

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



“REGENERACIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS  
DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ “*Coffea arabica*” UTILIZANDO DOS  
CONCENTRACIONES DE BENZIL AMINO PURINA (BAP)”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MARIO ALBERTO SOTO PLATERO

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MARZO DE 2008

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



"REGENERACIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS  
DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ "*Coffea arabica*" UTILIZANDO DOS  
CONCENTRACIONES DE BENZIL AMINO PURINA (BAP)"

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MARIO ALBERTO SOTO PLATERO.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

ASESORES:

M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA.

Licda. ANA MARICELA MEJÍA VILLACORTA.

Dr. ADÁN HERNÁNDEZ.

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MARZO DE 2008.

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



"REGENERACIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE  
HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ "*Coffea arabica*" UTILIZANDO DOS  
CONCENTRACIONES DE BENZIL AMINO PURINA (BAP)"

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MARIO ALBERTO SOTO PLATERO

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

ASESORES: M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA \_\_\_\_\_

Licda. ANA MARICELA MEJÍA VILLACORTA \_\_\_\_\_

Dr. ADÁN HERNÁNDEZ \_\_\_\_\_

JURADO: M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA \_\_\_\_\_

Master LASTENIA DE FLINT \_\_\_\_\_

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MARZO DE 2008.

# AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

Ing. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL

Lic. DOUGLAS VLADIMIR ÁLFARO CHAVEZ

FISCAL GENERAL

Dr. RENÉ MADECADEL PERLA JIMÉNEZ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO DE LA FACULTAD

Dr. RAFAEL ANTONIO GÓMEZ ESCOTO

DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. NOHEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO.

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, MARZO DE 2008

# CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
LISTA DE TABLAS .....	viii
LISTA DE GRÁFICOS .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	x
AGRADECIMIENTOS.....	xi
DEDICATORIA.....	xii
RESUMEN.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	2
2.1. Origen y Distribución Geográfica.....	2
2.2. Botánica del cafeto .....	2
2.2.1. Clasificación Botánica del café.....	3
2.2.2. Descripción botánica.....	4
2.2.2.1. Raíz .....	4
2.2.2.2. Tallo .....	4
2.2.2.3. Hojas .....	4
2.2.2.4. Flor .....	4
2.2.2.5. Fruto.....	5
2.3. Biotecnologías aplicadas a <i>C. arabica</i> .....	6
2.3.1. Generalidades.....	6
2.3.2. Técnicas de reproducción vegetativa <i>In vitro</i> .....	6
2.3.2.1. Organogénesis.....	7
2.3.2.2. Micropropagación mediante Microestacas .....	8
2.3.2.3. Micropropagación mediante Embriogénesis Somática.....	8
2.4. Cultivo de tejidos en Café.....	11
2.5. Embriogénesis somática .....	12
2.5.1. Embriogénesis somática de baja frecuencia y de alta frecuencia.....	14
2.5.2. Embriogénesis somática de Alta Frecuencia (ESAF) .....	15

2.5.3. Etapas de la Embriogénesis de Alta Frecuencia (ESAF) .....	16
2.5.3.1. Inducción del callo.....	16
2.5.3.2. Proliferación del callo Embriogénico en Suspensión Celular.....	17
2.5.3.3. Regeneración o Desarrollo de los Embriones Somáticos.....	17
2.5.3.4. Inducción de los Embriones Somáticos .....	17
2.5.3.5. Desarrollo de los Embriones somáticos .....	18
2.5.3.6. Proliferación .....	18
2.5.3.7. Maduración.....	18
2.6. Factores que influyen en el cultivo de tejidos vegetales.....	19
2.6.1. Material vegetal o explante .....	19
2.6.2. Potencial de Hidrógeno (pH) .....	19
2.6.3. Humedad.....	19
2.6.4. Oxígeno.....	20
2.6.5. Dióxido de carbono .....	21
2.6.6. Luz.....	21
2.6.7. Temperatura .....	21
2.7. Medios de Cultivo .....	22
2.7.1. Medios líquidos .....	23
2.7.2. Vitaminas.....	23
2.7.3. Agente solidificante .....	24
2.7.4. Reguladores de Crecimiento.....	25
2.7.5. Síntesis y Transporte de la Citocinina.....	26
2.8. Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®).....	27
2.8.1. Principales ventajas para el cultivo utilizando el sistema RITA®.....	27
2.8.2. Material necesario para el sistema RITA®.....	28

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Ubicación del área de Estudio .....	29
3.2. Material experimental.....	29
3.2.1. Material vegetativo .....	29
3.2.2. Medio de cultivo líquido utilizado .....	29
3.3. Etapa experimental .....	30
3.3.1 Etapa de regeneración de Embriones somáticos.....	30
3.3.2. Etapa de Germinación de Embriones somáticos.....	31
3.4. Análisis estadístico.....	32
3.4.1. Diseño experimental .....	32
3.4.2. Análisis de datos .....	32
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	34
4.1. Efecto de la BAP sobre el proceso de regeneración de embriones somáticos de <i>C. arabica</i> .....	34
4.2. Efecto de la BAP sobre el proceso de germinación de embriones somáticos de <i>C. arabica</i> .....	35
4.3. Producción de Embriones Somáticos regenerados de <i>C. arabica</i> , obtenidos al final de la etapa experimental.....	37
5. DISCUSIÓN.....	40
5.1. Medio de cultivo .....	41
5.2. Regeneración y Germinación de embriones somáticos de Híbridos F1 de <i>C. arábica</i> .....	42
6. CONCLUSIONES .....	45
7. RECOMENDACIONES .....	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
9. APÉNDICES.....	55

## LISTA DE TABLAS.

<b>Tabla N°</b>	<b><u>página</u></b>
1. Composición de los diferentes tratamientos experimentados en las etapas de regeneración y germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	30
2. Número promedio de embriones somáticos de <i>C. arabica</i> obtenidos al final de 14 semanas en los diferentes tratamientos de la etapa de regeneración.....	34
3. Número promedio de embriones somáticos de <i>C. arabica</i> obtenidos al final de ocho semanas en los diferentes tratamientos de la etapa de germinación.....	36
4. Número promedio de embriones somáticos de <i>C. arabica</i> obtenidos al final de 22 semanas en los diferentes tratamientos de la etapa de regeneración.....	37
5. Composición química del medio de cultivo líquido (Yasuda, 1985, café) utilizado en las etapas de regeneración y germinación de los embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	58
6. Cuadro de toma de datos para la regeneración de embriones somáticos.....	62
7. Cuadro de toma de datos para la etapa de germinación de embriones de café.....	63
8. Promedio del conteo de embriones obtenidos en cada tratamiento de la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	64



9. Análisis de varianza para la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	64
10. Prueba de Tukey aplicadas al promedio de embriones somáticos regenerados de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	64
11. Promedio del conteo de embriones obtenidos en cada tratamiento de la etapa de germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	65
12. Análisis de varianza para la etapa de germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	65
13. Prueba de Tukey aplicadas al promedio de embriones somáticos germinados de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> .....	65
14. Promedio del conteo de embriones obtenidos en cada tratamiento en la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> (Obtenida a las 22 semanas).....	66
15. Análisis de varianza para la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> . (Obtenida a las 22 semanas).....	66
16. Prueba de Tukey aplicadas al promedio de embriones somáticos regenerados de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> . (Obtenidos a las 22 semanas).....	66

## LISTA DE GRÁFICOS.

<b>Grafico N°</b>	<b><u>página</u></b>
1 Porcentaje de embriones somáticos regenerados en los diferentes tratamientos después de 14 semanas.....	35
2 Porcentaje de embriones somáticos germinados después de ocho semanas.....	36
3 Porcentaje de embriones somáticos regenerados después de 22 semanas.....	38

## LISTA DE FIGURAS.

1. Aspecto morfológico de embriones somáticos de híbridos F1 de <i>C. arabica</i> regenerados y germinados en los diferentes tratamientos.....	39
2. Esquema de la embriogénesis somática de Alta Frecuencia.....	56
3. Funcionamiento del Sistema Automatizado de Inmersión Temporal (RITA®).....	58
4. Diferentes estadios de los embriones somáticos.....	59
5. Esquema del desarrollo experimental de la regeneración y germinación de embriones somáticos F1 de café <i>C. arabica</i> .....	60
6. Esquema para el cambio de medio de cultivo líquido a los agregados embriogénicos.....	61

## **AGRADECIMIENTOS**

La Fundación Salvadoreña para la Investigación del Café (PROCAFE). Por haberme permitido desarrollar esta investigación en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

A mis asesores de tesis:

M.Sc. Yanira López

Por su gran labor como docente, por guiarme en este proceso, por su apoyo incondicional.

Licda. Ana Maricela Mejía.

Por brindarme su ayuda por haber estado en cada momento para guiarme y compartir sus conocimientos en el desarrollo de la investigación.

Dr. Adán Hernández.

Por haber apoyado mi estancia en la fundación PROCAFE para la realización de esta investigación.

Al jurado calificador:

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza.

Master Lastenia de Flint.

Por las observaciones que contribuyeron a fortalecer esta investigación.

A mis amig@s por estar en las buenas y en las malas.

## **DEDICATORIA**

**A DIOS**

**A MI FAMILIA**

## RESUMEN

El café (*Coffea arabica*) es una especie de importancia económica, ecológica y social. En El Salvador se produce solamente la especie Arábica, casi completamente en sus variedades tradicionales.

El café Bourbonn comprende el 68% del área total de café cultivada en el país, Pacas que representan el 29% y las especies híbridas representan solamente el 3%. La mayor parte de nuestro café (71%) es cultivado en media y estricta altura, entre los 900 y más de 1200 msnm.

La Embriogénesis somática de alta frecuencia presenta un potencial de multiplicación muy elevado. Esta técnica presenta aptitudes para la automatización gracias a la friabilidad y a la robustez del material embriogénico, además de utilizar medios líquidos. Estas cualidades son indispensables para la producción de materiales elites a un costo atractivo (Van Boxtel y Berthouly, 1996 citado por PROMECAFE, 1997).

En esta investigación se regenero y germino embriones somáticos de híbridos F1 de café *C. arabica* en un sistema RITA® estudiando el efecto del regulador de crecimiento Benzil Amino Purina (BAP) sobre la producción de embriones somáticos.

El material vegetal utilizado para esta investigación fueron callos embriogénicos obtenidos de fragmentos de hojas de plantas de híbridos F1 de café *C. arabica*. Estos callos fueron sometidos a tres diferentes tratamientos: Tratamiento (1) Yasuda, café, 1985, sin regulador de crecimiento; el tratamiento (2) con Yasuda, café, 1985 + 4 mg/l de BAP y el tratamiento (3) con Yasuda café, 1985 + 6 mg/l de BAP. Las variables a evaluar fueron el número de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica* producidos en las etapas de regeneración y germinación.

En la etapa de regeneración el conteo se realizo a las 14 semanas, el tratamiento que mejor producción presento fue el tratamiento (3) con una producción de 54% de embriones regenerados.

En la etapa de germinación el conteo se realizó a las 8 semanas el tratamiento que mejor producción presento fue el tratamiento (3) con una producción del 52% de embriones germinados

En los tres tratamientos existió una diferencia significativa según la prueba de post varianza realizada a la producción de embriones regenerados y germinados por lo que se determina que la concentración más apropiada para obtener una producción de embriones de híbridos F1 de *C. arabica* en las dos etapas fue el tratamiento (3) con 6 mg/l de BAP.

El presente estudio pretende contribuir al sector cafetalero del país poniendo a su disposición esta herramienta biotecnológica para poder propagar con mayor eficiencia y calidad, plantas mejoradas de café, en un menor tiempo, a un bajo costo.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El café (*Coffea arabica*) es uno de los productos de mayor exportación y su cultivo brinda beneficios sociales, económicos y ecológicos. En El Salvador la caficultura ha sido afectada por la reducción de bosques cafetaleros debido al cambio de uso de suelo, fenómenos naturales, los precios volátiles a nivel internacional, el control de plagas, los costos de fertilización que son aspectos que contribuyen en los costos de producción.

La demanda de una especie de café resistente a enfermedades, el aumento de la producción y calidad de la bebida, ha conducido a diferentes instituciones a crear programas de mejoramiento genético, y posteriormente desarrollar métodos eficientes para la propagación como por ejemplo la técnica Embriogénesis somática de alta frecuencia que es una alternativa interesante para propagar plantas seleccionadas en grandes cantidades en corto tiempo y a menor costo.

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática permite obtener volúmenes de producción superiores, lo cual convierte a este sistema en una vía de regeneración potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Thorpe, 1991).

En esta investigación se presenta el desarrollo de dos de las etapas que comprende de la Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (ESAF): regeneración y germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica*, evaluando en las dos etapas el aporte del regulador de crecimiento Benzil Amino Purina (BAP) en concentraciones de 4 mg/l y 6 mg/l verificando en cuál concentración se obtiene el mayor número de embriones somáticos regenerados y germinados para determinar la concentración de BAP más eficiente en las dos etapas.

Esta investigación pretende brindar los aportes necesarios en beneficio de la caficultura utilizando tecnología de alto nivel científico que les permita tener acceso a material genético mejorado y multiplicado.

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO.

### 2.1 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. Los árboles de café silvestres son componentes naturales de los bosques tropicales de África (Charrier & Berthaud, 1985).

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 esta región existe un número de variantes, que fueron consideradas para dar lugar a las subespecies (Albarrán R., J.G. 1999).

### 2.2 Botánica del Cafeto.

El árbol desarrollado normalmente tiene sólo un tallo vertical, que a partir del décimo segundo 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 & Aldana, 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 (Girón, I.E., 1998).

El genoma básico del género es 11 cromosomas y típico para la mayoría de los géneros de la familia *Rubiaceae*. En la sección *Coffea* todas las especies son diploides con  $2n = 22$  cromosomas y de polinización cruzada excepto para *C. Arabica* que es la única especie tetraploide ( $2n = 4x = 44$ ) y de autopolinización del género (Charrier y Berthaud, 1985). Este aislamiento genético ha inhibido la utilización de toda la variación morfológica y metabólica existente en el género para el mejoramiento genético (Albarrán R., J.G. 1999).

*C. arábica* 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 (Mejía, 2004).

El Salvador produce solamente la especie Arábica, casi completamente en sus variedades tradicionales. El café Bourbonnais comprende el 68% del área total de café cultivada en el país, Pacas que representan el 29% y las especies híbridas representan solamente el 3%. El Salvador clasifica su café de acuerdo a la altitud sobre el nivel del mar: Estricta altura: producido arriba de 1,200 metros; Media altura: producido entre 900 y 1,200 metros; Bajío: producido entre 600 y 900 metros sobre el nivel del mar. La mayor parte de nuestro café (71%) es cultivado en media y estricta altura, entre los 900 y mas de 1,200 metros del nivel del mar, por lo que no es extraño que sea disfrutado y muy bien aceptado gracias a su buena calidad en Alemania, Estados Unidos, Italia, Francia y Japón (Consejo Salvadoreño del Café 2005, en línea).

### **2.2.1 Clasificación botánica del café.**

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Sub-División: *Angiospermae*

Clase: *Magnoliata*

Sub-Clase: *Asteridae*

Orden: *Rubiales*

Familia: *Rubiaceae*

Género: *Coffea*

Especie: *arábica*

Nombre científico: *Coffea arabica*

Fuente: Carlier & Marzocca, 1981.



## **2.2.2. Descripción botánica.**

### **2.2.2.1. Raíz.**

Está constituida por la raíz principal o pivotante que puede alcanzar 50 o más centímetros de profundidad, de la cual se originan las raíces secundarias que ejercen la función de anclaje y las raíces terciarias de las que emergen las raicillas (cabellera), que sirven a la planta para la absorción de agua y nutriente.

El desarrollo normal del sistema radicular del cafeto es muy importante para su crecimiento, producción y longevidad. Por lo que desde la etapa de semillero y vivero se debe lograr una raíz principal bien formada, para obtener un excelente crecimiento en el campo.

### **2.2.2.2. Tallo.**

El cafeto es un arbusto que está formado por un tallo central en cuyo extremo se encuentra la "yema" terminal u ortotrópica", que es la responsable del crecimiento vertical, formando nudos y entrenudos. De los nudos se forman las ramas laterales o bandolas y las crinolinias o palmillas (crecimiento plagiotrópico). A través de ambos tipos de crecimiento se conforma la arquitectura del cafeto, es decir su sistema vegetativo y productivo.

### **2.2.2.3. Hojas.**

Las hojas nacen en la parte Terminal del tallo y en las ramas o bandolas laterales. Crecen en disposición opuesta, son de forma elíptica. Su tamaño, color y cantidad varía de acuerdo a la especie y variedad. La función principal de las hojas está asociada a la fotosíntesis y fotorespiración, procesos indispensables para regular la actividad productiva.

### **2.2.2.4. Flor.**

Al igual que la mayoría de especies de la familia *Rubiaceae*, la disposición floral del cafeto es distal o sea, en grupos separados de yemas, que brotan en los nudos de las ramas laterales. Cada flor tiene en la base un receptáculo corto que se prolonga en el

cáliz de color verde que mide de 1 a 2 milímetros (mm) de largo, con cinco picos terminales.

La corola es un tubo largo, cilíndrico en la base y de color blanco, que mide de 6 a 12 mm de largo, la cual se abre arriba en cinco pétalos. Consta de 5 estambres insertados en el tubo de la corola. El gineceo está constituido por un ovario súpero con dos óvulos. El estilo es fino y largo con terminaciones estigmáticas. (PROCAFE, 2007, en línea).

El inicio y crecimiento de la flor está influenciado por la luz solar (luminosidad menor a 13 horas), agua (mínimo 10 mm de lluvia), temperatura (20 a 25 °C) y por reguladores de crecimiento vegetal (hormonas).

El cafeto es una planta autógama por lo que, cuando la flor se abre, parte del polen ya se ha liberado internamente, habiendo ocurrido entre el 90 a 95% de autofecundación. Esta característica evita riesgos de contaminación genética.

En las condiciones de El Salvador, el régimen de lluvia permite que ocurran de 1 a 3 floraciones en el año, de marzo a mayo. Normalmente, la floración principal sucede al final de abril o en la primera semana de mayo. Se considera que 10 mm de lluvia son suficientes para inducir la floración del cafeto, después de 8 a 10 días de haber ocurrido la misma (PROCAFE, 2007, en línea).

#### **2.2.2.5. Fruto.**

El fruto, es una drupa que normalmente, contiene dos semillas con una longitud de 10 a 17 mm que se conoce como café uva, dependiendo de la variedad se necesitan 7 a 8 meses para que madure, su cubierta (pulpa) es roja o amarilla en algunas variedades. El fruto está formado por: la pulpa (exocarpio y mesocarpio), el pergamino (endocarpio), la película plateada (testa), la semilla (endosperma) y el embrión.

*Coffea arabica* es considerada una especie exclusivamente de las partes altas de las zonas tropicales y sub tropical. Es la especie más ampliamente cultivada en el mundo,

correspondiéndole el 80% de total de la producción. *C. canephora* es la segunda especie de mayor cultivo a nivel mundial después de *C. arabica*.

La excelente calidad de la bebida producida por *C. arabica* explica por qué es la de mayor cultivo; sin embargo esta especie tiene dos limitantes: una reducción en la productividad y calidad de la bebida en las partes cercanas a nivel del mar y la susceptibilidad de sus cultivares a las principales enfermedades fungosas provocadas por los hongos *Colletotrichum coffeanum*, *Hemileia vastratrix*, este último considerado como una de las siete enfermedades más importantes de las plantas en todos los tiempos.

La resistencia a enfermedades es una característica de cada especie y primeramente fue usada en *C. canephora*. Actualmente, existen algunas variedades *C. arabica* resistente a *H. vastratrix* (roya de cafeto) que se usan dentro de los programas de mejoramiento. Sin embargo su distribución y multiplicación es limitada.

Los avances logrados en el cultivo de las células somáticas de las plantas hacen ahora posible resolver este problema y aplicar las técnicas de la genética convencional a plantas superiores (Castro, F., J. 1982).

## **2.3 Las Biotecnologías aplicadas a *C. arabica*.**

### **2.3.1. Generalidades.**

La biotecnología es un conjunto de técnicas aplicadas a un organismo, parte de un organismo, entidades sub-celulares, o proceso biológico. Desde más de 20 años dichas técnicas son cada día más utilizadas en la agricultura, para tratar de responder más rápidamente a los problemas que enfrenta dicha agricultura moderna (Berthonly, M. 1997).

### **2.3.2. Técnicas de reproducción vegetativa *In vitro*.**

Llamadas también "Biotecnológicas" han permitido nuevas estrategias de investigación para hacer más eficiente la producción agronómica y de mejoramiento genético. Hoy en día la caficultura latino-americana enfrenta problemas como: plagas, enfermedades, baja adaptabilidad de las variedades liberadas, la competencia

internacional y los problemas económicos del mercado. La técnica de multiplicación vegetativa más utilizada en el cafeto es el esqueje, sin embargo, debido al dimorfismo de los ejes vegetativos, el número de esquejes ortotropicos que puede producir un cafeto es muy limitado. El marco de una multiplicación a gran escala, la poca disponibilidad de esquejes puede llevar a plazos considerables. Además, el esqueje hortícola exige la instalación de jardines clonales, lo que implica diversas limitaciones entre ellas y el mantenimiento y las superficies utilizadas. En este contexto la utilización de técnicas de multiplicación *In vitro* presenta un gran interés para poder incrementar la tasa de multiplicación y permitir una difusión rápida de una especie mejorada. Por las técnicas de cultivo *In vitro*, se conocen dos vías de multiplicación vegetativa del cafeto: el micro esqueje y la embriogénesis somática (Berthonly, M. 1997).

#### **2.3.2.1. Organogénesis.**

La formación de órganos de novo se puede inducir reproduciblemente a través de la manipulación química de los medios de cultivo. Cuando las células son cultivadas en condiciones apropiadas, son capaces de desarrollar individuos completos como lo hace el cigoto. El desarrollo de los primordios en los órganos respectivos es esencialmente el mismo tanto en cultivo de tejidos como en plantas intactas, por lo tanto, el uso de cultivo *In vitro* tiene grandes ventajas para estudios tanto básicos como aplicados (Villalobos, V., 1990).

Thorpe, (1980) considera que para el éxito en el establecimiento de un sistema de cultivos de tejidos, existen tres condiciones importantes: la selección del explante adecuado, la elección apropiada del medio y de las condiciones físicas. Los explantes *In vitro* seguirán un proceso morfológico por cualquiera de las rutas generales; esto es por medio de meristemoides, subsecuentemente primordios, brotes y finalmente la formación de raíces adventicias o bien a través de embriogénesis somática. (Winton, & Verhagn, 1977; Tran Thanh Van, 1980).

El cultivo *In vitro* ha permitido la aplicación de diferentes metodologías, como lo son: micro estacas, Embriogénesis somática directa e indirecta para la micropropagación

de genotipos de café, especialmente aquellos que no pueden reproducirse por semilla, y las descendencias de cruces interespecíficos de *C. arabica* y *C. canephora*. Estas técnicas permiten disminuir el tiempo de análisis y selección del material vegetal en estudio (Etienne et al., 1999; Dublín, 1993; citado por Girón, I.E., 1998).

### **2.3.2.2. Micropropagación mediante Microestacas.**

La técnica de micro esqueje del cafeto fue desarrollada por Dublín P., (1980, 1984) y Custers j., (1980). El principio de esta técnica tiene por base la del esqueje hortícola pero realizado *In vitro* cuyo objetivo es favorecer la callogénesis.

Tiene por finalidad la inducción *In vitro* de yemas axilares existentes a nivel de los nudos ortotropos, su desarrollo y su multiplicación en serie. Esta técnica comprende tres fases esenciales:

- a) Instalación del material vegetativo *In vitro* y obtención de micro tallos ortotropos.
- b) Multiplicación en serie de estas plántulas clónales.
- c) Enraizamiento y climatización de estas plántulas clónales.

### **2.3.2.3. Micropropagación mediante Embriogénesis Somática**

La célula posee una característica importante, la totipotencia, que demuestra que cada célula contiene todo el potencial genético para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico a la célula madre (Berthonly, M. 1997).

La Embriogénesis somática se define como el desarrollo de embriones a partir de células somáticas. Estos embriones somáticos se desarrollan al pasar por las fases (globular, corazón, torpedo, cotiledonario) idénticas al del embrión zigótico (Ammirato, P.V., 1987). Estos embriones poseen una estructura bipolar (meristemo radicular y caulinar).

Los primeros trabajos de embriogénesis somática sobre el cafeto fueron publicados por Staritsky (1970). Consiguió el desarrollo de callos vigorosos a partir de explantes de tallos de *C. arabica*, *C. canephora* y *C. Liberia*, pero solo los callos de *C. canephora* se diferenciaron en embriones somáticos y plántulas.

Sharp *et. al.*, (1973), trabajando sobre distintos explantes de *C. arabica*, relatan que el potencial morfológico varía acorde al explante utilizado.

Investigaciones realizadas ha permitido concluir que la embriogénesis somática puede ser inducida a partir de explantes de origen variado (Berthouly, M. 1997)

Tallos (Dublín, 1980; Staritsky y Van Hasselt, 1980).

Hojas (Herman y Hass, 1975; Sondhal y Sharp, 1977; Dublin, 1981; Yasuda *et. al.*, 1985),

- Óvulos (Lanaud, 1981)
- Anteras (Ascanio y Arcia, 1987)
- Protoplastos (Spiral y Périard, 1991; Acuna y Peña, 1991)
- Hojas (Berthouly y Michaux-Ferrieri, 1996)

Esto demuestra la aptitud de esta especie para la regeneración.

No obstante, depende mucho de la naturaleza y del origen del explante

De manera general, la embriogénesis somática puede lograrse mediante dos vías:

1- ) En una sola fase por cultivo de los explantes en un medio único. En este caso el medio puede contener ya sea una citocinina sola (Dublín, 1981; Yasuda *et. al.*, 1985), ya sea una auxina y una citocinina en asociación (Dublín, 1980.; Pierson *et. al.*, 1983).

2- ) En dos fases por cultivo de explantes en un primer medio de cultivo para iniciar una proliferación de callos, y luego en un segundo para desarrollar células embriónicas en embriones (Sondahl y Sharp, 1977; Dublín, 1984, Berthouly y Michaux-Ferriere 1996).

Sondahl y Sharp (1977) citado por Berthouly, M. (1997), describen dos secuencias de diferenciación morfológica a partir de explantes foliares de *C. arabica* que fueron llamados "High Frequency Somatic Embryogenesis" (HFSE) y "Low Frequency Somatic Embryogenesis" (LFSE).

“LFSE” está caracterizada por la aparición de embriones aislados bien constituidos (1 a 10 por explante) observados después de 13 a 15 semanas en el medio de inducción. En “HFSE”, los embriones se desarrollan a partir de callo Friable, este mismo oriundo de un callo primario. Los embriones aparecen más tardíamente que en el caso de LFSE (16 a 20 semanas). En los cultivos de tipo “HFSE”, la cantidad de embriones varía de 50 a 100 embriones (Sondhal y Sharp, 1977).

Dublín P., (1980, 1984) menciona que el proceso de embriogénesis somática en el género *Coffea* se distribuye acorde a 3 fases:

La fase uno de callogénesis se desarrolla en la oscuridad cuatro semanas en un medio que tiene reguladores de crecimiento de una o dos auxinas (2,4 D, A.I.B) solas o en combinación, y una citocinina BAP, 2ip (Berthonly, M. 1997).

La fase dos de diferenciación se desarrolla a la luz indirecta en medio que contiene una citocinina sola (BAP) o en asociación con una auxina (2, 4 D). Esta fase dura 8 a 10 semanas.

La fase tres de desarrollo de los embriones en un medio que contiene A.I.A y kinetina o solo BAP. Esta fase dura 10 semanas, en este medio los embriones se desarrollan hasta la formación de plántulas de 3 a 4 pares de hojas aptas para la transferencia al invernadero.

Staritsky y Van Haselt (1980) publicaron el primer trabajo sobre embriogénesis somática en medio líquido en *C. canephora* tiene por base la explotación de embriogénesis adventicia. En este método es utilizado el callo logrado en medio semi sólido (6-8 semanas) para iniciar el cultivo en medio líquido los primeros embriones (500-1000) aparecen 8 a 10 semanas después de las transferencias en medio líquido. Las producciones ulteriores de embriones se consiguen por brote de los embriones y por formación de novo a partir de los agregados celulares. Estos autores notan la necesidad de estudiar los aspectos cuantitativos del procedimiento y los problemas de aclimatación de las plántulas *In vitro* (Berthonly, M. 1997).

La embriogénesis somática aparece como una alternativa interesante y más económica para la multiplicación de plantas seleccionadas. Además de constituir un modelo interesante para estudios fundamentales, su aplicación más promisoría es la multiplicación de plantas a gran escala (Ammirato, P.V., 1987).

#### **2.4 Cultivo de tejidos en café.**

El primer trabajo en café fue hecho por Staritsky, (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 embriones a partir de callos de la primera hasta la cuarta generación.

Sharp *et al.*, en 1973 usando el mismo medio de cultivo que Staritsky pero incrementando algunos de los compuestos orgánicos, lograron también establecer cultivo de tejidos de café Crocomo *et al.*, 1975 citado por Mejía, (2004) 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 Staritsky en 1970, pero suplementado con caseína hidrolizada, mientras que para el desarrollo de brotes en unos pocos explantes fueron necesarias las vitaminas de White, kinetina (0.05 mg/l) y sin 2, 4-D.

Diferentes investigadores que han contribuido sobre el cultivo de tejidos de café en diferentes años entre ellos tenemos a: 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 kinetina y 2,4-D y a diferentes concentraciones en su formulación de sales minerales.



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

Dublín, (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.

Girón, I.E., (1998) menciona que Lanaud, usando óvulos de *C. canephora* en investigaciones sobre ginogénesis, obtuvo varios embriones somáticos que probablemente se iniciaron de los tegumentos.

## **2.5. 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) (Dublín, 1993, citado por Mejía, 2004).

Los embriones somáticos formados son: estructuras bipolares con un eje radial apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas completas y normales (Gómez R, 1998). En cambio, la organogénesis produce estructuras unipolares con un polo apical y uno radical, de modo que se genera un tallo o una raíz (Segura, 1994, citado por Jiménez, 1999).

Varios cambios ocurren durante la embriogénesis somática, los cuales reprograman una célula somática a un estado de célula embriogénica (EC). Un posible mecanismo para regular la expresión de los genes es la metilación del DNA, que se ha encontrado, esta correlacionado con la cantidad de auxina exógeno (Merkle *et al.*, 1995).

La Embriogénesis somática puede ocurrir por medio de la llamada ruta directa (baja frecuencia), y por la ruta indirecta (alta frecuencia); en el primer caso, las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos sin que haya una etapa

de callo. Este hecho se podría describir mejor como una formación accidental del embrión, 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*.

Mejía, (2004) menciona que Hernan *et al.*, en 1975 y Soundhal en 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). 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 (Dublín, 1993).

La Embriogénesis somática 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, 1994; citado por Girón, I., 1998).

## 2.5.1 Embriogénesis Somática de Baja Frecuencia y de Alta

### Frecuencia.

Muñoz T., S.Y. (2003) menciona que: los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen si el tejido del explante está formado de CsDPE (Células somáticas determinadas proembriogénicas) ó CsNE (Células somáticas no embriogénicas), términos que fueron planteados por Evans *et al* (1981); Sharp *et al* (1983) y Gómez R., (1998).

Bajo el primer caso "un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante" (Merkle *et al.*, 1995).

Este proceso es llamado comúnmente embriogénesis de baja frecuencia. Los explantes con este tipo de embriogénesis experimentan un mínimo de proliferación antes de formar los embriones somáticos, formándose en explantes en que todas o algunas de las células están predeterminadas como células embriogénicas, por haber retenido alguna de las propiedades de las células meristemáticas parentales de las que derivaron, embriones y semilla (Halperin, 1995).

En el caso de embriogénesis de alta frecuencia, las células no embriogénicas tienen que llevar a cabo varias divisiones mitóticas en la presencia de una auxina durante la inducción al estado de células embriogénicas, formándose los callos. En este proceso la fase de formación de callo se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos (Merkle *et al.*, 1995). Según Halperin (1995), este tipo de embriogénesis es característica de órganos maduros en que las células tienen que pasar por varios ciclos celulares para lograr la embriogénesis a determinadas condiciones.

Los términos embriogénesis baja y alta no indican necesariamente diferencias fundamentales en las células involucradas (Halperin, 1995).

### **2.5.2. Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (ESAF).**

La Embriogénesis de Alta Frecuencia 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 (ver apéndice 1). 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 & Etienne, 1999).

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, 1986. citado por Mejía, 2004).

Los autores antes mencionados, al igual que Zimmerman, (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 estadíos. Los embriones somáticos pueden presentar patrones de segmentación temprana, también pueden presentarse algunas anomalías como son la fasciación y la fusión de cotiledones (Mejía, 2004).

### **2.5.3 Etapas de la Embriogénesis de Alta Frecuencia (ESAF).**

#### **2.5.3.1. Inducción del Callo.**

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 (callo somático no embriogénico). 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 (Dublín, 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 pre condicionadas para los eventos morfogenéticos que llevan a esta Embriogénesis (Mejía, 2004).

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

Evans *et al.*, 1981 citado por Mejía, (2004) planteo 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*.

#### **2.5.3.2 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 (Etienne *et al.*, 1997).

#### **2.5.3.3. Regeneración o desarrollo de los embriones somáticos.**

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Inducción de los embriones somáticos.
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación y conversión en plantas

(Muñoz T., Y., 2003).

#### **2.5.3.4. Inducción de los embriones somáticos.**

La inducción del proceso consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante; siendo reemplazado por un programa de expresión del gen o genes de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante, los cuales pudieran dar lugar a embriones somáticos (Gómez. R., 1998).

Según Parrot *et. al.*, (1993) citado por Gómez. R., (1998). La inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que con

llevan a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente de explante.

El empleo de la auxina es la mejor manera de inducir la formación de células embriogénicas desde células somáticas. La inducción de la división celular como una respuesta a esta auxina puede resultar en un callo con crecimiento desorganizado o bien en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión

#### **2.5.3.5. Desarrollo de los embriones somáticos.**

El estadio temprano o pre globular de los embriones somáticos son fácilmente reconocidos generalmente por el contenido de citoplasma denso y la ausencia general de vacuolización (Krikorian, 1991). Durante esta fase las auxinas son inhibitorias para el desarrollo de los agregados celulares embriogénicos a embriones (Halperin, 1995).

#### **2.5.3.6. Proliferación.**

Uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkle et al., 1995).

El factor más fuerte asociado con la proliferación continua de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo parece ser que el efecto de esta fitohormona no puede ser considerado independiente a la reducción de la concentración de Nitrógeno, existiendo una fuerte evidencia de la interacción entre ambos (Ram et al., 1982, citado por Gómez, R., 1998). Además el nivel de auxina necesario para mantener la embriogénesis repetitiva varía de acuerdo a la especie (Merkle .et al., 1995).

#### **2.5.3.7. Maduración.**

La maduración es el período en el que el embrión somático sufre expansión de sus células, y la acumulación de sustancias de reserva (Bewley y Black, 1985, citado por Gómez, R., 1998). En esta etapa juega un papel fundamental la presencia de

Nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesario el suplemento con nitratos, amonio, aminoácidos y caseína hidrolizada. Los carbohidratos entre ellos la sacarosa en concentraciones de 3-6% son esenciales, junto a bajas concentraciones de Oxígeno en el medio, lo cual permite una maduración total y evita la germinación precoz (Merkle *et al.*, 1995).

## **2.6. Factores que influyen en el cultivo de tejidos vegetales.**

### **2.6.1. Material vegetal o explante.**

“Muchos factores influyen en la conducta del explante en el medio de cultivo (Murashige, 1974). Estos incluyen (1) el órgano que esta sirviendo como la fuente de tejido, (2) la edad fisiológica y ontogénica del órgano, (3) la estación en que el explante es obtenido, (4) el tamaño del explante y (5) las cualidades globales de la planta de la cual se ha obtenido el explante (Thorpe & Patel, 1984, citado por Thorpe *et al.*, 1991).

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

### **2.6.2. Potencial de Hidrógeno (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 según (Esquivel & Escalant, 1994, citado por Mejía, 2004).

### **2.6.3 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.

Intercambio gaseoso: los gases más conocidos son el Oxígeno, Dióxido de Carbono y el etileno.



#### **2.6.4. 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, Mejía (2004) comenta que 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.

El Oxígeno es importante para el metabolismo celular, es el electrón terminal aceptor en una foto fosforilación oxidativa y como un resultado, juega un papel crítico en el metabolismo de las células. 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 en muchos casos esta reducción de energía puede ser relacionada con alteraciones o cambios morfológicos (Payne, 1992).

Requerimientos Biológicos de Oxígeno: la tasa con 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.

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 éste son usados en 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. 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 (Payne, 1992).

### **2.6.5. 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 meristemo la producción de brotes es promovida por la presencia de CO<sub>2</sub>, seguramente por la acción en la fotosíntesis, sin embargo, en callos heterotróficos y cultivos celulares las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> a menudo inhiben la proliferación de brotes, tal como se evidenció en experimentos con *Daucus* y *Catharantes*. Adkins, 1992 citado por Mejía, (2004).

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 CO<sub>2</sub> puede ser desprendido del medio. Si bien el CO<sub>2</sub> es requerido para el cultivo, entonces el desprendimiento excesivo puede tener un efecto adverso (Payne, 1992).

### **2.6.6. Luz.**

En condiciones *In vitro* clásica, la intensidad de la luz es muy baja (10 w/m<sup>2</sup>), en comparación de condiciones naturales, la luz puede representar hasta 900 w/m<sup>2</sup>. 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, citado por Mejía, 2004).

### **2.6.7. 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.

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).

## **2.7. Medios de Cultivo.**

El éxito del cultivo de tejidos de plantas esta muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados, y otros factores ambientales. Es conocido que para un crecimiento adecuado las plantas necesitan tomar del suelo ciertas cantidades importantes de macronutrientes como las sales nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre y micronutrientes como sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. El medio de cultivo contiene estos elementos además de carbohidratos (usualmente sacarosa), para reemplazar el carbono, que la planta normalmente fija de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades, como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento. (Rosell, C & Villalobos V., 1990).

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 ( $\text{NH}_4$ ) y Nitratos ( $\text{NO}_3$ ), 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 macro elementos (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg) y micro elementos (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.; 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 (B<sub>1</sub>), Piridoxina (B<sub>6</sub>), Ácido Nicotínico (B<sub>3</sub>), Ácido Pantoteico complementado con Calcio (B<sub>5</sub>), Cobalamina (B<sub>12</sub>). 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.

Además del medio basal (MS) el medio de cultivo requiere si es necesario dependiendo de la especie en estudio, de otros tipos de sustancias como lo son Vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos, agente solidificante en caso que sea el medio semisólido.

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

### **2.7.1 Medios Líquidos.**

Este puede utilizarse para un cultivo estacionario, se recomienda para tejidos vegetales 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).

### **2.7.2 Vitaminas.**

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas mas empleadas son:

- a-) Tiamina (vitamina B1) se añade como tiamina-HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.
- b-) Acido nicotínico (niacina).
- c-) Piridoxina (vitamina B6): se añade como piridoxina-HCl.
- d-) Mio-inositol: no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.
- e-) Acido pantoténico: ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.
- f-) Acido fólico: disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizada a ácido P-aminobenzoico.
- g-) Riboflavina: es inhibidor de crecimiento de raíces.
- h-) Vitamina E: ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células.

### **2.7.3. Agente solidificante.**

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- a-) Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- b-) El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- c-) El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- d-) No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio (López P., C., 1990).

#### 2.7.4. Reguladores de Crecimiento.

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos: luz, nutrientes, agua y temperatura e internos: hormonas. Una definición global del término hormona es considerar bajo este nombre a cualquier producto químico, de naturaleza orgánica, que sirve de mensajero y que, producido en una parte de la planta, tiene como "blanco" otra parte de ella.

Las citocininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citocinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces.

Los diferentes tipos de citocininas son Zeatina, Kinetina y Benziladenina.

Las mayores concentraciones de citocininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citocininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citocininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles (LA REDBI, 2006).

En cultivos de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos:

a-) **auxinas:** ayudan a la elongación de las células.

**AIB** (ácido indolbutírico). **AIA** (ácido indolacético).

Estos se utilizan en un rango de 0.1 – 10 mg/l

**ANA** (ácido naftalenacético), **2, 4 D** (ácido diclorofenoxiacético).

**PCA** (ácido paraclorofenoxiacético).

Se utilizan en un rango de 0.001 – 10 mg/l.

La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la manera siguiente:

2,4D>ANA>AIB>AIA

b-) **Citocininas:** promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son BA benciladenina, cinetina y zeatina, en concentración de 0.03 – 30 mg/l la BA es la citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y de yemas adventicias.

c-) **Ácido giberélico:** promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.

d-) **Ácido abscísico:** se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la Embriogénesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento (López P., C., 1990).

### 2.7.5. Síntesis y transporte de las Citocininas.

Las citocininas se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas. Transporte en la planta por vía acropétala, desde el ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema.

Funciones:

1. Estimulan la división celular y el crecimiento
2. Inhiben el desarrollo de raíces laterales
3. Rompen la latencia de las yemas axilares
4. Promueven la organogénesis en los callos celulares
5. Retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales
6. Promueven la expansión celular en cotiledones y hojas
7. Promueven el desarrollo de los cloroplastos.

En el mercado se encuentran algunas formulaciones de citocininas, tal es el caso de la Benziladenina.

Las citocininas incrementan el ritmo de crecimiento celular y transforma unas células vegetales en otras (LA REDBI, en línea)

Según Merkle *et al.*, (1995), 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., 1988).

## **2.8. El Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®).**

El sistema RITA® consiste en un biorreactor simplificado desarrollado por el CIRAD (Montpellier, Francia), especialmente diseñado para el cultivo *In vitro*. Este aparato es ajustado a las necesidades del material vegetal, permitiéndole a las células en condiciones de cultivo, una inmersión temporal de algunos minutos por día en el medio nutritivo. El uso de este tipo de reactor evitará los problemas asociados a una inmersión permanente y a la agitación.

El RITA® tiene dos compartimientos, separados por un tamiz que consiste en una espuma de poliuretano. El medio se colocará en el compartimiento inferior y una sobre presión creada en este por una bomba de aire, propulsará el medio al compartimiento superior, que sumergirá el material vegetal (Albarran R., J.G., 1999). Ver funcionamiento del sistema RITA® (ver apéndice 2).

### **2.8.1 Principales ventajas para el cultivo utilizando el sistema RITA®**

- a-) Disminución del costo de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio.
- b-) Permite una mejor nutrición mineral. Un contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene sobre los explantes.



- c-) Fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente.
- d-) Renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión.
- e-) Mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas.
- f-) Control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia y la duración de inmersión.
- g-) Protección de cada recipiente contra la contaminación por los filtros. Manipulación individual fácil. Abolición de los riesgos de contaminación cruzada (VITROPIC, S. A., en línea).

### **2.8.2. Material necesario para el sistema RITA®**

a-) Alimentación de aire: es necesario tener una bomba o un compresor inyectado un litro de aire por minuto y por RITA® con una presión de 0,2 bar. El aire que entra en cada RITA® está esterilizado por los filtros.

b-) Automatización: Se realiza gracias a un reloj que permite la programación por cada minuto, un dispositivo de distribución de aire con una electro válvula tres vías y boquillas (VITROPIC, S. A., en línea).

El proyecto regional de PROMECAFE ha desarrollado investigaciones con el objetivo de mejorar las condiciones de cultivo en inmersión temporal.

Los parámetros estudiados son los siguientes:

\*Frecuencia y duración de las inmersiones.

\*Naturaleza del soporte del cultivo.

\*Condiciones de cultivo para regeneración de embriones somáticos de *Coffea canephora* (padres de la variedad Nemaya)

\*Efecto densidad durante la fase de germinación y incidencia sobre la aclimatación de los embriones somáticos (PROMECAFE, 1997).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Ubicación del área de estudio.**

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, en 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 13° 40' 58.99" Norte, 89°17' 14.96" Oeste y a una altitud de 956 msnm (Mejía, 2004).

#### **3.2 Material experimental.**

##### **3.2.1 Material vegetativo.**

Se utilizaron callos embriogénicos provenientes de fragmentos de hojas de híbridos F1 de café *Coffea arabica*, este material vegetal fue proporcionado por la fundación PROCAFE.

##### **3.2.2 Medio de cultivo líquido utilizado.**

El medio de cultivo líquido utilizado tiene como componente mineral básico el propuesto por Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) (ver apéndice 3).

Se realizaron previamente las soluciones madres de los componentes del medio de cultivo: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, Fe-EDTA, sucrosa, y el regulador de crecimiento BAP.

El diseño del experimento constó de tres tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones respectivamente, se prepararon 2400 ml de medio de cultivo Yasuda, café. Este medio fue dividido en tres partes y fueron rotuladas como: tratamiento (1) al cual no le se agregó regulador de crecimiento, el tratamiento (2) se le agregó 4 mg/l de BAP y al tratamiento (3) se le agregó 6 mg/l de BAP. Al medio de cultivo se le ajustó el pH a 5.6, luego este medio contenido en un Erlenmeyers fueron esterilizados en un autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121°C y una presión de 15 lb/pulg<sup>2</sup>

Los medios de cultivo fueron esterilizados y trasladados al cuarto de transferencia en condiciones asépticas para dispensar 200 ml a cada biorreactor RITA luego, fueron rotulados con el tipo de tratamiento y repetición. Terminado este proceso los biorreactores quedaron disponibles para la siembra del material vegetal.

En las dos etapas de regeneración y germinación el cambio de medio de cultivo líquido se realizó a las seis semanas.

### 3.3 Etapa experimental.

#### 3.3.1. Etapa de regeneración de embriones somáticos

Esta etapa se inició con la regeneración, donde los agregados celulares embriogénicos se transformaron en embriones somáticos pasando por los diferentes estadios de un embrión que son: globular, corazón y torpedo etc. (ver apéndice 4)

Para esta etapa se diseñó trabajar con tres tratamientos cada uno con cuatro repeticiones, cada tratamiento con su respectiva concentración del regulador de crecimiento de BAP (ver tabla 1)

El trabajo se inició con la extracción del callo embriogénico contenido en frascos con medio semisólido. Se utilizó una balanza semi analítica para pesar 100mg de callo y posteriormente inoculados en un biorreactor RITA<sup>®</sup>.

Tabla.1 Composición de los diferentes tratamientos experimentados en los etapas de regeneración y germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*.

TRATAMIENTO (c/u con 4 repeticiones)	MEDIO DE CULTIVO	REGULADOR DE CRECIMIENTO (BAP)	CALLO EMBRIOGÉNICO (inoculado)
Tratamiento 1	Yasuda, café (1985)	0.0 mg/l	100 mg
Tratamiento 2	Yasuda, café (1985)	4.0 mg/l	100 mg
Tratamiento 3	Yasuda, café (1985)	6.0 mg/l	100 mg.

Cada recipiente fue rotulado según el tratamiento, repetición, fecha de inoculación, terminada la siembra los 12 biorreactores fueron trasladados al cuarto de crecimiento donde se colocaron al azar en un estante a un mismo nivel (ver apéndice 5).

Las condiciones que se mantuvieron en el cuarto de crecimiento para las dos etapas fueron: temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , una humedad relativa de  $85-90 \pm 3\%$  y un fotoperiodo de 12 horas diarias de luz ( $50 \mu\text{E. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

El sistema RITA® fue programado a un tiempo y frecuencia de inmersión temporal de 4 veces al día con una duración de 1 minuto por inmersión ( $4\text{v} \times 1'$ ) sobre los agregados celulares.

El cambio de medio se realizó a las seis semanas en las dos etapas de la siguiente manera: se utilizaron biorreactores conteniendo medio de cultivo nuevo previamente esterilizado, se extrajo el material vegetal del biorreactor con los nutrientes agotados y se colocaron en el biorreactor con el medio nuevo (apéndice 6).

Finalmente se sellaron con plastic wrap, se rotularon con la misma información y posteriormente fueron trasladados al cuarto de crecimiento colocados en la misma posición.

El conteo directo en cada biorreactor se realizó al final de las 14 semanas tiempo estimado para esta etapa, verificando el número de embriones que se habían regenerado.

La toma de datos para la regeneración de embriones se realizó en el tiempo estimado con la ayuda de una hoja de toma de datos (ver apéndice 7).

### **3.3.2 Etapa de germinación de embriones somáticos.**

La germinación de los embriones se caracteriza por el desarrollo de al menos un par de hojas cotiledonales.

La etapa de germinación es la continuación de la etapa de regeneración, en esta etapa se mantuvieron las mismas condiciones de crecimiento al igual que la regeneración con respecto al medio de cultivo, los tratamientos con el respectivo

aporte del regulador de crecimiento, los cambios de medios se realizaron a las seis semanas, las condiciones del cuarto de crecimiento fueron las mismas así como la frecuencia y el tiempo de inmersión del sistema RITA<sup>®</sup>.

La etapa de germinación se mantuvo durante un tiempo de ocho semanas, se realizó un conteo directo por cada biorreactor al final de las ocho semanas para verificar el número de embriones germinados.

La toma de datos para la germinación de embriones se realizó en el tiempo estimado con la ayuda de una hoja de toma de datos (ver anexo 8).

### **3.4 Análisis estadístico.**

#### **3.4.1. Diseño experimental.**

Se usó un diseño completamente al azar. Modelo que describe la información obtenida de la variable en estudio (Steel, R.G & Torrie, J.H, 1985).

Modelo matemático:  $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta observada en cada RITA<sup>®</sup>

$\mu$  = Media de número de embriones en cada etapa.

$T_i$  = Efecto de los tratamientos.

$E_{ij}$  = Error experimental de todos los tratamientos en cada etapa.

#### **3.4.2 Análisis de datos.**

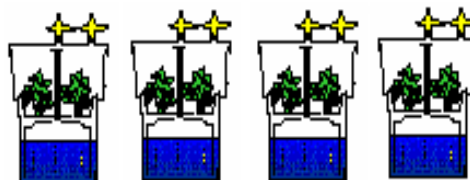
Se realizó un análisis de varianza, seguido de una prueba de post-varianza de "Tukey", para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0.05$ ). Se utilizó el paquete de diseño experimental "FAUANL" versión 1.4 creado por la facultad de agronomía de la Universidad de Nuevo León, (FAUANL) (Olivares, 1989).

La producción de embriones regenerados y germinados obtenidos se presenta además en gráficos para su mayor interpretación.

Los tratamientos evaluados son las diferentes concentraciones de Benzil Amino Purina (BAP) donde cada tratamiento posee cuatro repeticiones:

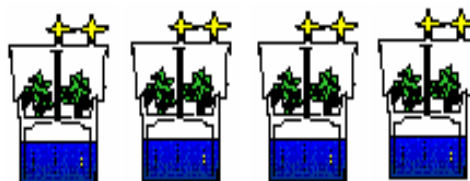
### Tratamiento 1 (T1)

Yasuda, (café) + **0.0 mg/l de BAP** + 100mg de agregados celulares.



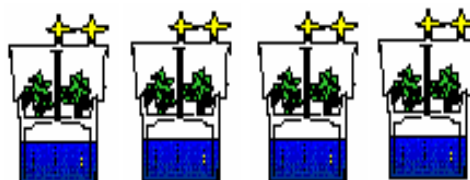
### Tratamiento 2 (T2)

Yasuda, (café)+ **4 mg/l de BAP** + 100mg de agregados celulares.



### Tratamiento 3 (T3)

Yasuda, (café) + **6 mg/l de BAP** + 100mg de agregados celulares



### Variable respuesta evaluada.

El número de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica* regenerados y germinados en los diferentes tratamientos.

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 4.1 Efecto del BAP sobre el proceso de regeneración de embriones somáticos de *C. arabica*.

En la presente investigación se evaluaron tres diferentes tratamientos con su respectiva concentración del regulador de crecimiento Benzil Amino Purina (BAP):

En cada tratamiento se obtuvo una respuesta diferente como lo demuestra el análisis estadístico. Existe una diferencia significativa según la prueba de varianza y post varianza motivo por el que se rechaza la hipótesis nula, la cual estima que: "Las concentraciones utilizadas de Benzil Amino Purina (BAP) no intervienen en la regeneración y germinación de embriones somáticos de híbridos de *C. arabica*." (Ver tabla 2).

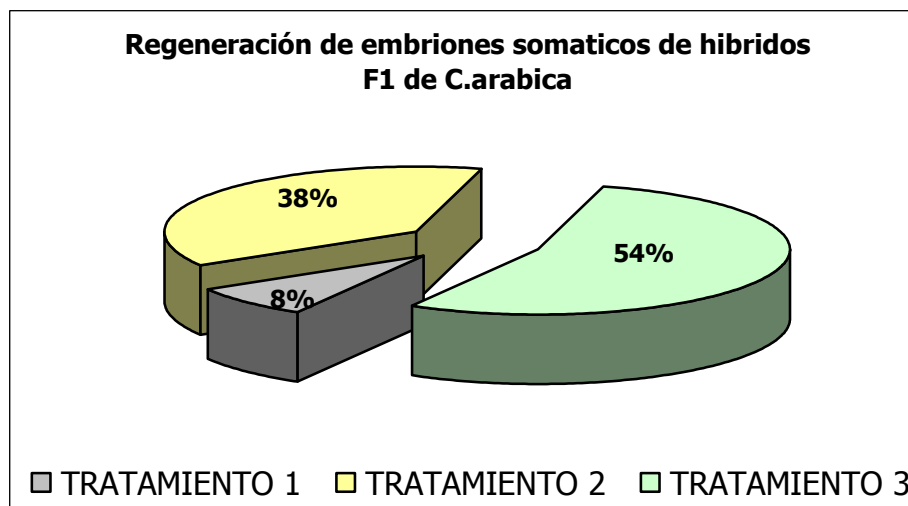
Tabla 2. Número promedio de embriones somáticos de híbridos F1 café *C. arabica* regenerados, al final de 14 semanas en los diferentes tratamientos  $P \leq 0.05$  (Tukey).

Tratamientos	Número promedio de embriones somáticos	
Tratamiento 3	10,665	A
Tratamiento 2	7,3875	B
Tratamiento 1	1,605	C

Al final de 14 semanas de regeneración la mayor producción de embriones se origino en el tratamiento (T3) con un 54% siendo el mejor; en el tratamiento (T2) presento un 38% y el tratamiento (T1) que presentó una producción baja de un 8% (ver grafico 1).

En esta investigación, en las primeras cuatro semanas no se observó ninguna forma de regeneración, las primeras manifestaciones ocurrieron en la 5ª semana, pero sólo en el (T2) y (T3) el (T1) reaccionó hasta la 9ª semana de tratamiento.

En cuanto al número de embriones en la etapa de regeneración, el efecto de los tratamientos quedaron en orden descendente así: T3>T2>T1.



Tratamiento 1: 0.0 mg/l BAP    Tratamiento 2: 4.0 mg/l BAP    Tratamiento 3: 6.0 mg/l BAP

Grafico N° 1. Porcentaje de embriones somáticos de café *Coffea arabica* regenerados en tres tratamientos después de 14 semanas

#### **4.2. Efecto del BAP sobre el proceso de germinación de embriones somáticos de *C. arabica*.**

En esta etapa se da una diferencia significativa según el análisis estadístico, por lo que rechazamos la hipótesis nula en esta etapa (ver tabla 3).

Para la etapa de germinación la mayor producción de embriones se generó en el Tratamiento (T3) con una media de 4.67 lo que representa un 52% seguido del tratamiento (T2) con una media de 2.88 lo que representa un 48% y el tratamiento (T1) con una media de cero (ver grafico 2).

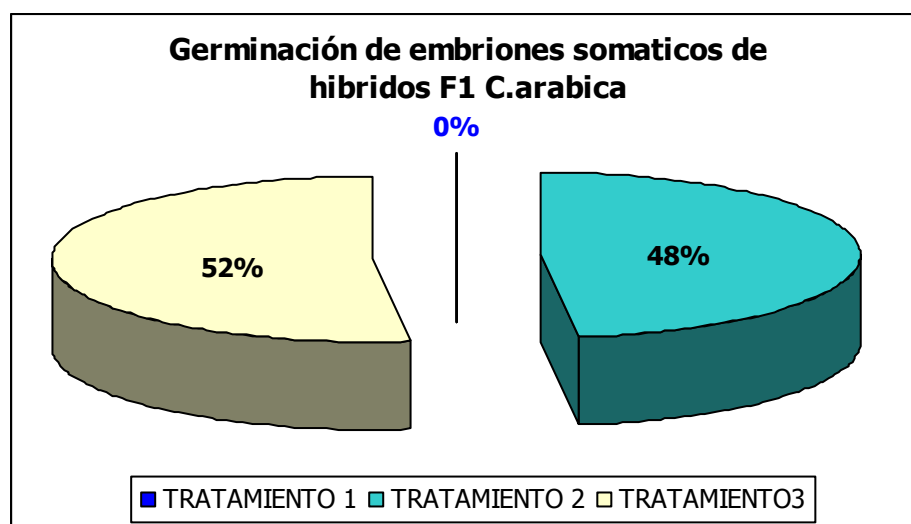
En cuanto al proceso de germinación de los embriones se pudo evidenciar hasta la 8ª semana, pero solamente en los (T2) y (T3). En el (T1) no hubo reacción y estos agregados celulares se oxidaron y posteriormente murieron.



Tabla 3. Número promedio de embriones somáticos de *C. arabica* obtenidos al final de ocho semanas en los diferentes tratamientos de la etapa de germinación  $P \leq 0.05$  (tukey).

Tratamientos	Número promedio de embriones somáticos	
Tratamiento 3	4,67	A
Tratamiento 2	2,88	B
Tratamiento 1	0	C

En cuanto al número de embriones en la etapa de germinación el efecto de los tratamientos quedaron en orden descendente así:  $T3 > T2 > T1$ .



Tratamiento 1: 0.0 mg/l BAP    Tratamiento 2: 4.0 mg/l BAP    Tratamiento 3: 6.0 mg/l BAP.

Grafico Nº 2. Porcentaje de embriones somáticos de *Coffea arabica* germinados en tres tratamientos después de ocho semanas.

### 4.3. Producción de embriones somáticos regenerados de *C. arabica* obtenidos al final de la etapa experimental.

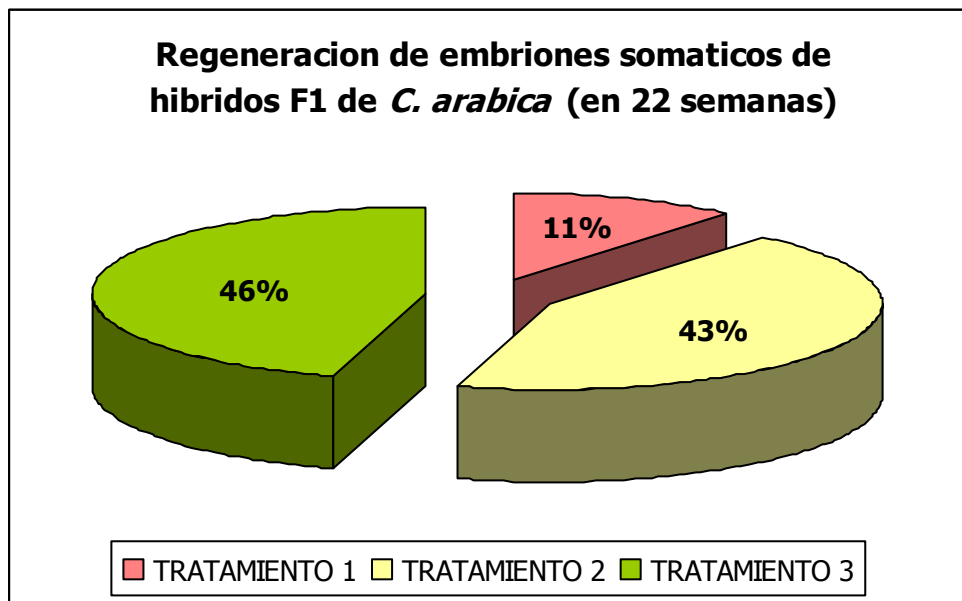
Al final de la etapa de germinación se decidió tomar nota de la producción de embriones que existían en proceso de regeneración la cual presentaban un buen número de embriones (ver grafico 3).

Este conteo se realizó a las 22 semanas. Este conteo no se estimó como variable a evaluar pero se considera importante conocer la cantidad de embriones que se siguió regenerando, y se pudieron observar embriones o paquetes de embriones secundarios que iniciaban la regeneración. Los datos obtenidos en cuanto a la media de producción determinó que el mejor tratamiento es el (T3) con una concentración de 6 mg/l de BAP, seguido por el Tratamiento (2) con 4 mg/l BAP y en tercer lugar el tratamiento (1) el cual no tenía regulador de crecimiento (ver tabla 4).

Tabla 4. Número promedio de embriones somáticos de *C. arabica* obtenidos al final de 22 semanas en los diferentes tratamientos de la etapa de regeneración  $P \leq 0.05$  (Tukey).

<b>tratamientos</b>	<b>Número promedio de embriones somáticos.</b>	
Tratamiento 3	19.11	A
Tratamiento 2	10.63	B
Tratamiento 1	1.71	C

En cuanto al número de embriones en la etapa de regeneración (22 semanas) el efecto de los tratamientos quedaron en orden descendente así: T3>T2>T1.



Tratamiento 1: 0.0 mg/l BAP    Tratamiento 2: 4.0 mg/l BAP    Tratamiento 3: 6.0 mg/l BAP.

Grafico N° 3. Porcentaje de embriones somáticos de café *Coffea arabica* regenerados en tres tratamientos después de 22 semanas

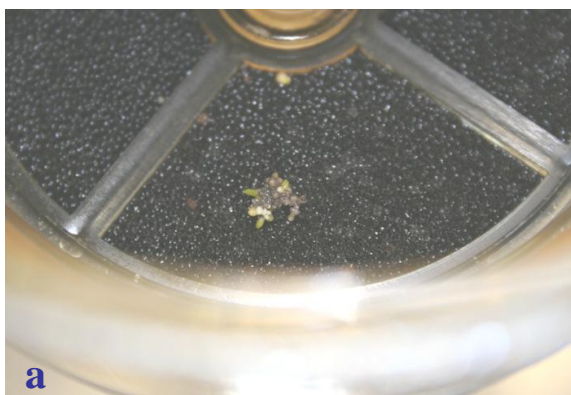
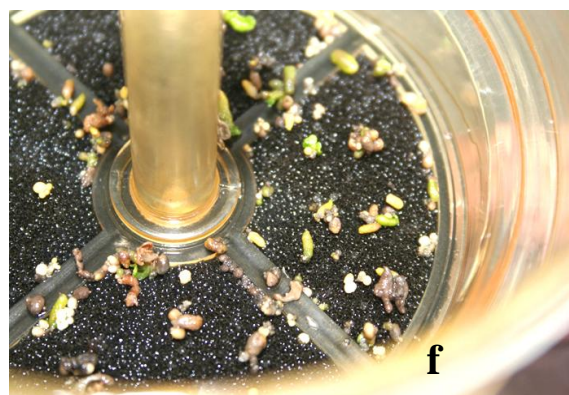
**TRATAMIENTO (1)****TRATAMIENTO (2)****TRATAMIENTO (3).**

Figura 1. Aspecto morfológico de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica* regenerados y germinados en los diferentes tratamientos. (a,b) se observa regeneración en el tratamiento (1) con 0.0 mg/l BAP, nótese la poca regeneración.; (c,d) nótese una abundante regeneración en el tratamiento (2) con 4 mg/l BAP; (e,f) se observa regeneración y germinación en los embriones del tratamiento (3) con 6 mg/l de BAP.

## 5. DISCUSIÓN.

La embriogénesis somática aparece como una alternativa interesante y más económica para la multiplicación de plantas seleccionadas, además de constituir un modelo interesante para estudios fundamentales, su aplicación más promisoría es la multiplicación de plantas a gran escala (Ammirato, P.V., 1987).

La regeneración de plantas por la vía de embriogénesis somática permite obtener volúmenes de producción superiores en tiempo y a un costo más bajo, lo cual convierte a este sistema en una vía de regeneración potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Thorpe, 1999).

La Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (ESAF) está caracterizada por la aparición de embriones aislados bien constituidos (1 a 10 por explante) observados después de 13 a 15 semanas en el medio de inducción (Sondhal y Sharp, 1977).

En esta investigación se utilizó callo embriogénico a diferencia de Albarrán R., J.G. (1999), que en su investigación utilizó agregados celulares embriogénicos procedentes de una suspensión celular, esta técnica le permitió multiplicar el material embriogénico obteniendo células individuales las cuales utilizó para la siembra en los biorreactores.

En esta investigación utilizar callo embriogénico no fue inconveniente para poder regenerar y germinar embriones somáticos ya que éste es capaz de poder regenerar embriones sin pasar por la fase de suspensión celular pero cabe mencionar que se pueden dar algunos problemas utilizando callo embriogénico y no agregados celulares como lo es: que el callo no sea friable y se oxide posteriormente; que el callo no sea embriogénico por lo tanto no será viable para poder continuar con el proceso de regeneración.

Otro inconveniente de utilizar callo embriogénico, es la asincronización en el desarrollo de los estadios de los embriones, las células que se encuentran en el entorno del callo tienden a iniciar antes el proceso de regeneración debido a la superficie de contacto que tienen con el medio de cultivo, motivo por el cual las

células que se encuentran en su interior necesitan más tiempo para poder disgregarse e iniciar la regeneración.

Una de las ventajas que proporciona el uso de biorreactores es el efecto de disgregación que sucede en el callo durante las inmersiones del medio este efecto proporciona a los agregados celulares embriogénicos una mayor superficie de contacto con el medio de cultivo lo que permite una mejor captación de los nutrientes.

### **5.1 Medio de cultivo.**

Albarrán R., J.G. (1999) realizó la comparación de la eficiencia de la composición básica de varios medios de cultivo para regeneración utilizando: el medio T4 (Berthouly, 1995, café); medio Yasuda (Yasuda, 1985, café) y los medios M3 y M4 (Cote et al., 1996, banano). Concluyó que el más eficiente de todos resultó el de Yasuda, café (1985) que permitió una producción de biomasa más orientada a la producción de embriones somáticos y un bajo crecimiento de callo.

En esta investigación se tomó de referencia el medio de Yasuda, café, (1985) por las características que presenta para el desarrollo de la etapa de regeneración y por los resultados obtenidos por Albarrán R. *et. al.*, (2005).

### **5.2 Regeneración y Germinación de embriones somáticos de Híbridos F1 de *C. arabica*.**

Muñoz T., S.Y. (2003) menciona que los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática dependen, si el tejido del explante está formado de CsDPE (Células somáticas determinadas proembriogénicas) ó CsNE (Células somáticas no embriogénicas), términos que fueron planteados por Evans *et al* (1981); Sharp *et al* (1983) y Gómez R., (1998).

En esta investigación se utilizaron callos embriogénicos provenientes de un tejido formado por células somáticas determinadas como proembriogénicas, esto se puede comprobar ya que el material utilizado reacciono en las dos etapas evaluadas.

La Embriogénesis de Alta Frecuencia 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, una vez que se logra obtener el embrión somático éste se diferencia y 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 & Etienne, 1999).

Utilizando callo embriogénico en esta investigación se logro regenerar los embriones somáticos pasando por los estadios que son globular, corazón y torpedo como lo describe Ammirato, P.V., (1987) hasta llegar a la etapa de germinación donde se logró observar el surgimiento de las hojas cotiledonales el tratamiento (3) fue el que mejor resultados proporcionó en cuanto al número de embriones regenerados y germinados.

En la presente investigación, los diferentes tratamientos evaluados en la etapa de regeneración respondieron en un tiempo de 14 semanas, en los tratamientos (2) y (3) la fase de expresión en los embriones se dio a las cinco semanas.

En esta investigación se observó en la regeneración de embriones que los primeros embriones dan origen a una segunda generación de embriones en forma de paquetes que emergen de los primeros embriones regenerados por lo que se comprueba según lo descrito por Ammirato, P.V., (1987).

Según Dublín, (1993) 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.

En esta investigación se observó una baja producción de masa de callo en los tres tratamientos experimentados. La producción de embriones obtenidos en los tratamientos (T1) fue del 8%, tratamientos (T2) de 38% en (T3) de 54% en la etapa de regeneración se orientó a obtener una producción de embriones somáticos germinados.

Según Albarrán R., J.G. (1999) las citocininas exógenas estimulan la regeneración, en su estudio utilizó el medio Yasuda, café (1985) con concentraciones de BAP de 0.0mg/l, 0.5mg/l, 1.1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l y 8 mg/l. El medio de cultivo en presencia de 4 y 6 mg/l de BAP observó una mejor organización y formación de epidermis, comparándola con las otras concentraciones, además le produjo la mayor producción de embriones torpedo con la menor formación de callo.

Albarrán R., J.G. (1999) concluyó que el aporte de BAP brinda un efecto positivo sobre la producción de embriones somáticos, pero que a la vez el aporte hormonal juega un papel secundario.

Se comprueba que el tratamiento (T1) presento una regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica* pero la cantidad de embriones es mínimo y el tiempo de desarrollo de los embriones es lento.

Por lo antes mencionado se demuestra que es necesario el aporte hormonal de BAP para poder acortar el tiempo de regeneración y elevar la producción de embriones en la etapa de regeneración y su posterior germinación.

Albarrán R., J.G. (1999) realizó un estudio donde observó a través de un análisis histológico el estado morfológico de los embriones provenientes de diferentes concentraciones de BAP, y la mejores resultados morfológicos que se obtuvieron provenían de una concentración de 6mg/l.

En esta investigación no se realizó análisis histológicos, pero se pudo observar una buena apariencia del estado morfológico de los embriones provenientes de una concentración de 6 mg/l, los embriones provenientes de una concentración de 4 mg/l



también presentaban una apariencia morfológica aceptable en las dos etapas de la investigación.

Mejía, (2004) menciona que Hernan *et. al.*, (1975). & Soundhal, (1977), obtuvieron embriones somáticos que aparecieron a los 3 meses de haber iniciado el proceso de diferenciación, el material que posee características como la apariencia del tejido que tiende envejecer, pero luego emergen embriones de éste.

En este trabajo se pudo evidenciar la apariencia del tejido envejecido en algunas repeticiones de los tres tratamientos pero de este tejido emergieron embriones en estado globular por lo que se observó que el tejido del callo no murió internamente solamente que tuvo el inconveniente de no poder fragmentarse.

Albarrán R., J.G. (1999) dispuso para la etapa de regeneración de catorce semanas y ocho semanas para la germinación.

En el segundo informe anual en el proyecto regional de mejoramiento genético del café PROMECAFE, presenta las etapas del proceso de embriogénesis somática donde estiman para la etapa de regeneración de 4 a 5 meses PROMECAFE, (1997).

Albarran R., J. G. (1999) propone en su investigación que la expresión de los embriones en proceso de regeneración se logra a las 6 semanas de iniciado el proceso de regeneración y las siguientes ocho semanas sirven para que los embriones se desarrollen; en total propone que para la etapa de regeneración son 14 semanas para esta etapa.

En la presente investigación se determinó que 14 semanas para la regeneración y ocho para la germinación son tiempos considerados para poder obtener una reacción por parte del material experimentado que en esta ocasión trato de Híbridos F1 de *C. arabica* y utilizando 6 mg/l de BAP para la etapa de regeneración y germinación el cual fue la mejor concentración que produjo mayor número de embriones regenerados y germinados.

## 6. CONCLUSIONES

Al finalizar esta investigación se concluye que:

- 1) El tratamiento (3) con una concentración de 6 mg/l de BAP fue la mejor para obtener el mayor número de embriones somáticos regenerados de híbridos F1 de café, *C. arabica*.
- 2) El tratamiento (3) con una concentración de 6 mg/l de BAP fue la mejor para obtener el mayor número de embriones somáticos germinados de híbridos F1 de café, *C. arabica*.
- 3) El aporte de BAP como regulador de crecimiento es necesario para poder obtener un buen número de embriones regenerados y germinados de híbridos F1 de café, *C. arabica*.

## **1. RECOMENDACIONES.**

- 1) Impulsar la embriogénesis somática de alta frecuencia como una alternativa para multiplicar materiales vegetales mejorados de café (*Coffea arabica*).
- 2) Retomar ensayos de embriogénesis somática de callos de *C. arabica* y de suspensiones celulares para evaluar mayor número de tratamiento hasta llegar a evaluar las plántulas en vivero y posteriormente en campo.
- 3) Investigar los procesos fisiológicos de los embriones somáticos en las etapas de regeneración y germinación para optimizar algunos en las etapas de embriogénesis somática de alta frecuencia.

## 2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Acuña J.R., De Peña M., 1991. plant regeneration from o embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra, plant Cell Reports, 10: 345-348 pp.
2. 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.
3. Albarran, J.; Bertrand, B.; Lartaud, M. & Etienne, H. 2004 Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffe (*Coffea arabica*) somatic embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult (2005) 81: 27-36 pp.
4. Ascanio E.C.E., Arcia M.M.A., 1987. Haploids from anther culture in *Coffea arabica* L. In: Internacional Congress de plant Tissue Culture, Tropical Species; (Bogota, 21-25 Sept.) Abstract p. 68 pp.
5. Adkins, S. W. 1992. Cereal Callus Cultures. Control of Headspace Gases cans Optimize The Conditions of Callus Proliferation. Aust. J. But. 40: 434-449 pp.
6. Ammirato, P.V., 1987. organized events during somatic embryogenesis. In plant Biology Plant Tissue and Cell Culture, C.E. Green, D.A. Somers, W:P. Hackett, D.D. biesboer, ed. New York, Alan R. Liss, Inc., 3: 57-81 pp
7. Barceló, J. Coll. 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Omega, España, 662 pp.
8. 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 pp

9. Berthouly M. Y Michaux-Ferriere, 1996. High frequency somatic embryogenesis y *Coffea canephora*: Induction conditions and histological evolution. *Plant cell, Tissue and organ culture* 44: 169-176 pp
10. Berthonly, M. 1997, biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*, trabajo presentado como conferencia magistral en el XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, San José, Costa Rica, septiembre 16 al 18 de 1997. p. 25-47.
11. Berthouly, M.; H Etienne., 1999. Somatic Embriogenesis in *Coffea*. in: *Somatic Embriogénesis in Woody Plants*.
12. Carlier Smith y Marzocca, A. 1981. Manual de Preparaciones de cafés fríos & calientes, curso teórico y práctico (en línea), Costa Rica, consultado 4/12/2007, disponible en: [www.icafe.go.cr/icafe/downloads/ManualPrepacafe.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/downloads/ManualPrepacafe.pdf)
13. Castro F., J. 1982. La roya del cafeto. INIA–SARH. Méx. Folleto misceláneo 43 pp
14. Charrier, A.; Berthaud, J. 1985. Botanical classification of Coffee. In Clifford, M.N.; Willson, K. Eds. *Coffee: Botany biochemistry and beverage*. Biddles Ltd, Guildford and King 's Lynn, England. pp 13-47.
15. Consejo Salvadoreño del Café 2005, (en línea). El Salvador, consultado 11-12-2007. Disponible:[www.salvadorancoffees.com/cafe/sp/fmain01.htm](http://www.salvadorancoffees.com/cafe/sp/fmain01.htm)
16. Crocomo O. & J.F.J.P. Carvalho; P.C.T. Carvalho; W.R. Sharp; G. Bandil. 1975. Controle Hormonal da Diferenciacao di Tecido de Café Cultivado *in vitro*. 26<sup>th</sup>. Congr. Nac. Botánica, Río de Janeiro, Brasil.
17. Custers J., 1980. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: *9eme Colloque Scientifique international sur le café* (Londres, 16-20 juin), ASIC, Paris, 589-596.
18. Dixon R. A., 1987. *Plant Cell Culture: a Practical Approach*. Lrl-Press. Oxford, England. 236pp.

19. Dublin P., 1980. Multiplication vegetative *In vitro* de l'arabusta. *Café Cacao Thé*, 24, (4) : 281-289 pp.
20. \_\_\_\_\_ 1984 Techniques de reproduction vegetative *In vitro* et amelioration genetique Chez les cafeiers cultivés. *Café cacao The*, 28 (4) : 231-244
21. \_\_\_\_\_ 1993. Multiplicación Vegetativa de Café, Hevea y Cacao. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT. Cali. Colombia. pp. 577-61.
22. Engelman F., 1990. Utilisation D'atmospheres a Teneur en Oxigene Reduite pour la Conservation de Cultivars D'embryos Somatiques de Palmeira a Huile (Fleis guinensis Jacq.). *C.R. Acad. Sci. Paris*. 310, Serie III, pp. 679-684.
23. Etienne H. & B. Bertrand; F Anthony; F. Côte; M. Brethily. 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.
24. 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.
25. Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flink. 1981. Growth and behavior of Cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A., Ed.. *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture*. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. 45-113.
26. 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.

27. 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.
28. Gómez, R. 1998. Generalidades sobre la embriogénesis somática. Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva in Vitro de especies vegetales instituto biotecnología de las plantas. Santa clara – Cuba. 134pp.
29. Gresshoff, P.M. & Doy, C.H. 1972. Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta*, 107: 161-170.
30. Halperin, W. 1995. *In vitro* embriogénesis: some historical issues and unresolved problems. In: *In vitro* Embriogénesis in plants. (Ed.) Thorpe TA. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands. pp1-16.
31. Herman B., Hass G.J., 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10 (6): 588-589.
32. Jiménez C., 1999. Papayo (*Carica papaya* Linnaeus) Cultivar PT-101-B. Tesis. Inducción de Embriogénesis Somática en Universidad Nacional Agraria La Molina, 82 p.
33. 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.
34. Kuan, C. J. & I. C. Ospina. 1990. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos. Instituto Nac. de Aprendizaje. San José, Costa Rica, 86 pp.
35. LA REDBI, 2006. Las hormonas vegetales (en línea). Barcelona, España. consultado 22-02-2006. Disponible: <http://www.biología-en-internet.com>.

36. Lismaier, M. & F. Skoog. 1965. Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue 2º informe anual, proyecto regional de mejoramiento genético de café, 1997).
37. López P., C., 1990. Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT) Roma, Italia, pp 15-20.
38. Mejía Villacorta, A.M. 2004. Evaluación de tasas de siembra de callos embriogénicos de café "*Coffea arabica*" utilizando tres tamaños de recipiente para desarrollar suspensiones celulares. Tesis de licenciatura en Biología, Universidad de El Salvador. 94pp.
39. Merino, M. E. 1994. Medio de Cultivo. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México, Cap. V: pp 67-85.
40. Merkle, S. Parrot W. y Flinn B., (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis in plant, pp 155-203.
41. Monnier, M. 1974. Culture of Zygotic Embryos. Frontiers of Plant Tissue Culture. Department of Biology, Calgary University, Canada, pp 277-286.
42. Montes, S.; Martínez, M.; Rojas, R.; Santana, N.; Cuba, M. 1995. Obtención de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Coffea canephora* variedad robusta. Cultivos tropicales. 16(3): 77-81
43. Muñoz T., S.Y., 2003, Embriogénesis somática en cedro (*Cedrela odorata Linnaeus*) a partir de cotiledones. Tesis para optar el grado de Lic. en Biología, Universidad Agraria La Molina, Lima-Perú. 116 pp.
43. Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol Plant*, 15: pp 473-479.
44. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ana. rev. plant physiol.* 25: 135-166.



45. Ospina- Machado. J.E. & Aldana A, H. M. 1995. Producción Agrícola, Editorial Terranova, Bogotá, Colombia, (2): 552 pp
46. Olivares S., E., 1989. Paquete de Diseño experimental FAUANL. Versión 1.4 creado por la facultad de agronomía de la Universidad de Nuevo León, (FAUANL), Nuevo León, México.
47. Parrott, W.A.; Dryden, G.; Vogt, S.; Hildebrand, D.f.; Collins, G.B.; Williams, E.G. 1988. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell. Dev. Biolo.* 24: 817-820 pp
48. Payne, 1992. Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, Printed in Germany by Passovia Druckerei Passau. 346 pp.
49. Pierson, E.S; Lammeren, A.. A .M; Schel, J.H.N; Staritski, G. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea Canephora*. 115:208-216 pp.
50. PROCAFÉ, 2007. Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (en línea) Santa Tecla, San Salvador consultado 4/12/2007 disponible en: <http://www.procafe.com.sv>.
51. PROMECAFE, 1997 (programa cooperativo regional para el desarrollo tecnológico y modernización de la caficultura en México, Centro América, Republica Dominicana y Jamaica, 1997). Segundo informe anual, proyecto regional de mejoramiento genético de café.
52. Rosell, C & Villalobos V., 1990. Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT) Roma, Italia. 61-112 pp.
51. Sharp W.r., Caldas L.S., Crocomo O.J., Monaco L.C., Carvalho A., 1973. Production of coffea arabica callus of three polidy levels and subsequent morphogenesis. *Phynton*, 31 (2): 67-74.

53. Sondahl, M.R.; Sharp, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explant of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzphysiol. Bd. 81: 395-408.
54. Staritsky, G. 1970. Embryoid Formation in Callus Tissues of *Coffea*. Acta Bot. Neerl. 19 (4): 509-514.
55. Staritsky, G.; van Hasselt, A.M. 1980. The Synchronised mass propagation of *Coffea canephora* in vitro. In 9<sup>a</sup> coloquio científico internacional N<sup>o</sup>. 8. Wallengland. GBR. Pp. 401-420.
56. Steel, R.G & Torrie, J.H, 1985. Bioestadística: principios y procedimientos, Mc Graw Hill, Latinoamericana S. A de C. V, 2<sup>o</sup> edición, Bogota, Colombia. 622pp.
57. Thorpe, T.A. 1980. Organogenesis *In vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. International review of cytology, supplement 11A: 71-111.
58. Thorpe, T.; Harry, I. S. & Kumar P. P. 1991. Application of micropropagation to forestry. , In: Micropropagation: Technology and Application. Debergh, P. C. & Zimmerman R.H. (eds). Kluwer Academic Publisher. Netherlands. P 311-336
59. Tran Thanh Van, M. 1980. Control of Morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. Int. Rev. cytol. Suppl. 11A: 175 – 194.
60. Van der Vossen, H.A.M. 1985. Coffee selection and breeding. In Clifford, M.N.; Willson, K. Eds. Coffee: Botany, biochemistry and beverage. Biddles Ltd, Guilford and King's Lynn, England. pp. 48-96
61. VITROPIC S.A, The French vitroplant specialist. (RITA: the culture systems services),(en linea). Saint-Mathieu-de treviers, France. Consultado 18 de Enero 2006. Disponible en <http://www.vitropic.fr/>

62. Villalobos V., 1990. Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO (organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT) Roma, Italia. 29-31 pp.
63. Villalobos V. & Thorpe T. (1991). Micropropagacion: conceptos, metodología y resultados. En: roca WM y Mroginski LA (Eds.) Cultivo de tejidos en la Agricultura, pp 127-141. CIAT. Cali.
64. Winton, L. L. and S.A. Verhagen. 1977. Shoot from Douglas- fir cultures. *Can.J.Bot.*55: 1246- 1250 pp.
65. Yasuda, T.; Fujii, Y.; Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597 pp
66. Zamarripa, A., 1994. Optimización de la Embriogénesis somática de café Arabusta (*Coffea canephora p. x Coffea arabica L.*) a partir de una suspensión celular. *Agric. Tec.: Méx.* 20: 27-41 pp
67. Zimmerman, J. L ,1993. Somatic Embryogenesis: amodel for early development in higher plants. *The plant cell.*: 1411-1423 pp.

# APÉNDICES.

## Apéndice 1.

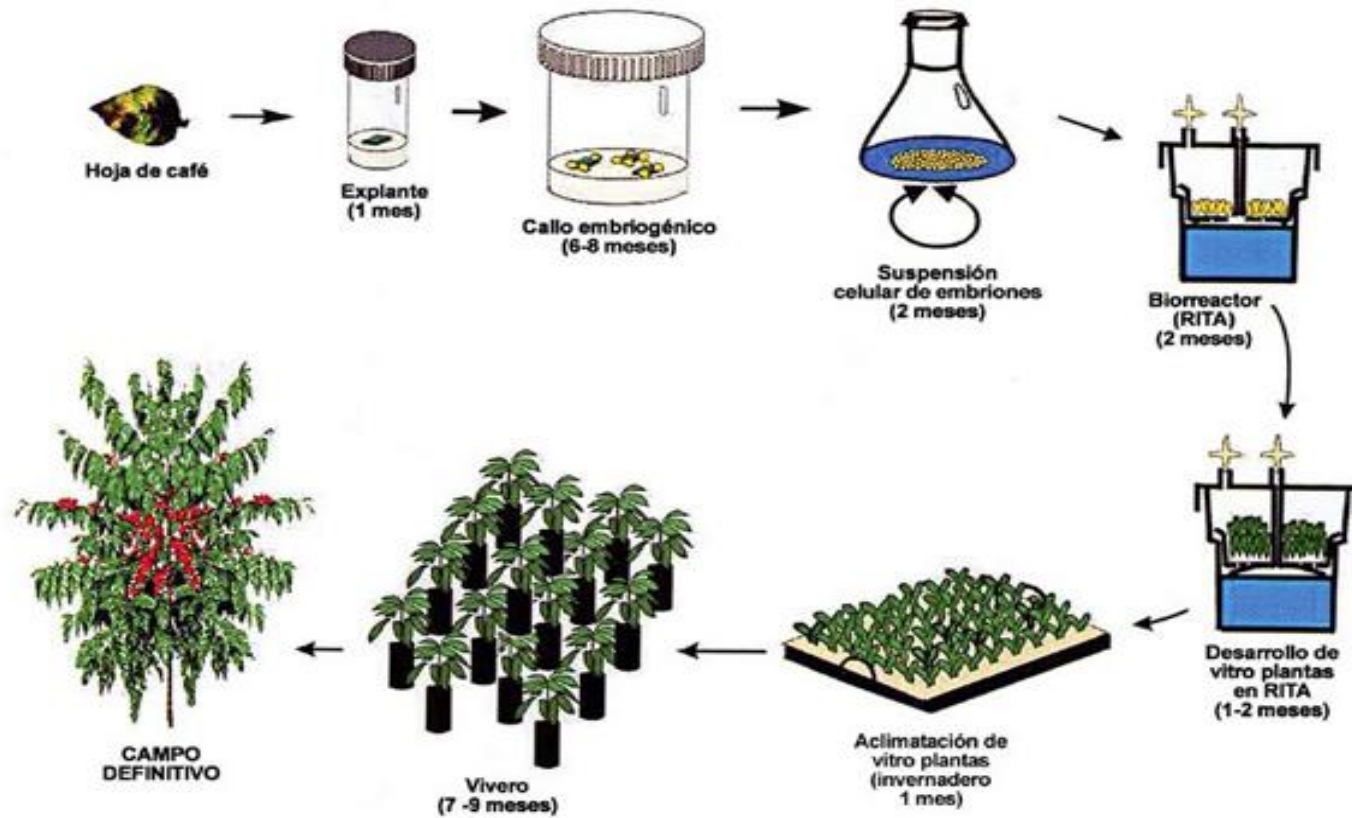
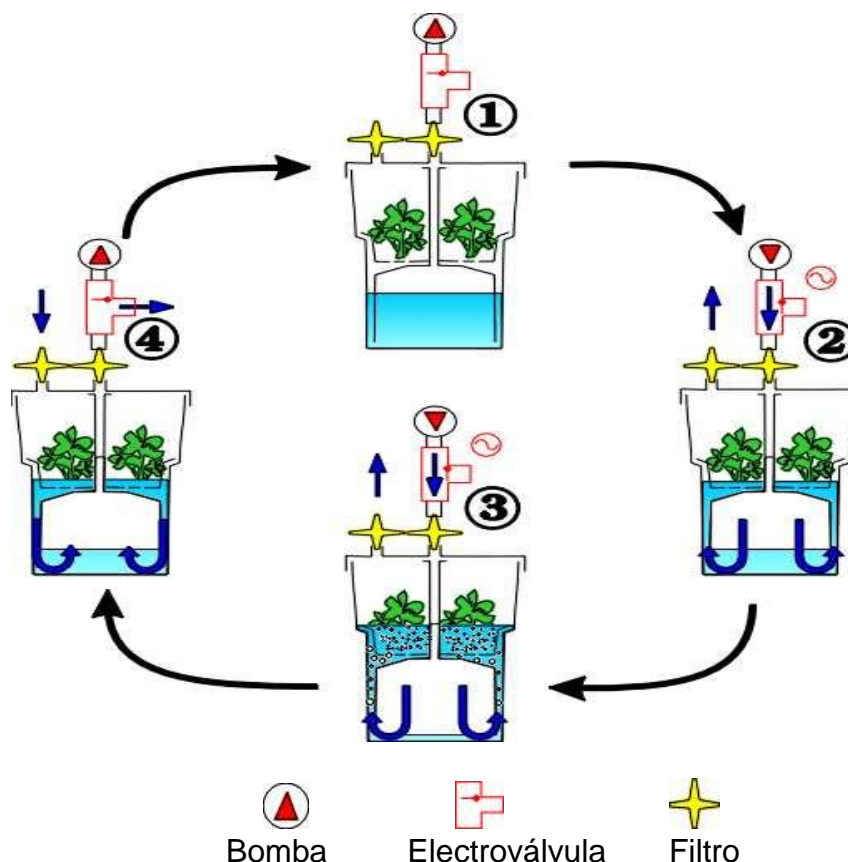


Figura. 2 Esquema de la Embriogénesis somática de alta frecuencia de embriones somáticos de *Coffea arabica* (fuente: Albarran, R., J.R., 1999)

## Apéndice 2.



**Figura 3 Funcionamiento del Sistema Automatizado de Inmersión Temporal (RITA®)**

■ **Fase emergida.** Esta fase es la de mayor duración.

① Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano.

■ **Fase sumergida.** La duración de esta fase se define por experimentación pero siempre es muy corta: Puede variar de 1 minuto por día hasta 4 veces 15 minutos por día.

② Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes.

③ El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente.

④ Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes

Fuente: <http://vitropic.fr/>

### Apéndice 3

Tabla 5. Composición química del medio de cultivo líquido (Yasuda, 1985, café) utilizado en las etapas de regeneración y germinación de los embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*

<b>Compuestos</b>	<b>mg/l</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	412
KNO <sub>3</sub>	475
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	110
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	92
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	6,8
ZnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	4,3
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125
<b>Fe-EDTA</b>	
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
<b>Vitaminas</b>	
Mio-inositol	100
ácido nicotínico	1
piridoxina. HCl	1
Tiamina. HCl	10
<b>Regulador de crecimiento</b>	
Benzil Amino Purina	según el tratamiento
<b>Fuentes de carbono</b>	
sucrosa	30000
pH	5,6

## Apéndice 4.

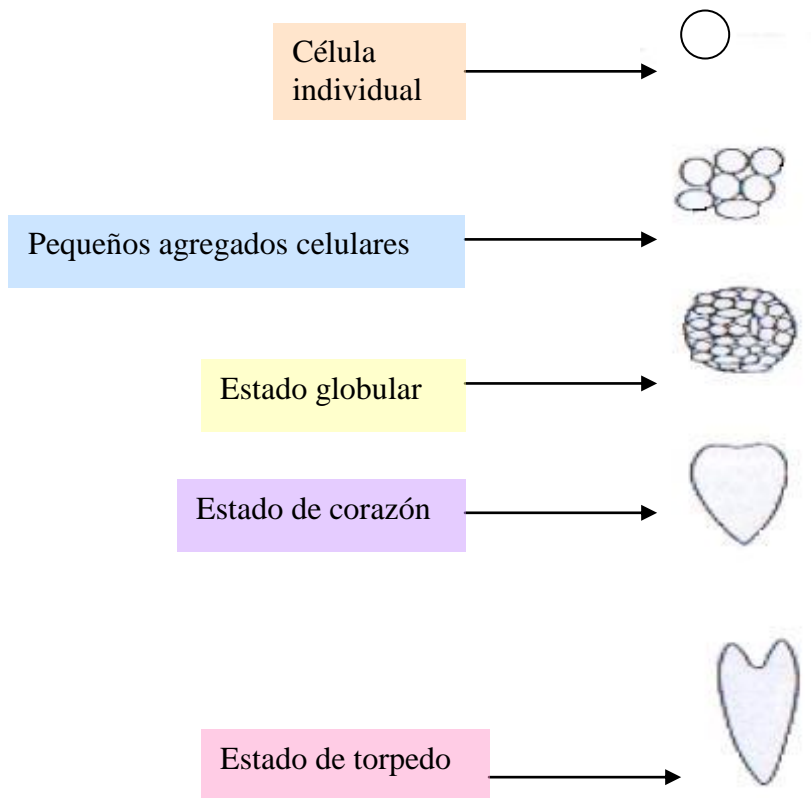


Figura 4 Diferentes estadios de los embriones.  
(Fuente: Payne, 1992).



## Apéndice 5

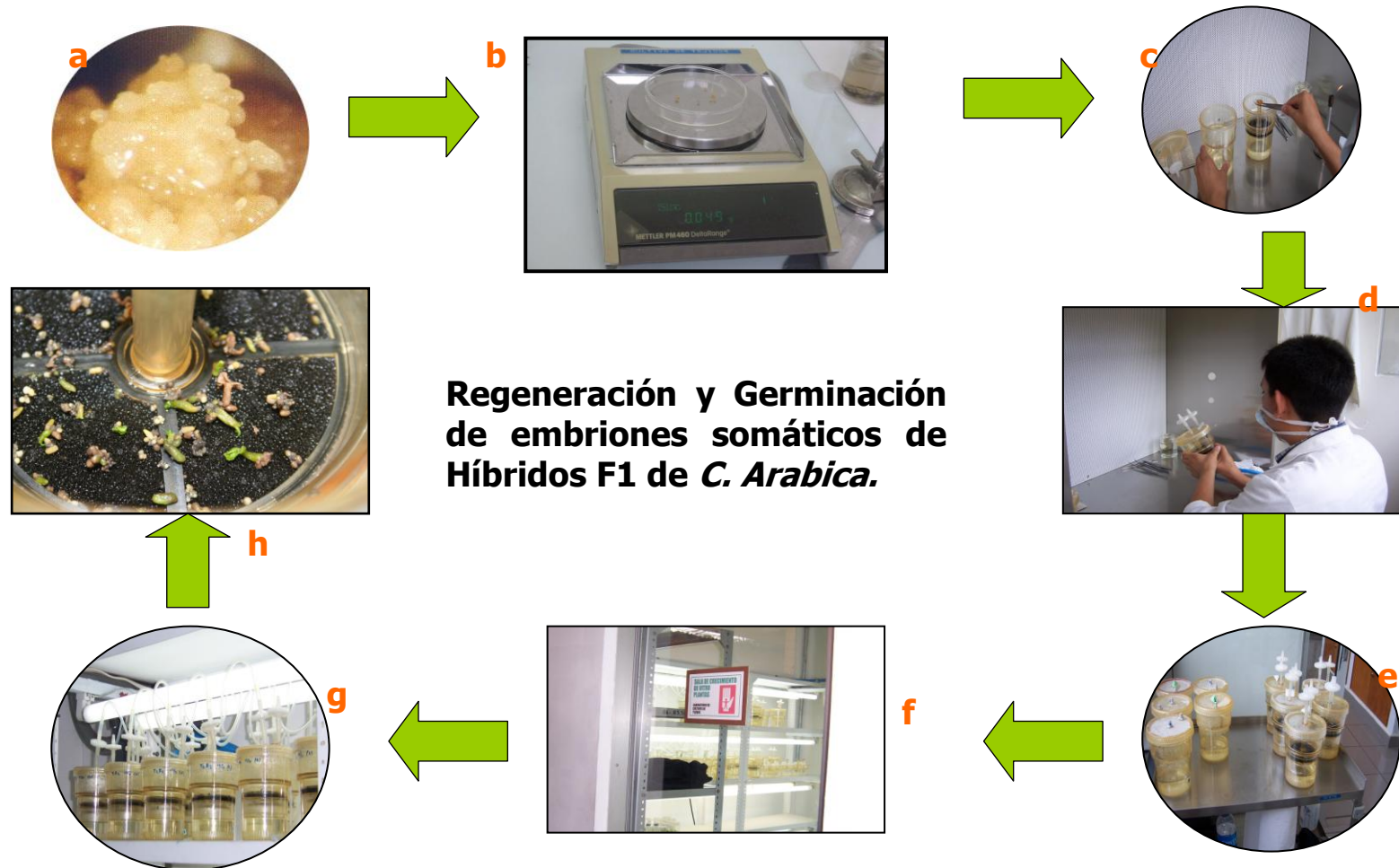


Figura 5. Esquema del desarrollo experimental de la regeneración y germinación de embriones somáticos F1 "café" (*Coffea arabica*) (a) callo embrionario, (b) Peso del callo embrionario en gramos, (c) siembra del inoculo en los biorreactores (d, e) sellado e identificación de los biorreactores. (f) cuarto de crecimiento, (g) biorreactores colocados al azar, (h) embriones regenerados y germinados en el sistema RITA.

## Apéndice 6.

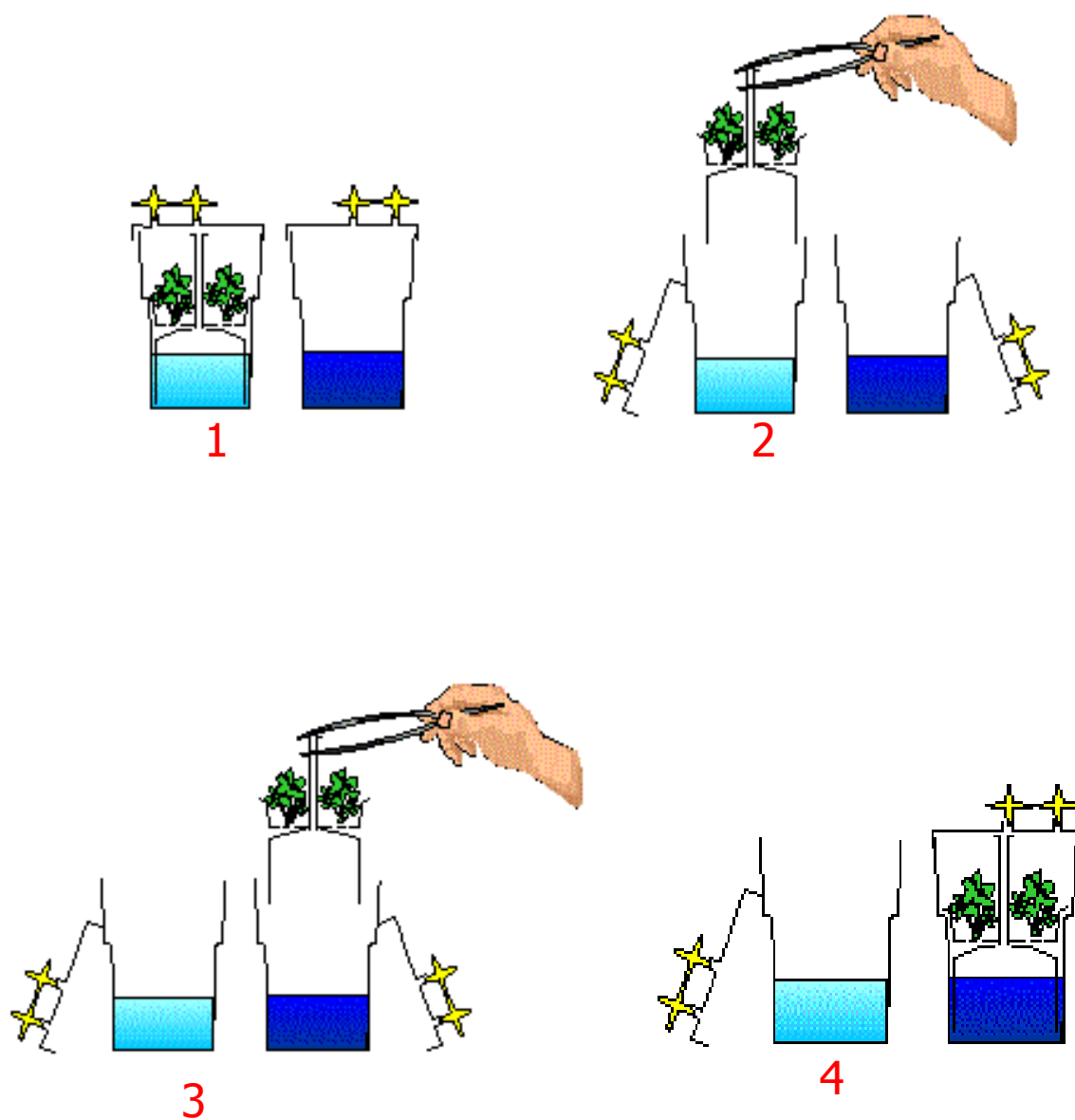


Figura 6 Esquema para el cambio de medio de cultivo líquido a los agregados embriogénicos. (1) biorreactor conteniendo el medio nuevo; (2 y 3) traslado del material vegetal hacia el biorreactor que contiene el medio nuevo; (4) material introducido en biorreactor conteniendo medio nuevo, este medio se mantiene por seis semanas.

## Apéndice 7.

Regeneración y germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de café "*Coffea arabica*" utilizando dos concentraciones de Benzil Amino Purina (BAP)

Tabla N° 6. TOMA DE DATOS PARA ETAPA DE REGENERACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

FECHA: \_\_\_\_\_

N°	Tratamiento y repetición	N° de embriones regenerados	Contaminación	Necrozamiento o muerte.	Observaciones
		Total de embriones regenerados			
1	T1R1				
2	T1R2				
3	T1R3				
4	T1R4				
5	T2R1				
6	T2R2				
7	T2R3				
8	T2R4				
9	T3R1				
10	T3R2				
11	T3R3				
12	T3R4				
	<b>Total</b>				

T1: Yasuda 1985, café (testigo)  
 T2: Yasuda 1985, café + 4 mg/l de BAP.  
 T3: Yasuda 1985, café + 6 mg/l de BAP.

T = Tratamiento      R.= Repetición.

## Apéndice 8.

Regeneración y germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de café "*Coffea arabica*" utilizando dos concentraciones de Benzil Amino Purina (BAP)

Tabla N° 7 TOMA DE DATOS PARA LA ETAPA DE GERMINACIÓN DE EMBRIONES.

FECHA: \_\_\_\_\_

N°	Tratamiento y repetición	N° de embriones Germinados	Contaminación por hongo o bacteria.	Necrozamiento o muerte.	Observaciones
1	T1R1				
2	T1R2				
3	T1R3				
4	T1R4				
5	T2R1				
6	T2R2				
7	T2R3				
8	T2R4				
9	T3R1				
10	T3R2				
11	T3R3				
12	T3R4				
	<b>Total</b>				

T1: Yasuda 1985, café (testigo)  
 T2: Yasuda 1985, café + 4 mg/l de BAP.  
 T3: Yasuda 1985, café + 6 mg/l de BAP.

T = Tratamiento

R.= Repetición.

## Apéndice 9.

**Tabla 8: Promedio del conteo de embriones obtenidos en cada Tratamiento de la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica***

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	Promedio
Tratamiento 1	4	1,6
Tratamiento 2	4	7,38
Tratamiento 3	4	10,66

**Tabla 9: Análisis de varianza para la etapa de regeneración de Embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*.**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	2	168,35	84,17		
ERROR	9	10,83	1,2		
TOTAL	11	179,18		69,9	0
C.V. =16,74 %					

**Tabla 10: Prueba de Tukey aplicadas al promedio de embriones Somáticos regenerados de híbridos F1 de *C. arabica*.**

TRATAMIENTO	Nº REPETICIONES	MEDIA	NIVEL DE SIGNIFICANCIA	TUKEY	VALORES DE LA TABLA
T3	4	10,66 A			
T2	4	7,38 B			
T1	4	1,6 C	0,05	1,25	(0,05), (0,01)= 3,95 5,43

Se presenta el análisis estadístico realizado a la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*.

## Apéndice 10.

**Tabla 11: Promedio del conteo de embriones obtenidos en cada Tratamiento de la etapa de germinación de embriones Somáticos de híbridos F1 de *C. arabica***

TRATAMIENTO	REPETICION	Promedios
Tratamiento 1	4	0
Tratamiento 2	4	2,88
Tratamiento 3	4	4,67

**Tabla 12: Análisis de varianza para la etapa de germinación de Embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*.**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTO	2	44,51	22,25	65,83	0
ERROR	9	3,04	0,33		
TOTAL	11	47,55			
C.V.= 23,07 %					

**Tabla 13: Prueba de Tukey aplicadas al promedio de embriones Somáticos germinados de híbridos F1 de *C. arabica*.**

TRATAMIENTO	MEDIA		NIVEL DE SIGNIFICANCIA	TUKEY	VALORES DE TABLA
Tratamiento 3	4,67	A	0,05	0,66	(0,05), (0,01)= 3,95 5,43.
Tratamiento 2	2,88	B			
Tratamiento 1	0	C			

Se presentan los análisis estadísticos realizados a la etapa de germinación de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*.

## Apéndice 11

**Tabla 14: Promedio del conteo de embriones obtenidos en Cada tratamiento en la etapa de regeneración de embriones Somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*. (Obtenida a las 22 semanas)**

TRATAMIENTO	REPETICIONES	MEDIA
Tratamiento 1	4	1,71
Tratamiento 2	4	10,63
Tratamiento 3	4	19,11

**Tabla 15: Análisis de varianza para la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica*. (Obtenida a las 22 semanas)**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	2	605,29	302,64	6,55	0,017
ERROR	9	415,57	46,17		
TOTAL	11	1020,86			
C.V.= 64,79%					

**Tabla 16: Prueba de Tukey aplicadas al promedio de embriones somáticos regenerados de híbridos F1 de *C. arabica*. (Obtenidos a las 22 semanas).**

TRATAMIENTO	MEDIA	NIVEL DE SIGNIFICANCIA	TUKEY	VALORES EN TABLA
Tratamiento 3	19,11 A	0,05	7,74	(0,05), (0,01)= 3,95 5,43
Tratamiento 2	10,63 B			
Tratamiento 1	1,71 C			

Se presentan los análisis estadísticos realizados a la etapa de regeneración de embriones somáticos de híbridos F1 de *C. arabica* obtenidos al final de las 22 semanas.