embriogenesis in Coffee. in: Somatic Embriogénesis in Woody Plants.

- Crocomo O. & J.F.J.P. Carvalho; P.C.T. Carvalho; W.R. Sharp; G. Bandil. 1975. Controle Hormonal da Diferenciação de Tecido de Café Cultivado *in vitro*. 26th. Congr. Nac. Botânica, Rio de Janeiro, Brasil.
- Dixon, R. A. 1987. Plant Cell Culture: a Practical Approach. IRL-Press. Oxford, England. 236pp.
- Dublin P. 1993. Multiplicación Vegetativa de Café, Hevea y Cacao. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia. pp. 577-619.
- Endress, Rudolf. 1994. Plant Cell Biotechnology, Germany, 353 pp.
- Engelman, F. 1990. Utilisation d'atmosphères à teneur en oxygène réduite pour la conservation de cultivars d'embryos somatiques de Palmeira à huile (*Flacis guinensis* Jacq.). C.R. Acad. Sci. Paris. 310, Serie III, pp. 679-684.
- Etienne, H. & B. Bertrand. 2002. Somaclonal Variation en *Coffea arabica*; Effects of Genotype and embryogenic cell Suspension Age on the Frequency and Phenotype of Variants. Published on line. Tree Physiology Volume Variants.
- Etienne, H. & B. Bertrand. 2001. Trueness – to – type and Agronomic Characteristics of *Coffea arabica* Trees Micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. Tree physiology 21, 1031-1038. Heran Publishing – Victoria, Canada.
- Etienne, H. & D. Barry; Nelly Vásquez y M. Berthouly. 1999. Desafíos de la Caficultura en Centro América. Capítulo 13: Aportes de la Biotecnología al Mejoramiento Genético del Café: El Ejemplo de la Multiplicación por Embriogénesis Somática de Híbridos F1 en América Central. CIRAD, IRD-IICA, PROMECAFE. Editorial San José, Costa Rica, 496 pp.

- Etienne, H. & B. Bertrand; F Anthony; F. Côte; M. Breathily. 1997. L'embriogese Somatique; Un Outil Pour L'amélioration Génétique Du Cafèier. 17 Coloquio Científico Internacional Sobre el Café, 21-25 Julio 1997, Nairobi (Kenia), ASIC ed.
- García, E. G. & M. Rafael. 1989. Propagación de Plantas der Café (*Coffea arabica* L. "Catimor") a Partir de Microesquejes Cultivados *in vitro*. Agronomía Tropical, Venezuela, 39, pp 249-268.
- Gautheret, R. J. 1992. History of Plant Tissue and Cell Culture a Personal Account in Cell Genetics of Plants. Academic Press, France, pp 2 -50.
- Girón, I. E. 1998. Desarrollo y Maduración de Embriones Somáticos de Híbridos F₁ de *Coffea arabica* para una Producción Masal. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica. Centro Tropical de Investigación y Enseñanza. 92pp.
- Gresshoff, P.M. & Doy, C.H. 1972. Development and Differenatiation of Haploid *Licopersicum esculentum* (Tomato). Planta, 107: 161-170.
- Heuptee, V.R.B. & Tom, A.S. 1998. Peptides Released by Cultured Peanut Cells During Growth. J. Plant Physiol, 133:645.
- Herman, E.B. & Haas, G.J. 1975. Clonal Propagation of *Coffea arabica* L. From Callus Culture. Hort Sci. 10(6): 588-589.
- Krikorian, A. D. 1991. Medios de Cultivo: Generalidades, Composición y Preparación. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. III: pp 41-76.

- Kuan, C. J. & I. C. Ospina. 1990. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica, 86 pp.
- Lindsey, K. & M. G. K. Jones. 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia S.A., España, 276 pp.
- Lismaier, M. & F. Skoog. 1965. Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Litz, R. E. & R. L. Jarret. 1993. Regeneración de Plantas en Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, pp 173-210, Cap. VIII.
- Luna Rosales, S. 1994. Cultivo de Células en Suspensión. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México, Cap. X, pp 122-132.
- Mejía M. J. & Villegas A. 1990 Micropropagación de café. Fundamentos Teórico-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia, 235 pp.
- Mendoza de Gyves, B. 1994. Agrobiotecnología. Grupo Editorial Iberoamericana. México, 79 pp.
- Merino, M. E. 1994 (a). Cultivo de Hojas. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México, Cap XII: pp 67- 153.
- _____. 1994 (b). Medio de Cultivo. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México, Cap. V: pp 67-85.
- Monnier, M. 1974. Culture of Zygotic Embryos. *Frontiers of Plant Tissue Culture.* Department of Biology, Calgary University, Canada, pp 277-286.

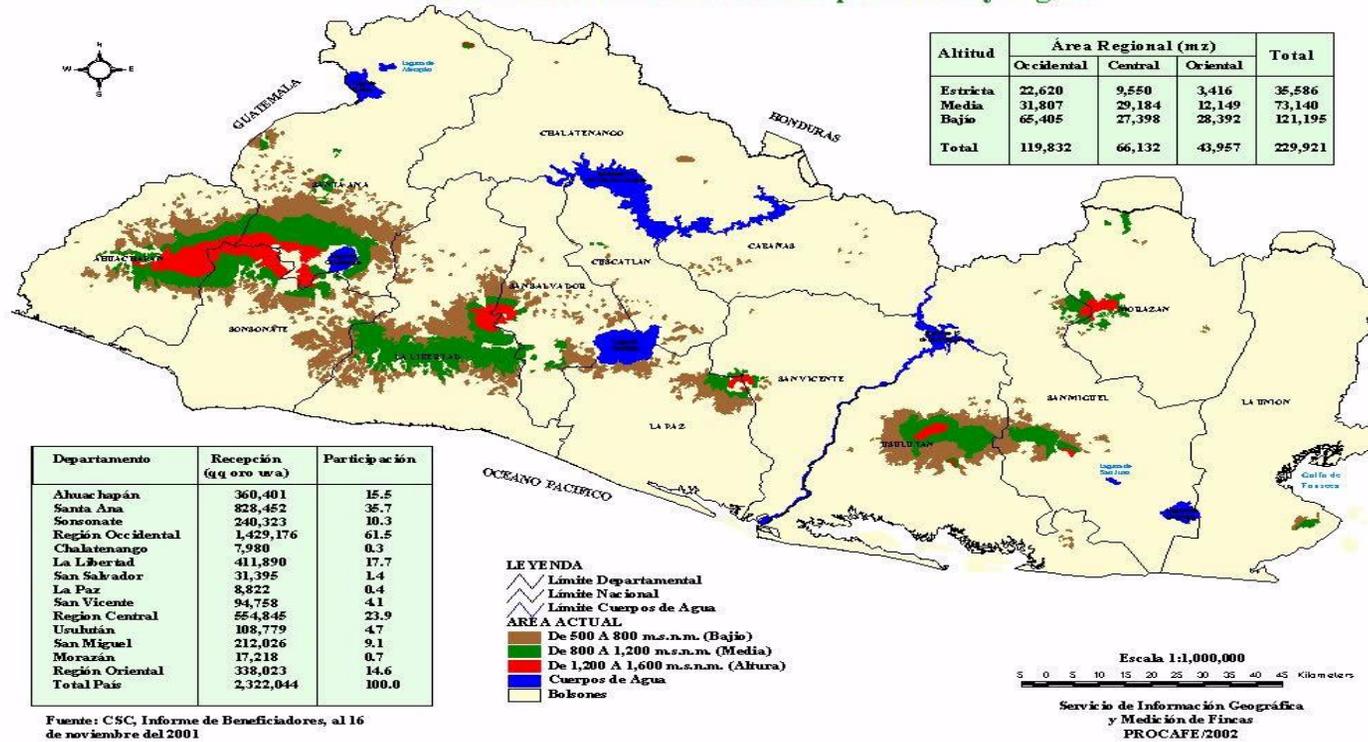
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant*, 15: pp 473-479.
- Navarro Urrutia, S. 1987. Cultivo de Meristemos. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México, Cap. XI: pp 133-148.
- Ochoa Lejo, N. 1990. Establecimiento de Cultivos *in vitro*. Fundamentos Teórico Práctico de Cultivo de Tejidos Vegetales. Pp 25-27.
- Ospina- Machado. J.E. & H. M. Aldana A. 1995. Producción Agrícola, Editorial Terranova, Bogotá, Colombia, (2): 552 pp.
- Payne. 1992. Plant Cell and Tissue Cultura in Liquid Systems, Printed in Germany by Passovia Druckerei Passau. 346 pp.
- Perea D. M. & W. N., Álvarez. 1988. Técnicas *in vitro*. Para la Producción y Mejoramiento de Plantas. Conicit. Costa Rica. 104pp.
- Rivera Magaña, R. & M. Silva Parada; M. Santos Girón. 2003. El Impacto de la Crisis del Café en El Salvador. Fundación Nacional para el Desarrollo. San Salvador, El Salvador, 296 pp.
- Robert, M. L. & J. Reyes; M. V. Loyola. 1993. Biosíntesis y Bioconservación de Metabolitos Secundarios por Células Cultivadas *in vitro*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, pp 211-238, Cap. IX.
- Roca, W. M. & L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, 970 pp.

- Sharp, W.R. & L.S. Caldas; O.J. Crocomo; L.C. Monahco; A. Carvalho. 1973. Production of *Coffea arabica* Callus of Three Ploidy Levels and Subsequent Morphogenesis. *Phyton* 31: 67-74.
- Sondhal, M.R. & W.R. Sharp. 1977. High Frequency Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzen Physiol.* 81: 395-408.
- Staritsky, G. 1970. Embryoid Formation in Callus Tissues of *Coffea*. *Acta Bot. Neerl.* 19 (4): 509-514.
- Szabados L., Mroginski L. A., Roca W. M. 1993. Suspensiones Celulares: Descripción, Manipulación y Aplicaciones. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Cali. Colombia. pp. 173-203.
- Teisson E., Alvard D., Berthouly M., Cote F., Escalant J. V., Etienne H. 1995. Culture *in vitro* Par Immersion Temporaire: Un Nouveau Récipient. *Plantations, Recherche, Developpement*.
- Villalobos A. V. M., Thorpe T. A. 1993. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Cali. Colombia. pp. 127- 141.
- Weimer, R. C. 1998. Estadística. Segunda Edición, Compañía Editorial Continental, México DF, México, 839 pp.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

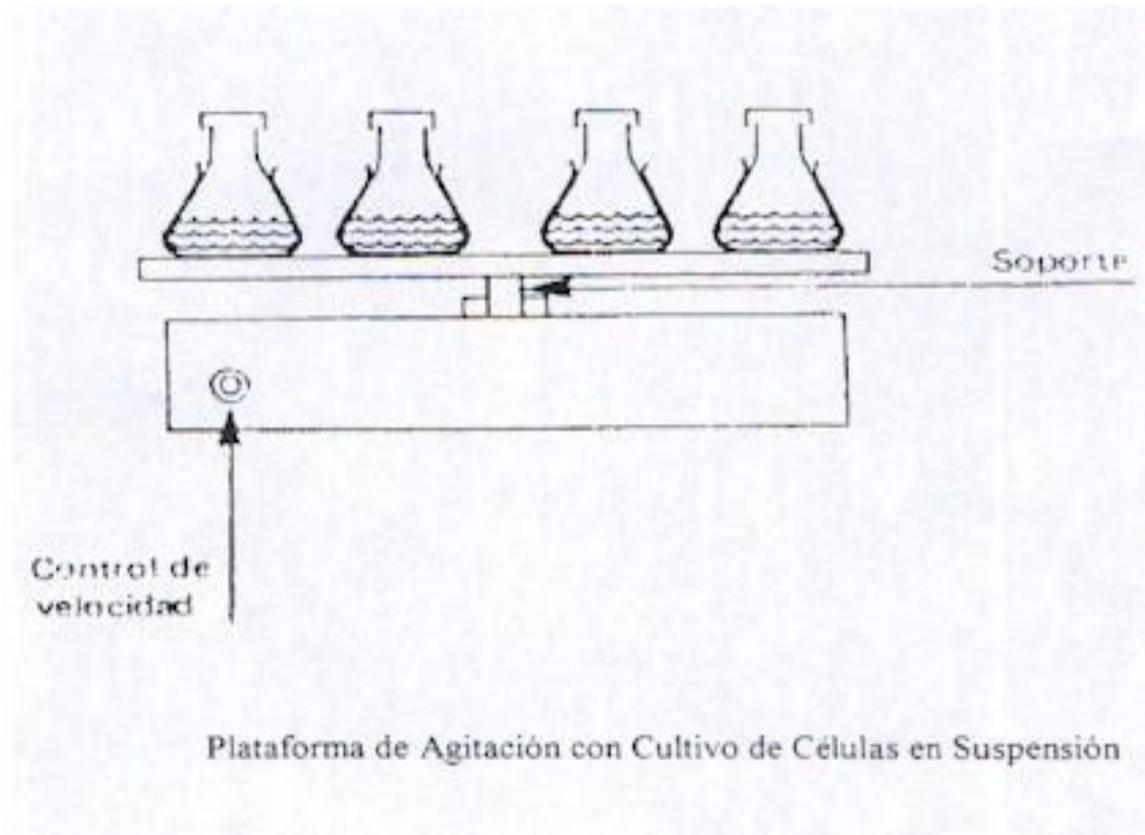
El Salvador. Áreas cafetaleras por altitud y región



Áreas cafetaleras por altitud y región en El Salvador.

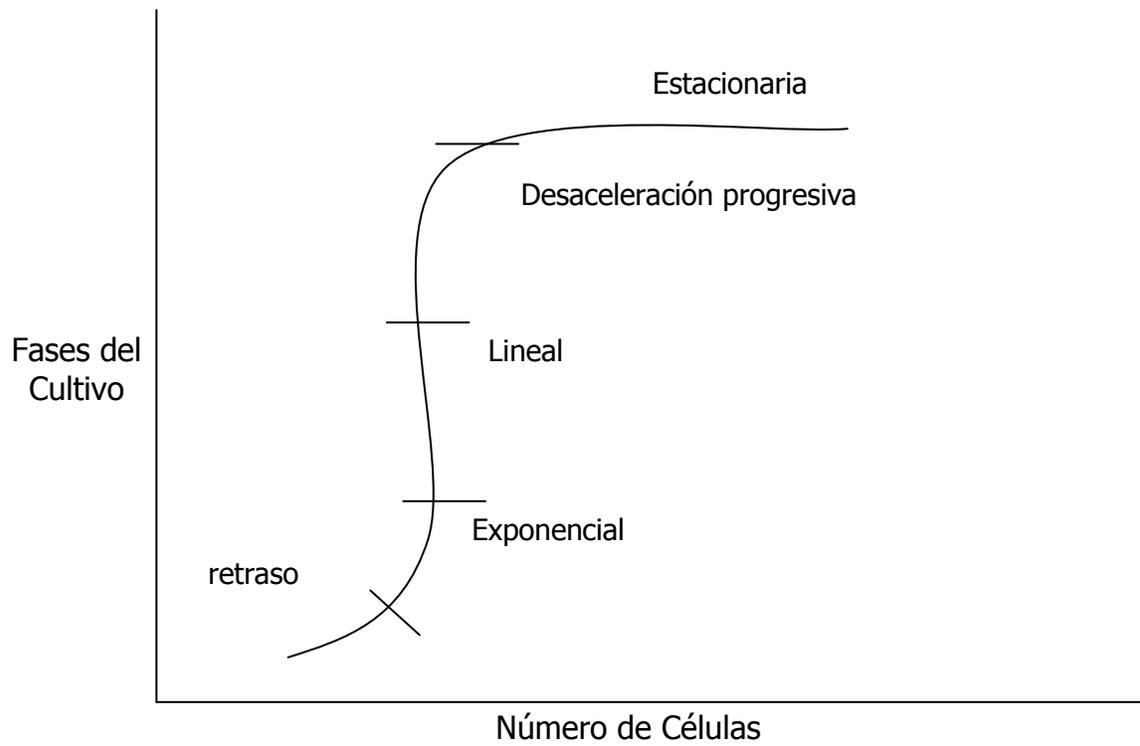
Fuente: Economía Agropecuaria, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Escala: 1, 1,000,000.

APÉNDICE 2



Plataforma de Agitación para Suspensiones Celulares de "café" (*Coffea arabica*).

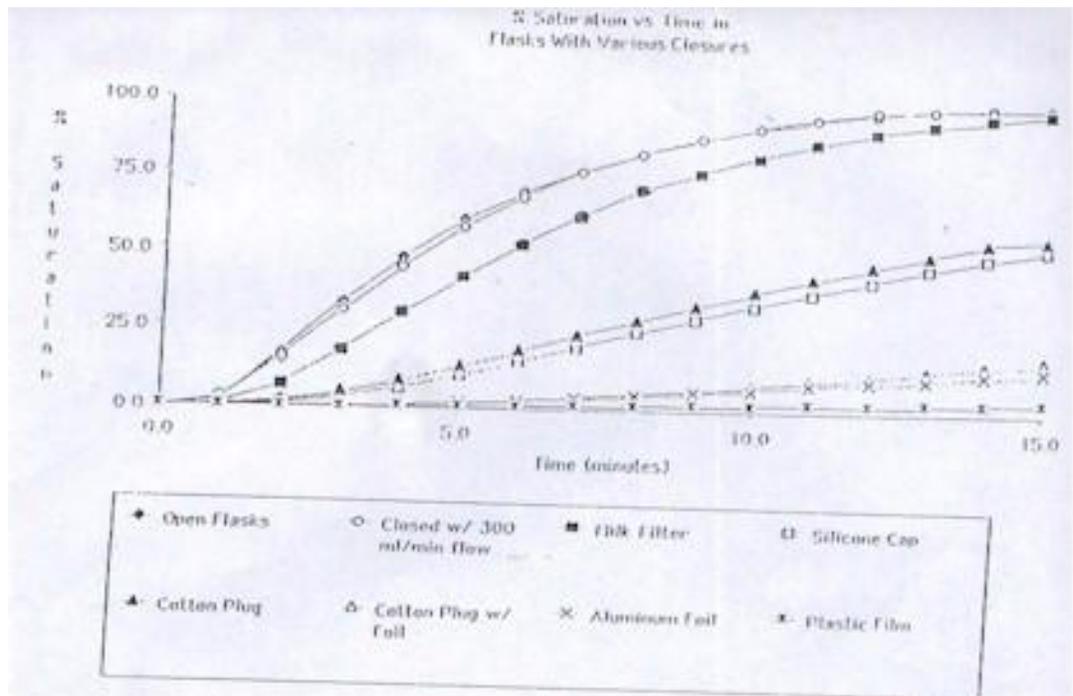
APÉNDICE 3



Curva de crecimiento típica en la cual se relaciona el número de células en las diferentes fases (De Retraso, Exponencial, Lineal, Desaceleración y Estacionaria) con el tiempo de incubación en un cultivo.

Fuente: Zsabados *et al.*, 1993.

APÉNDICE 4



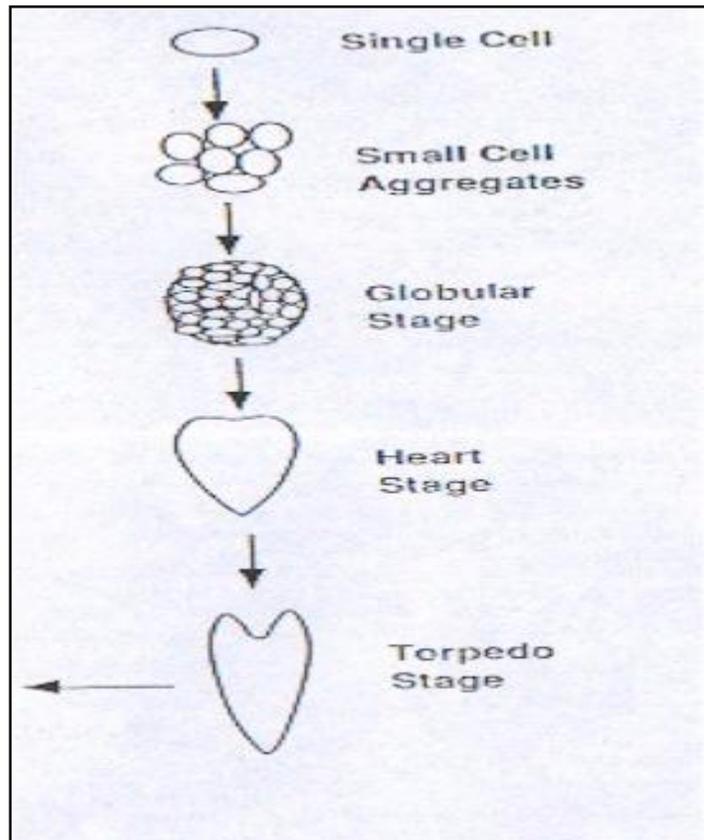
Crecimiento de las células en suspensión con diferente cubierta de frasco.

APÉNDICE 5



Esquema de las diferentes del procedimiento de micropropagación por microestacas en el café (Figura 13-1, según fuente: Albarrán, 1999).

APÉNDICE 6



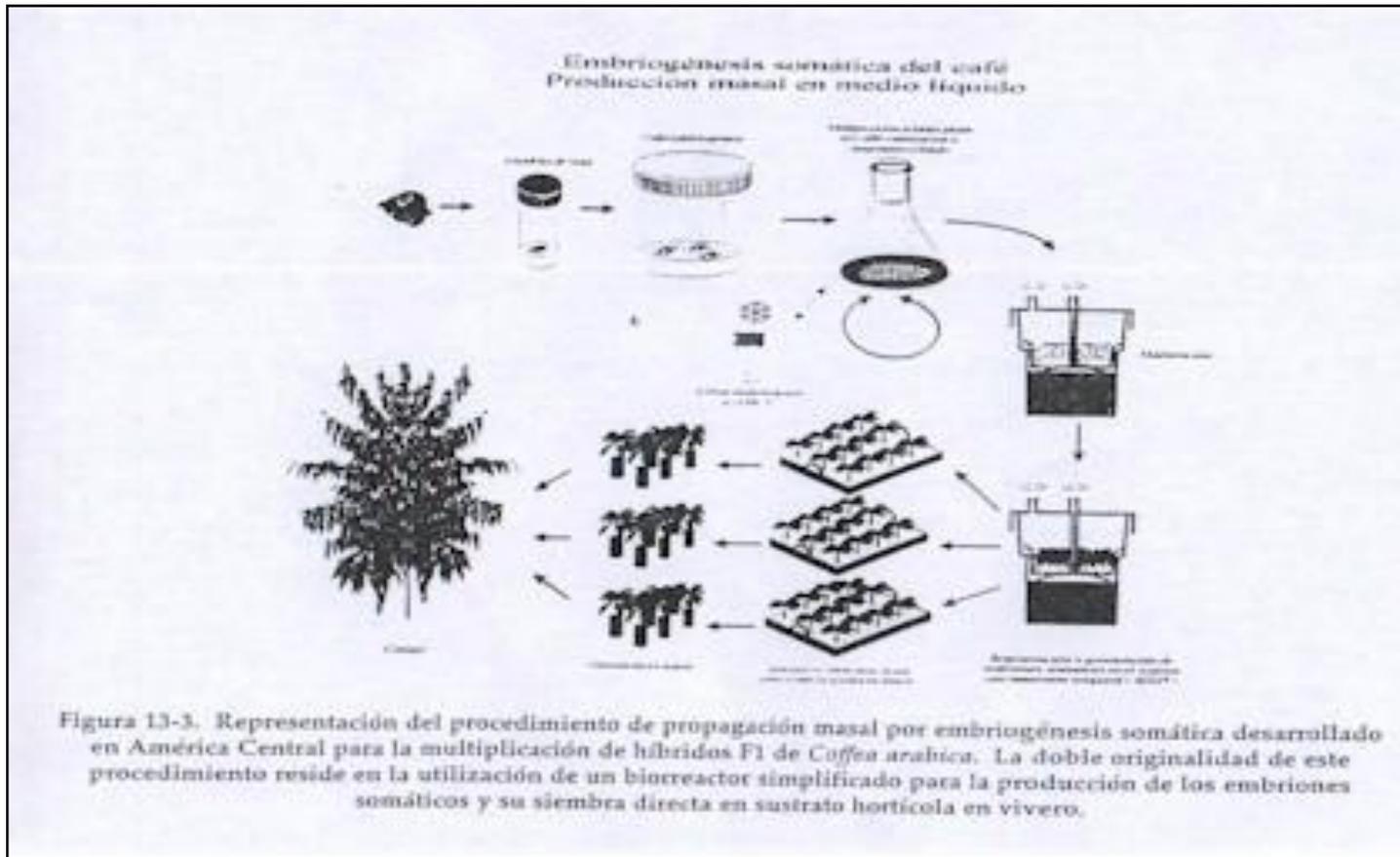
Diferentes etapas de los embriones somáticos.
Fuente: Payne, 1992.

APÉNDICE 7



Esquema de las dos vías de embriogénesis somática en el caféto (Figura 13-2, según fuente: Albarrán, 1999).

APÉNDICE 8



Multiplicación de cafeto por embriogénesis somática de alta frecuencia en medios líquidos (Figura 13-3, según fuente: Albarrán, 1999).

APÉNDICE 9

Medio T3B

Mac Mic	2,15 g
Vitaminas T3B	5 ml
Mioinositol	100 mg
Extracto de Malta	200 mg
Caseína Hidrolizada	100 mg
2,4 – D	1 mg
Kinetina	1 mg
Sucrosa	30 g
PH	5.6
q.s.p	1000 ml

Vitaminas T3B

L- Cisteína	400mg
Thiamina HCL	200mg
Piridoxina	20mg
A. Nicotínico	20mg
q.s.p	200ml

Medio T4B

Mac Mic	2,15 g
Vitaminas T3B	5 ml
Mioinositol	100 mg
Extracto de Malta	200 mg
Caseína Hidrolizada	100 mg
BAP	4 mg
Adenina	40 mg
Kinetina	1 mg
Sucrosa	40 g
PH	5.6
Phytigel	2 g
q.s.p	1000 ml

Medios de Cultivo utilizados para Suspensiones Celulares de "café" (*Coffea arabica*)

APÉNDICE 10

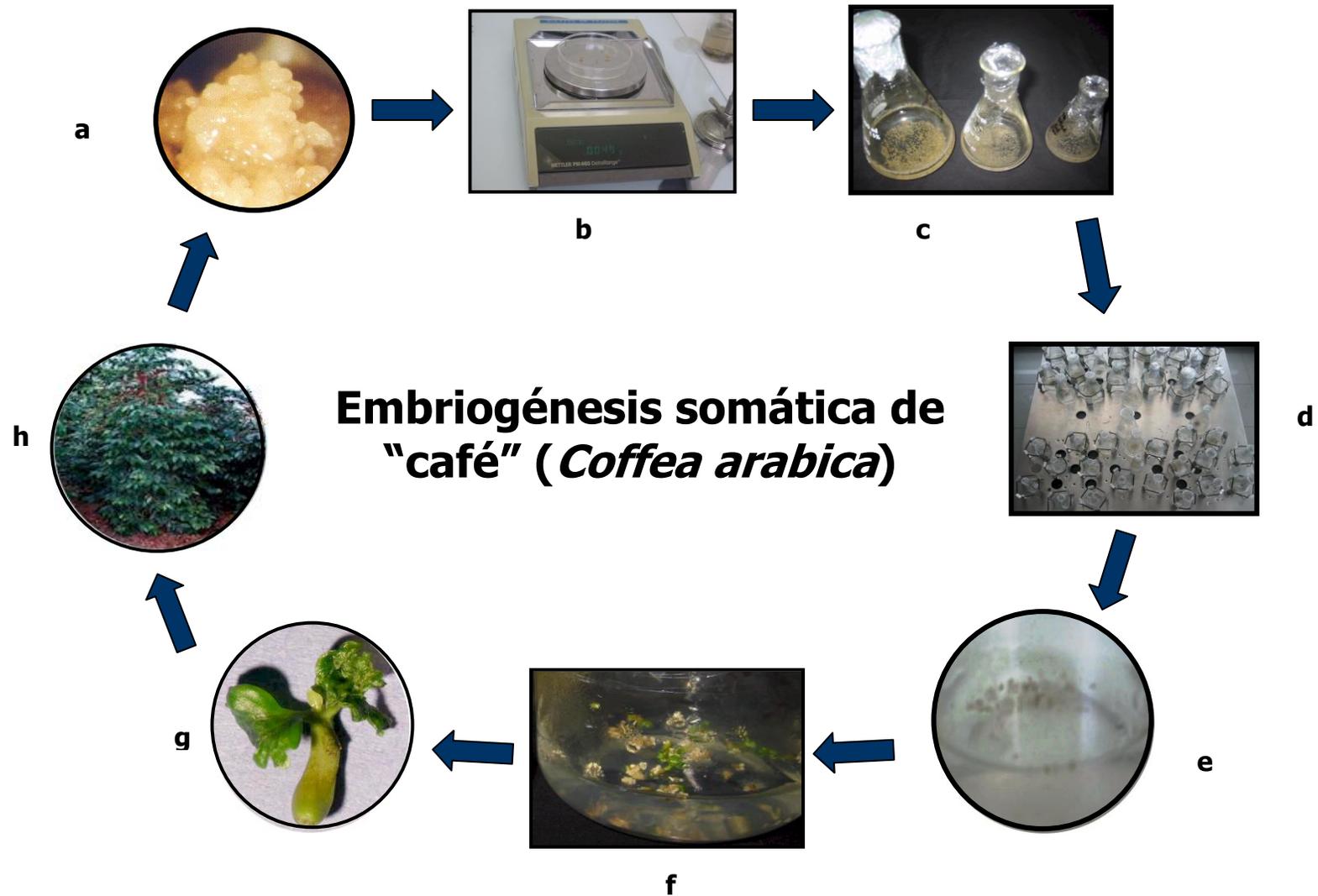


Figura 1. Desarrollo de suspensiones celulares de "café" (*Coffea arabica*) L₅A₂₆. (a) Planta de "café", (b) Callo embriogénico, (c) Peso del inóculo en gramos, (d) Agitador a rpm, (e) Células embriogénicas, (f) Células embriogénicas en medio sólido, (g) Vitroplanta.

APÉNDICE 11

HOJA DE DATOS UTILIZADA PARA EL EXPERIMENTO: EVALUACIÓN DE TASAS DE SIEMBRA DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE "CAFÉ" (*Coffea arabica*) UTILIZANDO TRES TAMAÑOS DE RECIPIENTE PARA DESARROLLAR SUSPENSIONES CELUALRES.

SUBCULTIVO: _____

FECHA: _____

Número de Recipientes	Volumen de la suspensión	Volumen de las células	Necrosamiento	Contaminación	
				Hongo	Bacteria

OBSERVACIONES: _____

APÉNDICE 12

Tabla No. 2. ANDEVA aplicado a subcultivo 1 de suspensiones

Valores	Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	Significancia
2	Recipiente	2	1607.487	803.704	217.0000	0.0000
4	Tasa de siembra	2	2148.741	1070.370	289.0000	0.0000
6	Interacción (R.TS)	4	3881.4821	970.370	262.0000	0.0000
-7	Error	18	66.667	3.704		
	Total	26	7696.296			

Coefficiente de Variación: 6.5%.

Tabla No. 3. Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente en subcultivo 1.

Recipiente	Tasas de Siembra		
	0.5	1	1.5
50 ml	50	20	20
125 ml	67	30	20
250 ml	10	20	30

ANDEVA aplicado a subcultivo 1 de suspensiones y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente en subcultivo 1.

APÉNDICE 13

Tabla No. 4. ANDEVA aplicado a subcultivo 2 de suspensiones

Valores	Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	Significancia
2	Recipiente	2	7029.630	3514.815	189.8000	0.0000
4	Tasa de siembra	2	1096.296	548.148	29.6000	0.0000
6	Interacción (R.TS)	4	2881.481	570.370	30.83000	0.0000
-7	Error	18	333.333	18.519		
	Total	26	10740.741			

Coefficiente de Variación: 7.35%.

Tabla No. 5. Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente en subcultivo 2.

Recipiente	Tasas de Siembra		
	0.5	1	1.5
50 ml	46.66	56.66	20
125 ml	70	80	90
250 ml	56.66	63	43

ANDEVA aplicado a subcultivo 2 de suspensiones y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente en subcultivo 2.

APÉNDICE 14

Tabla No. 6. ANDEVA aplicado a subcultivo 3 de suspensiones

Valores	Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	Significancia
2	Recipiente	2	1611.556	805.778	16.1395	0.0001
4	Tasa de siembra	2	16.667	8.333	0.1669	
6	Interacción (R.T.S)	4	1781.778	445.444	8.9221	0.0004
-7	Error	18	898.667	49.926		
	Total	26	4308.667			

Coefficiente de Variación: 0.68%.

Tabla No. 7. Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente en subcultivo 3.

Recipiente	Tasas de Siembra		
	0.5	1	1.5
50 ml	1025.0	1025.0	1029.6
125 ml	1046.3	1030	1050
250 ml	1037.6	1059	1034.3

ANDEVA aplicado a subcultivo 3 de suspensiones y Cuadro de doble entrada de las tasas de siembra y tamaño del recipiente en subcultivo 3.

APÉNDICE 15

Tabla No. 8. Prueba de Tukey aplicada a los tamaños de los recipientes en subcultivo 1

< -----Orden Original -----> < -----Orden por Rango ----->

Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos	Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos
1	30.00	B	2	38.89	A
2	38.89	A	1	30.00	B
3	20.00	C	3	20.00	C

A: Recipiente 2 (125 ml)

B: Recipiente 1 (50 ml)

C: Recipiente 3 (250 ml)

Tabla No. 9. Prueba de Tukey aplicada a las tasas de siembra en subcultivo 1

< -----Orden Original -----> < -----Orden por Rango ----->

Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos	Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos
1	42.22	A	1	24.22	A
2	23.33	B	2	23.33	B
3	23.33	B	3	23.33	B

A: Tasa de siembra 1 (0.5 gL⁻¹)

B: Tasa de siembra 2 y 3 (1.0 y 1.5 gL⁻¹)

Prueba de Tukey aplicada a los tamaños de recipiente y tasas de siembra en subcultivo 1.

APÉNDICE 16

Tabla No. 10. Prueba de Tukey aplicada a los tamaños de los recipientes en subcultivo 2

< -----Orden Original -----> < -----Orden por Rango ----->

Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos	Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos
1	41.11	C	2	80.00	A
2	80.00	A	3	54.44	B
3	54.44	B	1	41.11	C

A: Recipiente de 125 ml.

B: Recipiente de 250 ml.

C: Recipiente de 50 ml.

Tabla No. 11. Prueba de Tukey aplicada a las tasas de siembra en subcultivo 2

< -----Orden Original -----> < -----Orden por Rango ----->

Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos	Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos
1	57.78	B	2	66.67	A
2	66.67	A	1	57.78	B
3	51.11	B	3	51.11	B

A: Tasa de siembra 1.0 gm.

B: 0.5 y 1.5 gm.

Prueba de Tukey aplicada a los tamaños de recipiente y tasas de siembra en subcultivo 2.

APÉNDICE 17

Tabla No. 12. Prueba de Tukey aplicada a los tamaños de los recipientes en subcultivo 3

< -----Orden Original -----> < -----Orden por Rango ----->

Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos	Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos
1	1025	B	3	1044	A
2	1042	A	2	1042	A
3	1044	A	1	1027	B

A: Recipiente 2 y 3 (125 y 250 ml)

B: Recipiente 1 (50 ml)

Tabla No. 13. Prueba de Tukey aplicada a las tasas de siembra en subcultivo 3

< -----Orden Original -----> < -----Orden por Rango ----->

Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos	Medias	Valor Estimado	Grupos Homogéneos
1	1036	A	2	1038	A
2	1038	A	3	1038	A
3	1038	A	1	1038	A

A: Tasa de siembra 1, 2 y 3 (0.5, 1.0 y 1.5 gL⁻¹)

Prueba de Tukey aplicada a los tamaños de recipiente y tasas de siembra en subcultivo 3.