

# Capítulo 26

## **Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao**

P. Dublin\*

---

\* Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier Cédex, Francia.

## **Introducción**

El empleo de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se extiende cada vez más, tanto en los establecimientos públicos como en los privados. Numerosos laboratorios, en Europa y en América, utilizan estas técnicas para multiplicar en gran cantidad plantas ornamentales y frutales (rosal, 'gerbera', claveles, manzano, melocotonero, y otros). Esta nueva tecnología ofrece además múltiples ventajas a numerosas disciplinas de investigación como la genética, la bioquímica, el fitomejoramiento y la fitopatología.

El cultivo de tejidos vegetales presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas, como ciclos de selección más cortos, multiplicación vegetativa rápida, y creación de nuevas formas. De estas formas del cultivo de tejidos, la reproducción vegetativa es, sin duda la más difundida y la que más ha contribuido al desarrollo de esa tecnología. Sin embargo, cualquiera que sea el procedimiento utilizado, la reproducción vegetativa siempre ha desempeñado un papel determinante en el mejoramiento genético de las plantas cultivadas. En realidad, es el único método que permite reproducir individuos excepcionales —obtenidos del azar de las combinaciones genéticas o de las mutaciones— cuya fiel reproducción no puede realizarse por vía sexual por diferentes razones (barreras biológicas, tiempo de depuración genética muy largo y costoso). Esto ocurre precisamente con varias especies tropicales perennes de gran interés económico como las palmeras, el cacao, el café, y el caucho o hevea.

Durante muchos años las técnicas del cultivo de tejidos se habían empleado solamente en plantas de regiones templadas. Hace poco tiempo su uso se extendió a las plantas tropicales y numerosos laboratorios aplican hoy procedimientos *in vitro* para el mejoramiento genético de especies como el café, el cacao, la caña de azúcar, las palmeras, el hevea, la yuca, el plátano, y la piña. Las técnicas de multiplicación vegetativa *in vitro* de estas especies ya se han perfeccionado y permitirán la conservación de esos recursos genéticos, actualmente en peligro.

El principio del cultivo de tejidos parece sencillo y la iniciación en sus diferentes técnicas parece fácil. Esta situación explica, en parte, la tendencia a generalizar indebidamente su empleo. En varios países en vías de desarrollo hay una distancia notable entre los productos de la investigación y la utilización local de dichos productos. A menudo, un mejoramiento de las condiciones del cultivo permitiría alcanzar progresos agrícolas mucho más efectivos que la difusión de un material vegetal demasiado sofisticado y no adaptado aún a la situación local de ese cultivo.

A causa de las inversiones inherentes a la producción de plantas in vitro, el precio de producción de éstas a menudo será más alto que el de una planta obtenida por la vía hortícola clásica, especialmente cuando las tasas de multiplicación sean bajas. En consecuencia, la planta producida in vitro se preferirá cuando genere, en relación con las plantas obtenidas por la vía clásica, una plusvalía real, tal como un aumento en el vigor, la resistencia a una enfermedad, mayor rendimiento, o la ausencia de algún virus.

Las circunstancias en que se empleen las plantas in vitro podrá diferir de un país a otro y de una especie a otra. En ciertos casos, esas plantas se utilizarán como complemento de procedimientos hortícolas. En el cafeto, las condiciones in vitro permiten un rápido establecimiento de almácigos de retoños; en el hevea, el cultivo in vitro produce tallos rejuvenecidos cuyo enraizamiento se hace en condiciones hortícolas.

Igualmente los requisitos de homogeneidad genética podrán variar según las circunstancias locales y la naturaleza del producto de consumo (fruto, flor, bebida). En efecto, cuando se consume un producto transformado, como aceite, jugo de frutas, bebida, etc., en que las características individuales de la planta desaparecen en beneficio del producto comercial estándar, la uniformidad genética será menos rigurosa.

La homogeneidad genética, con sus limitaciones (suministro regular de fertilizantes, fungicidas e insecticidas) y sus peligros (generalización de ataques parasitarios a causa de una base genética demasiado estrecha) se adapta bien a una agricultura moderna y bien planificada, pero no tan bien a la de los países tropicales donde es difícil obtener un ambiente regular y homogéneo para el cultivo.

El peligro que representa, por ejemplo, la roya del cafeto para los productores latinoamericanos de café es la consecuencia directa de la base genética estrecha de los cafetos cultivados en esos países. La variedad más cultivada es la caturra, que requiere fertilizantes, es de crecimiento lento y escaso follaje, y se siembra a una alta densidad (más de 5000 plantas/ha). Por tanto, desde el punto de vista económico, está mal adaptada a una micropropagación in vitro por su bajo coeficiente de multiplicación y por el costo de producción elevado de las plantas in vitro. Una variedad de mayor tamaño, de crecimiento rápido y por ello de un coeficiente de multiplicación in vitro más alto, capaz de dar buen rendimiento con menor densidad de siembra (2000 plantas/ha) estaría mejor adaptada para el sistema in vitro porque el costo de la siembra será menor.

Igualmente, la técnica de reproducción vegetativa (embriogénesis somática) que desemboca en una relativa variabilidad genética, es decir, en una

población heterogénea pero de mayor capacidad de adaptación y resistente a los factores ambientales aleatorios, es inaceptable en el contexto agrícola de los países industrializados, pero será recomendable en el medio agrícola de algunos países tropicales.

Las investigaciones sobre la multiplicación vegetativa in vitro de plantas tropicales de interés económico son cada día más numerosas. Se han realizado simultáneamente en varios países para muchas plantas: la palma de aceite, la caña de azúcar, el cafeto, el cacao, el plátano, la piña, el hevea. Los éxitos obtenidos varían de una especie a otra.

Las dificultades que se deben solucionar son típicas de cada especie vegetal. En el hevea es difícil establecer una técnica de micropropagación: el establecimiento in vitro de los clones adultos, la obtención de un sistema radical pivotante, y el mantenimiento de los tallos producidos in vitro hasta que alcancen un crecimiento suficiente que asegure su multiplicación y evite recurrir nuevamente a la planta donante. Otro tipo de planta, el cacao, tiende a presentar una calogénesis anárquica en todos los explantes que se cultivan; esta tendencia es un serio obstáculo para el establecimiento de una técnica de micropropagación en el cacao y por ello su multiplicación vegetativa mediante técnicas hortícolas (esquejes en invernadero, injerto) da mejores resultados hasta el momento.

En las páginas siguientes se examinarán los conocimientos que se han adquirido en materia de la reproducción vegetativa in vitro de tres grupos de plantas de gran interés económico: el café, el hevea y el cacao. Estas especies pertenecen a familias diferentes y cada una presenta reacciones específicas in vitro. Las técnicas de reproducción vegetativa están bien establecidas en el cafeto, pero no en las otras especies. Estas aún representan numerosos problemas que seguramente se resolverán en los próximos años.

## Café

### Orientaciones modernas del mejoramiento genético

La mayor parte del café que se consume en el mundo proviene de dos especies, *Coffea arabica* y *C. canephora* cuya variedad *robusta* es la más cultivada. *C. arabica* es originaria de las regiones montañosas de Etiopía y se cultiva en las regiones de altura, principalmente en América Latina. Este cafeto alotetraploide ( $2n = 44$ ), es autocompatible; por tanto, puede

reproducirse fielmente mediante semillas. Los principios de su mejoramiento, basados en la autogamia, llevaron a la creación de cultivares relativamente homogéneos (Caturra, Mundo Novo) que se diseminaron por todos los países productores de café de América Latina. Sin embargo, su base genética tan estrecha expone actualmente estas variedades al peligro de la roya (*Hemileia vastatrix*) que ya ha llegado a casi todos esos países (Cherrier, 1980).

*C. canephora* es diploide ( $2n = 22$ ), se cultiva en zonas de menor altura (Africa, Asia y América), es autoincompatible, y es resistente a la roya. Su mejoramiento comprende dos etapas: una sexual que conduce a poblaciones heterogéneas, y una vegetativa que resulta en clones y sólo puede emplearse en una mezcla policlonal a causa de su autoincompatibilidad (Dublin, 1967; Berthaud, 1980).

La obtención de progenitores homocigóticos derivados de haploides dobles permitiría crear híbridos vigorosos y relativamente homogéneos en los cafetos (Dublin et al., 1975; Couturon et al., 1982). Tanto en Africa como en América, desde hace algunos años el mejoramiento del café ha sido orientado hacia la obtención de híbridos interespecíficos de *C. arabica* x *C. canephora* pero con objetivos muy diferentes (Louarn, 1982).

En Africa, donde el objetivo es la creación de híbridos de café adaptados a las condiciones ecológicas de *C. canephora* y que den un producto de calidad superior al de los cafetos *robusta*, la selección se ha limitado a los híbridos  $F_1$  de *C. arabica* mejor conocidos como *arabusta* (Duceau, 1980). Estos híbridos, que son tetraploides o hexaploides, sólo pueden reproducirse por vía vegetativa (Capot, 1972; Le Pierres et al., 1980; Berthaud, 1977).

En América Latina, donde es indispensable encontrar una solución genética al problema de la roya, el objetivo es transferir a *C. arabica* los genes de resistencia a la roya de *C. canephora* y crear híbridos estables; sus exigencias ecológicas y sus características agronómicas serán idénticas a las de *C. arabica* y serán capaces de reproducirse fielmente mediante semillas (Bettemcourt et al., 1980).

Teniendo en cuenta estas perspectivas, desde hace algunos años se emprendieron investigaciones sobre los híbridos Catimor e Icatú; éstos dieron como resultado, en Colombia, la creación de una multiraza, la variedad 'Colombia', cuyas plantas son resistentes a las diferentes razas de roya conocidas hasta el momento en ese país. La creación de estos híbridos exige un tiempo considerable; por esto y por la creciente amenaza de la

roya, el fitomejorador desearía actualmente una selección mucho más temprana como aquella basada en las técnicas del cultivo in vitro.

Además, en el progenitor recurrente *arabica* aparece, desde la tercera generación de retrocruces, cierto número de individuos de gran desempeño en la productividad, en la calidad comercial y en la resistencia a la roya; la multiplicación de éstos, en gran cantidad y por vía vegetativa, es de sumo interés (Carvalho, 1982; Carvalho et al., 1982). En el grupo *arabica* hay plantas de resistencia incompleta a la roya cuya utilidad para la caficultura fue subrayada por Leguizamón (1983).

A veces se ha mencionado la existencia en *C. arabica* de plantas con vigor híbrido obtenido de cruzamientos intervarietales. Desafortunadamente, la reproducción masiva de tales híbridos por vía sexual es imposible a causa del sistema de reproducción de esas plantas: no tienen genes de esterilidad masculina y su producción de semillas en fecundaciones dirigidas es baja. Esa vía de mejoramiento puede obviarse, sin embargo, mediante las técnicas in vitro para sacar provecho de la heterosis de los cruzamientos entre cafetos *arabica* genéticamente alejados.

Datos recientes han demostrado que, en el marco de las investigaciones de los cafetos resistentes a la roya, es indispensable tener una producción abundante y regular de esporas de *H. vastatrix* resistentes a los parásitos; las plántulas de los cafetos desarrolladas en condiciones in vitro podían servir a este propósito (Amar, 1984; Leguizamón, 1983).

Finalmente, se puede pensar que con el progreso de la biotecnología —descrita como transformación genética mediante el cultivo de células, el cultivo y fusión de protoplastos, y otros procedimientos— será posible crear, en un futuro cercano, nuevos cafetos con características definidas. Al principio estarán representadas por pocos ejemplares que luego se reproducirán por vía vegetativa.

Estos datos demuestran el papel general que desempeñará la multiplicación vegetativa en el mejoramiento genético de los cafetos (Mónaco et al., 1977). En particular, la propagación in vitro será esencial en la conservación de los recursos genéticos del cafeto y en la diseminación de individuos selectos obtenidos de cruzamientos intervarietales o interespecíficos. Este procedimiento debería ser la base de los cambios inevitables que, a causa de la roya, se producirán en la caficultura de América Latina durante los próximos decenios.

## Técnicas de multiplicación vegetativa

**En condiciones hortícolas.** La reproducción vegetativa del café por procedimientos hortícolas se conoce desde hace mucho tiempo (Valleys, 1952). Esta técnica se aplica principalmente en Africa, donde es imposible, por incompatibilidad, la reproducción adecuada por vía sexual de individuos excepcionales seleccionados en la especie *canephora* y en la variedad *robusta*. Cada año se producen millones de esquejes enraizados de estos cafetos en diversos países de Africa como Costa de Marfil, Togo, Camerún. En cambio, en los cafetos *arabica* se puede obtener una reproducción adecuada por semillas, y la multiplicación vegetativa en condiciones hortícolas nunca ha preocupado a los fitomejoradores; esas técnicas nunca han salido de la etapa de experimentación en los centros de investigación.

A causa del dimorfismo vegetativo de los cafetos, la multiplicación vegetativa por vía hortícola sólo puede efectuarse con un fragmento de tallo ortótropo joven; estos tallos siempre serán escasos en un clon recién seleccionado. Los esquejes de las ramas plagiótropas producen cafetos que presentan un porte horizontal, sin interés agronómico. En consecuencia, el empleo de procedimientos hortícolas para la difusión de un nuevo clon de cafeto puede requerir una cantidad de tiempo considerable.

El esqueje comprende un nudo, un par de hojas con sus láminas reducidas a la mitad, y un fragmento de entrenudo de 4 a 5 cm de longitud. Después de aplicarle en la base un producto auxínico, el esqueje se coloca en un recipiente en el invernadero. El sustrato de establecimiento varía según las posibilidades locales (arena, aserrín de madera, cáscara de arroz). Las tasas de establecimiento, algunas veces muy elevadas (90%), varían según la posición del esqueje en el tallo (los esquejes terminales o cercanos al meristema terminal enraizan mejor), el estado fisiológico de la planta, y el tiempo en que se hace el desqueje (Dublin, 1964).

En condiciones hortícolas doce meses transcurren entre el corte del esqueje de la planta y su trasplante en el campo; el mismo tiempo se necesita para que este esqueje pueda producir unos cincuenta nuevos esquejes y, desde los 24 meses, la producción es de unos 1000 esquejes por año. El desqueje hortícola requiere la instalación de un vivero de retoños, con todos los requisitos de mantenimiento y de área de trabajo disponible para una producción masiva (Deuss y Descroix, 1982).

Además del desqueje, cabe mencionar algunas formas de injerto que sólo se habían utilizado para la reproducción y se destinaban a las colecciones. Sin embargo, se están efectuando experimentos en mayor escala del injerto de *C. arabica* sobre *C. canephora* (*robusta*) denominado *C.*

*arabusta* (hib.) en varios países de América Latina, para luchar contra los nematodos; las raíces de la primera especie son más sensibles a estos parásitos que las de la segunda.

Los dos procedimientos de multiplicación vegetativa, *in vitro* e *in vivo*, podrán complementarse a menudo cuando se extienda su uso en un futuro en los países en vías de desarrollo.

**En condiciones *in vitro*.** En la reproducción vegetativa, el empleo de técnicas *in vitro*, comparado con el de las técnicas hortícolas, presenta un coeficiente de multiplicación mucho más alto. Independientemente de los factores de estación y clima, estas técnicas *in vitro* pueden utilizarse durante todo el año; permiten además un crecimiento continuo y una ruptura de la latencia que causa una 'brotación' en cascada. Por otra parte, hay toda una gama de explantes (hojas, pedúnculos florales) que no son utilizables para el esqueje hortícola pero lo son en condiciones *in vitro*, y contribuyen a aumentar ese coeficiente de multiplicación. En el café hay dos vías de multiplicación vegetativa *in vitro*: la embriogénesis somática y el microdesqueje.

### **Técnicas de embriogénesis somática**

Los primeros casos conocidos de embriogénesis somática en el género *Coffea* fueron obtenidos por Staritsky (1970) con explantes de ramas ortótropas jóvenes de *Coffea canephora*. Sin embargo, la mayor parte de los trabajos se han realizado con *C. arabica*. Hermann et al. (1975) y luego Sondhal et al. (1977), obtuvieron embriones somáticos con fragmentos de hojas de *C. arabica*. Además, estos dos últimos investigadores descubrieron dos estructuras con diferente potencialidad embriogénica en este tipo de explante. Desde entonces se han desarrollado investigaciones sobre la embriogénesis somática en el género *Coffea* en diversos países (Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983).

Las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, primero con *arabusta* y luego con *arabica*, dieron como resultado la implementación de técnicas de embriogénesis somática a partir de explantes de origen diverso, como fragmentos de tallos ortótropos, de ramas plagiótropas, de hojas, y de tegumentos de óvulos; esta metodología fue descrita en publicaciones anteriores (Dublin, 1980a; 1980b; 1981). Las hojas, que son abundantes y de fácil desinfección, proporcionan los mejores explantes para la embriogénesis somática en el café.

Los explantes, luego de un lavado con agua corriente seguido de un paso rápido por alcohol de 70°, son desinfectados por inmersión en una solución

de hipoclorito de calcio (10 g/litro) durante 20 minutos para las hojas y 30 minutos para los fragmentos de tallo, suplementada con varias gotas de Tween-80. Después de tres enjuagues con agua estéril, se cortan los explantes en fragmentos de 1 cm de longitud, si son tallos, y de 1 cm<sup>2</sup> de área, si son hojas. Los fragmentos de tallo se colocan horizontalmente en el medio de cultivo, mientras que los fragmentos de hoja se extienden con la cara inferior en contacto con el medio.

El proceso de embriogénesis somática en el género *Coffea* se compone, generalmente, de dos etapas:

- A) Etapa de inducción de callo, que se desarrolla en la oscuridad durante 4 a 6 semanas, en un medio que contiene los elementos minerales de Murashige et al. (1962), las vitaminas de Morel, cisteína (20-50 mg/litro), sacarosa (30 g/litro), 2,4-D (0.1-0.5 mg/litro), KIN (1-2 mg/litro), y agar (6-7 g/litro); el pH del medio se ajusta a 5.6 antes de pasarlo por el autoclave. El complejo vitamínico de Morel puede remplazarse por una simple mezcla de tiamina (4 mg/litro) y de inositol (100 mg/litro); asimismo, el 2,4-D puede sustituirse por ANA o AIB (0.5-1.0 mg/litro), aunque parece que los resultados son mejores con 2,4-D.
- B) Etapa de diferenciación, que se desarrolla con luz difusa (fotoperíodo de 12 h), en un medio basal idéntico al de la etapa A excepto que el 2,4-D y la KIN se remplazan por BAP (1-3 mg/litro). La adición de extracto de malta (400-1000 mg/litro) y de adenina (40-100 mg/litro), en algunos casos, puede acrecentar la tasa de embriogénesis somática (Dublin, 1980a; 1980b; 1981).

La temperatura en las dos etapas es de 26-27 °C; sin embargo, parece que una disminución de la temperatura de 1 a 2 °C durante la etapa B es favorable para la embriogénesis. Numerosas variantes experimenta esta metodología general. Así, la embriogénesis somática puede obtenerse en el café con luz continua, en oscuridad continua, o en un régimen de luz-oscuridad, en un medio sólido o líquido. La embriogénesis también puede ser inducida, y puede ocurrir en una sola etapa, en un medio único que contenga una citocinina (Dublin, 1981) o en una mezcla de citocinina y de auxina (Pierson et al., 1983). En un medio de diferenciación, generalmente, los embriones somáticos aparecen al final de los tres meses de iniciado el cultivo, en tejidos que envejecen. El embrión se desarrolla pasando por todas las etapas clásicas (globular, torpedo, cotiledones). Su color blanco nacarado contrasta fuertemente con el del explante de origen, que presenta un color marrón oscuro. Sin embargo, la embriogénesis

somática precoz en callos recién diferenciados fue observada por Pierson et al. (1983) en fragmentos de hoja de *C. canephora*.

El momento de aparición de los primeros embriones, las tasas de embriogénesis (porcentaje de explantes que producen embriones) y el número de embriones producidos por explante dependen de varios factores, entre ellos, las combinaciones de auxina/citocinina utilizadas en la etapa A, la duración de esta misma etapa, el origen del explante, y el estado fisiológico de la planta de la que se tomaron los explantes.

En *C. arabusta* (hib.) y en *C. arabica* se obtuvieron embriones somáticos partiendo de fragmentos de hojas, tanto en los callos de cicatrización como después de la formación de un callo primario no diferenciado, o indirectamente en callos secundarios de segunda generación y fuertemente embriogénicos. Estos tres niveles de la inducción de embriogénesis somática corresponden en el tiempo a períodos de 2 a 7 meses igualmente diferenciados (Dublin, 1981).

Cualquiera que sea el explante utilizado, los primeros embriones diferenciados dan origen a embriones secundarios que producen una tercera generación de embriones y así sucesivamente. Esta multiplicación produce rápidamente un número impresionante de embriones, de tamaños diferentes, derivados de un solo explante.

El desfase en el desarrollo de los embriones somáticos diferenciados en medio sólido puede compararse con la diferenciación en medio líquido agitado. La autoreproducción de los embriones somáticos de los cafetos puede mantenerse y así se obtienen millares de cafetos partiendo de un simple fragmento de hoja de 1 cm<sup>2</sup>. Esta es una ventaja considerable de la embriogénesis somática que abre perspectivas muy alentadoras para el mejoramiento genético de estas plantas.

Cualquiera que sea la naturaleza del explante de origen (tallos, hoja, óvulo), cualquiera sea el nivel de inducción de la embriogénesis somática (directa, en callo de primera generación o de segunda generación), el embrión somático tendrá, al final de su diferenciación, una zona radicular con hipocótilo, y una zona cauliforme con dos hojas cotiledonares. Según el equilibrio hormonal de los medios de diferenciación, estos embriones pueden presentar un desarrollo privilegiado de una u otra de estas dos zonas. Un medio rico en citocinina favorece el desarrollo caulinar y entonces la zona epicotiledonar se transforma rápidamente en tallo. En cambio, un medio rico en auxina favorece el desarrollo de la región hipocotiledonar en detrimento de los cotiledones, que reducen su tamaño y, algunas veces, hasta desaparecen. Pueden presentarse bloqueos en el desarrollo como resultado de la competencia por nutrientes.

Los embriones somáticos completamente diferenciados se trasplantan a un medio de cultivo donde desarrollan raíces y tallos, hasta que se forman plántulas de 4 a 5 pares de hojas aptas para las condiciones corrientes de cultivo (Dublin, 1980a; 1980b).

Los trasplantes individuales representan un trabajo delicado y tedioso y se prefiere 'sembrar' estos embriones en un medio fortalecido con BAP (1-5 mg/litro) que sólo favorecerá el desarrollo de su parte caulinar. Desarrollados así los tallos, se establecen, durante una segunda etapa, en un medio con agar o directamente in vivo. Esta técnica del 'cultivo en platos' presenta varias ventajas como el crecimiento más rápido de la plántula, y la eliminación por selección natural de embriones mal formados o insuficientemente desarrollados.

Las plántulas obtenidas por embriogénesis somática y suficientemente desarrolladas (3 ó 4 pares de hojas) pueden trasplantarse al vivero. Su sistema radicular se desarrolla, cada nuevo par de hojas es más grande que el anterior, la 'miniaturización' de la técnica in vitro, junto con el volumen gaseoso y la forma del recipiente desaparecen rápidamente, y se obtiene una plántula cuyo desarrollo es normal. Esta plántula es apta para su siembra en el campo a los 16 ó 18 meses después de la extracción del explante en *C. arabusta* (hib.), y a los 18 ó 24 meses en *arabica*; en esta última especie el crecimiento es más lento, particularmente en la variedad caturra.

El injerto directo, en el vivero, de embriones somáticos sobre el hipocótilo de plántulas originadas de semillas acelerará el desarrollo de las plántulas de caféto obtenidas de sus embriones somáticos. Esta técnica presenta un interés limitado (Danchechin Dorval, 1983) debido a su escaso rendimiento (40-50 embriones injertados por hombre por día).

Las tasas de multiplicación varían según el nivel de inducción de la embriogénesis escogida. Las tasas más elevadas se obtienen en callos secundarios. Estos callos, altamente embriogénicos, permiten obtener varias centenas de embriones partiendo de un solo fragmento de hoja (Dublin, 1981).

## Microesquejes

Las investigaciones sobre cultivos de esquejes de café in vitro son más recientes, y menos numerosas, que las realizadas sobre embriogénesis somática con los mismos cafetos: *C. arabica*, *C. arabusta* (hib.) y los tipos robusta (Custers, 1980; Dublin, 1980a; 1980b). Los primeros cultivos

fueron hechos por Custers (1980) partiendo de fragmentos de tallos ortótropos y plagiótropos de *C. arabica* provistos de yemas, y tomados de cafetos jóvenes de 1 a 2 años obtenidos de semillas. El establecimiento de estos microesquejes in vitro fue relativamente difícil. Por otra parte, el autor comprobó que los tallos obtenidos de yemas plagiótropas y desarrollados in vitro presentaban un porte vertical, comparable al de aquéllos obtenidos de yemas ortótropas, bajo las mismas condiciones.

Como resultado de las investigaciones hechas en nuestro laboratorio con *arabusta* y *arabica*, se desarrolló un procedimiento que comprende tres etapas: 1) la obtención in vitro de tallos ortótropos, 2) la multiplicación y establecimiento de los microesquejes, y 3) la transferencia de plántulas desde condiciones in vitro a condiciones in vivo.

En la primera etapa se obtiene un primer tallo ortótropo que posteriormente se cortará en microesquejes; cada microesqueje tendrá un par de hojas con sus láminas reducidas a la mitad y un fragmento de entrenudo. En la segunda, estos primeros microesquejes se cultivan en un medio caulógeno (BAP, 1-5 mg/litro, y sacarosa, 40 g/litro), que favorece exclusivamente el desarrollo de yemas latentes en los nuevos tallos ortótropos. De éstos se cortan nuevos microesquejes que también se colocan en el mismo medio, y así sucesivamente. Se continúa este proceso hasta que se obtenga un número suficiente de tallos de 4 a 5 pares de hojas, aptos para su establecimiento en la etapa final.

La primera etapa, donde se obtienen las ramas ortótropas en condiciones in vitro, es sumamente delicada. En efecto, durante el paso de las condiciones in vivo a las condiciones in vitro, se afrontan los problemas de contaminación (bacterias, hongos) y de oxidación fenólica, que son más acentuados en las regiones tropicales y aún más cuando los explantes se toman directamente del campo.

El explante, con sus yemas ortótropas, se toma de un tallo ortótropo joven, clorofílico. Comprende un nudo (sin hojas) prolongado por un fragmento de entrenudo de 2 a 3 cm de longitud. La desinfección de los tallos se hace mediante lavado con agua corriente seguido de un paso rápido (2 minutos) por alcohol a 70° y de la inmersión (30 minutos al vacío) en una solución de hipoclorito de calcio (10 g/litro). Después de tres enjuagues en agua estéril, los tallos se cortan en explantes que se colocan en un medio de organización de las yemas ortótropas en tallos ortótropos. Este medio contiene elementos minerales de MS o de Margara (1978), suplementados con vitaminas de Morel, cisteína (30 ng/litro), BAP (1-5 ng/litro), sacarosa (30-40 g/litro), y agar (6-7 g/litro); el pH se ajusta a 5.6 antes de la esterilización en autoclave.

Para reducir la oxidación fenólica, siempre frecuente en este material, se pueden remojar los explantes en una solución de ácido ascórbico (60-90 mg/litro) durante 10 a 15 minutos antes de colocarlos en cultivo; luego se colocan en la oscuridad durante los 8 primeros días a 25-27 °C antes de pasarlos a la luz. El subcultivo en medios frescos, cuando aparecen los primeros indicios de oxidación fenólica, reduce los daños que ocasiona este fenómeno.

Es frecuente observar, en los explantes extraídos directamente del campo y colocados en un medio de cultivo, proliferaciones bacterianas difíciles de combatir. Las yemas ortótropas están protegidas por estípulas que también mantienen las bacterias fuera del alcance de los productos desinfectantes. Sin embargo, si se toman tempranamente estas yemas que han proliferado, se pasan por una segunda desinfección leve (15 a 20 minutos en hipoclorito de calcio de 6 a 8 g/litro) y se colocan en un medio fresco, es posible que ellas se desarrollen como tallos. Este proceso es más largo que el de las yemas no escindidas del explante primario, y conduce además a tallos más débiles, a un desarrollo más lento, y a entrenudos más cortos.

Se puede cortar también el explante primario para obtener cada una de las series de yemas ortótropas opuestas; de esta manera se logra una mejor nutrición del explante (mayor superficie de contacto con el medio) y un desarrollo mucho más rápido de las yemas en tallos. Este desarrollo, después de la primera etapa, puede obtenerse en un medio sólido y también en un medio líquido. El explante se inserta entre los pliegues de un papel filtro doblado en forma de acordeón, y su base se humedece en el medio líquido que tiene la misma composición del medio de organización antes mencionado.

En general, las contaminaciones bacterianas son menos frecuentes en el medio líquido; en cambio la velocidad de crecimiento de los tallos es mayor en el medio semisólido. Por tanto, los medios líquidos se utilizarán preferiblemente como una etapa transitoria, después del desarrollo de las yemas ortótropas preexistentes en los tallos.

El primer tallo ortótropo desarrollado *in vitro* puede obtenerse partiendo de un ápice terminal de algunos milímetros de longitud o incluso de meristemas (Aponte de Londoño, 1981; Kartha et al., 1981; Zok, 1983). En ciertos casos, es posible obtener tallos ortótropos *in vitro* partiendo de yemas neoformadas. El explante, un fragmento de entrenudo de tallo ortótropo joven y clorofílico, se coloca en posición normal (la parte distal sumergida en el medio) en un medio basal de idéntica composición al del

medio de organización de las yemas en tallos, pero suplementado con adenina (50-100 mg/litro) y extracto de malta (500-1000 mg/litro).

Luego de tres semanas de cultivo, la parte apical del explante produce un callo de cicatrización que consta de algunas capas de células de origen cambial, las cuales se diferencian de los meristemas en que se desarrollan rápidamente en yemas y luego en tallos ortótropos con hojas (Dublin, 1980a; 1980b; Saleil, 1982).

Se puede obtener la neoformación de yemas (ortótropas o plagiótropas) a partir de fragmentos ortótropos o plagiótropos. Por otra parte, esta habilidad para la neoformación está vinculada con los tejidos jóvenes, y sólo los 2 ó 3 entrenudos más cercanos al meristema son capaces de producir yemas neoformadas.

La habilidad de un vegetal para producir yemas neoformadas es una característica relacionada con su genotipo; las condiciones in vitro sólo permiten la expresión de este carácter ya existente. En el género *Coffea*, la habilidad para la neoformación de yemas varía de una especie a otra; existe en *C. arabica*, en *C. canephora*, en el híbrido interespecífico de la primera generación de *C. arabusta* (hib.), e igualmente en los híbridos de esas dos especies.

Las tasas de neoformación dependen del explante (edad del explante y estado fisiológico de la planta donante) y de las condiciones físicas y químicas del cultivo. Ciertos compuestos como la sacarosa y las citocininas tienen un efecto positivo en la neoformación de yemas. Las tasas de neoformación (porcentaje de explantes con yemas neoformadas) y el número de yemas neoformadas por explante aumentan generalmente con la mayor concentración de citocininas y de sacarosa del medio de cultivo. En medios muy ricos en citocininas, el desarrollo de las yemas neoformadas puede ser bloqueado y no se forman tallos. Otros factores (frecuencia de los subcultivos, composición de los medios de cultivo, contenido de agar, temperatura, luz, volumen gaseoso, y forma de los recipientes de cultivo) modifican la velocidad de crecimiento de los tallos desarrollados in vitro. El efecto del recipiente se manifiesta en el crecimiento y en el grado de miniaturización.

Los tallos ortótropos, obtenidos de yemas preexistentes o neoformadas, se cortan en microesquejes que constan de un par de hojas y un entrenudo; éstos se subcultivan en el medio fresco caulógeno que sólo favorece su desarrollo como tallo. Si las condiciones del medio de cultivo, la temperatura, y la luz son adecuadas, cada microesqueje puede producir un tallo nuevo con cuatro a seis pares de hojas al final de las ocho semanas de

cultivo. Este tallo podrá cortarse en igual número de microesquejes, mientras que el microesqueje originario, colocado otra vez en medio fresco, producirá nuevos tallos que se cortarán, y así sucesivamente. Este proceso de corte y subcultivo periódico in vitro de los microesquejes crea verdaderas cepas de producción de microesquejes vigorosos con la misma apariencia de los que se producen in vivo en el vivero. Estas cepas pueden obtenerse mediante la utilización de microesquejes de dos nudos que se colocan horizontalmente en el medio de cultivo. Al final de dos meses, el conjunto de tallos (sin ápices) y de microesquejes de origen estarán nuevamente en posición horizontal, en un medio fresco; rápidamente se formará una cepa que producirá tallos tanto más vigorosos cuanto mayor sea el tamaño del recipiente.

Los cálculos muestran que, en las condiciones mencionadas, un solo microesqueje puede suministrar al final de un año unas 20,000 plántulas y 5<sup>12</sup> plántulas después de dos años. A título de comparación, en condiciones hortícolas un esqueje sólo puede producir de 100 a 200 esquejes 24 meses después de su extracción y de su colocación en recipientes de esqueje. Los niveles de producción de los nuevos microesquejes dependen de la velocidad de crecimiento de los genotipos, muy elevada en los híbridos vigorosos del tipo *arabusta* y mucho menor para las variedades de *C. arabica* de crecimiento lento (tipo caturra).

Conviene anotar que en el café, incluso en presencia de contenidos elevados de citocinina (1-10 mg/litro de BAP), la dominancia apical no es afectada y la ruptura de la latencia de las yemas se produce en raras ocasiones.

Los esquejes in vitro que han alcanzado un desarrollo suficiente (de 5 a 6 pares de hojas) pueden establecerse muy fácilmente. La rizogénesis puede lograrse ya sea por subcultivo de los microesquejes en un medio sólido con una leve concentración de los elementos minerales (MS diluído a la mitad, suplementado con 2 mg/litro de AIB), o por inmersión de la base de los microesquejes durante 24 horas en una solución de AIB (50 mg/litro) y transfiriendo luego éstos al medio anterior sin auxina.

En todos los casos las raíces aparecen 15 días después del tratamiento auxínico. La tasa de enraizamiento es de 90% a 100%. El trasplante al vivero, en condiciones ordinarias de cultivo, puede hacerse cuando las raíces son visibles (0.5-1.0 cm) o incluso inmediatamente después del remojo en la solución auxínica concentrada, a condición de que se mantengan los microesquejes en una atmósfera caliente saturada de humedad. En el vivero, el desarrollo de las raíces continúa y la miniaturización, caracterizada por hojas pequeñas y entrenudos cortos, desaparece con el

progresivo fortalecimiento del sistema radical. A los 8 ó 10 meses después del tratamiento auxínico, la planta exhibe un desarrollo vegetativo suficiente que permite colocarla en el campo.

## **Reversión de la plagiotropía in vitro**

En condiciones in vitro, los tallos plagiótropos pueden obtenerse tanto partiendo de yemas plagiótropas preexistentes como de yemas plagiótropas neoformadas. Estos tallos plagiótropos se cortan en microesquejes que, colocados sobre un medio caulógeno, desarrollarán nuevos tallos plagiótropos, y así sucesivamente.

El tallo plagiótropo obtenido del microesqueje in vitro se caracteriza por un porte vertical pero con hojas cuyas láminas se enrollan. El tallo ortótropo obtenido bajo las mismas condiciones tiene un porte vertical con hojas cuyos limbos están unidos y bien extendidos en un plano horizontal. Los entrenudos de los tallos ortótropos son más largos que los de los tallos plagiótropos. En condiciones naturales, la torsión de las hojas de las ramas plagiótropas ocurre en los pecíolos, porque la exposición al sol de la cara superior de esas ramas es mayor.

Cuando se promueve un ritmo acelerado de renovación de las yemas in vitro, mediante corte y trasplante frecuentes en condiciones físicas y químicas óptimas del cultivo, se puede, partiendo de tallos plagiótropos, inducir la formación de tallos que presenten características ortótropas típicas, es decir, que sean verticales con entrenudos más largos, y cuyas hojas tengan los limbos unidos, no presenten torsión, y estén bien extendidas en un plano horizontal.

En un cafeto adulto, la casi totalidad de las ramificaciones son plagiótropas; la ramificación ortótropa se reduce a ramas basales que no se pueden utilizar directamente para el desqueje hortícola. Se sabe también que todo desqueje de tallos plagiótropos en condiciones hortícolas produce un cafeto de porte horizontal que no presenta interés práctico.

La posibilidad de obtener una reversión de la plagiotropía en ortotropía, mediante el empleo de métodos in vitro, puede ser de interés en la reproducción vegetativa de genotipos excepcionales, recientemente seleccionados, y representados aún por un número limitado de individuos. Este tipo de reversión, con cambios morfogenéticos, es sólo un ejemplo de los fenómenos de rejuvenecimiento favorecidos en condiciones in vitro, y mencionados a menudo en la literatura (Franclet, 1983).

## Conclusiones

La multiplicación vegetativa, bajo todas sus formas, desempeñará un papel primordial en el mejoramiento genético de los cafetos cultivados durante los próximos años. Será indispensable además para multiplicar en gran cantidad los genotipos excepcionales obtenidos ya sea de combinaciones genéticas dirigidas o de variaciones inducidas *in vitro* y cuya fijación por vía sexual sería demasiado larga y costosa.

En comparación con los procedimientos hortícolas de reproducción vegetativa, como el esqueje y el injerto, las técnicas *in vitro* presentan las siguientes ventajas: coeficiente de multiplicación mucho más elevado; material (microesquejes) de tamaño reducido que puede transportarse a largas distancias a menor costo; material vegetal 'limpio' que no ofrece ningún riesgo de introducción de enfermedades; material, en fin, que facilita la constitución y la multiplicación de las colecciones de recursos genéticos de los cafetos, fuera de las zonas tradicionales de cultivo de estos vegetales.

Se cuenta actualmente con varios procedimientos de reproducción vegetativa *in vitro* de los cafetos, tanto de *C. arabica* y *C. canephora* como de los híbridos interespecíficos de estas dos especies. Los microesquejes ortótropos pueden obtenerse de diferentes fuentes: yemas ortótropas preexistentes (laterales o terminales), yemas ortótropas neoformadas, reversión de la plagiotropía, y cultivo de ápices.

Los cultivos de meristemas tradicionalmente utilizados en micropropagación poco se justifican en el cafeto. La escisión del meristema es una operación delicada, y las tasas de rebrote están muy comprometidas por las oxidaciones fenólicas. Además, a causa del predominio apical, esos meristemas no dan origen a varios tallos a la vez ('explosión' de tallos); su desarrollo *in vitro* es lento: se requieren varios meses para obtener un tallo de dimensiones suficientes que pueda cortarse en microesquejes. La ausencia de una enfermedad viral en los cafetos, hasta el momento, no hace necesario el cultivo de meristemas. La única ventaja de este tipo de explante podría ser el rejuvenecimiento más rápido del tallo regenerado y la adquisición de características vinculadas con este rejuvenecimiento como la facultad de enraizamiento.

En el microesqueje de cafeto, los mejores explantes son los fragmentos de los tallos ortótropos con yemas preexistentes. Las yemas neoformadas siempre se obtienen muy rápidamente (21 días) en callos de cicatrización delgados y en medios de cultivo que no contengan ninguna auxina. Estas yemas deberían producir individuos idénticos a la planta de origen.

La embriogénesis somática en los cafetos parece un fenómeno de fácil inducción. Los embriones somáticos de estas plantas pueden obtenerse de cualquier tejido somático (fragmentos de tallo ortótropo, de tallo plagiótropo y de hoja). La embriogénesis puede ser inducida en dos niveles diferentes: a) directamente sin formación de callo; b) sobre callo primario o sobre callo secundario con diferentes grados de diferenciación (3 a 7 meses). La embriogénesis puede obtenerse con combinaciones auxínicas muy diferentes y en condiciones físicas igualmente diferentes (oscuridad continua, luz continua, alternancia de luz y oscuridad). En comparación con el microdesqueje, la embriogénesis somática presenta un coeficiente de multiplicación más alto y puede proporcionar además diversos explantes; por esto es más consistente que el microdesqueje.

La embriogénesis somática diferida (en callo primario y secundario) pasa por una etapa de callo no diferenciado que puede producir variaciones genéticas, más o menos acentuadas según las condiciones del cultivo; sólo la experimentación en el campo permitirá determinar su importancia. No obstante, en el café no puede considerarse este fenómeno con tanto rigor como en las especies florales o frutales de las regiones templadas; en el café el producto final del consumo es una bebida que resulta de diversas transformaciones tecnológicas y donde las cualidades de una planta individual desaparecen en beneficio de un valor promedio. Por tanto, es fundamental la diferencia entre el café y otras especies cuyos productos (frutos y flores) son utilizados directamente por el consumidor; en ellas el mantenimiento de la uniformidad durante la reproducción vegetativa es indispensable.

En el café —siempre y cuando las variaciones que resultarían del empleo de procedimientos *in vitro* no afecten sus características agronómicas primordiales (rendimiento medio por hectárea, resistencia a enfermedades) sino sus características secundarias (período de maduración, tamaño de los frutos) dentro de los límites previstos— se podrá tolerar una cierta variabilidad genética que incluso sería objeto de investigación en los próximos años. En efecto, la variabilidad genética va acompañada de flexibilidad, adaptabilidad a diferentes ecologías, y mayor resistencia a factores adversos.

En conclusión, la embriogénesis somática deberá utilizarse en la reproducción vegetativa de gran número de cafetos, como un experimento de campo que permitirá precisar la naturaleza y los límites de las variaciones inducidas tanto por los diferentes niveles de la embriogénesis somática (con o sin callo diferenciado) como por sus diferentes modalidades (con o

sin auxina). Siempre que se requiera estabilidad integral, es decir, conservación de los recursos genéticos, únicamente deberá utilizarse el microdesqueje hecho en explantes obtenidos de yemas preexistentes.

Si se emplean las técnicas *in vitro* en la caficultura durante los próximos decenios, es preciso hacer varias observaciones. Teniendo en cuenta los costos de producción, a veces relativamente altos, de las plantas *in vitro*, éstas sólo podrán producirse masivamente en la medida en que suministren una plusvalía real en relación con las plántulas obtenidas de semillas. Este sería el caso de la reproducción de los cafetos de *C. arabica* y de los híbridos de individuos de alto desempeño —o sea, con resistencia a la roya, producción abundante, y vigor híbrido— incapaces de multiplicarse por vía sexual.

En la mayor parte de los países latinoamericanos, donde la variedad caturra está ampliamente diseminada, las densidades de siembra son a menudo muy altas (5000 árboles/ha). Estas densidades difícilmente son compatibles con el empleo de plantas generadas *in vitro* a causa del precio de retorno de la hectárea sembrada, que sería entonces considerable. El desarrollo de la tecnología *in vitro* en la caficultura de esos países debería ir acompañado de un cambio en las prácticas de siembra, en el diseño de los cafetales, en el concepto en suma de la caficultura. La prioridad que se ha dado a las variedades genéticamente homogéneas posteriores al caturra, que requieren fertilizante, debería dar lugar poco a poco a cultivares heterogéneos y a los individuos heterocigóticos, resistentes a la roya y capaces de adaptarse a diferentes ecologías. La creación y la difusión masiva de la variedad colombiana 'multiraza' es el primer indicio de esa evolución de la caficultura en América Latina.

En África, en las plantaciones de *C. canephora* (var. *robusta* y *arabusta* hib.) la técnica *in vitro* debería servir como alternativa para instalar más rápidamente los viveros para los clones recién seleccionados.

## **Hevea**

### **Antecedentes históricos**

La especie *Hevea brasiliensis*, originaria de la cuenca amazónica, suministra un látex que es el producto básico para la fabricación del caucho. Brasil se mantuvo como el primer productor mundial de este producto hasta principios del siglo XX.

En 1876, después de una expedición a la Amazonia, Wickman recogió 70,000 semillas de hevea que se enviaron al Jardín Botánico de Kew; 2400 se enviaron al Jardín Botánico de Ceylán donde germinaron y produjeron 2000 plantas. Finalmente, 22 de las plántulas de Ceylán se enviaron al Jardín Botánico de Singapur; estos 22 árboles dieron origen a casi todas las plantaciones de hevea del Extremo Oriente. Hasta 1900 la producción de América representaba un 95% de la producción mundial; desde 1930 Asia suministra un 98% de esa producción. En 1982 la producción mundial de caucho era de 3,675,000 toneladas.

Las primeras plantaciones de hevea que se hicieron, partiendo de semillas, presentaban una gran heterogeneidad si se consideran las producciones individuales: 30% de los árboles suministraban el 70% de la producción. Se aplicaron entonces dos estrategias para reducir esta heterogeneidad, que es una consecuencia de la alogamia predominante en el hevea:

- Mejoramiento de los almácigos para seleccionar los progenitores productores de semilla (plantas de semilla).
- Mejoramiento mediante reproducción vegetativa de los individuos de alto desempeño (selección clonal).

Los primeros clones de hevea fueron seleccionados por Cramer en 1883 y se reprodujeron mediante una técnica de injerto elaborada por van Helten en 1918.

## **Técnicas de multiplicación vegetativa**

**Injerto.** El injerto permite reducir la heterogeneidad y aumentar los niveles de producción; a pesar de todo, queda cierta heterogeneidad a causa de la heterocigosis de los progenitores que producen la semilla.

Varios autores (Nozeran et al., 1969; MacIndoe, 1958; Templeton et al., 1967) aclararon las diferencias entre las yemas de injerto respecto a su velocidad de proliferación, a su potencial morfológico, y a su producción en función de su posición. Así, las yemas de tipo juvenil regeneran por injerto árboles de tronco cónico, de morfología semejante a la de una plántula, mientras que las yemas de ramas producen árboles de tronco seudocilíndrico, análogos a las ramas gruesas con un abultamiento a nivel del injerto (pie de elefante).

El éxito de los injertos, en la práctica, depende de la selección del injerto y del portainjerto, y del grado de compatibilidad entre ambos. Los portainjertos vigorosos, de crecimiento rápido, favorecen el desarrollo posterior