

# Capítulo 27

## Propagación in vitro del café

M. R. Sondahl\*

T. Nakamura\*

W. R. Sharp\*

---

\* DNA Plant Technology Corporation, Cinnaminson, Nueva Jersey, E. U.

## Importancia Económica

El café es el producto agrícola más importante en el mercado internacional (US\$9,000-12,000 millones anualmente). Su producción, restringida a los países tropicales, les aporta ingresos por exportaciones del grano que son su principal fuente de divisas y que les dan acceso a las tecnologías y a los servicios modernos. La producción mundial de café en el año 1981-82 fue de 96.4 millones de sacos de 60 kg. Algunos de los principales países productores de café en esa cosecha fueron: Brasil (34.2%), Colombia (14.5%), Indonesia (5.4%), Costa de Marfil (4.8%), México (3.7%), Guatemala (2.8%) y El Salvador (2.5%).

Existen dos especies de cafeto de importancia comercial: *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre (variedad Robusta). La bebida de calidad se obtiene de *C. arabica*, especie que se cultiva a mayor altura que otras. Esta especie representa el 70% del café comercial del mundo y un 99% de la producción cafetera de América Latina. *C. canephora* se cultiva generalmente en las áreas tropicales de menor elevación; el 80% de la producción africana es de este tipo. En escala más reducida se cultiva *C. liberica* en Liberia, Surinam y Malaysia; *C. racemosa* en Mozambique, y *C. dewevrei* en la Costa de Marfil y en Zaire. Estas especies producen granos de inferior calidad, aceptables solamente en el mercado local.

El costo de producción de un cafetal varía de país a país. En una finca cafetera típica del Brasil, con una producción media de 1500 kg/ha (25 sacos de 60 kg), los costos de fertilización y de control fitosanitario representan el 30% de los costos totales de producción. El mejoramiento de las plantas de café debería pues concentrarse tanto en estas dos áreas del costo de producción como en la calidad del producto final.

## Embriogénesis Somática del Café: un Sistema Modelo

La obtención de 'embriones somáticos de alta frecuencia' de los tejidos adultos (hojas, p.ej.) de las plantas de café se ha convertido en un sistema modelo que resulta atractivo para otras especies arbóreas. Resultados similares se han obtenido con algunos árboles frutales utilizando el tejido nucelar como fuente del explante. Tanto en el café como en los árboles frutales, el grado de éxito de la embriogénesis somática varía según los genotipos cultivados. Una característica común de la embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) es la presencia de un tejido embriogénico;

este tejido se diferencia a partir de células individuales, llamadas células embriónicas madres.

Los tejidos embriónicos pueden describirse como tejidos friables, que contienen células pequeñas y esféricas (15-20  $\mu$  de diámetro) con las siguientes características: citoplasma denso, nucléolo prominente, núcleo basófilo, y ciclo celular corto. Otra característica general de los sistemas de embriogénesis de alta frecuencia es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo: a) alta relación auxina/citocinina durante el cultivo primario (medio de inducción), y b) baja relación auxina/citocinina o ausencia de reguladores del crecimiento durante el cultivo secundario (medio de acondicionamiento).

En el café se pueden reconocer las siguientes fases de la ESAF:

- Medio de inducción (división celular y redeterminación).
- Medio de acondicionamiento (diferenciación).
- Rescate del embrión (aislamiento).
- Germinación del embrión (crecimiento del brote y de la raíz).
- Fortalecimiento de la plántula.
- Trasferencia al suelo.

Se han identificado varios factores generales que controlan la ESAF:

### **a. Tejidos donantes**

- Especies vegetales o variedades.
- Fuente del explante.
- Pretratamiento del explante.

### **b. Medio de cultivo**

- Constituyentes orgánicos e inorgánicos.
- Reguladores del crecimiento (tipos y concentraciones).
- Osmolaridad total.

### **c. Condiciones de crecimiento**

- Luz (calidad, intensidad, fotoperíodo).
- Temperatura (termoperíodo).
- Intercambio gaseoso.
- Régimen de subcultivo.
- Selección de tejidos durante los subcultivos.

El éxito de la ESAF en otras especies perennes puede mejorarse teniendo en cuenta estos parámetros. La literatura actual de la embriogénesis somática describe un medio que contiene una alta concentración de sales para el cultivo primario (75% en las dicotiledóneas y 82% en las monocotiledóneas). Durante la fase de inducción, la adición de 2,4-D y KIN (22%) o de 2,4-D solo (15%) ha prevalecido para las dicotiledóneas; en las monocotiledóneas, el 2,4-D, aplicado solo, se ha utilizado con éxito en un 68% de los medios de inducción.

La propagación vegetativa se ha logrado principalmente induciendo el desarrollo de meristemas preexistentes, ya sea apicales o axilares. Desde hace poco tiempo se han utilizado con más frecuencia los brotes adventicios (organogénesis) y los embriones somáticos de alta frecuencia como un medio de propagación vegetativa. Las plantas de café pueden propagarse exitosamente por medio de la embriogénesis somática (Figura 27.1, A-C) o mediante el desarrollo de las yemas axilares (Figura 27.1, D-F).

## **Cultivo de Tejidos del Café**

### **Hojas**

Las hojas maduras de ramas ortótropas o plagiótropas de plantas de invernadero se desinfectan superficialmente en una solución al 1.6% de hipoclorito de sodio (30% de un agente blanqueador comercial) durante 30 minutos, y luego se enjuagan tres veces en agua estéril doblemente destilada. Si las plantas de café crecen en el campo es más difícil lograr la desinfección de la superficie foliar. El siguiente procedimiento ha dado algún grado de éxito para el material procedente del campo: 2.6% de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, enjuagar luego en agua estéril, incubar en cajas Petri selladas durante la noche, exponer nuevamente a 2.6% de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, y enjuagar finalmente tres veces con agua estéril. Se ha encontrado que el etanol al 70% y las soluciones de  $HgCl_2$  son tóxicas para las hojas del cafeto; en cambio, las soluciones de hipoclorito de sodio o de calcio son efectivas y no son tóxicas. Antes de sumergir las hojas en la solución desinfectante se aconseja lavarlas manualmente con una solución de detergente al 1% y enjuagarlas en agua destilada; si se dispone de agua ozonizada se recomienda una inmersión de 5 minutos. El uso de antibióticos y fungicidas sistémicos en un medio salino-azucarado durante el periodo de precultivo de tres días ha sido benéfico para reducir la contaminación por bacterias y hongos de los materiales de campo.

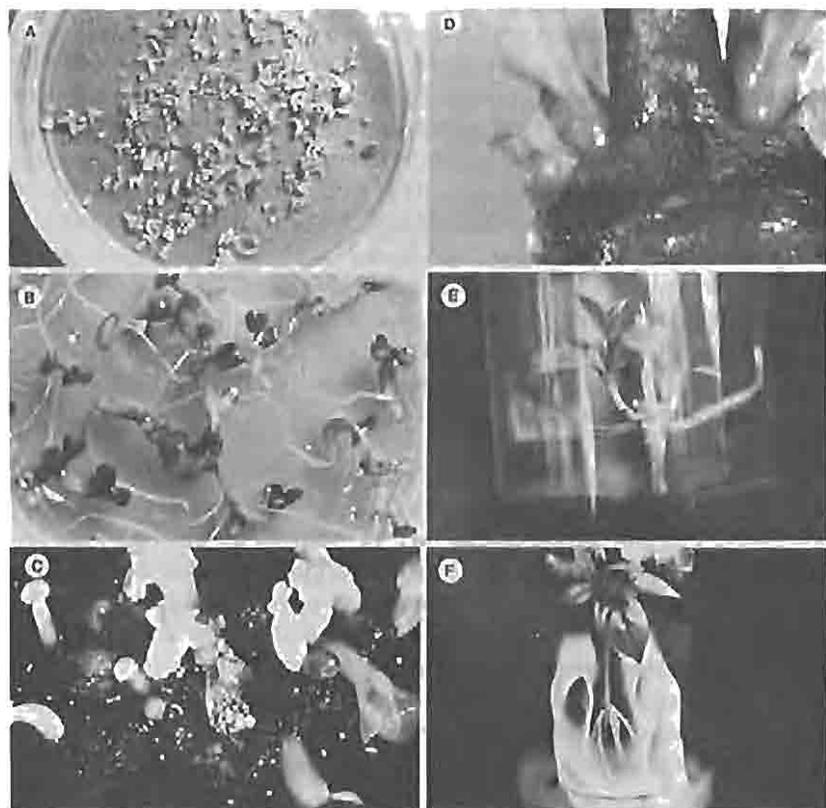


Figura 27.1. Propagación del café mediante embriogénesis somática (A-C) y por cultivo de yemas axilares (D-F). A) Embriogénesis somática de alta frecuencia (o embriogénesis indirecta) de un solo explante foliar del café. Los embriones crecen en el medio basal líquido durante cinco semanas, aproximadamente, después de aislar el tejido embriogénico partiendo del cultivo secundario (1.0X). B) Germinación de embriones en un medio basal sólido (1.2X). C) Diferenciación de embriones somáticos de baja frecuencia (o embriogénesis directa) durante el cultivo secundario de un solo explante foliar del café. Esta vía embriogénica suministra un número menor de embriones. Obsérvese que no todos los embriones presentan un desarrollo morfológico normal. D) Etapa temprana (cerca de tres semanas) en el desarrollo de las yemas axilares del cultivo de un nudo ortótropo. Obsérvese el desarrollo de tres yemas ortótropas de cada lado del nudo (1.0X). E) Crecimiento del brote de nudo ortótropo cultivado después de unas ocho semanas en cultivo primario (1.0X). F) Establecimiento del brote del café derivado de la yema axilar mediante un cultivo sobre papel filtro (1.0X).

Se cortan explantes foliares de unos 7 mm<sup>2</sup> excluyendo la nervadura central, los márgenes, y las porciones apicales y basales de la lámina foliar. Al eliminar la nervadura central se excluyen los domacios y por ello disminuye el número de explantes foliares contaminados; los domacios son poros profundos (aproximadamente, de 0.18 mm de diámetro) localizados en el ángulo agudo formado por la nervadura central y las nervaduras secundarias, en el lado abaxial de la hoja del cafeto, en los cuales se acumulan microorganismos contaminantes. Las secciones foliares se cortan generalmente sobre papel filtro estéril (o en toalla de papel) que se cambia frecuentemente para evitar la contaminación cruzada. Todos los lados del explante foliar deben cortarse ya que la proliferación de callo sólo ocurre en los bordes cortados. Los estudios histológicos han demostrado que el tejido de callo se origina en las células del mesófilo del explante foliar (Sondahl et al., 1979b).

Los explantes foliares se colocan en cajas Petri de 20 x 100 mm que contienen el medio salino solidificado con agar (sales MS a la mitad de la concentración, con sacarosa 0.06 M). El período de precultivo de los explantes foliares puede cumplirse en la oscuridad o en la luz durante unas 72 horas; no se han hallado diferencias entre estas dos condiciones. El precultivo ha sido muy útil para seleccionar explantes viables y para eliminar las partes foliares contaminadas. Los explantes foliares se colocan de manera que su superficie abaxial —que se distingue claramente por una coloración verde pálida de tono mate, diferente del verde oscuro y brillante de la superficie adaxial— mire hacia arriba.

En frascos de una capacidad aproximada de 50 ml se vierten 10 ml de medio basal esterilizado en autoclave; este medio contiene sales inorgánicas MS (Murashige et al., 1962) y ha recibido además los siguientes compuestos: tiamina-HCl 30 µM, L-cisteína 210 µM, 550 µM myoinositol, sacarosa 117 mM, y 8 g/litro de Bacto Agar Difco. En el cultivo primario se utiliza un 'medio de inducción' que contiene una combinación de KIN (20 µM) y 2,4-D (5 µM), y se incuban los frascos en la oscuridad a 25 ± 1 °C durante 45-50 días. Este medio de inducción se considera ideal para la inducción de ESAF de *C. arabica* cv. Bourbon (Sondahl y Sharp, 1977).

Se establecen entonces —con un período de luz de 12 horas y a 24-28 °C— cultivos secundarios mediante el subcultivo de tejidos de 45-50 días de edad en un 'medio de acondicionamiento' que contenga los siguientes componentes: sales orgánicas MS a la mitad de la concentración (con excepción de KNO<sub>3</sub>, cuya concentración se duplicó), sacarosa 58.4 mM, KIN 2.5 µM, y ANA 0.5 µM. Después de la transferencia al medio de

acondicionamiento, el crecimiento de tipo parenquimatoso del callo se detuvo y los tejidos tomaron lentamente un color marrón. Se han caracterizado dos secuencias de diferenciación morfogénica en los cultivos secundarios de explantes foliares en el género *Coffea*: embrión somático de baja frecuencia (embriogénesis directa o ESBF) y embrión somático de alta frecuencia (embriogénesis indirecta o ESAF). Al adoptar el protocolo de cultivo estándar descrito para *C. arabica* cv. Bourbon, se observó el ESBF 13 a 15 semanas después del cultivo secundario y el ESAF 16 a 19 semanas después del mismo cultivo (Figura 27.1, A-C). El ESBF apareció 3 a 6 semanas antes del grupo visible de ESAF (Sondahl y Sharp, 1979; Sondahl et al., 1979a; 1979b).

La aparición de embriones somáticos aislados que se desarrollan hasta plántulas normales verdes (en números que varían entre 1 y 10 por cultivo) es típica del ESBF. En contraposición, en el ESAF se sigue una secuencia de desarrollo única: un tejido blanco friable que contiene estructuras globulares, definido como **tejido embriogénico**, se desarrolla de la masa de células marrones de callo, no proliferantes; las estructuras globulares parecen desarrollarse sincrónicamente durante un período de 4 a 6 semanas.

El tejido embriogénico origina embriones somáticos y finalmente plántulas, aunque esta última etapa de desarrollo carece del sincronismo de la primera. La cantidad producida de tejido embriogénico varía pero, en promedio, grupos de este tejido desarrollan de 100 a 200 embriones somáticos. Con el fin de acelerar este proceso y aumentar el porcentaje de plántulas totalmente desarrolladas, se aconseja aislar los tejidos embriogénicos y cultivarlos con luz a 26 °C en 5-10 ml de medio basal líquido desprovisto de reguladores del crecimiento, durante 4 a 6 semanas (etapa de aislamiento del embrión). Después de este período, los embriones somáticos en forma de torpedo y las plántulas jóvenes se colocan en cajas Petri, en un medio de cultivo sólido que contenga sacarosa 0.015 M a 0.03 M, en presencia de luz (etapa de germinación del embrión).

Las plántulas individuales que presenten una raíz primaria desarrollada se extraen del medio de cultivo, se lavan cuidadosamente, y se trasplantan inmediatamente a pequeñas macetas dentro de una cámara húmeda. Después de un período de fortalecimiento de un mes, pueden exponerse a la humedad atmosférica normal y transferirse al invernadero. Otra manera de fortalecer las plántulas es colocarlas en un medio de cultivo sólido (aproximadamente 100 ml) sin sacarosa, en frascos Erlenmeyer de 250 ml sellados con tapones de algodón y papel. Estos frascos se exponen a la luz solar en una sección sombreada del invernadero; generalmente se los

protege con mallas de plástico que filtran de 60% a 70% de los rayos solares. Después de dos meses, aproximadamente, las plántulas exhiben un buen desarrollo foliar y radical y pueden ser trasplantadas a pequeñas macetas que contengan suelo.

Este procedimiento se ha aplicado a cuatro especies diferentes de café y a muchos cultivares de *C. arabica*. Se han obtenido recientemente embriones somáticos de los tejidos foliares de algunos mutantes morfológicos del café, con el fin de evaluar la estabilidad del genotipo obtenido mediante esta metodología; se presentó, en efecto, variabilidad en los siguientes genes mutantes únicos: *Erecta* (Er), *Purpurascens* (pr), *Angustifolia* (ag), *Nanna* (na), *San Ramón* (Sr) y *Volutifolia* (vf). Actualmente estos cultivos presentan tejidos embriogénicos y embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. El análisis genético de las plantas derivadas del cultivo de explantes foliares de estos mutantes morfológicos indicará si es factible producir embriones somáticos para la propagación vegetativa de las plantas. Además, ese análisis permitirá quizás hacer una diferenciación adicional, basada en la estabilidad genética y en el origen citológico, entre la organogénesis y la embriogénesis.

En la literatura no se encuentran referencias sobre el cultivo de las hojas cotiledonares del café. Se ensayó esta fuente de explante con plántulas de tres meses de edad de *C. arabica* cv. Mundo Novo, utilizando la misma tecnología descrita para las hojas maduras, con excepción de una modificación hecha en la concentración de 2,4-D durante el cultivo primario. Después de dos meses de cultivo primario, los resultados indicaron que la contaminación entre los 550 segmentos cotiledonares cultivados fue escasa y que la concentración más baja de 2,4-D ( $1 \mu\text{M}$ ) también indujo la diferenciación de las raíces adventicias. La concentración  $5 \mu\text{M}$  del 2,4-D, la misma que se utiliza para hojas maduras, se adoptó para cultivos futuros de explantes foliares cotiledonares. Después de cuatro meses de cultivo secundario se consiguió la proliferación del tejido embrionario.

## Meristema apical

El desarrollo de un protocolo para el cultivo de meristemas es un prerequisite para la futura criopreservación del germoplasma de café. Kartha et al. (1981) aislaron meristemas apicales de 0.3 mm partiendo de plántulas estériles de *C. arabica* cv. Caturra Rojo y cv. Catuai. El medio de cultivo —compuesto de sales MS y vitamina B5, y complementado con BAP o ZEA ( $5-10 \mu\text{M}$ ) y ANA ( $1 \mu\text{M}$ )— indujo la producción de brotes múltiples, mientras que menores concentraciones de citocininas produjeron brotes simples. El establecimiento sólo ocurrió cuando el medio tenía,

con la mitad de la concentración, las sales MS desprovistas de sacarosa pero con AIB 1  $\mu\text{M}$ .

En este laboratorio, los meristemas apicales de *C. arabica* cv. Mundo Novo, de tres meses de edad, se escindieron y sembraron en cajas Petri que contenían una solución salina con sacarosa y agar. Después de cinco días de precultivo, 192 meristemas fueron trasladados al cultivo primario luego de descartar los contaminados (32%) y los oxidados (4%). El medio de cultivo consistía en sales MS (solución 0.1X), piridoxina (15  $\mu\text{M}$ ), cisteína (500  $\mu\text{M}$ ), sacarosa (0.087 M), AIA (0.5  $\mu\text{M}$ ), y varias concentraciones de BAP. Después de 10 semanas de cultivo, los meristemas cultivados en el medio que contenía BAP 5  $\mu\text{M}$  fueron los más vigorosos. El medio de enraizamiento adoptado estaba compuesto por sales MS a la mitad de la concentración (microelementos, 0.1X), sacarosa (0.058 M), vitaminas, AIB (5-10  $\mu\text{M}$ ) y ANA (5-10  $\mu\text{M}$ ).

En todos los casos sólo se obtuvieron raíces sencillas. Con el fin de lograr la formación de raíces secundarias y pelos radicales, se subcultivaron las plántulas en una mezcla 2:3 de arena:sustrato estéril de vermiculita. Los meristemas apicales de *C. arabica* cv. Catuai se cultivaron con el mismo protocolo descrito para cv. Mundo Novo y se obtuvieron resultados similares.

## **Yemas axilares**

Las plantas de café tienen, en cada nudo del tallo, múltiples yemas ortótropas inactivadas y dos yemas plagiótropas. Las yemas plagiótropas se diferencian sólo después del décimo o undécimo nudo de una plántula en desarrollo, mientras que las yemas ortótropas están presentes en el primer nudo (nudo cotiledonar). La escisión del meristema apical resulta en el desarrollo de dos brotes ortótropos del nudo apical, uno en cada axila foliar. En cada axila foliar de las ramas plagiótropas hay cuatro yemas inactivadas colocadas en serie; estas yemas se diferenciarán como capullos florales bajo condiciones ambientales adecuadas. Algunas veces, las yemas más altas de la serie, a un solo lado o a ambos lados de un nudo, se desarrollarán como una yema vegetativa y no como una yema floral y darán origen a una rama plagiótropa secundaria.

Se ha explorado el uso de estas yemas inactivadas como un medio de propagación vegetativa de las plantas de café. Los explantes nodales de plantas de *C. arabica* cultivadas asépticamente se han cultivado en el medio MS suplementado con BAP (44  $\mu\text{M}$ ) y AIA (0.6  $\mu\text{M}$ ), bajo un fotoperíodo de 16 horas (2000 lux) a  $25 \pm 0.5$  °C (Custer et al., 1980). Se

desarrollan 2.2 brotes por nudo, en promedio, después de 2 a 5 semanas de cultivo. El uso del ANA (1.1  $\mu\text{M}$ ) en completa oscuridad promueve un buen establecimiento de estos brotes jóvenes de café. Se recomienda emplear plantas in vitro de un mínimo de tres meses de edad para escindir de ellas las secciones nodales, y conservar sus hojas durante el cultivo. Dublin (1980) ha utilizado técnicas similares con plantas de *Arabusta*; los brotes se desarrollaron en el medio suplementado con extracto de malta (400 mg/litro) y BAP (4.4  $\mu\text{M}$ ).

### Yemas ortótropas

Para los cultivos nodales de ramas ortótropas de cafeto, las plantas donantes se obtuvieron del invernadero (alrededor de 10 meses de edad), del vivero (de 1 a 2 años) o de parcelas de campo (de 15 a 20 años). Los brotes ortótropos verdes, con 4 a 6 nudos, fueron escindidos de las plantas. Después de lavarlos con detergente al 1% y con agua estéril, los tejidos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2.6% durante 30 minutos bajo agitación continua (150 rpm). Los brotes escindidos de las plantas del vivero o de las que crecían en el campo se incubaron en una cámara húmeda durante la noche y se sometieron a una segunda desinfección, como se describió anteriormente. En todos los brotes ortótropos se eliminaron los meristemas apicales. Al nudo más próximo al meristema apical se asignó el número 1. Cuando fue posible, se cultivaron los nudos sin escindir el par foliar insertado, que se recortó a la mitad o a una tercera parte de su tamaño original.

El medio primario era el medio B5 modificado que contenía pirodixina (15  $\mu\text{M}$ ), ácido nicotínico (15  $\mu\text{M}$ ), tiamina (30  $\mu\text{M}$ ), inositol (550  $\mu\text{M}$ ), cisteína (500  $\mu\text{M}$ ), sacarosa (87 mM), BAP (25-50  $\mu\text{M}$ ), AIA (10  $\mu\text{M}$ ), carbón activado (2.5 g/litro), PVP-40 (1 g/litro), y agar (7 g/litro). Se utilizaron botellas con tapa de rosca de 150 ml de capacidad, aunque se llenaron sólo con 25 ml del medio. En las botellas se colocaron nudos individuales; y luego fueron selladas con una película de PVC de 16.5 mm. Esta película presentaba las siguientes características de permeabilidad: al  $\text{CO}_2$ , 10  $\text{cm}^3/\text{cm}^2$  en 24 h; al  $\text{O}_2$ , 2  $\text{cm}^3/\text{cm}^2$  en 24 h; al  $\text{N}_2$ , 0.4  $\text{cm}^3/\text{cm}^2$  en 24 h; y al vapor de agua, 10  $\text{mg}/\text{cm}^2$  en 24 h.

Los cultivos nodales se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo una iluminación de 500 lux y con un fotoperíodo de 14 horas. La contaminación fue muy alta durante el cultivo primario. Los nudos más altos de las plantitas presentaron un 60% de contaminación, que alcanzó en los nudos inferiores (números 4 a 6) niveles de 90 a 100%. Los datos, promedios de

824 explantes nodales de cuatro cultivares diferentes de plantas de café que crecían en el campo, presentaron frecuencias de 43% de contaminación y 42% de oxidación.

El desarrollo de las yemas ortótropas inactivas de cultivos nodales se hace visible durante la tercera semana de cultivo (Figura 27.1, D). El número de yemas desarrolladas por nudo varía de 1 a 6, y está parcialmente controlado por el nivel de citocinina. Niveles más altos de citocinina inducen el desarrollo de un mayor número de yemas, pero pueden ocasionar efectos adversos en el crecimiento posterior de los brotes derivados de ellas y pueden disminuir las frecuencias de establecimiento. En relación con la fuente de citocinina, el BAP ha demostrado ser más eficiente que KIN tanto a 25  $\mu\text{M}$  (2.1 contra 1.2 yemas por nudo desarrollado) como a 50  $\mu\text{M}$  (2.3 contra 1.4 yemas por nudo).

Se ensayó el efecto del AG en la elongación de los entrenudos del brote. No se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se adicionó AG, esterilizado en autoclave o mediante filtros de membrana, a medios sólidos; en los pocos tratamientos efectivos se aplicaron 25-50 ppm de AG directamente a los brotes en desarrollo, en el momento de la escisión anterior a su establecimiento.

A lo largo de los brotes ya desarrollados aparecían tres nudos (Figura 27.1, E), aproximadamente a los 60 días de cultivo primario, que podían escindir-se, separarse y establecerse. Las mejores frecuencias de establecimiento (60%) se han registrado con los brotes tratados con AIB (10  $\mu\text{M}$ ). Un medio de doble capa puede utilizarse para el establecimiento: el medio basal suplementado con AIB (10  $\mu\text{M}$ ) se extiende en la capa superior y el medio básico con carbón activado (2.5 g/litro) en la inferior. Otra técnica de establecimiento consiste en tratar los brotes no desarrollados con una solución de auxina líquida durante 10 días y luego transferirlos a un medio basal o a un puente de papel (Figura 27.1, F). Finalmente, los brotes tratados con una preparación de talco de la auxina también han presentado altas frecuencias de establecimiento (60%) en el medio basal sólido.

Después de la escisión de los primeros brotes desarrollados, los explantes nodales se transfieren a un medio primario fresco con el fin de recuperar el resto de las yemas ortótropas inactivas. Un explante nodal puede sobrevivir de 2 a 3 subcultivos y permite por ello recuperar la mayor parte de las yemas inactivas; en varios casos, 9 ó 10 de las yemas en desarrollo se han recuperado después de la tercera transferencia bimensual, es decir, a los 6 meses de cultivo continuo. Las yemas desarrolladas de los explantes nodales originales se denominan yemas o brotes primarios; en cambio, las

que se han desarrollado de los nudos de los brotes primarios se denominan yemas o brotes secundarios.

En un experimento con un cultivo nodal de plantas de café (*C. arabica* cv. Mundo Novo) de un año de edad, se registraron las frecuencias de desarrollo, por nudo, de las yemas primarias y secundarias luego de seis meses de cultivo continuo con transferencias bimensuales. Una frecuencia de 1.33 yemas por nudo desarrollado se observó después de los primeros 60 días de cultivo; al final del segundo período de cultivo (120 días) la frecuencia acumulada fue de 4.5 yemas/nudo; y al final del tercer período de cultivo (180 días) esa frecuencia fue de 7.5 yemas por nudo. Estos datos muestran el potencial de las yemas ortótropas inactivas para la propagación vegetativa de plantas superiores de café mediante la técnica del cultivo nodal (Sondahl y Nakamura, 1980; Nakamura y Sondahl, 1981). Al término de los 120 días se observó una recuperación del 45% de todas las yemas inactivas. Si se consideran ahora los datos experimentales, se puede hacer una estimación teórica de la tasa de multiplicación, de la siguiente manera:

- Primer período de crecimiento (6 meses) = 26 brotes de 3 nudos.
  - Segundo período de crecimiento (3 meses) = 104 brotes de 3 nudos.
  - Tercer período de crecimiento (3 meses) = 415 brotes de 3 nudos.
- Los nudos procedían de cultivos nodales de una rama ortótropa que contenía 6 nudos.

Este protocolo permite pues la recuperación de 415 brotes de una rama de 6 nudos después de 12 meses de cultivo continuo. Puesto que una planta de café tiene varias ramas ortótropas que pueden utilizarse para este fin, en el lapso de un año se obtiene un número mayor de plántulas mediante esta técnica. En conclusión, el número final de brotes propagados variará según el número de ramas ortótropas utilizadas de cada planta donante o según las pérdidas debidas tanto a la contaminación y oxidación de los brotes como a la eficiencia del establecimiento de los cultivos.

## **Aspectos Teóricos de la Embriogénesis Somática**

### **Hipótesis de trabajo**

Se ha asociado frecuentemente la embriogénesis somática *in vitro* con la presencia de un tejido cuya estructura organizada contiene pequeñas células periféricas (10-20  $\mu$  de diámetro) que se dividen activamente (ciclo

celular corto). Estas células tienen núcleos basófilos y nucléolos prominentes, típicos de una intensa actividad de ARN. Este tejido se expande a causa de sucesivas divisiones celulares pero más tarde, en el desarrollo, las células hijas se cimentan unas con otras y adoptan la polaridad en el curso de su diferenciación. Las estructuras globulares se vuelven visibles y anuncian las formas finales del embrión.

El tejido se reconoce en todos los casos de ESAF y se denomina tejido embriogénico (TE). La intensidad de la fase inicial de la actividad mitótica antes de la formación de las estructuras globulares, al igual que el lapso transcurrido hasta que aparece el TE, pueden variar entre las especies y entre las fuentes del explante. En cultivos foliares del género *Coffea*, el TE es muy distinto y ha sido totalmente caracterizado. Es importante subrayar que el TE debería rastrearse hasta las células embriogénicas maternas (CEM), es decir, aquéllas que se hallan en una etapa regulatoria particular del ciclo celular y que toman la vía embriogénica activadas por condiciones específicas del cultivo.

Se pueden distinguir dos patrones generales de desarrollo de la embriogénesis in vitro:

1. **Embriogénesis directa:** los embriones se originan directamente de los tejidos sin que haya proliferación de callo, como ocurre con las células epidérmicas del hipocótilo en la zanahoria silvestre y en *Ranunculus sceleratus* (Kato y Takeuchi, 1966; Konar y Nataraja, 1965).
2. **Embriogénesis indirecta:** la proliferación de callo y el TE están asociados con el desarrollo del embrión como ocurre con el floema secundario de la zanahoria doméstica, con el tejido foliar del café, con el polen del arroz y de algunas otras gramíneas, y con otros tejidos.

La embriogénesis directa procede de células proembriogénicas determinadas (CPD), mientras que la embriogénesis indirecta requiere de la redeterminación de células diferenciadas, de la proliferación de callo, y de la inducción de células embriogénicas determinadas (ICED) (Figura 27.2).

Aparentemente, las CPD requieren ya sea de la síntesis de una sustancia inductora o de la eliminación de una sustancia inhibidora para reanudar su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico. En cambio, las células sometidas a una diferenciación del tipo ICED necesitan tener una sustancia mitogénica o estar expuestas a concentraciones específicas de reguladores del crecimiento —o cumplir ambos requisitos— para entrar de nuevo al ciclo mitótico. La inactivación puede ocurrir en cualquier paso de este proceso.

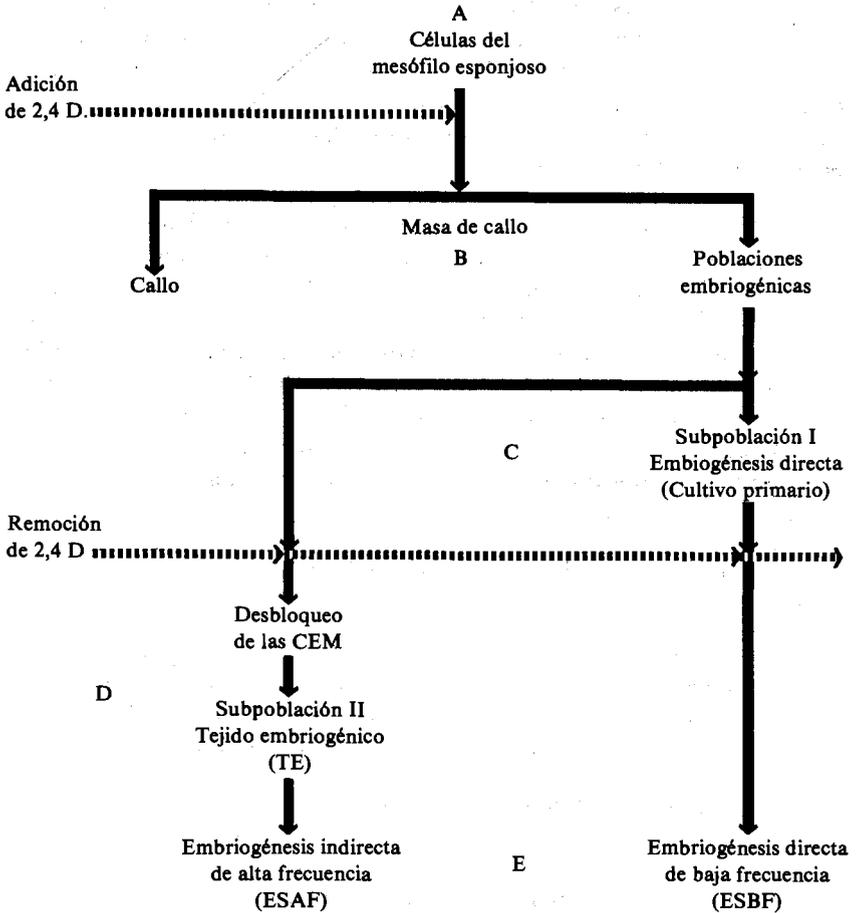


Figura 27.2. Modelo de desarrollo de la embriogénesis somática en explantes foliares de café. A) Células de mesófilo esponjoso o en fase  $G_0$  que reingresan al ciclo celular en presencia de 2,4-D y de KIN. B) Dos poblaciones de células, por lo menos, están presentes en la masa de callo: las células de callo (largas, muy vacuoladas) y las células embriogénicas (esféricas, de citoplasma denso). C) Una subpoblación de células embriogénicas sigue el patrón de la embriogénesis directa (ESBF), todavía en cultivo primario; la germinación del embrión ocurre al hacer la transferencia al medio secundario. D) La remoción del 2,4-D durante el cultivo secundario permite la diferenciación, como tejido embriogénico, de la segunda subpoblación de células. E) Embriones somáticos completamente diferenciados que se derivan de la subpoblación I (baja frecuencia) y de la subpoblación II (alta frecuencia). Debido al proceso de diferenciación hay una diferencia de tiempo de 1 a 2 meses entre estos dos grupos de embriones somáticos.

Cada fase del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  y M) posee una maquinaria sintética específica que está bajo control. La duración de las fases S y M (síntesis del DNA y mitosis) es relativamente constante en un sistema tisular dado, mientras que la duración de  $G_1$  y  $G_2$  (fases de crecimiento anterior y posterior, respectivamente, a la síntesis del DNA) es variable. Los puntos principales de control del ciclo celular mitótico están situados en  $G_1$  y  $G_2$  (Van't Hof et al., 1972). Se ha sugerido que la decisión de proliferar y el destino de las células hijas después de la mitosis ocurren en estas etapas críticas.

Se postula en este trabajo que tanto la concentración total de reguladores del crecimiento, exógenos y específicos como la relación de las concentraciones de diferentes reguladores en el medio de cultivo tienen un doble papel en la iniciación de la embriogénesis. En primer lugar, los reguladores del crecimiento manejan o bien la iniciación de la división celular, es decir, el reingreso de las células al ciclo celular mitótico en  $G_0$  (un estado especial no operacional del ciclo celular), o bien los puntos principales de control de Van't Hof en  $G_1$  o en  $G_2$ . En segundo lugar, los reguladores del crecimiento desempeñan un papel directo o indirecto en el control de la síntesis de los factores citoplásmicos durante las fases  $G_1$  y  $G_2$ . En el momento de la citocinesis, ocurriría una división mitótica cuántica que resultaría en dos células hijas fenotípicamente diferentes y comprometidas en patrones de desarrollo diferentes.

Debe comprenderse que las divisiones celulares precedentes pueden influir en la diferenciación posterior; los eventos ocurridos en los ciclos celulares pueden determinar o limitar las vías de citodiferenciación que las células puedan tomar más tarde. Un largo intervalo de tiempo puede separar una división celular reguladora de la aparición de signos visibles de citodiferenciación. Se presume que durante una división celular cuántica una de las células hijas sigue siendo meristemática, mientras que la otra está determinada para desarrollarse como célula madre diferenciada.

Importa explicar aquí el concepto de poblaciones fenotípicas múltiples en cultivos de tejidos de plantas (Webster y Davidson, 1968). Los explantes utilizados para el establecimiento de cultivos primarios consisten generalmente en una gama de poblaciones fenotípicas celulares que pueden caracterizarse según su morfología celular básica, sus características bioquímicas, y el tiempo de su ciclo celular mitótico. Estas células tienen diferentes destinos en su desarrollo, determinados por la diferente expresión de la secuencia del ADN. Además, algunas de estas poblaciones celulares se están dividiendo activamente mientras que otras se hallan en fases anteriores a la mitosis ( $G_0$ ,  $G_1$  ó  $G_2$ ).

Sería ingenuo esperar que una combinación específica de reguladores del crecimiento tuviese un efecto uniforme en poblaciones de células fenotípicamente mixtas. En cambio, se esperaría que cierta proporción de reguladores del crecimiento afectase la mitosis o la redeterminación —o ambos fenómenos— de una población celular fenotípica en particular. Por tanto, se sugiere que las células embriogénicas maternas (CEM) descendan de una población de células que son receptoras a una concentración reguladora del crecimiento embriogénico-inductor crítico o a cierta proporción de las concentraciones de las sustancias reguladoras del crecimiento (auxina y citocinina). Tales células están redeterminadas respecto a sus opciones de desarrollo durante una división mitótica cuántica *in vitro* que resulta en dos hijas, una de las cuales es probablemente la célula embriogénica madre.

Parecería que los reguladores del crecimiento —en particular las auxinas y las citocininas— tienen dos funciones en el medio de cultivo de acondicionamiento (medio de cultivo primario): a) la determinación de las CEM y b) la sincronización de las CEM. Por consiguiente, esta población celular se encuentra probablemente en un estado de inactivación mitótica hasta que se subcultive en un medio de inducción embriogénico del cual se haya removido la auxina, que con frecuencia es 2,4-D. Este traslado libera probablemente las CEM de la inactivación mitótica y permite el ulterior desarrollo embrionario.

Las secuencias de desarrollo que conducen al TE no han sido aún totalmente explicadas. Es posible que los reguladores del crecimiento induzcan la diferenciación de una población distinta de células mediante alguno de los siguientes mecanismos:

- a. La proliferación de una población fenotípica única del explante original, como un cambium o un floema secundario.
- b. La prolongación de un ciclo celular mitótico de una población celular particular, causando interferencia en uno o más puntos de control y de redeterminación.
- c. La determinación y la inactivación de una población celular diferenciada en el ciclo celular, con un bloqueo de  $G_0$  o  $G_1$  o  $G_2$ .

En la literatura científica hay muy poca información que relacione los reguladores del crecimiento con las actividades del ciclo celular. La KIN puede causar un bloqueo en la interfase  $G_1/S$  (McLeod, 1968). La KIN puede afectar la oxidación de carbohidratos porque inhibe la glicólisis; en consecuencia, aumenta la oxidación de carbohidratos en la derivación de

las pentosas, una variante del ciclo glicolítico (McLeod, 1968). Los procesos de transcripción y traslación en las diferentes poblaciones celulares que comprenden los tejidos de callo se encuentran obviamente afectados en los intervalos de fase de su ciclo celular, en diferentes medios de cultivo. Probablemente los reguladores del crecimiento que se añaden al medio de cultivo controlan la morfogénesis indirectamente, no específicamente, mediante el control de la división celular y el envejecimiento celular. Es interesante observar, según se ha informado, que el envejecimiento del callo, la omisión de la sacarosa del medio, o la irradiación gamma estimulan la embriogénesis en tejidos de óvulo no fertilizado de *Citrus sinensis* Shamouti (Kochba y Button, 1974). Existe un informe de una correlación positiva entre el aumento de la concentración de 2,4-D y el aumento del tiempo promedio de generación, en la suspensión celular de zanahoria (Bayliss, 1977). También se encontró que la duración mitótica aumentaba y el índice mitótico disminuía al elevar las concentraciones de 2,4-D de 0.5 a 70  $\mu\text{M}$  (Bayliss, 1977). Estos resultados se interpretaron como un bloqueo, o una prolongación, de  $G_1$  y  $G_2$ , y como la prolongación de la profase y la metafase en relación con la anafase y la telofase. Es interesante notar que la embriogénesis somática de la zanahoria ocurre sólo después de la remoción del 2,4-D, y que el umbral de concentración de 2,4-D para la inhibición embrionaria es de 0.1  $\mu\text{M}$ .

Los picos en la actividad de la peroxidasa están asociados con la aparición de embriones somáticos en los tejidos ovulares del naranjo. Un análisis de las isoenzimas de estos tejidos revela una banda catódica que está claramente asociada con el proceso embriogénico (Kochba et al., 1977). El acortamiento de  $G_1$  y el aumento de la actividad de la peroxidasa se han descrito también asociados con el desarrollo en forma de capucha de los primordios de cebada (Gupta y Stebbins, 1969).

## **El sistema del café**

Es sorprendente la activación de la ESAF (hasta el 60%) y su eficacia mediante la adición de 2,4-D en combinación con KIN durante el cultivo primario. Otras fuentes de auxinas (AIB y ANA) en combinación con KIN no son muy efectivas en la inducción de la ESAF (10% a 20%). Sin embargo, ANA en combinación con la cinetina induce la ESBF hasta en 60% de los frascos cultivados. Además, la remoción del 2,4-D y la disminución de las concentraciones de ANA y de KIN, en el medio de inducción de los cultivos secundarios, se consideran esenciales para el desarrollo de los embriones somáticos de la ESAF en *Coffea* spp. El papel efectivo y preferencial del 2,4-D en la activación de las secuencias de desarrollo que

conducen a la ESAF no puede explicarse totalmente en este momento. Los callos inducidos con 2,4-D y ANA parecen fenotípicamente similares cuando se hace una observación visual. Sin embargo, es posible que 2,4-D induzca la diferenciación de una población diferente de células. Se requiere más trabajo experimental para explicar el efecto fisiológico diferente de 2,4-D o de ANA cuando inducen la embriogénesis somática en los tejidos foliares del café.

Dos poblaciones distintas de células aparecen en la masa de callo durante el cultivo de tejidos del café: una consta de células elongadas y la otra de pequeñas células esféricas. Los explantes foliares desarrollan un tejido de callo blando de color crema que contiene células elongadas similares al parénquima (alrededor de  $140 \times 25 \mu$ ) durante el cultivo primario. Después de 50 días en el cultivo primario, los tejidos de callo toman un color marrón y ya no se observa su proliferación. Después de 16 a 19 semanas de cultivo secundario en un medio de inducción, del que se remueve más tarde el 2,4-D, es aparente la diferenciación, en el tejido de callo, de un tejido embriogénico friable. Este tejido se aísla de la masa de callo original a medida que ocurre la proliferación de células las cuales se separan hacia el medio de cultivo circundante. El tejido embriogénico consta de pequeñas células esféricas que se dividen con mucha frecuencia durante el desarrollo temprano.

En este período de proliferación, todas las células esféricas hijas, resultantes de estas divisiones, se separan unas de otras. En un período posterior, las células hijas originadas de las esféricas ya no se separan más sino que permanecen como un tejido coherente. Estos cambios conducen al desarrollo de los embriones globulares, que son las primeras estructuras en el desarrollo embrionario in vitro de las células de *Coffea* sp. Recientemente se ha encontrado que la ESBF, en particular, puede inducirse de explantes foliares de café cultivados en un medio basal, con un suplemento de citocinina y sin auxina. La sensibilidad diferencial a los reguladores del crecimiento de las plantas, los lapsos entre la ESBF y la ESAF, y el patrón de diferenciación de la ESBF sugieren que las células madre de la ESBF provienen de una población celular distinta de aquella responsable de la ESAF. Un modelo de desarrollo para la embriogénesis somática de explantes foliares de café se presenta en la Figura 27.2.

## Resumen de la hipótesis

Las condiciones de cultivo, especialmente los reguladores del crecimiento de las plantas, desempeñan un papel importante en la inducción de la actividad mitótica de diferentes poblaciones celulares de los tejidos

cultivados. Esas condiciones propiciarán diferentes tiempos de los ciclos celulares y diversos bloqueos, según el estado regulatorio particular de una población de células. Los embriones somáticos pueden rastrearse hasta las CEM que están asociadas con dos secuencias de desarrollo: la de las células proembriogénicamente determinadas (CPD) y la inducción de células embriogénicamente determinadas (ICED).

El estrés derivado del ambiente y del cultivo puede afectar selectivamente las diferentes poblaciones celulares, favoreciendo en ellas los cambios regulatorios y de sincronización en el ciclo celular así como la determinación de las CEM. Al aumentar la población de CEM de un sistema particular, puede hacerse un análisis más detallado (niveles citológicos y bioquímicos) y se observará que también aumenta la producción de los embriones somáticos.

Se espera que la marcación del ADN permita una estrecha monitoría de la acción (o las acciones) de los genes durante la determinación de las CEM y en su posterior desarrollo.

La secuencia de desarrollo de CPD deberá diferir de la ICED durante las etapas iniciales de cultivo, para que la comparación entre estas dos vías ayude a comprender el control de la embriogénesis somática. El modelo para la diferenciación de los embriones somáticos (Figura 27.3) sugiere que las CEM están bien asociadas ya sea con las CPD o con las de ICED. El modelo también explica el origen de la vía organogénica, que es una desviación de la vía embriogénica normal. La organogénesis se efectúa en una fase temprana de la formación del tejido embriogénico; por medio de ella las células hijas permanecen unidas entre sí, en un grupo celular sin bipolaridad.

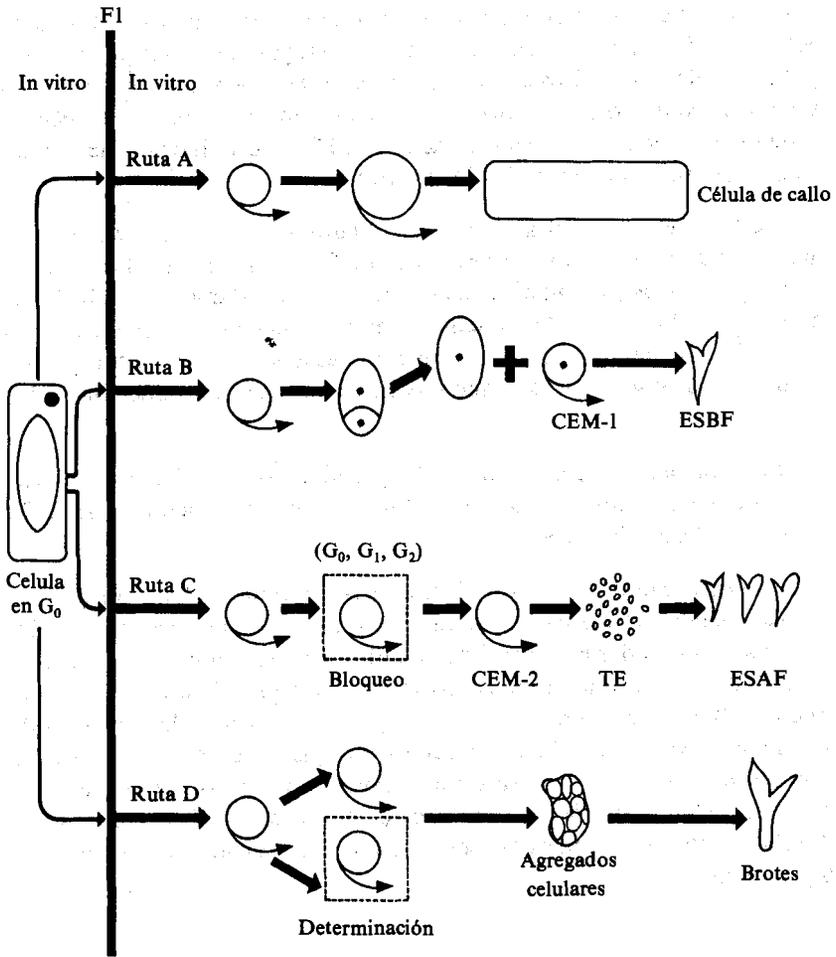


Figura 27.3. Modelo de diferenciación de embriones somáticos para la regeneración de plantas in vitro. A, B, C y D se refieren a cuatro vías distintas de diferenciación que siguen las divisiones celulares in vitro. **Ruta A:** Divisiones celulares sucesivas que conducen a la célula de callo. **Ruta B:** División celular desigual, y redeterminación orientada a la célula embriogénica madre CEM-1 y a la embriogénesis directa. **Ruta C:** Redeterminación mediante un bloqueo celular y liberación de la célula embriogénica madre CEM-2; derivación del tejido embriogénico (TE) a partir de divisiones sucesivas de CEM-2; finalmente, formación del embrión de alta frecuencia. **Ruta D:** Durante la división celular in vitro, algunas poblaciones celulares se determinan para seguir la vía de organogénesis que conduce a la formación de brotes. Este modelo propone que tanto la embriogénesis como la organogénesis podrían rastreadse hasta una sola célula, que se predetermina in vivo o se induce in vitro mediante las condiciones del cultivo.

## Referencias

- Bayliss, M. W. 1977. The effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Daucus carota*. *Plant Sci. Lett.* 8:99-111.
- Custer, J. B. M.; van Ee, G. y Buijs, L. C. 1980. Clonal propagation on *Coffea arabica* L. by nodal culture. En: Colloque de l'Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). 9ème, Londres.
- Dublin, P. 1980. Multiplication végétative in vitro de l'*Arabusta*. *Café-Cacao-Thé* 24:281-290.
- Gupta, V. y Stebbins, G. L. 1969. Peroxidase activity in hooded and awned barley at successive stages of development. *Biochem. Genet.* 3:15.
- Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica*) by in vitro culture of shoot apical meristems. *Plant Sci. Lett.* 22:301-307.
- Kato, H. y Takeuchi, M. 1966. Embryogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. *Sci. Papers College Gen. Educ. Univ. Tokyo* 16:245.
- Kochba, J. y Button, J. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the Shamouti orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *Z. Pflanzenphysiol.* 73:415.
- ; Lavee, S. y Spiegel-Roy, P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic Shamouti orange ovular callus lines. *Plant & Cell Physiol.* 18:463-467.
- Konar, R. N. y Nataraja, K. 1965. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L.: Development of embryos from the stem epidermis. *Phytomorphology* 15:132.
- MacLeod, R. D. 1968. Changes in the mitotic cycle in lateral root meristems of *Vicia faba* following kinetin treatment. *Chromosoma* 24:177.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473.
- Nakamura, T. y Sondahl, M. R. 1981. Multiplicação in vitro de genes ortotropicas em *Coffea* spp. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 9o., São Lourenço, Brasil. *Memorias.* p. 162-163.
- Sondahl, M. R. y Sharp, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 81:395-408.

- y Sharp, W. R. 1979. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. En: Sharp, W. R.; Larsen, P. O.; Paddock, E. F. y Raghavan, V. (eds.). Plant cell and tissue culture: Principles and applications. Ohio State University Press, Columbus, Ohio, E.U. p. 527-584.
- ; Salisbury, J. L. y Sharp, W. R. 1979a. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. Z. Pflanzenphysiol. 94:185-188.
- ; Spahlinger, D. A. y Sharp, W. R. 1979b. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 94:101-108.
- y Nakamura, T. 1980. Propagação vegetativa *in vitro* de *Coffea* spp. En: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 8o., Campos Jordão, Brasil. p. 129.
- Van't Hof, J. y Kovacs, C. 1972. Mitotic cycle regulation in the meristem of culture roots: The principal control point hypothesis. En: Miller, M. W. y Ceuhner, C. C. (eds.). The dynamics of the meristem cell populations. Plenum Press, Nueva York. p. 13-33.
- Webster, P.L. y Davidson, D. 1968. Evidence from thymidine-<sup>3</sup>H labeled meristems of *Vicia faba* of two cell populations. J. Cell Biol. 39:332.