



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

## **ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Colombia)**

**CONSUELO MARGARITA AVILA VICTOR**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2019**



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe, **Consuelo Margarita Avila Victor**, Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Alejandrina Robledo Paz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Establecimiento de un Sistema de Producción y Multiplicación *In Vitro* de Plantas de Café (*Coffea arabica* L. var. Colombia)**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 23 de julio de 2019

Consuelo Margarita Avila Victor

Vo. Bo. de la Dra. Alejandrina Robledo Paz

La presente tesis titulada “**Establecimiento de un Sistema de Producción y Multiplicación *in vitro* de Plantas de Café (*Coffea arabica* L. var. Colombia)**”, realizada por la alumna: **Consuelo Margarita Avila Victor**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**CONSEJO PARTICULAR**

**Consejera**

\_\_\_\_\_  
Dra. Alejandrina Robledo Paz

**Asesor**

\_\_\_\_\_  
Dr. Víctor Manuel Ordaz Chaparro

**Asesor**

\_\_\_\_\_  
Dr. Enrique de Jesús Arjona Suárez

**Asesor**

\_\_\_\_\_  
Dr. Leobardo Iracheta Donjuan

**Asesor**

\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Carlos Gómez Merino

Montecillo, Texcoco, México, agosto de 2019

# ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Colombia)

Consuelo Margarita Avila Victor, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

El café es uno de los cultivos más importantes en el mundo. Existen más de 124 especies, pero solo dos tienen importancia comercial, arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora* var. Robusta), mismas que representan el 70 % y 30 % respectivamente, de la producción mundial. La embriogénesis somática ha permitido la propagación masiva de diferentes genotipos de café; no obstante, la eficiencia de los protocolos de propagación por embriogénesis somática depende del genotipo, motivo por el cual es necesario establecer las condiciones de cultivo para cada variedad o especie. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo para la producción *in vitro* de plantas de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia) mediante embriogénesis somática. En este estudio se cultivaron segmentos foliares (explantes) en el medio Murashige y Skoog suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 109 mg L<sup>-1</sup> de sorbitol más 2.3 o 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel, con lo que se logró que 90 % de los explantes formaran callo embriogénico (31.38 % fue friable y 68.62 % compacto). El número más alto de embriones por gramo de callo se obtuvo cuando se combinó el callo compacto con 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel. En cuanto a embriogénesis somática indirecta, el mayor número de embriones por gramo de callo se formó en los callos obtenidos con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel. El medio de desarrollo que contenía 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA, permitió que 51 % de los embriones globulares alcanzaran la etapa cotiledonar. Veinte por ciento de los embriones cultivados en una mezcla

vermiculita:perlita (3:1) se convirtieron en plantas. El número de embriones por gramo de callo formados mediante embriogénesis indirecta (153.2) fue significativamente mayor que aquellos generados por embriogénesis directa (10.3).

**Palabras clave:** Embriogénesis somática, callogénesis, vitroplantas, micropropagación, café

**ESTABLISHMENT OF AN *IN VITRO* PRODUCTION AND MULTIPLICATION  
SYSTEM OF COFFEE PLANTS (*Coffea arabica* L. var. Colombia)**

Consuelo Margarita Avila Victor, Ph. D.

Colegio de Postgraduados, 2019

**ABSTRACT**

Coffee is one of the most important crops in the world. There are more than 124 species, but only two have commercial importance, arabica (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora* var. Robusta), which represent 70 % and 30 % respectively, of worldwide production. Somatic embryogenesis has allowed the massive propagation of different coffee genotypes; however, the efficiency of propagation protocols for somatic embryogenesis depends on the genotype, for that reason, is necessary to establish the culture conditions for each variety or species. The objective of this research was to develop a protocol for the *in vitro* production of coffee plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) by somatic embryogenesis. In this study foliar segments (explants) were grown on the Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D; 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, 109 mg L<sup>-1</sup> sorbitol plus 2.3 or 5.0 g L<sup>-1</sup> phytagel, which allowed 90 % of the explants to form embryogenic callus (31.38 % was friable and 68.62 % compact). The highest number of embryos per gram of callus was obtained when the compact callus was combined with 5.0 g L<sup>-1</sup> phytagel. Regarding indirect somatic embryogenesis, the greatest number of embryos per gram of callus was formed in calli obtained with 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 1.1 mg L<sup>-1</sup> BAP and 5.0 g L<sup>-1</sup> phytagel. The development medium containing 0.25 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.25 mg L<sup>-1</sup> AIA, allowed 51 % of the globular embryos to reach the cotyledonary stage. Twenty percent of the embryos grown in a vermiculite:perlite mixture (3:1) became plants. The number of embryos per gram of callus formed

by indirect embryogenesis (153.2) was significantly higher than those generated by direct embryogenesis (10.3).

**Key words:** Somatic embryogenesis, callogenesis, vitroplants, micropropagation, coffee

## AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** por mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme los recursos económicos para realizar los estudios de doctorado.

A la **Dra. Alejandrina Robledo Paz** por su confianza depositada en mí, por sus conocimientos transmitidos durante mi formación académica, por ser mi guía y soporte durante esta investigación; pero sobre todo gracias por su cariño y comprensión.

Al **Dr. Víctor Manuel Ordaz Chaparro** por ser mi apoyo incondicional en todo momento, gracias por tus palabras de aliento.

Al **Dr. Enrique de Jesús Arjona Suárez** por sus conocimientos aportados en esta investigación, gracias su paciencia y dedicación.

Al **Dr. Leobardo Iracheta Donjuan** gracias por sus valiosas aportaciones, su disposición y su tiempo invertidos en esta investigación.

Al **Dr. Fernando Carlos Gómez Merino** por sus contribuciones e interés puesto en esta investigación.

Al **M. C. Jorge Valdez Carrasco** por su apoyo ilimitado en la obtención y edición de las imágenes de este trabajo.

A todos y cada uno de los doctores y al personal administrativo que de manera directa o indirecta contribuyeron en la realización de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

### **A mi padre: Ramiro Avila Jarero**

Gracias por tu cariño infinito, por tus consejos, por ser mi compañero de vida, mi fortaleza, mi aliciente, mi consejero, mi todo. Gracias por dejarme ser, por tu confianza. Algún día estaremos juntos de nuevo. Espero que donde te encuentres estés de lo mejor.

### **A mi madre: Consuelo Victor Gutiérrez**

Gracias Chelin por ser mi consuelo y apoyo incondicional en cada paso de mi vida, por tu cariño y comprensión mil gracias.

### **A mis hermanas: Beatriz Adriana y Martha Cecilia**

Gracias por ser mis compañeras en este camino llamado vida, las amo.

### **A mi hermano: Francisco Javier; sus hijas: Daniela Paola y Paula Sofía y mi cuñada: Norma Fabiola**

Gracias por su apoyo, por creer y confiar en mí en todo momento de mi vida.

### **A mi hermano: Rodrigo, sus hijas: Regina y Romina y mi cuñada: Ivonne**

Que aun en la distancia le dan sentido a mi vida formando parte de mi familia.

### **A mi compañero de aventura: David Trujano San Luis**

Por tu paciencia, comprensión, cariño y apoyo incondicional mil gracias.

### **A mis amigos:**

Isabel, Jael, Violeta, Luis, Benjamín, Rafael y Luvia por hacer más divertida y llevadera esta aventura.



## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	vi
CONTENIDO .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE CUADROS.....	xv
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 General.....	4
2.2 Específicos .....	4
3. HIPÓTESIS.....	5
3.1 General.....	5
3.2 Específicas .....	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
4.1 Generalidades del cultivo.....	6
4.2 Mejoramiento genético de café .....	8
4.2.1 Convencional.....	9
4.3 Biotecnología .....	10
4.4 Cultivo de tejidos vegetales .....	12
4.5 Embriogénesis somática.....	13
4.5.1 Maduración, germinación y conversión de embriones somáticos.....	16
5. LITERATURA CITADA .....	18
CAPÍTULO I. TIPO DE CALLO Y PHYTAGEL EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA DE CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia) .....	26
RESUMEN .....	26
ABSTRACT.....	28
1.1. INTRODUCCIÓN .....	30
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
1.2.1. Desinfestación.....	31



1.2.2.	Inducción de callo embriogénico .....	32
1.2.3.	Diferenciación (formación) de los embriones somáticos.....	33
1.2.4.	Histología.....	33
1.2.5.	Análisis estadístico.....	33
1.2.6.	Desarrollo, germinación y conversión de los embriones .....	34
1.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
1.3.1.	Nivel de phytigel .....	34
1.3.2.	Tipo de callo.....	36
1.3.3.	Efecto de tratamientos (interacción nivel de phytigel y tipo de callo).....	37
1.3.4.	Análisis histológico del callo embriogénico .....	39
1.3.5.	Desarrollo, germinación y conversión de los embriones .....	41
1.4.	CONCLUSIONES .....	43
1.5.	LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS DE CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA.....		47
RESUMEN .....		47
ABSTRACT.....		48
2.1.	INTRODUCCIÓN .....	49
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	50
2.2.1.	Desinfestación.....	50
2.2.2.	Inducción de callo embriogénico .....	50
2.2.3.	Multiplicación de los callos embriogénicos.....	51
2.2.4.	Diferenciación (formación) de los embriones somáticos.....	53
2.2.5.	Desarrollo y maduración de los embriones.....	53
2.2.6.	Conversión .....	54
2.2.7.	Análisis estadístico.....	54
2.2.8.	Histología.....	54
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
2.3.1.	Inducción de callo embriogénico .....	55
2.3.1.1.	Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento .....	55
2.3.1.2.	Efecto de la concentración de phytigel .....	57



2.3.1.3. Efecto de la interacción combinación hormonal y phytigel (tratamientos) .....	58
2.3.2. Multiplicación de callo embriogénico.....	60
2.3.3. Diferenciación (formación) de los embriones somáticos.....	62
2.3.3.1. Efecto la combinación de reguladores de crecimiento .....	62
2.3.3.2. Efecto de la concentración de phytigel .....	63
2.3.3.3. Efecto de la interacción combinación de reguladores de crecimiento y phytagel	64
2.3.4. Desarrollo y maduración .....	66
2.3.5. Conversión .....	67
2.3.6. Análisis histológico de la embriogénesis somática.....	69
2.4. CONCLUSIONES .....	72
2.5. LITERATURA CITADA.....	72
CAPÍTULO III. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA E INDIRECTA EN <i>Coffea arabica</i> var. Colombia.....	78
RESUMEN .....	78
ABSTRACT.....	79
3.1. INTRODUCCIÓN .....	80
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	81
3.2.1. Desinfestación del material vegetal .....	81
3.2.2. Embriogénesis somática directa .....	81
3.2.3. Embriogénesis somática indirecta.....	82
3.2.4. Condiciones de cultivo .....	82
3.2.5. Variables de respuesta y diseño experimental .....	82
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	83
3.3.1. Embriogénesis somática directa .....	83
3.3.2. Embriogénesis somática indirecta.....	85
3.4. CONCLUSIONES .....	88
3.5. LITERATURA CITADA .....	88
CONCLUSIONES GENERALES.....	92

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Tipos de callo embriogénico en *Coffea arabica* L. var. Colombia. (a) Callo friable a las ocho semanas de cultivo. (b) Callo compacto dos meses después de la siembra. (c) Formación de masas proembriogénicas en callo friable. (d) Callo compacto con masas proembriogénicas. (e) Histología de callo friable. (f) Histología de callo compacto. (g) Formación de embriones a los seis meses de cultivo a partir de callo friable. (h) Embriones formados en callo embriogénico después de seis meses de cultivo. cf: callo friable, cc: callo compacto, mpe: masas proembriogénicas; f: fenoles; e: embriones. .... 42
- Figura 1.2. Plantas de *Coffea arabica* L. var. Colombia regeneradas por embriogénesis somática indirecta. .... 43
- Figura 2.1. Embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). (a) Callo embriogénico generado en medio de inducción a partir de explantes de hoja después de ocho semanas de cultivo. (b) Multiplicación de callo embriogénico en medio líquido después de 12 semanas. (c) Embriones en distintas fases de desarrollo. (d) Embriones germinados después de un mes de cultivo en medio de desarrollo. (e) Vitroplanta de café cultivada en vermiculita:perlita. (f) Planta de café regenerada *in vitro* cultivada en condiciones de invernadero. .... 68
- Figura 2.2 Histología de la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. var Colombia. (a) Masa proembriogénica formándose a partir de un callo primario. (b) Embriones somáticos diferenciados sobre la masa proembriogénica que produce fenoles. (c) Embrión globular a las 16 semanas de cultivo en el medio de diferenciación. (d) Embrión en etapa de corazón después de 18 semanas de cultivo en medio de diferenciación. (e) Embrión en etapa torpedo después de 19 semanas de cultivo en el medio de diferenciación. (F) Embrión en etapa cotiledonar en el que se observa la protodermis y el procambium. Cp: callo primario; mpe: masa proembriogénica; f: fenoles; e: embriones; pd: protodermis; pc: procambium. .... 71



- Figura 3.1. Embriogénesis somática directa de *Coffea arabica* var. Colombia. (a) Masas proembriogenicas. (b) Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. (c) Embriones somáticos en etapa cotiledonar. (d) Embriones somáticos germinados..... 83
- Figura 3.2. Embriogénesis somática indirecta en explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Colombia. (a) Callo compacto. (b) Callo friable. (c) Embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo. (d) Embrión somático germinado. .... 87



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Medios utilizados en la etapa de inducción de callo embriogénico en <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia. ....	32
Cuadro 1.2. Efecto del phytigel en las características de los callos generados a partir de explantes de hoja de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia. ....	35
Cuadro 1.3. Número de embriones formados por gramo de callo de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia obtenido en distintas concentraciones de phytigel. ....	36
Cuadro 1.4. Número de embriones generados por gramo de callo de <i>Coffea arabica</i> L var. Colombia provenientes de diferentes tipos de callo (friable y compacto) después de 6 meses de cultivo. ....	37
Cuadro 1.5. Número de embriones formados por gramo de callo de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia generados en distintos tratamientos después de seis meses de cultivo. ....	38
Cuadro 2.1. Tratamientos utilizados en la etapa de inducción de callo embriogénico. ....	52
Cuadro 2.2. Formación de callo en los explantes de hoja de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia expuestos a distintas combinaciones de reguladores de crecimiento, después de dos meses de tratamiento. ....	56
Cuadro 2.3. Respuesta de los explantes de hoja de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia a distintas concentraciones de phytigel después de dos meses de cultivo. ....	58
Cuadro 2.4. Respuesta de los explantes de hoja de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia a distintas concentraciones de reguladores de crecimiento y phytigel después de dos meses de tratamiento. ....	59
Cuadro 2.5. Biomasa producida por los callos embriogénicos de <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia durante la fase de multiplicación. ....	61
Cuadro 2.6. Número de embriones formados por los callos de <i>Coffea arabica</i> var. Colombia obtenidos en distintas combinaciones de reguladores de crecimiento. ....	62
Cuadro 2.7. Número de embriones por gramo de callo generados en los distintos tratamientos de crecimiento. ....	65
Cuadro 2.8. Porcentaje de embriones globulares y torpedo que alcanzaron la madurez (etapa cotiledonar) después de 30 días de cultivo en los medios de desarrollo. ....	66



Cuadro 3.1. Embriogénesis somática directa en <i>Coffea arabica</i> var. Colombia después de seis meses de cultivo.....	84
Cuadro 3.2. Embriogénesis somática indirecta en <i>Coffea arabica</i> var. Colombia después de seis meses de cultivo.....	85



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Café es el nombre común de las semillas provenientes de los arbustos del género *Coffea* (*Rubiaceae*), cuyo cultivo tiene gran importancia agronómica y comercial en el mundo. Aunque incluye más de 124 especies (Davis, 2011), solo dos son importantes a nivel comercial, arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora* var. Robusta) (Wintgens, 2012), mismas que representan el 70 % y 30 % respectivamente, de la producción mundial (USDA 2012). Actualmente, el mayor volumen de producción de café se concentra en Brasil, Vietnam y Colombia (USDA, 2018).

En México, en 2017, la producción fue de 835,380 toneladas distribuida en diez estados productores principalmente; siendo las identidades de Chiapas, Veracruz y Puebla donde se generan los volúmenes más significativos, y por consiguiente el mayor aporte al valor de cosecha; estas entidades representan el 79 % del total de la producción nacional (SIAP, 2018). La especie *Coffea arabica* constituye el 97 % de la producción nacional y solo 3 % de la producción corresponde *Coffea canephora*, conocida como robusta la cual se cultiva en zonas bajas de Veracruz, Chiapas y Oaxaca (PENITTEC, 2003).

Hasta 2017, los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Puebla, fueron los principales estados productores de café orgánico, con un volumen de producción de 350 mil sacos de 60 kg, lo que colocó a México como el segundo productor mundial. En cuanto a la exportación, México es el principal proveedor mundial, cada año envía más de 28 mil toneladas a países europeos (SAGARPA, 2017).



El café es un cultivo de enorme trascendencia, no solo desde el punto de vista económico y social, sino cultural y ecológico; ya que es una de las mayores fuentes generadoras de empleo en el medio rural, su producción emplea a más de 500 mil productores de 15 entidades federativas y 480 municipios, en particular en las comunidades marginadas enclavadas en las serranías; donde hombres, mujeres y niños intervienen en el proceso productivo del cultivo (SADER, 2018; SIAP 2018; SAGARPA, 2017), cerca de 300 mil familias dependen del grano (SAGARPA, 2017; Cafés de México, 2001). Genera más de 700 mil empleos directos e indirectos, de los que dependen más de 3 millones de personas que participan en todo el sistema agroindustrial (SAGARPA, 2017; Cafés de México, 2001). El café ha ocupado el 9 % de la fuerza de trabajo empleada en la agricultura nacional (Cafés de México, 2001).

Asimismo, el café es un cultivo de relevancia económica en México; representa el 0.66 % del producto interno bruto (PIB) agrícola nacional y el 1.34 % de la producción de bienes agroindustriales; sus exportaciones generan 383 millones de dólares (SIAP, 2018).

La siembra de café se caracteriza por ser un sistema agroforestal que proporciona servicios ambientales tales como: captura de carbono y contaminantes; generación de oxígeno; provisión de agua; control de erosión; conservación de suelos y biodiversidad; paisaje y recreación (Soto, 2007).

La producción de café en México, desde 2012, presenta una tendencia decreciente provocada principalmente por la enfermedad conocida como roya del café (SIAP, 2018), la cual ha provocado una disminución de 4.5 millones de sacos de 60 kg (2011) a 2.2 millones de sacos de 60 kg (2016) (USDA, 2016). La roya del café es una enfermedad foliar, considerada la más devastadora para el cultivo y es causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (USDA, 2017).



Para enfrentar el problema de la baja productividad una alternativa económica es el uso de variedades resistentes a plagas o enfermedades, ya que la variedad del cafeto también juega un papel importante en cualquier sistema de producción, pues del genotipo y su adaptación depende la cantidad y la calidad de frutos a cosechar (Hein y Gatzweiler, 2006; Kathurima *et al.*, 2009). La variedad Colombia es una variedad compuesta resistente a la roya (*Hemileia vastatrix*), cuyos progenitores son la variedad Caturra, de la especie *Coffea arabica* y el híbrido de Timor. Además de ser resistente contra la roya, cuenta con altos estándares de calidad de la bebida y del grano, porte bajo, alta producción, uniformidad fenotípica, adaptabilidad y rendimiento (Alvarado-Alvarado y Puerta-Quintero, 2002).

La mejora del café es un tema actual de interés debido a la importancia económica del cultivo, herramientas biotecnológicas como la transformación genética y la micropropagación (embriogénesis somática) han sido utilizadas para proporcionar resultados prácticos en su mejoramiento. Las metodologías para inducir la embriogénesis somática y el posterior desarrollo de los embriones dependen del genotipo, por lo que el desarrollo de protocolos específicos para cada cultivar siguen siendo casi empíricos (Santana-Buzzy *et al.*, 2007). Por lo anterior la presente investigación tuvo como objetivos:



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 General

Desarrollar un protocolo para la producción *in vitro* de plantas de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia) mediante embriogénesis somática.

### 2.2 Específicos

- Determinar el efecto del tipo de callo (friable y compacto) y la concentración de phytagel en la capacidad embriogénica de *C. arabica* var. Colombia.
- Establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de plantas de café mediante embriogénesis somática indirecta a partir de explantes foliares de *C. arabica* var. Colombia.
- Establecer las condiciones de cultivo para inducir la embriogénesis somática directa e indirecta en *C. arabica* var. Colombia a partir de tejidos foliares.



### 3. HIPÓTESIS

#### 3.1 General

El protocolo desarrollado permitirá la producción *in vitro* de plantas de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia) mediante embriogénesis somática.

#### 3.2 Específicas

- Tanto el callo friable como el compacto tendrán la capacidad de formar embriones somáticos cuando se cultiven en un medio con alta concentración de phytagel.
- Al menos uno de los tratamientos probados permitirá obtener callos embriogénicos, así como la diferenciación, el desarrollo, la maduración y la conversión de los embriones somáticos en plantas.
- Es posible inducir la embriogénesis somática directa e indirecta a partir de segmentos de hoja de *C. arabica* L. var. Colombia.



## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Generalidades del cultivo

El café es uno de los productos más importantes a nivel mundial debido a su impacto económico en muchos países, cuyo cultivo requiere de características geográficas muy específicas para su producción; altitud 600 a 1,600 msnm., lluvia 1,000 a 3,000 mm, temperatura 17 a 23 °C y condiciones edáficas con más de un metro de profundidad, de textura franca a migajón arcilloso, pH de 4.5 – 7.0 (SIAP, 2018).

El café es una planta que se puede propagar por semillas, estacas y por cultivo de tejidos (embriogénesis somática), siendo la primera la más usada en todo el mundo (PROCAFE, 2005; Fernández *et al.*, 2010). La propagación de la especie *Coffea arabica* se da por semillas, mientras que el uso de esquejes sólo se aplica en *Coffea canephora* (Campos *et al.*, 2017).

Existen dos especies que se cultivan y comercializan ampliamente: arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora* var. Robusta) (Wintgens, 2012). Existen otras especies como *C. iberica*, *C. dewevrei* y *C. racemosa* que se plantan en escala local y normalmente no entran a los canales comerciales (PENITTEC, 2003; Kumar *et al.*, 2006). Actualmente, se producen en el mundo un total de 168 millones sacos de café de 60 kg, de los cuales 105 millones pertenecen a arábicas y 63 millones corresponden a robustas (ICO, 2019).

Las importaciones del café están concentradas en la Unión Europea, Japón, Noruega, Rusia, Suiza, Túnez y Estados Unidos; durante el período 2017/18 un total de 130 millones de sacos de 60 kg fueron importados por estos países (ICO, 2019).



El consumo de café se da principalmente en países no productores como la Unión Europea y Estados Unidos, cuya población tiene alto poder adquisitivo y orienta su consumo hacia el café de especialidad; el consumo en estos países en 2017/18 fue de 44 y 26 millones de sacos de café de 60 kg, respectivamente, que representa el 39 y 23 % del consumo de los países importadores (Castañeda, 2004; ICO, 2019).

En el mercado internacional se distinguen cuatro categorías de café de acuerdo con el tipo de grano. En orden descendente con respecto a la calidad y el precio, son: suaves colombianos (10 %), granos de arábica lavados, producidos principalmente en Colombia; otros suaves (18 %), granos de arábica, cuyos principales productores son México y Centroamérica; brasileños naturales (30 %), granos de arábica sin lavar, provenientes de Brasil y otros países sudamericanos; y robustas (42 %), producidos en África, Asia y algunos países sudamericanos (ICO, 2019).

El café en México es producido por cerca de 500 mil productores, en una superficie aproximada de 722 mil hectáreas en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, Nayarit, San Luis Potosí, Jalisco y Colima; el principal productor es el estado de Chiapas, entidad que aporta el 41 % de la producción nacional; seguido de Veracruz con el 23 % y Puebla con 15 %. El rendimiento promedio de café cereza es de 1.3 t ha<sup>-1</sup> con un precio de 5,872 pesos t<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2017; SIAP, 2018).

Las condiciones agroecológicas donde se cultiva café en nuestro país son propicias para la producción de cafés de calidad. Al respecto, el 35 % de la superficie de café está ubicada a una altitud superior a los 900 metros sobre el nivel del mar (msnm) donde se producen cafés de altura y estrictamente altura, el 43.5 % se encuentra a una altura entre los 600 y 900 msnm, con potencial para producir café con calidad de exportación prima lavado y el restante 21.5 % de la superficie se



encuentra por debajo de los 600 msnm, donde generalmente se producen cafés de calidades inferiores (Cafés de México, 2001).

La mayoría de las enfermedades del cultivo de café son causados por hongos patógenos y, menos frecuente por bacterias y virus. Las plagas más comunes del café son la broca del café (*Hypothenemus hampei*), el minador de la hoja (*Leucoptera coffella*, que predomina en Latinoamérica y *Leucoptera coffeina*, que se encuentra en países productores de África), cochinillas (Hemiptera: *Pseudococcidae* y *Putoidae*) y nematodos (*Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Criconemella* sp.); mientras que las enfermedades principales son la roya del café (*Hemileia vastatrix*), marchitez del café (*Corticium koleroga*) y el mal rosado (*Corticium salmonicolor*) (Ribeyre y Avelino, 2012; Gil *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2017).

Las plagas y enfermedades del café reducen los rendimientos, por causar la muerte de las plantaciones o por afectar negativamente la calidad del café. El impacto en la calidad puede ser sanitario, físico y organoléptico. Las cualidades físicas y organolépticas son elementos que se tienen en cuenta al establecer los precios del café (Perriot *et al.*, 2006; Ribeyre y Avelino, 2012).

#### **4.2 Mejoramiento genético de café**

El mejoramiento genético de plantas inició con la domesticación de las mismas bajo condiciones controladas y la selección de aquellas capaces de proporcionar una mejor fuente de alimentos; su objetivo es incrementar la producción, resistencia a plagas y enfermedades, y la adaptación a ambientes específicos, regiones y usos, mediante la selección de variedades cultivadas localmente, cruzadas entre sí o con las de otras áreas, o también con plantas silvestres que tengan los genes deseados (Gutiérrez *et al.*, 2003).



En algunas especies obtener plantas mejoradas de manera convencional resulta difícil, por lo que se utilizan otros métodos para producir variantes útiles, tales como la selección celular, la variación somaclonal y las mutaciones inducidas, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Las principales vías por las cuales se han originado y domesticado las especies cultivadas son las combinaciones de genes por medio de hibridaciones y mutaciones, estas últimas tanto en la estructura (deleciones, inversiones, translocaciones, entre otros) como en el número de cromosomas (ploidía), ocurridas en forma natural y/o artificial (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Las especies con variantes genéticos producidos han sido seleccionados de acuerdo con las necesidades y gustos del hombre a través de los años; dando origen a cruzamientos naturales y produciendo grandes cantidades de combinaciones génicas resultando nuevos tipos (Gutiérrez *et al.*, 2003).

#### **4.2.1 Convencional**

Existen más de 124 especies del género *Coffea* (Davis, 2011), pero solo dos son cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* L. ( $2n=4x=44$ ) y *Coffea canephora* var. Robusta ( $2n=2x=22$ ) (Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019; Wintgens, 2012). Todas las especies son autoincompatibles, excepto *Coffea arabica* L., *Coffea heterocalyx* L. y *Coffea anthonyi* L. (Davis *et al.*, 2006).

*C. arabica* L. es alotetraploide autofértil ( $2n=4x=44$ ), producto de la hibridación espontánea entre *Coffea canephora* Pierre (progenitor paterno) y *Coffea eugenoides* L. (progenitor materno) (Lashermes *et al.*, 1999; Mishra y Slater, 2012).



El género *Coffea* presenta limitantes para su mejoramiento genético por los métodos convencionales por su carácter perenne y diferencias en su nivel de ploidía e incompatibilidad; puede llevar al menos 20 años para tener un nuevo genotipo en el mercado. Además, existen características de importancia como resistencia a plagas o patógenos, que no se encuentran presentes en el germoplasma disponible (Campos *et al.* 2017; Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019). Etienne *et al.*, (2002) y Melese (2016) mencionan que la obtención de variedades élite podría tomar más de 30 años mediante el mejoramiento clásico.

En *C. arabica* el mejoramiento genético convencional se ha enfocado a la hibridación, selección genealógica y selección por cruzas y retrocruzas interespecíficas, con el fin de transferir resistencia a patógenos y plagas, mejorar la adaptación y el rendimiento del cultivo. Además, se ha utilizado la introducción y selección de plantas, cruzas artificiales con parentales seleccionados y ensayos de mutagénesis y radiación en semillas (Berthouly, 1997; Solano, 2001).

La variedad Colombia es un cultivar generado a partir de la variedad Caturra (*Coffea arabica*) y el híbrido de Timor, seleccionados por atributos agronómicos sobresalientes y buena calidad de la bebida y el grano; con amplia adaptación a las condiciones geográficas; resistencia completa e incompleta a la roya del cafeto; porte bajo; alta producción; uniformidad fenotípica y buen rendimiento, característica por las cuales puede ser utilizada para mejorar el cultivo de café (Alvarado-Alvarado y Puerta-Quintero, 2002).

### **4.3 Biotecnología**

La biotecnología aporta herramientas que permiten romper las barreras físicas, bioquímicas y genéticas que interrumpen el buen funcionamiento de las hibridaciones normales por vía sexual (Gutiérrez *et al.*, 2003).



La biotecnología vegetal ofrece varias posibilidades de aumentar la productividad y la diversificación; incluye técnicas de cultivo de tejidos de plantas, de biología molecular avanzada para la transformación de plantas, análisis genómico junto con diagnósticos de cría y enfermedades de la planta (de los Santos-Briones y Hernández-Sotomayor, 2006).

La variación somaclonal y la inducción de mutaciones *in vitro*, son una fuente de variación de la que se pueden seleccionar características agronómicas de interés. Esta selección que es factible realizar *in vitro* y/o *ex vitro* puede estar orientada a la adaptación por medio de resistencia o tolerancia a factores ambientales que permitan el cultivo masivo de la especie (Gutiérrez *et al.*, 2003).

La transformación genética se ha convertido en una herramienta indispensable en el mejoramiento genético de los cultivos es considerada como una extensión de las tecnologías convencionales de mejoramiento genético (Zhong, 2001); ofrece oportunidades para superar las barreras de compatibilidad entre especies, para así desarrollar fenotipos con rasgos deseados que no están disponibles en el germoplasma de las plantas de cultivo (Mishra y Slater, 2012). En café, las principales aplicaciones de la técnica de ingeniería genética son introducir nuevos rasgos en genotipos de élite, desarrollar nuevos cultivares con características deseables como la resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a herbicidas, tolerancia a sequía y heladas, y mejorar la calidad de la taza (Mishra y Slaters, 2012).

Los marcadores moleculares se han utilizado en café para evaluar la diversidad genética de las especies y construir mapas genéticos (De-Kochko *et al.*, 2010); además, para la evaluación de introgresión, determinación del modo de herencia de enfermedad y resistencia a plagas, evaluación



de la calidad de la bebida y el análisis e identificación de loci de rasgos cuantitativos (Melese, 2016).

La ingeniería genética de plantas posee ventajas como aumentar el rango de caracteres de interés a transferir a las especies y modificar puntualmente a los organismos al integrar uno o pocos genes, y no el genoma completo (De-Gluglielmo, 2009). En café, la ingeniería genética se ha enfocado en conocer la función, regulación e interacción de genes agronómicos importantes e introducir nuevos rasgos en genotipos élite, desarrollar nuevos cultivares con rasgos deseables como resistencia a plagas, patógenos y herbicidas, tolerancia a sequía y heladas, y mejoramiento de la calidad de taza (Fernández *et al.*, 2010).

La técnica de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRIPSR-Cas9, por sus siglas en inglés), es una de las nuevas tecnologías con potencial uso en programas de mejoramiento genético vegetal no convencional. Esta permite el corte de una molécula de ADN de manera precisa y controlada, logrando modificar la secuencia del genoma al eliminar o insertar nuevo ADN (Ran *et al.*, 2013).

#### **4.4 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Castilla, 2005).

Su aplicación permite la propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción; la clonación de individuos de características agronómicas deseables durante todo el año; la obtención de plantas libres de patógenos; la producción de semillas sintéticas; la conservación de germoplasma; la obtención de metabolitos



secundarios; la producción de nuevos híbridos; la mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas); la germinación de semillas; la producción de haploides; estudios fisiológicos diversos; facilita la comercialización de las especies vegetales (Calva y Pérez, 2005; Castilla, 2005).

Las rutas morfogénicas para la obtener una planta a través del cultivo de tejido son organogénesis [estructuras unipolares (tallos o raíces)] y embriogénesis [formación de embriones (vástago y raíz) sin la unión de gametos]; ambas rutas pueden ser de manera directa [sin la formación de callo (masa de células desorganizadas)] o indirecta (con la generación de callo) (Calva y Pérez, 2005, Jiménez, 2005).

#### **4.5 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es una herramienta biotecnológica utilizada en la mejora de cultivos, se puede definir como la producción de un embrión a partir de una célula somática sin fecundación, o bien, como el proceso por el cual las células del explante (porción de la planta donante) cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos (de Feria *et al.*, 2003).

Las células embriogénicas muestran dos características importantes: son capaces de multiplicarse (lo que permite la producción masiva de células) y generar un nuevo individuo a partir de una sola célula (totipotencia celular) (de Feria *et al.*, 2003).

La embriogénesis somática también es utilizada para investigar los eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares y bioquímicos que ocurren en plantas superiores; además de ser usada para conservar genotipos de interés y/o aquellos que están en peligro de extinción (Yang y Zhang, 2010; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006)



Las metodologías para inducir la embriogénesis somática y el desarrollo posterior del embrión son dependientes del genotipo, lo que conduce a un desarrollo casi empírico de protocolos específicos para cada cultivar (Silva *et al.*, 2015; de Rezende *et al.*, 2011; Santana-Buzzy *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2002).

El proceso de embriogénesis somática para todas las especies se inicia al exponer los tejidos de las plantas al estímulo correcto, generalmente por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente de auxinas y citocininas (Campos *et al.*, 2017; Yang y Zhang, 2010).

Los embriones formados por embriogénesis somática pasan por las mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos: globular, corazón, torpedo y cotiledonar en dicotiledóneas y globular, escutelar y coleoptilar en monocotiledóneas (Yang y Zhang, 2010; Etienne *et al.*, 2013; Pádua *et al.*, 2014).

La propagación de plantas por embriogénesis somática está bien establecida en algunas especies de café como *Coffea arabica* (Gatica-Arias *et al.*, 2008; Menéndez-Yuffá *et al.*, 2010; Bobadilla *et al.*, 2013; Workia *et al.*, 2013; Georget *et al.*, 2017) y *Coffea canephora* (Cevallos *et al.*, 2002; Ducos *et al.*, 2007; Ducos *et al.*, 2009; González-Vega *et al.*, 2010).

Los embriones somáticos se pueden obtener por dos vías, directa e indirecta; de manera directa los embriones se generan directamente sobre el explante sin una fase previa de callo (masa de células desorganizadas); mientras que por la vía indirecta existe una fase previa a la formación del embrión donde se genera callo (Fehér *et al.*, 2003; Jiménez, 2005; Yang y Zhang, 2010).



La embriogénesis somática directa se describe como un método de baja frecuencia, es decir, el número de embriones producidos es bajo; sin embargo, tiene la ventaja que se usa solo un medio de cultivo y los embriones se obtienen en corto tiempo (aproximadamente 70 a 150 días); mientras que la vía de regeneración indirecta se considera un método de alta frecuencia ya que genera embriones de manera masiva, se utilizan diversos medios de cultivo (inducción de callo, multiplicación de callo, diferenciación, maduración y germinación de embriones) y el tiempo que tarda para la producción de embriones es de nueve a diez meses (Etienne, 2005; Loyola-Vargas *et al.*, 2016).

La vía indirecta de la embriogénesis más utilizada consiste en suspender las células embriogénicas en medios líquidos (células en suspensión). Las suspensiones celulares ofrecen ventajas como sistema de propagación masiva de plantas por las altas tasas de multiplicación, además presentan mayor homogeneidad en las condiciones de cultivo y la posibilidad de automatización (Hermoso-Gallardo y Menéndez-Yuffá, 2000; Etienne, 2005; Simoes-Costa *et al.*, 2009). La producción de plantas a gran escala ha sido posible por el uso de los sistemas automatizados para cultivar las células. Uno de estos sistemas es el de inmersión temporal, en el cual el contacto de los explantes con el medio de cultivo líquido se reduce a pocos minutos por día, lo que permite eliminar desórdenes fisiológicos ligados a la inmersión permanente propia de los biorreactores clásicos y los matraces Erlenmeyer, incluyendo el desarrollo asincrónico de la población de embriones, anomalías morfológicas y heterogeneidad del tamaño (Etienne *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2006; Ducos *et al.*, 2007).

Distintos autores afirman que la frecuencia embriogénica es mayor a partir de secciones foliares, resaltando el último par de hojas más cercanas al ápice de la rama como el que poseen mayor potencial embriogénico (López-Gómez, 2010; Yang y Zhang, 2010). Las hojas utilizadas como



explante inicial pueden provenir de vitroplantas o de plantas de invernadero; no obstante, se ha reportado que las primeras ofrecen mayor número de embriones que las segundas (Van Boxtel y Berthouly, 1996; Menéndez-Yuffá y Hermoso- Gallardo, 1998).

Para llevar a cabo la selección de las hojas que serán utilizadas como explante se deben tener en cuenta varios parámetros, como el estado fisiológico de la planta madre, la edad de la hoja (inmadura, joven, madura), las condiciones ambientales donde se encuentra la planta madre, y la época de año en la que se recolectan las hojas (Molina *et al.*, 2002; Santana *et al.*, 2004; López-Gómez *et al.*, 2010).

La inducción de embriogénesis somática frecuentemente requiere de la combinación de una auxina y una citocinina (normalmente mayor concentración de auxina); aunque es posible obtener embriones somáticos con el uso de una citocinina solamente (Papanastasiou *et al.*, 2008). Para el desarrollo embrionario generalmente se disminuye o elimina la auxina del medio de cultivo (Pádua *et al.*, 2014).

#### **4.5.1 Maduración, germinación y conversión de embriones somáticos**

Las metodologías para inducir la formación, el desarrollo, maduración y germinación de embriones somáticos son dependientes del genotipo (Santana-Buzzy *et al.*, 2007). Los embriones somáticos se pueden obtener por dos vías, directa e indirecta. En la vía directa, los embriones se forman directamente sobre el explante y de manera indirecta, primero se forma un callo embriogénico (masa de células desorganizadas) y de este se generan los embriones (Yang y Zang, 2010).



La forma de los embriones somáticos es normalmente más irregular que los embriones cigóticos debido a las condiciones físicas y químicas del cultivo *in vitro* (Bertrand *et al.*, 2012; Etienne *et al.*, 2013). En dicotiledóneas, como el café, el desarrollo de los embriones se divide en cuatro fases; globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Etienne *et al.*, 2013; Pádua *et al.*, 2014). La metilación del ADN aumenta en la etapa globular del desarrollo de los embriones (Bobadilla *et al.*, 2013). En café, se han identificado 14 proteínas relacionadas con las diferentes fases del desarrollo embrionario durante la embriogénesis somática, las más abundantes son las relacionadas con la producción de energía (Tonietto *et al.*, 2012).

Una baja densidad celular beneficia la maduración de embriones somáticos *in vitro* (Santana *et al.*, 2004; Etienne, 2005). La eficiencia de las fases de ontogénesis y maduración del embrión es clave para el éxito de la conversión en plantas. Las tasas de conversión de embriones somáticos a plantas mediante la micropropagación siguen siendo bajas y requiere de mejoras para que pueda ser rentable comercialmente (Etienne *et al.*, 2013). El bajo vigor de las plantas somáticas de café se debe a la falta de acumulación de sustancias de reservas al inicio del proceso de germinación (Etienne *et al.*, 2013). Una alternativa para optimizar el proceso de conversión de embriones somáticos a plantas es utilizar la alta plasticidad fenotípica de los embriones con respecto a ciertas funciones fisiológicas como la fotosíntesis para estimular la autotrofia durante los primeros pasos de la germinación (Etienne *et al.*, 2013).



## 5. LITERATURA CITADA

- Alvarado-Alvarado, G., y G. I. Puerta-Quintero. 2002. La variedad Colombia y sus características de calidad física y en taza. Cenicafé. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Berthouly, M. 1997. Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. En: E. L. Ibarra, editor, Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA-PROMECAFE, San José, CRI. pp: 25-49.
- Bertrand, B., C. Montagnon, R. Landey B., E. Dechamp, I. Jourdan, E. Alpizar, H. Etienne, E. Malo, and F. Georget. 2012. Un exemple de transfert technologique réussi en micropropagation: la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. Cahiers Agric. 21: 115-124. doi:10.1684/agr.2012.0553
- Bobadilla L., R., A. Cenci, F. Georget, B. Bertrand, G. Camayo, E. Dechamp, J. C. Herrera, S. Santoni, P. Lashermes, J. Simpson, and H. Etienne. 2013. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. PLOS ONE. 8:1-15. <http://doi:10.1371/journal.pone.0056372>
- Cafés de México. 2001. Publicaciones Camacho. México, D.F. Octubre, 2001. 157 p.
- Calva C., G., y J. Pérez V. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria. 6(11): 1-16.
- Campos, N. A., B. Panis, and S. C. Carpentier. 2017. Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. Front. Plant Sci. 8: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>
- Castañeda, E. 2004. Bases potenciales: de la chacra cafetalera diversificada y amigable con el medio ambiente. Lima, Peru: Tecnatrop 158 p.
- Castilla Y. 2005. Cultivo de tejidos de rosas (*Rosa sp*): un acercamiento a investigaciones recientes. Cultivos Tropicales. 26(4): 43-47.



- Cevallos, M., I. Sánchez, and S. Montes. 2002. Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Protección Vegetal*. 17: 14–19.
- Davis, A. P., R. Govaerts, D. M. Bridson and P. Stoffelen. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (*Rubiaceae*). *Bot. J. Linn. Soc.* 152: 465-512. <https://doi:10.1111/j.1095-8339.2006.00584>
- Davis, P. A. 2011. *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. *Nord. J. Bot.* 29: 471–472. <https://doi:10.1111/j.1756-1051.2011.01113>
- de Feria, M., E. Jimenez, R. Barbon, A. Capote, M. Chavez, and E. Quiala. 2003. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 72: 1–6. <https://doi:10.1023/A:1021202305692>
- de los Santos-Briones, C. and S. M. T. Hernández-Sotomayor. 2006. Coffee biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 217-227. <https://doi:10.1590/S1677-04202006000100015>
- de Rezende C., J., C. H. de Carvalho S., M. Pasqual, A. C. Santos R., and S. de Carvalho M. 2011. Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. *Ciência Rural, Santa Maria.* 41: 384–389.
- De-Gluglielmo, C. Z. 2009. Ingeniería genética aplicada al café. *Rev. UDO Agric.* 9: 475-486.
- De-Kochko, A., S. Akaffou, A. C. Andrade, C. Campa, D. Crouzillat, R. Guyot, P. Hamon, R. Ming, L. A. Mueller, V. Poncet, C. Tranchant, and S. Hamon. 2010. Advances in *Coffea* genomics. *Adv. Bot. Res.* 53: 23-63. [https://doi:10.1016/s00065-2296\(10\)53002-7](https://doi:10.1016/s00065-2296(10)53002-7)
- Ducos, J. P., B. Terrier, and D. Courtois. 2009. Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 115: 89-115. doi:10.1007/10\_2008\_28
- Ducos, J. P., P. Chantanumat, P. Vuong, C. Lambot, and V. Pétiard. 2007. Mass propagation of robusta clones: disposable plastic bags for pregermination of somatic embryos by temporary immersion. *Acta Hort.* 764: 33-40. <https://doi:10.17660/ActaHortic.2007.764.3>
- Etienne, H. 2005. Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). *Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants.* 77: 167–179. [https://doi:10.1007/1-4020-2985-3\\_14](https://doi:10.1007/1-4020-2985-3_14)



- Etienne, H., B. Bertrand, F. Georget, M. Lartaud, F. Montes, E. Dechamp, J.-L. Verdeil, and D. Barry-Etienne. 2013. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*. 33, 640–653. <https://doi:10.1093/treephys/tpt034>
- Etienne, H., F. Anthony, S. Dussert, D. Fernandez, P. Lashermes, and B. Bertrand. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 38: 129-138. <https://doi.org/10.1079/IVP2001273>
- Fehér, A., T. P. Pasternak, and D. Dudits. 2003. Transition of somatic plants cells to an embryogenic state. *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 74: 201-228. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- Fernández, R., Z. De-Guglielmo, and A. Menéndez. 2010. Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Rev. Invest.* 34: 57-84.
- Gatica-Arias, A. M., G. Arrieta-Espinoza, and A. M. Espinoza E. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *C. arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *E. J. Biotech.* 11: 1-12. <https://doi:10.2225/vol11-issue1-fulltext-9>
- Georget, F., P. Courtel, E. M. Garcia, M. Hidalgo, E. Alpizar, J. C. Breitler, B. Bertrand, and H. Etienne. 2017. Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. *Sci. Hortic.* 216: 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.017>
- Gil P., Z. N., P. Benavides M., y C. Villegas G. 2015. Manejo integrado de las cochinillas de las raíces del café. *Cenicafé. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchiná, Caldas, Colombia.* 459: 1-8.
- González-Vega, M. E., M. M. Hernández-Espinoza, y A. Hernández-Rodríguez. 2010. Influencia de la edad del callo en la inducción de suspensiones celulares de cafeto. *Agronomía Mesoamericana.* 21: 299-306.
- Gutiérrez M., A., F. Santacruz, R., J. L. Cabrera P., and B. Rodríguez G. 2003. Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis* 1: 1-20.
- Hein, L., and F. Gatzweiler. 2006. The economic value of coffee (*Coffea arabica*) genetic resources. *Ecological Economics.* 60: 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2005.11.022>



- Hermoso, G. L. y A. Menéndez-Yuffá. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante el cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. Act. Cient. Ven. 51: 90-95.
- ICO. 2019. Monthly Coffee Market Report, April 2019. International Coffee Organization.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regul. 47: 91–110. [https://doi: 10.1007/s10725-005-3478-x](https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x)
- Kathurima, C.W., B. M. Gichimu, G. M. Kenji, S. M. Muhoho and R. Boulanger. 2009. Evaluation of beverage quality and green bean physical characteristics of selected Arabica coffee genotypes in Kenya. African J. of Food Sci. 3: 365-371.
- Kumar, V., M. Madhava Naidu, and G. A. Ravishankar 2006. Developments in coffee biotechnology — in vitro plant propagation and crop improvement. Plant Cell Tissue Organ Cult. 87: 49–65. [https://doi:10.1007/s11240-006-9134-y](https://doi.org/10.1007/s11240-006-9134-y)
- López-Gómez, P., L. Iracheta-Donjuan, M. Castellanos-Juárez, I. Méndez-López, A. Sandoval-Esquivez, J. F. Aguirre-Medina, M. C. Ojeda-Zacarias, y A. Gutierrez-Díez. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café: Rev. Fitotec. Mex. 33: 205-213.
- Loyola-Vargas, V. M., J. R. Avilez-Montalvo, R. N. Avilés-Montalvo, R. Marquez-Lopez, R. Galaz-Avalos, and E. Mellado-Mojica. 2016. “Somatic embryogenesis in *Coffea* spp,” in Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications, eds (Cham: Springer International Publishing). pp: 297–318.
- Melese, K. 2016. The role of biotechnology on coffee plant propagation: A current topics paper. J. Biol. Agric. Healthcare. 6: 13-19.
- Menéndez-Yuffá A. y L. Hermoso-Gallardo. 1998. Estudio comparativo de la embriogénesis somática en café a partir de secciones de hojas de plantas de invernadero y vitroplantas (Resumen). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana, 515 p.
- Menéndez-Yuffá, A., D. Barry-Etienne, B. Bertrand, F. Georget, H. Etienne. 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). Plant Cell. Tiss. Organ Cult. 102: 297-307. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9734-4>



- Mishra, M.K., A. Slater. 2012. Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnology Research International*. 2012: 1-18. <http://doi:10.1155/2012/580857>
- Molina, D. M., M. E. Aponte, H. Cortina, G. Moreno. 2002. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 71: 117-123.
- Pádua S., M., L. Paiva V., L. da Silva C., K. G. do Livramento, E. Alves, A. H. Castro F. 2014. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. *Ciênc. Rural* 44: 660–665. [https://doi: 10.1590/S0103-84782014000400014](https://doi:10.1590/S0103-84782014000400014)
- Papanastasiou, I., K. Soukouli, G. Moschopoulou, J. Kahia, and S. Kintzios. 2008. Effect of liquid pulses with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (*Coffea arabica* L.) callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92: 215–225. [https://doi: 10.1007/s11240-007-9326-0](https://doi:10.1007/s11240-007-9326-0)
- PENITTEC. 2003. Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología del Estado de Chiapas. 58 p.
- Pérez Q., F., D. Cruz Ch., E. Poma L., y F. Cadena M. 2017. Densidad poblacional de nematodos en el cultivo del café (*Coffea arábica* L), Alto Lima-Caranavi. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*. 4: 53-59.
- Perriot, J. J., F. Ribeyre, y C. Montagnon. 2006. The qualities of a coffee. In Montagnon Ch ristophe (ed). *Coffee: terroirs and qualities*. Versailles: Ed. Quae. 1: 1-20.
- PROCAFE. 2005. Programa del Mejoramiento del Café. Cultivo de tejidos vegetales. La libertad, República del Salvador. Hoja técnica. 13: 1-3.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos, and V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86: 285–301. [https://doi: 10.1007/s11240-006-9139-6](https://doi:10.1007/s11240-006-9139-6)
- Ran, F. A., P. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. Scott, and F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8: 2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ribeyre, F. and J. Avelino. 2012. Impact of field pests and diseases on coffee quality. *Specialty Coffee. Managing Quality*. pp: 151-176.



- SADER. 2018. México, onceavo productor mundial de café. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/sader/es/articulos/mexico-onceavo-productor-mundial-de-cafe>
- SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Café mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)
- Santana, N, M. E. González, M. Valcárcel, A. Canto-Flick, M. M. Hernández, F. J. Fuentes-Cerda, F. Barahona, J. Mijangos-Cortés, and V. M. Loyola-Vargas. 2004. Somatic embryogenesis: A valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 40: 95–101. <https://doi.org/10.1079/IVP2003486>
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos, J. R. Ku-Cauich, J. Mijangos-Cortés, L. C. Gutiérrez-Pacheco, A. Canto, F. Quiroz-Figueroa, and V. M. Loyola-Vargas. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 43: 507–520. <https://doi:10.1007/s11627-007-9074-1>
- SIAP. 2018. Atlas agroalimentario 2012-2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Silva, A.T., D. Barduche, K. G. do Livramento, and L.V. Paiva, 2015. A Putative BABY BOOM-like Gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 51: 93-101. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9643-z>
- Simões-Costa, M.C., E. Carapuça, and I. R. Moura. 2009. Somatic embryogenesis induction in different genotypes of *Coffea* spp. *Acta Horticulturae*. 812: 295-300. <https://doi:10.17660/actahortic.2009.812.40>
- Solano, W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* por embriogénesis somática. Tesis Lic., Universidad de Costa Rica, Turrialba, CRI.
- Soto, P. L. 2007. Diversidad y otros servicios ambientales de los cafetales. *Ecofront*. 32: 2-5.
- Tonietto, A., J. H. Sato, J. B. Teixeira, E. M. de Souza, F. O. Pedrosa, O. L. Franco, and A. Mehta. 2012. Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Mol. Biol. Report*. 30: 1393-1399. [doi:10.1007/s11105-012-0425-7](https://doi.org/10.1007/s11105-012-0425-7)



- USDA. 2012. Production Flat with Quality Exports and Robusta Bean Imports Both Rising. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-14-2012.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-14-2012.pdf)
- USDA. 2013. Situation Update--Coffee Rust in Mexico. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Situation%20Update--Coffee%20Rust%20in%20Mexico\\_Mexico\\_Mexico\\_2-27-2013.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Situation%20Update--Coffee%20Rust%20in%20Mexico_Mexico_Mexico_2-27-2013.pdf)
- USDA. 2016. Mexico Launches New Policies as Rust Continues to Impact Production. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-13-2016.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-13-2016.pdf)
- USDA. 2018. Coffee Plan on Track to Achieve Goals. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-15-2018.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-15-2018.pdf)
- Van Boxtel J. and M. Berthouly. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 44: 7-17.
- Villalta-Villalobos, J., y A. Gatica-Arias. 2019. Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agron. Mesoam.* 30(2): 577-599. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/index>
- Wintgens, J. N. 2012. "The coffee plant," in *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*, ed. W. J. Nicolas (Weinheim: Wiley-VCH). pp: 3–24.
- Workia, A., F. Tileye, and T. Disasa. 2013. Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 88: 469-475. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512993>
- Yang, X., and X. Zhang. 2010. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 29: 36-57. <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>



Zhong, G.Y. 2001. Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. *Euphytica*. 118: 137-144.  
<https://doi:10.1023/A:1004048019670>



## CAPÍTULO I. TIPO DE CALLO Y PHYTAGEL EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Colombia)

### RESUMEN

El café es cultivo de relevancia mundial, son dos las principales especies cultivadas, *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. La embriogénesis somática indirecta representa una herramienta biotecnológica importante para la regeneración rápida y a gran escala de plantas de café; es la vía de regeneración más utilizada debido a la cantidad de embriones que se puede obtener. Las características de los callos obtenidos afectan su capacidad para regenerar embriones somáticos, dichas características pueden variar de acuerdo al genotipo. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del tipo de callo (friable y compacto) y de la concentración de phytigel en la capacidad embriogénica de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). Se cultivaron segmentos de hoja (explantes) en medio MS suplementado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $109 \text{ mg L}^{-1}$  de sorbitol más  $2.3$  o  $5.0 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel. La diferenciación de embriones se llevó a cabo en un medio de cultivo que contenía las sales Yasuda *et al.*,  $1.1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $2.3 \text{ g L}^{-1}$  o  $5.2 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel. Embriones en estado globular, corazón y torpedo inicial fueron colocados en un medio de cultivo que contenía las sales Yasuda *et al.*,  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA. Los embriones en etapa cotiledonar fueron transferidos a frascos de 200 mL que contenían una mezcla de vermiculita:perlita. Los explantes generaron dos tipos de callo con características morfológicas diferentes: friables y compactos, los callos friables eran de color beige y de fácil disgregación, además estaban formados de células de parénquima con espacios intercelulares abundantes y grandes, núcleos poco evidentes y vacuolas grandes. El callo compacto era de color blanco y de difícil disgregación, sus células eran alargadas, con cierto grado de organización, espacios intercelulares pequeños y núcleos evidentes. El nivel de phytigel ( $2.3$  y  $5.0 \text{ g L}^{-1}$ ) y el tipo de callo



(friable y compacto) de manera independiente no mostraron diferencias significativas en la capacidad para formar embriones somáticos. El número más alto de embriones por gramo de callo (127.47) se obtuvo cuando se combinó el callo compacto con 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel. El callo friable, así como el compacto tienen la capacidad para formar embriones somáticos en *C. arabica*.

**Palabras clave:** Callo friable, callo compacto, embriones somáticos, café



## TYPE OF CALLUS AND PHYTAGEL ON INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE (*Coffea arabica* L. var. Colombia)

### ABSTRACT

Coffee is a crop of global importance, there are two main cultivated species, *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. Indirect somatic embryogenesis represents an important biotechnological tool for rapid and large-scale regeneration of coffee plants; it is the most used propagation route due to the amount of embryos that can be obtained. The characteristics of the calli obtained affect their ability to regenerate somatic embryos, these characteristics may vary according to the genotype. The objective of this investigation was to determine the effect of the type of callus (friable and compact) and the concentration of phytigel on the embryogenic capacity of coffee (*Coffea arabica* L. var. Colombia). Leaf segments (explants) were cultured on MS medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, 109 mg L<sup>-1</sup> sorbitol plus 2.3 or 5.0 g L<sup>-1</sup> phytigel. Embryo differentiation was carried out on a culture medium containing Yasuda *et al.* salts, 1.1 mg L<sup>-1</sup> BAP and 2.3 g L<sup>-1</sup> or 5.2 g L<sup>-1</sup> phytigel. Globular, heart and initial torpedo embryos were placed in a culture medium containing the Yasuda *et al.* salts, 0.25 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.25 mg L<sup>-1</sup> AIA. The cotyledone embryos were transferred to 200 mL bottles containing a mixture of vermiculite:perlite. The explants generated two types of callus with different morphological characteristics: friable and compact, the friable calli were beige and easy to disintegrate, they were also formed of parenchyma cells with abundant and large intercellular spaces, little evident nuclei and large vacuoles. The compact calli were white and difficult to disintegrate, their cells were elongated, with some degree of organization, small intercellular spaces and evident nuclei. The level of phytigel (2.3 and 5.0 g L<sup>-1</sup>) and the type of callus (friable and compact) independently showed no significant differences in the ability to form somatic embryos. The highest number of embryos per



gram of callus (127.47) was obtained when the compact callus was combined with 5.0 g L<sup>-1</sup> phytigel. The friable callus, as well as the compact have the ability to form somatic embryos in *C. arabica*.

**Key words:** Friable callus, compact callus, somatic embryos, coffee



## 1.1. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los cultivos de importancia mundial debido a su valor comercial y agrícola. Las especies arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora* var. Robusta) son las más cultivadas y comercializadas, representan el 70 % y 30 % de la producción mundial, respectivamente (Davis, 2011; USDA, 2012; Wintgens, 2012).

El género *Coffea* L. presenta limitantes para su mejoramiento genético a través de programas convencionales por su carácter perenne y diferencias en su nivel de ploidía e incompatibilidad; puede llevar al menos 20 años para tener un nuevo genotipo en el mercado. Además, existen características de importancia como resistencia a plagas o patógenos, que no se encuentran presentes en el germoplasma disponible (Campos *et al.* 2017; Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019).

La embriogénesis somática es una herramienta biotecnológica utilizada para la regeneración rápida y a gran escala de plantas de café; consiste en la producción de embriones sin fecundación a partir de células somáticas (de Feria *et al.*, 2003; Pádua *et al.*, 2014). La embriogénesis somática indirecta en el cultivo de café, es decir, la generación de embriones somáticos pasando por una etapa previa de callo, es la vía de regeneración más utilizada en la actualidad debido a la cantidad de embriones que se puede obtener (de Feria *et al.*, 2003).

En café, el callo embriogénico derivado de explantes foliares es el más utilizado en el proceso de embriogénesis somática (Ribas *et al.*, 2011). Las características del callo repercuten en la capacidad de regeneración de embriones somáticos, ya que las células embriogénicas deben ser capaces de multiplicarse y ser competentes para formar embriones; dichas características pueden variar de acuerdo al genotipo (de Feria *et al.*, 2003; Santana-Buzzy *et al.*, 2007).



Algunos autores clasifican los callos que se forman en café en embriogénicos y no embriogénicos de acuerdo a sus características morfológicas y su capacidad para formar embriones (Pádua *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2015). La distinción entre callo embriogénico y no embriogénico se considera relevante para mejorar los protocolos de embriogénesis somática (Fernández-Da Silva y Menéndez-Yuffá, 2006).

Por otro lado, el tipo de agente gelificante y las concentraciones a ser empleadas pueden ser tan importante como la mezcla de nutrimentos (López-Escamilla *et al.*, 2016). El agente gelificante puede afectar el potencial hídrico del medio permitiendo mayor o menor toma de agua y nutrimentos por el tejido (explante), lo que se refleja en las características fisiológicas, morfológicas y morfogenéticas del explante (Chacón *et al.*, 2000; Veitía *et al.*, 2012).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto del tipo de callo y de la concentración de phytigel en la capacidad embriogénica de *C. arabica* var. Colombia.

## **1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.2.1. Desinfestación**

El primero y segundo par de hojas jóvenes sanas y sin daño obtenidas de plantas crecidas en el invernadero, se sumergieron en una solución fungicida al 0.1 % (Promyl®: metil-1-butil carbamoil-2-bencimidazol carbamato) durante 15 minutos; posteriormente, éstas se colocaron en hipoclorito de sodio (1.2 % de cloro activo) por 20 minutos, para después enjuagarlas con agua destilada esterilizada.



### 1.2.2. Inducción de callo embriogénico

Segmentos de 1 cm<sup>2</sup> (explantes) de las hojas previamente desinfectadas se colocaron en cajas Petri de 90 x 15 mm que contenían 30 mL de los medios inducción que consistían en las sales basales de Murashige y Skoog (MS) (1962), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (1.0 mg L<sup>-1</sup>) y 6-bencilaminopurina (BAP) (1.0 mg L<sup>-1</sup>), sorbitol (109 mg L<sup>-1</sup>) y dos distintas concentraciones de phytigel (2.3 g L<sup>-1</sup> y 5.0 g L<sup>-1</sup>) (Cuadro 1.1). Los medios de cultivo fueron adicionados con 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; el pH de los mismos se ajustó 5.7 y fueron esterilizados en autoclave a 121 ° C durante 20 min. Los cultivos permanecieron en una cámara de crecimiento en oscuridad a 26 ± 2 °C por dos meses.

Cuadro 1.1. Medios utilizados en la etapa de inducción de callo embriogénico en *Coffea arabica* L. var. Colombia.

Medio	Reguladores de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )	Phytigel (g L <sup>-1</sup> )
M1	2,4-D, 1.0 BAP, 1.0	2.3
M2	2,4-D, 1.0 BAP, 1.0	5.0

2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP, 6-bencilaminopurina



### 1.2.3. Diferenciación (formación) de los embriones somáticos

Los callos formados en los explantes cultivados en cada uno de los medios de inducción se clasificó en friable (color beige y fácil disgregación) y compacto (color blanco y difícil disgregación). Un gramo de callo (friable o compacto) se colocó en cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 mL de medio de diferenciación, el cual contenía las sales basales de Yasuda *et al.* (1985), 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.3 g L<sup>-1</sup> o 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel. Los cultivos fueron incubados a 26 ± 2 °C en oscuridad y después de cuatro meses se cuantificó número de embriones por gramo de callo.

El experimento tuvo un diseño factorial completamente al azar con dos factores: concentración de phytigel (2) y tipo de callo (2), dando lugar a 4 tratamientos; cada tratamiento constó de 10 repeticiones y una repetición consistió de una caja Petri con callo.

### 1.2.4. Análisis estadístico

Para probar el efecto del nivel de phytigel (2.3 y 5.0 g L<sup>-1</sup>) y el tipo de callo (friable y compacto) de manera independiente los datos se analizaron mediante la prueba de F para varianzas de dos muestras; la diferencia entre las medias se comparó mediante la prueba de “t de student” a un nivel de significancia de 5 %. Para la combinación de tipo de callo (friable y compacto) y phytigel (2.3 y 5.0 g L<sup>-1</sup>) los datos se procesaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA). Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

### 1.2.5. Histología

Callos embriogénicos friables y compactos fueron fijados en una mezcla de formaldehído 10 %, ácido acético 5 %, etanol 52 %, agua 33 % (v/v); luego se deshidrataron con etanol al 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %.



50 %, 70 %, 85 %, 100 % y alcohol etílico 50 %-xileno 50 %, xileno puro, para luego embeberse en parafina. Cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor se realizaron con un micrótomo de rotación (American Optical<sup>®</sup>, modelo Spencer 820, USA). Las muestras fueron tratadas con xileno (100 %), y etanol al 50, 70 %, 85, y 100 % para eliminar la parafina; luego, se tiñeron con O-safranina-verde fijo, se infiltraron y se embebieron en resina sintética de acuerdo a la metodología de López *et al.* (2005). Las muestras se observaron con un microscopio óptico Carl Zeiss<sup>®</sup> (Modelo Tessovar) y las imágenes se captaron con una cámara digital Paxcam<sup>®</sup>.

### **1.2.6. Desarrollo, germinación y conversión de los embriones**

Los embriones en estado globular, corazón y torpedo inicial fueron colocados en cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 mL de medio de cultivo que contenía las sales basales de Yasuda *et al.*, 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA (medio MG). Los embriones en etapa cotiledonar fueron transferidos a frascos de 200 mL de capacidad que contenían una mezcla de vermiculita:perlita (3:1, tamaño de partícula de 0.5 mm); la mezcla de sustratos fue humedecida con 30 mL del medio MG sin phytigel.

## **1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.3.1. Nivel de phytigel**

Los explantes cultivados en el medio de inducción generaron dos tipos de callo: friable y compacto, los cuales mostraban características morfológicas distintas, del total del callo generado 31.38 % fue friable y 68.62 % compacto. Tanto los explantes que se cultivaron en los medios que contenían 2.3 como 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel se generó callo compacto y friable; sin embargo, en el medio con 5.2 g L<sup>-1</sup> el porcentaje de explantes que formaron callos compactos fue de significativamente mayor (82 %) (Cuadro 1.2).



Cuadro 1.2. Efecto del phytigel en las características de los callos generados a partir de explantes de hoja de *Coffea arabica* var. Colombia.

Nivel de phytigel (g L <sup>-1</sup> )	Tipo de callo	Formación de callo (%)
2.3	Friable	44.91 b
	Compacto	55.09 b
5.0	Friable	17.84 c
	Compacto	82.16 a

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (t de student  $\alpha=0.05$ ).

Por otro lado, el número de embriones formados por gramo de callo no se vio significativamente afectado por la concentración de phytigel en el medio de cultivo (Cuadro 1.3). La embriogénesis somática se induce en las células cuando se exponen a estrés y/o alta concentración de reguladores de crecimiento, como se ha podido constatar por distintos autores quienes durante la embriogénesis somática detectaron la expresión de un gran número de genes asociados al estrés; en especies como algodón (*Gossypium hirsutum*), zanahoria (*Daucus carota*), soya (*Glycine max*) (Fehér, 2015; Jin *et al.*, 2014); por lo tanto, las condiciones del medio de cultivo son determinantes en la formación de embriones somáticos. Aun cuando estadísticamente no hubo diferencias entre las dos concentraciones de phytigel probadas, el número de embriones tendió a incrementarse conforme aumentó la concentración de phytigel.



Cuadro 1.3. Número de embriones formados por gramo de callo de *Coffea arabica* var. Colombia obtenido en distintas concentraciones de phytigel.

Nivel de phytigel (g L <sup>-1</sup> )	Número de embriones por gramo de callo
2.3	49.93 a
5.0	87.54 a

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (t de student  $\alpha=0.05$ ).

### 1.3.2. Tipo de callo

Los callos compactos al igual que los friables tuvieron capacidad para formar embriones, aun cuando no se encontraron diferencias significativas en el número de embriones generados (por gramo) por ambos tipos de callo (Cuadro 1.4).

Las células somáticas de los explantes cultivados *in vitro* bajo las condiciones apropiadas comienzan a dividirse y producen una masa celular no organizada llamada callo, el cual está conformado por células con diversos grados de diferenciación (Ikeuchi *et al.*, 2013; Fehér, 2015).



Cuadro 1.4. Número de embriones generados por gramo de callo de *Coffea arabica* L var. Colombia provenientes de diferentes tipos de callo (friable y compacto) después de 6 meses de cultivo.

Tipo de callo	Número de embriones por gramo de callo
Friable	47.68 a
Compacto	85.81 a

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (t de student  $\alpha=0.05$ ).

El callo inducido por heridas se deriva de varios tipos de células, que incluyen células vasculares, corticales y de médula (Iwase *et al.*, 2011; Ikeuchi *et al.*, 2013). Sugimoto *et al.* (2010) demostraron que el callo no solo es resultado de la dediferenciación de células somáticas, sino también de la presencia de células madre que parecen existir alrededor los haces vasculares en varios tipos de órganos. Con base en lo anterior, se puede inferir que tanto en los callos friables como en los compactos existen diferentes tipos de células y que algunas de ellas mantienen su totipotencia, lo cual permite que en ambos tipos de callos se formen embriones somáticos.

### 1.3.3. Efecto de tratamientos (interacción nivel de phytagel y tipo de callo)

Fue posible encontrar diferencias significativas entre los tratamientos probados con respecto al número de embriones que se formaron por gramo de callo. La mayor cantidad de embriones somáticos (127.4) se obtuvo al utilizar 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytagel y callo compacto y el número más bajo en la combinación del callo friable y 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytagel (37.63) (Cuadro 1.5).



Cuadro 1.5. Número de embriones formados por gramo de callo de *Coffea arabica* var. Colombia generados en distintos tratamientos después de seis meses de cultivo.

Nivel de phytigel (g L <sup>-1</sup> )	Tipo de callo	Número de embriones por gramo de callo
2.3	Friable	55.72 b
	Compacto	44.15 b
5.0	Friable	37.63 b
	Compacto	127.47 a

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Los resultados obtenidos se pueden atribuirse por un lado a la concentración de phytigel en el medio de inducción de callo embriogénico, ya que el phytigel a altas concentraciones (5 g L<sup>-1</sup>) causa estrés osmótico, el estrés puede promover la formación de embriones (Fehér, 2015). La respuesta al estrés y la desdiferenciación están asociados con un estado celular transitorio requerido para la extensa reprogramación genética y el cambio de destino celular (Grafi *et al.*, 2011). Los distintos tipos de estrés (abióticos y bióticos) pueden alterar la expresión de genes (modulación dinámica) involucrados en la metilación del ADN (Luo *et al.*, 2012). Asimismo, la respuesta observada, pudo deberse también al tipo de células que conformaban ambos tipos de callo, ya que aun cuando los callos friables también regeneraron embriones cuando se cultivaron en 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel, la respuesta fue menor que cuando se utilizó el callo compacto.

La fase de inducción en la embriogénesis somática tiene por objetivo que las células del explante adquieran competencia embriogénica, para lograrlo es necesario una reprogramación de la expresión génica seguida de un crecimiento polarizado de las células (Corredoira *et al.*, 2019). Se puede inferir que la presencia de reguladores de crecimiento como el 2,4-D, altas concentraciones de phytigel y las condiciones de cultivo *in vitro* per se contribuyeron significativamente a la adquisición de competencia embriogénica de las células somáticas de *C. arabica*.

#### **1.3.4. Análisis histológico del callo embriogénico**

Después de 60 días de cultivo en el medio de inducción de callo, los explantes comenzaron a formar en la periferia y en la nervadura central dos tipos de callo: friable de consistencia acuosa, de color beige y fácil disgregación (Figura 1.1a, b). Este tipo de callo presentaba células de parénquima poliédricas, con espacios intercelulares abundantes y grandes, núcleos poco evidentes y vacuolas grandes (Figura 1.1e).

El callo compacto por su parte, era blanco y difícil de disgregar; dicho callo estaba conformado básicamente de células de parénquima, alargadas, con cierto grado de organización, con espacios intercelulares pequeños y núcleos poco evidentes (Figura 1.1f).

Aun cuando en un inicio ambos tipos de callo eran visualmente muy diferentes, después de que fueron subcultivados en el medio de diferenciación (dos meses), tanto los callos friables como los compactos perdieron turgencia, se tornaron de color café oscuro y comenzaron a formar estructuras nodulares (masas proembriogénicas), las cuales posteriormente dieron lugar a embriones somáticos (Figura 1.1c-f).



Dichas masas proembriogénicas estaban constituidas de células pequeñas e isodiamétricas, con núcleos grandes, espacios intercelulares escasos, que se dividían activamente (Figura 1.1e-f), tal como lo observaron otros autores en cultivos embriogénicos de *C. arabica* cvs. Caturra, Catuai y Catiguá (Gatica-Arias *et al.*, 2008; Pádua *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

Las masas proembriogénicas al principio tenían coloración cremosa pero conforme transcurrió el tiempo de cultivo también se oscurecieron (Figura 1.1c, d). El oscurecimiento de los callos y de las masas proembriogénicas se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos (Figura 1.1e, f).

La presencia de estructuras nodulares y el oscurecimiento de las mismas marcaron el inicio de la formación de embriones somáticos, ya que los callos que no presentaron estas características no formaron embriones.

Los resultados parecen indicar que para que ocurra la formación de embriones somáticos es necesario que las células pierdan agua y produzcan compuestos fenólicos. Al respecto, Martins *et al.* (2016) observaron que en *Arbutus unedo* y *Allagopappus canariensis* el oscurecimiento del explante y del callo fue un pre-requisito para la formación de embriones somáticos.

Los resultados obtenidos permiten inferir que la presencia de fenoles y el estrés están asociados a la adquisición de la capacidad embriogénica de las células de *C. arabica* var. Colombia. De la misma manera, este estudio permitió confirmar que las estructuras que se originaron tanto de los callos compactos como de los friables son embriones somáticos (Figura 1.1g-h).



A diferencia de lo reportado por otros autores, los callos friables y compactos de *C. arabica* var. Colombia obtenidos bajo las condiciones de cultivo probadas en la presente investigación, mostraron capacidad para formar embriones somáticos (Gatica-Arias *et al.*, 2008; Pádua *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Lo anterior permite utilizar todo el material vegetal (callo) que se genera en la fase de inducción, reduciendo el tiempo y mano de obra requeridos para la selección de los callos embriogénicos.

### **1.3.5. Desarrollo, germinación y conversión de los embriones**

Cuarenta y ocho por ciento de los embriones en estado globular, corazón y torpedo inicial que se cultivaron en el medio Yasuda *et al.* adicionado con partes iguales de BAP y AIA, llegaron a la etapa cotiledonar. Asimismo, 23.4 % de los embriones que alcanzaron la etapa cotiledonar germinaron y se convirtieron en plantas, mismas que lograron adaptarse a las condiciones de invernadero (Figura 1.2).

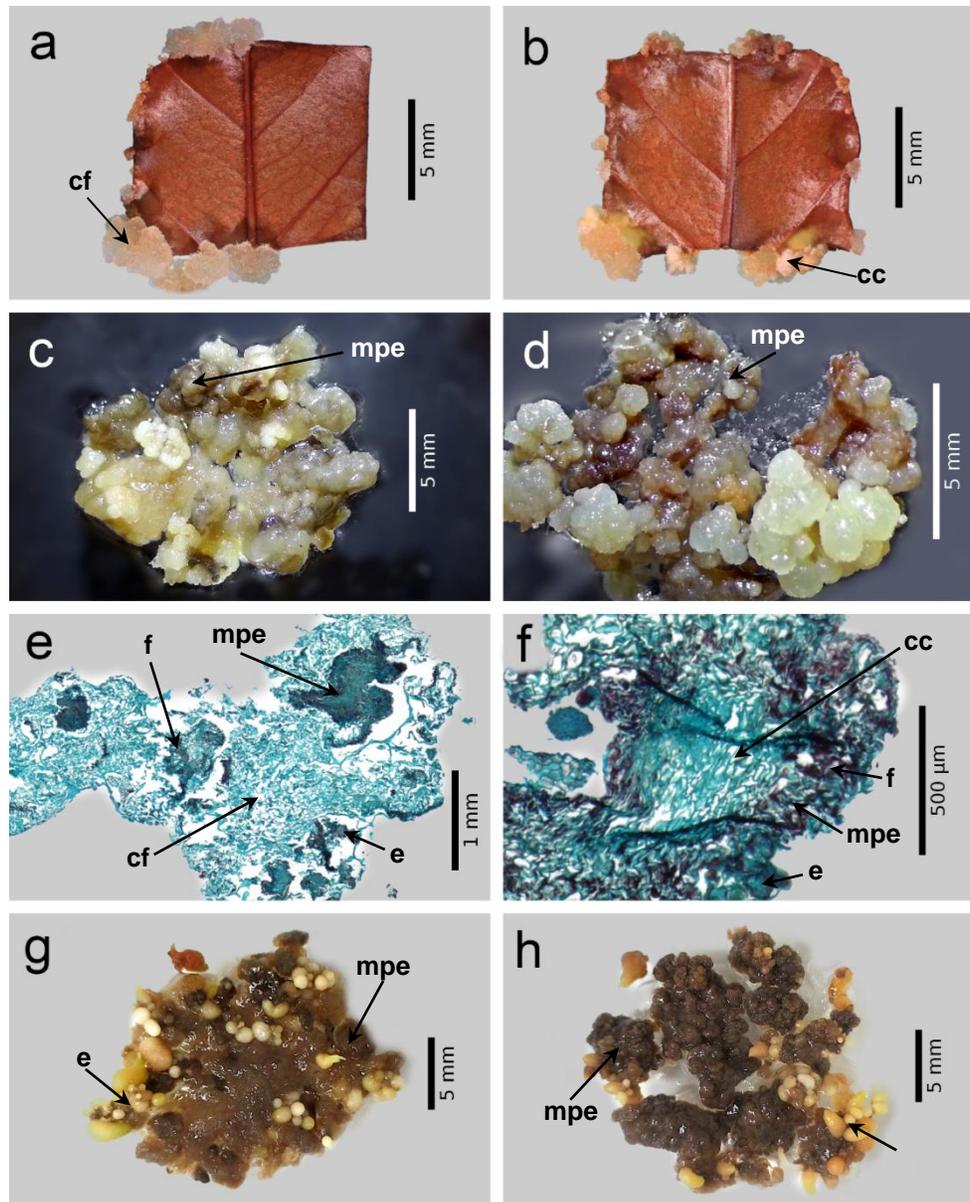


Figura 1.1. Tipos de callo embriogénico en *Coffea arabica* L. var. Colombia. (a) Callo friable a las ocho semanas de cultivo. (b) Callo compacto dos meses después de la siembra. (c) Formación de masas proembriogénicas en callo friable. (d) Callo compacto con masas proembriogénicas. (e) Histología de callo friable. (f) Histología de callo compacto. (g) Formación de embriones a los seis meses de cultivo a partir de callo friable. (h) Embriones formados en callo embriogénico después de seis meses de cultivo. cf: callo friable, cc: callo compacto, mpe: masas proembriogénicas; f: fenoles; e: embriones.



Figura 1.2. Plantas de *Coffea arabica* L. var. Colombia regeneradas por embriogénesis somática indirecta.

#### 1.4. CONCLUSIONES

El phytigel a altas concentraciones puede promover la formación de embriones somáticos en *C. arabica* var. Colombia. El estrés y la producción de fenoles están estrechamente relacionados con la capacidad de las células para formar embriones. Las células de los callos friables así como las de los compactos poseen capacidad embriogénica, por lo que es factible el uso de ambos tipos en los protocolos de regeneración de plantas por embriogénesis somática.

#### 1.5. LITERATURA CITADA

Campos, N. A., B. Panis, and S. C. Carpentier. 2017. Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Front. Plant Sci.* 8: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>



- Chacón, A. G., F. Saborio, L. Gómez, S. Torres, y R. Valverde. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Costarricense*. 24: 57-64.
- Corredoira, E., S. A. Merkle, M. T. Martínez, M. Toribio, J. M. Canhoto, S. I. Correia, A. Ballester and A. M. Vieitez. 2019. Non-zygotic embryogenesis in hardwood species. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 38: 29-97. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>
- Davis, P. A. 2011. *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. *Nord. J. Bot.* 29: 471–472. <https://doi:10.1111/j.1756-1051.2011.01113>
- de Feria, M., E. Jimenez, R. Barbon, A. Capote, M. Chavez, and E. Quiala. 2003. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 72: 1–6. <https://doi:10.1023/A:1021202305692>
- Fehér, A. 2015. Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim. Biophys. Acta*. 1849: 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Fernandez-Da Silva, R., and A. Menendez-Yuffa. 2006. Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. *Electron. J. Biotechnol.* 9(5): 593-597. doi:10.2225/vol9-issue5-fulltext-4
- Gatica-Arias, A. M., G. Arrieta-Espinoza, and A. M. Espinoza E. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *C. arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *E. J. Biotech.* 11: 1-12. <https://doi:10.2225/vol11-issue1-fulltext-9>
- Grafi, G., A. Florentin, V. Ransbotyn, and Y. Morgenstern. 2011. The stem cell state in plant development and in response to stress. *Front. Plant Sci.* 2: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00053>
- Ikeuchi, M., K. Sugimoto, and A. Iwase. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*. 25: 3159–3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Iwase, A., M. Ohme-Takagi, and K. Sugimoto. 2011. WIND1 A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signal Behav.* 6: 1943–1945. <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18266>
- Jin, F., L. Hu, D. Yuan, J. Xu, W. Gao, L. He, X. Yanq, and X. Zhanq. 2014. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress



- response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*. 12: 161–173. <https://doi.org/10.1111/pbi.12123>.
- López C., M.A., J. Márquez G., y G. Murguía S. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2 ed. 177 p.
- López-Escamilla, A. L., M. López-Herrera, y C. Loaiza-Alanís. 2016. Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link *et* Otto (Cactaceae). *Polibotánica*. 42: 153-166. doi:10.18387/polibotanica.42.8
- Luo, M., X. Liu, P. Singh, Y. Cui, L. Zimmerli, and K. Wu. 2012. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta*. 1819: 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.06.008>
- Martins, J. F., T. Santos, S. I. Correia, and J. M. Canhoto. 2016. Somatic embryogenesis in *Arbutus unedo* L. and other *Ericaceae*. *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science, Online Edition 673p.
- Montilla-Escudero, E. A., M. F. Dulce-Rivedeneira, B. Quevedo-Hidalgo, M. Mercado-Reyes, R. Álvarez-León, J. N. Molina-Vargas, y A. A. Trespalacios-Rangel. 2011. Efecto del tratamiento alcalino sobre la productividad y las propiedades físicas del agar-agar proveniente de *Gracilaria verrucosa*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVERMAR*. 40(1): 75-88.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- Nogueira, R. C., R. Paiva, J. M. P. Porto, P. M. Nicioli, V. C. Stein, S. Deuner, y E. Alves. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Revista Brasileira de Biociências*. 5(2): 48-50.
- Pádua S., M., L. Paiva V., L. da Silva C., K. G. do Livramento, E. Alves, A. H. Castro F. 2014. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. *Ciênc. Rural* 44: 660–665. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000400014>
- Ribas, A. F., E. Dechamp, A. Champion, B. Bertrand, M. Combes, J. Verdeil, F. Lapeyre, P. Lashermes, and H. Etienne. 2011. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is



- greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biol.* 11:92.  
doi:10.1186/1471-2229-11-92
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos, J. R. Ku-Cauich, J. Mijangos-Cortés, L. C. Gutiérrez-Pacheco, A. Canto, F. Quiroz-Figueroa, and V. M. Loyola-Vargas. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43: 507–520.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-007-9074-1>
- SAS Institute. 2002. *SAS/STAT User's Guide*. (Release 9.1) Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Silva, A.T., D. Barduche, K. G. do Livramento, and L.V. Paiva, 2015. A Putative BABY BOOM-like Gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 51: 93-101. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9643-z>
- Sugimoto, K., Y. Jiao, and E. M. Meyerowitz. 2010. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev. Cell.* 18: 463–471.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.004>
- USDA. 2012. Production Flat with Quality Exports and Robusta Bean Imports Both Rising. United States Department of Agriculture.  
[https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-14-2012.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-14-2012.pdf)
- Veitía, N., R. Collado, L. R. García, I. Bermúdez-Caraballoso, D. Torres, D., y C. Romero. 2012. Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Biotechnología Vegetal.* 12(3): 143-148.
- Villalta-Villalobos, J., y A. Gatica-Arias. 2019. Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. *Agron. Mesoam.* 30(2): 577-599.  
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/index>
- Wintgens, J. N. 2012. “The coffee plant,” in *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*, ed. W. J. Nicolas (Weinheim: Wiley-VCH). pp: 3–24.
- Yasuda, T., Y. Fujii, and T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595–597.



## CAPÍTULO II. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Colombia) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA

### RESUMEN

*Coffea arabica* L. es uno de los genotipos de café más importantes a nivel comercial. La embriogénesis somática constituye una herramienta biotecnológica que ha permitido la propagación masiva de diferentes genotipos de café; sin embargo, la regeneración de plantas *in vitro* depende del genotipo. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de plantas de café var. Colombia mediante embriogénesis somática a partir de explantes foliares. El medio de inducción que contenía las sales basales de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel indujo a que 90 % de los explantes formaran callos embriogénicos. La acumulación de biomasa fresca de callo en la fase multiplicación fue mayor (18.9 g) cuando no se realizaron subcultivos y los matraces que los contenían se colocaron inclinados en el agitador; el tamaño del matraz utilizado no influyó significativamente el peso fresco del callo. El mayor número de embriones por gramo de callo (118.74) se formó en los callos obtenidos con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel. El medio de desarrollo que contenía 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel indujo a que 51 % de los embriones globulares alcanzaran la etapa cotiledonar. Cultivar los embriones en una mezcla de perlita:vermiculita permitió que 21 % de éstos se convirtieran en plantas.

**Palabras clave:** Café, embriones somáticos, propagación *in vitro*, cultivo de tejidos



**IN VITRO PROPAGATION OF COFFEE PLANTS (*Coffea arabica* L. var. Colombia) BY  
INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS**

**ABSTRACT**

The species *Coffea arabica* L. is one of the most important commercial coffee genotypes. Somatic embryogenesis is a biotechnological tool that has allowed the mass propagation of different coffee genotypes; however, *in vitro* plant regeneration depends on the genotype. The objective of this research was to establish a protocol for the *in vitro* plant propagation of coffee var. Colombia by somatic embryogenesis from leaf explants. The induction medium containing the basal salts of Murashige and Skoog (MS), supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP and 2.3 g L<sup>-1</sup> phytigel, induced that 90 % of the explants form embryogenic calli. The accumulation of fresh biomass of callus in the multiplication phase was higher (18.9 g) when subcultures were not carried out and the flasks containing them were placed inclined in the agitator; the size of the flask did not influenced the fresh callus weight. The highest number of embryos per gram of callus (118.74) was formed in the calli obtained with 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 1.1 mg L<sup>-1</sup> BAP and 5.0 g L<sup>-1</sup> phytigel. The development medium containing 0.25 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0.25 mg L<sup>-1</sup> IAA and 5.0 g L<sup>-1</sup> phytigel induced 51 % of the globular embryos to reach the cotyledon stage. Cultivating the embryos in a perlite:vermiculite mixture allowed 21% of these to be converted into plants.

**Key words:** Coffee, somatic embryos, *in vitro* propagation, tissue culture



## 2.1. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, las especies arábica (*Coffea arabica*) y robusta (*Coffea canephora* var. Robusta) representan 70 % y 30 % de la producción global, respectivamente (Davis, 2011; Wintgens, 2012; USDA, 2012).

En México el cultivo de café contribuye con 0.66 % al producto interno bruto (SIAP, 2018). En los últimos años la producción de café se ha visto afectada por la roya del café, enfermedad causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, considerada la más devastadora para el cultivo (SADER, 2018). La incidencia de esta enfermedad provocó que de los 4.5 millones de sacos (de 60 kg) que se producían en 2011, solo se produjeran 2.2 millones de sacos en 2016 (USDA, 2016).

En 2015, la SAGARPA implementó el Plan Integral de Atención al Café (PIAC), cuyo objetivo es alcanzar una producción de 4.5 millones de sacos. Para cumplir con tal objetivo, dicho programa tiene como meta renovar 300,000 hectáreas de plantaciones en los próximos años, para lo cual se requerirán alrededor de 459 millones de plantas (USDA, 2017).

Una alternativa para mejorar la producción de café, así como reforzar una agricultura rentable, sostenible y amigable con el ambiente, es renovar las plantaciones con variedades resistentes a plagas o enfermedades (USDA, 2017). Colombia es una variedad compuesta derivada de la variedad Caturra (*Coffea arabica*) y el híbrido de Timor. Esta variedad además de ser resistente a la roya, tiene altos estándares de calidad de taza y de grano, porte bajo, alta producción, uniformidad fenotípica, adaptabilidad y buen rendimiento, por lo tanto, puede ser utilizada para mejorar el cultivo de café (Alvarado-Alvarado y Puerta-Quintero, 2002).

Herramientas biotecnológicas como la micropropagación mediante embriogénesis somática han sido utilizadas en el mejoramiento de café por proporcionar resultados prácticos, ya que permite



producir plantas de cultivares selectos en forma masiva a partir de células somáticas (de Feria *et al.*, 2003; Gatica-Arias *et al.*, 2008; Menéndez-Yuffá *et al.*, 2010; Etienne *et al.*, 2012; Georget *et al.*, 2017).

Aun cuando, se han desarrollado protocolos para la producción de embriones somáticos en distintas variedades de café (Molina *et al.*, 2002; Ducos *et al.*, 2007; Etienne *et al.*, 2013), las metodologías para inducir la embriogénesis somática dependen del genotipo, por lo que es necesario definir las condiciones de cultivo *in vitro* para cada cultivar (Santana-Buzzy *et al.*, 2007). Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo que permita regenerar plantas de *Coffea arabica* L. var. Colombia mediante embriogénesis somática.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Desinfestación**

El primero y segundo par de hojas jóvenes sanas y sin daño obtenidas de plantas crecidas en el invernadero, se sumergieron en una solución fungicida al 0.1 % (Promyl<sup>®</sup>: metil-1-butil carbamoil-2-bencimidazol carbamato) durante 15 minutos; posteriormente, éstas se colocaron en hipoclorito de sodio (1.2 % de cloro activo) por 20 minutos, para después enjuagarlas con agua destilada esterilizada.

### **2.2.2. Inducción de callo embriogénico**

Segmentos de 1 cm<sup>2</sup> (explantos) obtenidos de las hojas previamente desinfestadas se colocaron en cajas Petri de 90 x 15 mm que contenían 30 mL de medio basal de Murashige y Skoog (MS) (1962) (medio de inducción) que contenía seis distintas combinaciones de reguladores de crecimiento y dos niveles de phytigel (Cuadro 2.1). Los medios de cultivo fueron adicionados con 200 mg L<sup>-1</sup>



de ácido ascórbico, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; el pH de los mismos se ajustó 5.7 y fueron esterilizados en autoclave a 121 ° C durante 20 min.

Los cultivos permanecieron en una cámara de crecimiento en oscuridad a 26 ± 2 °C y después de dos meses se evaluó el porcentaje de explantes que generaron callo y la cantidad de éste que formó cada explante. Para evaluar la cantidad de callo se utilizó la siguiente escala considerando el área del explante cubierta con callo: 1: 0–20 %; 2: 21–40 %; 3: 41–60 %; 4: 61–80 %, 5: 81–100 %. El experimento para la inducción de callo tuvo un arreglo factorial con dos factores: combinación hormonal (3) y concentración de phytigel (2), dando lugar a seis tratamientos. Cada tratamiento estuvo conformado de diez repeticiones y una repetición consistió de una caja Petri con seis explantes.

### **2.2.3. Multiplicación de los callos embriogénicos**

Un gramo de callo se colocó en matraces de 250 mL con 100 mL de medio MS al 100 % suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; asimismo, 0.5 gramos fueron colocados en matraces de 125 mL con 50 mL de medio. Los matraces se pusieron en un agitador orbital (Thomas Scientific®) a 110 rpm en oscuridad.

Para evaluar el incremento en biomasa de los callos se probaron tres condiciones de cultivo: la primera consistió en colocar los callos en matraces de 250 mL y 125 mL y subcultivarlos cada cuatro semanas durante tres meses en posición vertical en un agitador orbital. En la segunda y tercera condición de cultivos, el callo se cultivó en matraces de 250 mL y 125 mL sin realizar subcultivos, después de tres meses se registró el peso del callo. La diferencia entre la segunda y tercera condición consistió en colocar los matraces en el agitador en posición vertical o inclinada (30° aproximadamente), respectivamente.



Cuadro 2.1. Tratamientos utilizados en la etapa de inducción de callo embriogénico.

<b>Tratamiento</b>	<b>Reguladores de crecimiento (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Phytigel (g L<sup>-1</sup>)</b>
<b>T1</b>	2,4-D, 0.5	2.3
	BAP, 1.1	
<b>T2</b>	2,4-D, 0.5	5.0
	BAP, 1.1	
<b>T3</b>	2,4-D, 1.0	2.3
	BAP, 1.0	
<b>T4</b>	2,4-D, 1.0	5.0
	BAP, 1.0	
<b>T5</b>	2,4-D, 2.0	2.3
	BAP, 0.20	
<b>T6</b>	2,4-D, 2.0	5.0
	BAP, 0.20	

2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP, 6-bencilaminopurina



Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos y 10 repeticiones, se consideró un matraz como una repetición.

#### **2.2.4. Diferenciación (formación) de los embriones somáticos**

El callo formado en cada uno de los medios de inducción se separó y se colocó en cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 mL de medio de diferenciación, el cual contenía las sales basales de Yasuda *et al.* (1985), 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Los cultivos fueron incubados a 26 ± 2 °C en oscuridad y después de cuatro meses se cuantificó número de embriones por gramo de callo.

El experimento tuvo un arreglo factorial con dos factores: combinación de reguladores de crecimiento del medio de inducción (3) y concentración de phytigel (2) dando lugar a seis tratamientos; cada tratamiento constó de 10 repeticiones y una repetición se conformó por una caja Petri con callo.

#### **2.2.5. Desarrollo y maduración de los embriones**

Los embriones en estado globular, corazón y torpedo inicial fueron colocados en cajas Petri de 60 x 15 mm con 15 mL de dos medios de cultivo elaborados con las sales basales de Yasuda *et al.* (1985), 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa más 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) (medio MD1) o 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA (medio MD2). El número de embriones en etapa cotiledonar se evaluó después de cuatro semanas. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos. Cada tratamiento (medio de cultivo) constó de 15 repeticiones considerando como unidad experimental una caja Petri con 10 embriones.



### 2.2.6. Conversión

Los embriones en etapa cotiledonar fueron transferidos a frascos de 200 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio MS al 50 %, 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel y 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa o una mezcla de vermiculita:perlita (3:1, tamaño de partícula de 0.5 mm); dicha la mezcla fue humedecida con 30 mL del medio antes descrito sin agar . Los cultivos permanecieron a 26 ± 2 °C y 16 horas de luz blanca fría fluorescente (60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Después de dos meses se contabilizó el número de embriones que lograron convertirse en plantas. El diseño experimental fue uno completamente al azar con dos tratamientos y 10 repeticiones; un frasco con 10 embriones se consideró como una unidad experimental.

### 2.2.7. Análisis estadístico

Los datos se procesaron estadísticamente utilizando un análisis de varianza (ANOVA); las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5 %. Se utilizó el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

### 2.2.8. Histología

Callos embriogénicos en distintas etapas de desarrollo fueron fijados en una mezcla de formaldehído 10 %, ácido acético 5 %, etanol 52 %, agua 33 % (v/v); luego se deshidrataron con una serie de etanoles (30, 40, 50, 70, 85, 100 %) y xilenos (alcohol etílico 50 %-xileno 50 %, xileno puro) y se embebieron en parafina. Cortes de 10 μm de grosor se realizaron con un micrótopo de rotación (American Optical®, modelo Spencer 820, USA). Las muestras fueron tratadas con xileno (100 %), y una serie de alcoholes (etanol 50 %, 70 %, 85 %, 100 %) para eliminar la parafina; luego se tiñeron con O-safranina-verde fijo y se infiltraron y se embebieron en resina sintética (López *et al.*, 2005). Las muestras fueron observadas con ayuda de un



microscopio óptico Carl Zeiss® (Modelo Tessoar) y las imágenes se captaron con una cámara digital Paxcam®.

## **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1. Inducción de callo embriogénico**

#### **2.3.1.1. Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento**

El porcentaje de explantes que generaron callo no se vio significativamente afectado por la combinación de reguladores de crecimiento del medio de cultivo; más de 75 % de los explantes formaron callo en las tres combinaciones de reguladores de crecimiento probadas (2,4-D, 0.5 mg L<sup>-1</sup> y BAP, 1.12 mg L<sup>-1</sup>; 2,4-D, 1.0 mg L<sup>-1</sup> y BAP, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; 2,4-D, 2.0 mg L<sup>-1</sup> y BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup>) después de dos meses de cultivo (Cuadro 2.2). Al respecto, Workia *et al.* (2013) encontraron que el mayor porcentaje explantes con callo (96 %) se logró cuando los explantes del híbrido de café (*Coffea arabica*) “Ababuna” se cultivaron en un medio MS adicionado con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 2.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP durante 90 días. Asimismo, 87 % y 67 % de los explantes de las variedades Caturra y Catuaí, respectivamente, formaron callo en presencia de 6-furfurilaminopurina (cinetina) (4 mg L<sup>-1</sup>) y 2,4-D (1 mg L<sup>-1</sup>) después de cuatro meses (Gatica-Arias *et al.*, 2008). Los resultados observados indican que las combinaciones de reguladores utilizadas pueden promover la formación de callo en la variedad Colombia en menor tiempo que el reportado para otros genotipos de café.



Cuadro 2.2. Formación de callo en los explantes de hoja de *Coffea arabica* var. Colombia expuestos a distintas combinaciones de reguladores de crecimiento, después de dos meses de tratamiento.

Combinación de reguladores de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )	Explantes con callo (%)	□ Cantidad de callo
2,4-D, 0.5; BAP, 1.1	84.29 a	1.02 b
2,4-D, 1.0; BAP, 1.0	76.63 a	1.17 a
2,4-D, 2.0; BAP, 0.2	87.42 a	1.20 a

□ Área del explante cubierta con callo: 1: 0–20 %; 2: 21–40 %; 3: 41–60 %; 4: 61–80 %, 5: 81–100 %. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

La inducción de callos embriogénicos está estrechamente relacionada con la concentración de reguladores de crecimiento y el tiempo de exposición a los mismos (Yang y Zhang, 2010). El tipo de regulador de crecimiento, la concentración óptima y el tiempo de exposición que promueva la embriogénesis somática depende del genotipo, el tipo de explante y su estado de desarrollo (Silva *et al.*, 2015).



Por otro lado, la mayor cantidad de callo se obtuvo al utilizar 2,4-D, 1.0 mg L<sup>-1</sup> y BAP, 1.0 mg L<sup>-1</sup> o 2,4-D, 2.0 mg L<sup>-1</sup> y BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup> (0-20 %) (Cuadro 2.2); es decir, en ambos tratamientos estuvo presente el 2,4-D en igual o mayor cantidad que la citocinina (Bobadilla *et al.*, 2013; Workia *et al.*, 2013; López-Gómez *et al.*, 2010). El 2,4-D es un herbicida que en bajas concentraciones puede promover la embriogénesis somática; este compuesto además de funcionar como auxina es un inductor de estrés, características que contribuyen a su eficacia como inductor de la embriogénesis somática (Song, 2014). La presencia de 2,4-D en el medio de cultivo conduce a la reprogramación genómica en las células somáticas y de cientos de genes requeridos específicamente para la adquisición de la competencia embriogénica (Karami y Saidi, 2010).

#### **2.3.1.2. Efecto de la concentración de phytigel**

La concentración de phytigel mostró efecto significativo tanto en el porcentaje de explantes que formaron callo como en la cantidad de callo producido. El mayor porcentaje (90 %) de explantes que formaron callo y la mayor cantidad de callo (0-20 %) se observó en aquellos cultivados en presencia de 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel (Cuadro 2.3). El hecho de que en la concentración más baja de phytigel se formara la mayor cantidad de callo, podría indicar que la dediferenciación y división celular ocurre de manera más eficiente cuando hay más agua libre en el medio.

Cuadro 2.3. Respuesta de los explantes de hoja de *Coffea arabica* var. Colombia a distintas concentraciones de phytigel después de dos meses de cultivo.

Concentración de phytigel (g L <sup>-1</sup> )	Explantes con callo (%)	□ Cantidad de callo
2.3	90.00 a	1.20 a
5.0	77.04 b	1.06 b

□ Área del explante cubierta con callo: 1: 0–20 %; 2: 21–40 %; 3: 41–60 %; 4: 61–80 %, 5: 81–100 %. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

### 2.3.1.3. Efecto de la interacción combinación hormonal y phytigel (tratamientos)

Con excepción del tratamiento T4 (2,4-D, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 5.0 g L<sup>-1</sup>), todos los tratamientos probados promovieron la formación de callo en más del 75 % de los explantes; en tanto que la mayor cantidad de callo se observó en los explantes cultivados en la combinación de 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel (T5) (Cuadro 2.4). Los resultados muestran que la capacidad de los explantes para formar callo tiende a reducirse conforme se incrementa la concentración de phytigel; asimismo, indican que la combinación de reguladores y de phytigel que conforman el tratamiento T5 pueden ser utilizados para lograr que un mayor número de explantes produzcan callo embriogénico en mayor cantidad.



Cuadro 2.4. Respuesta de los explantes de hoja de *Coffea arabica* var. Colombia a distintas concentraciones de reguladores de crecimiento y phytigel después de dos meses de tratamiento.

Tratamiento	Explantes con callo (%)	□ Cantidad de callo
<b>T1: 2,4-D, 0.5 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 1.1 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 2.3 g L<sup>-1</sup></b>	90.00 a	1.03 bc
<b>T2: 2,4-D, 0.5 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 1.1 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 5.0 g L<sup>-1</sup></b>	75.74 ab	1.00 c
<b>T3: 2,4-D, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 2.3 g L<sup>-1</sup></b>	90.00 a	1.20 b
<b>T4: 2,4-D, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 1.0 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 5.0 g L<sup>-1</sup></b>	69.00 b	1.15 bc
<b>T5: 2,4-D, 2.0 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 2.3 g L<sup>-1</sup></b>	90.00 a	1.38 a
<b>T6: 2,4-D, 2.0 mg L<sup>-1</sup>; BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup>; phytigel, 5.0 g L<sup>-1</sup></b>	85.05 a	1.03 bc

□ Área del explante cubierta con callo: 1: 0–20 %; 2: 21–40 %; 3: 41–60 %; 4: 61–80 %, 5: 81–100 %. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).



### 2.3.2. Multiplicación de callo embriogénico

No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de biomasa al utilizar matraces de 250 mL (9.67 g) o de 125 mL (6.18 g). Probablemente el tamaño del matraz no tuvo efecto significativo en esta variable debido a que la cantidad inicial de células fue proporcional al volumen de medio y del matraz.

Por otro lado, fue posible observar diferencias significativas por efecto de la posición del matraz y el tiempo de subcultivo de los callos del cultivar Colombia. De esta forma los callos cultivados en los matraces (250 y 125 mL) con inclinación y sin subcultivar durante tres meses incrementaron su biomasa 18.9 veces (18.9 g), el máximo peso fresco acumulado en los distintos tratamientos probados. En contraste, los callos que se cultivaron en posición vertical y no se subcultivaron, solo aumentaron su peso cinco veces (Cuadro 2.5). Gatica-Arias *et al.* (2008) obtuvieron 1.4 g de peso fresco de callo de *C. arabica* L. cv. Catuaí a partir de 250 mg de peso fresco de callo cultivado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio líquido, durante cuatro semanas en oscuridad. Asimismo, de Rezende *et al.* (2012) observaron que los callos del Clon 3 [Siriema (*C. racemosa* x *C. arabica*)] cultivados en las sales MS al 50 %, 1.1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1.0 mg L<sup>-1</sup> de IBA y 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 2iP durante 63 días (con subcultivo cada 21 días), aumentaron su peso fresco 7 siete veces, mientras que los del Clon 28 (cruza de Red Catuaí IAC 44 x Timor Hybrid CIFIC 2750) incrementaron su biomasa 9.8 veces, bajo las mismas condiciones de cultivo.

En general cuando las células permanecen en suspensión, la absorción y utilización de los nutrientes, reguladores de crecimiento y el agua es mayor que cuando se cultivan en medios semisólidos (Gatica-Arias *et al.*, 2008). No obstante, en un cultivo líquido pueden darse condiciones anaeróbicas debido a que el oxígeno se difunde con menor facilidad, lo que causa que



el nivel de oxígeno en el tejido se reduzca y con ello la acumulación de biomasa sea menor (Curtis, 2005).

Cuadro 2.5. Biomasa producida por los callos embriogénicos de *Coffea arabica* L. var. Colombia durante la fase de multiplicación.

<b>Posición del matraz-subcultivo</b>	<b>Biomasa (g)</b>
<b>Inclinado-sin</b>	18.94 a
<b>Vertical-sin</b>	5.17 b
<b>Vertical-con</b>	1.27 b

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

En contraste cuando los matraces permanecieron inclinados, las células solo estuvieron sumergidas temporalmente en el medio de cultivo, lo que pudo haber permitido que el oxígeno presente en el matraz estuviera más disponible para éstas, promoviendo que su metabolismo y crecimiento se diera de manera óptima (de Feria *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que los nutrientes del medio de cultivo soportaron el crecimiento de los callos durante tres meses sin tener que renovarlo, lo que permite ahorrar insumos, mano de obra, reducir el riesgo de contaminación, así como la probabilidad de que ocurra variación somaclonal (Bobadilla *et al.*, 2015). Mantener los matraces en posición inclinada puede ser una alternativa para la multiplicación exitosa de los cultivos embriogénicos de café.



### 2.3.3. Diferenciación (formación) de los embriones somáticos

#### 2.3.3.1. Efecto la combinación de reguladores de crecimiento

El análisis de los resultados mostró diferencias significativas en el número de embriones formados por gramo de callo, los callos generados en la combinación de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP formaron el mayor número de embriones por gramo de peso fresco (78.8) después de subcultivarlos en un medio con 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Cuadro 2.6). Al respecto, Workia *et al.* (2013) obtuvieron 58 embriones el híbrido “Ababuna” de *Coffea arabica* L., generado en 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, y cultivado durante seis meses en presencia de 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Cuadro 2.6. Número de embriones formados por los callos de *Coffea arabica* var. Colombia obtenidos en distintas combinaciones de reguladores de crecimiento.

Combinación de reguladores de crecimiento (mg L <sup>-1</sup> )	Número de embriones por gramo de callo
2,4-D, 0.5; BAP, 1.1	78.18 a
2,4-D, 1.0; BAP, 1.0	18.13 b
2,4-D, 2.0; BAP, 0.2	24.97 b

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).



Aunque las auxinas son esenciales para la etapa de inducción pueden afectar de manera negativa la diferenciación de los embriones. Por esta razón después de la etapa de inducción o multiplicación, se recomienda omitir o disminuir las auxinas en el medio de cultivo para lograr la diferenciación y el desarrollo de embriones (Campos *et al.*, 2017; Pádua *et al.*, 2014). Lo anterior fue confirmado en la presente investigación, ya que cuando se retiró el 2,4-D del medio, los embriones comenzaron a diferenciarse.

### **2.3.3.2. Efecto de la concentración de phytigel**

Los resultados mostraron que suplementar el medio de cultivo con 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel promovió la formación de un número significativamente mayor de embriones (53.2 por gramo de callo) que cuando se incluyeron 2.3 g L<sup>-1</sup> (25.17).

El hecho de que la mayor concentración de phytigel (5.0 g L<sup>-1</sup>) promoviera la formación de un mayor número de embriones, podría deberse a que éste actuó como una matriz la cual redujo la disponibilidad del agua y de los nutrimentos del medio de cultivo para las células. El movimiento del agua en la superficie del medio de cultivo semisólido se ve afectado por el potencial de solutos ( $\Psi\pi$ ) y el potencial matricial ( $\Psi m$ ), reducir alguno de los dos potenciales tiene como resultado menor movimiento del agua hacia la superficie, provocando un estrés hídrico en las células (Huang *et al.*, 2009; 2010). El estrés desempeña un papel importante en la inducción de la embriogénesis somática ya que promueve la reprogramación celular y la modificación en las vías fisiológicas y metabólicas (Pasternak *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003; Fehér, 2005; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Al respecto, Fehér *et al.* (2003) indican que el estrés no solo afecta la desdiferenciación celular, sino que también promueve la formación de embriones somáticos.



### 2.3.3.3. Efecto de la interacción combinación de reguladores de crecimiento y phytigel

Fue posible observar diferencias significativas entre tratamientos para el número de embriones por gramo de peso fresco de callo. El valor máximo para esta variable se obtuvo en los callos que provenían del medio de inducción que contenía 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel (T2); en tanto que el número más bajo de embriones se observó en el tratamiento T3 (2,4-D 1.0 mg L<sup>-1</sup>, BAP 1.0 mg L<sup>-1</sup>, phytigel 2.3 g L<sup>-1</sup>) (Cuadro 2.7). Los resultados mostraron que la presencia de 2,4-D y BAP en proporción 1:2 y alta concentración de phytigel (5.0 g L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo tuvo un efecto sinérgico y positivo para inducir la embriogénesis somática en los callos de café. La interacción entre auxinas, citocininas y estrés lleva a la reprogramación celular y adquisición de la competencia embriogénica de las células somáticas (Fehér, 2005). La embriogénesis somática solo es posible si las células son competentes y reciben los estímulos inductores adecuados, ya que debe sustituirse el patrón existente de expresión génica en el tejido del explante por un nuevo programa de expresión de genes embriogénicos (Chugh y Khurana, 2002; Zeng *et al.*, 2007; Zavattieri *et al.*, 2010).

Gatica-Arias *et al.* (2008) evaluaron el efecto de dos medios de cultivo en la formación de embriones de *Coffea arabica* cv. Catuaí y encontraron que en el medio que contenía 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP produjo 307 embriones, mientras que el medio que tenía 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 0.05 mg L<sup>-1</sup> de ANA solo 12 embriones, después de ocho semanas de cultivo.



Cuadro 2.7. Número de embriones por gramo de callo generados en los distintos tratamientos de crecimiento.

Tratamiento	Número de embriones por gramo de callo
T1: 2,4-D, 0.5 mg L <sup>-1</sup> ; BAP, 1.1 mg L <sup>-1</sup> ; phytigel, 2.3 g L <sup>-1</sup>	44.03 b
T2: 2,4-D, 0.5 mg L <sup>-1</sup> ; BAP, 1.1 mg L <sup>-1</sup> ; phytigel, 5.0 g L <sup>-1</sup>	118.74 a
T3: 2,4-D, 1.0 mg L <sup>-1</sup> ; BAP, 1.0 mg L <sup>-1</sup> ; phytigel, 2.3 g L <sup>-1</sup>	7.81 c
T4: 2,4-D, 1.0 mg L <sup>-1</sup> ; BAP, 1.0 mg L <sup>-1</sup> ; phytigel, 5.0 g L <sup>-1</sup>	27.94 b
T5: 2,4-D, 2.0 mg L <sup>-1</sup> ; BAP, 0.2 mg L <sup>-1</sup> ; phytigel, 2.3 g L <sup>-1</sup>	23.75 b
T6: 2,4-D, 2.0 mg L <sup>-1</sup> ; BAP, 0.2 mg L <sup>-1</sup> ; phytigel, 5.0 g L <sup>-1</sup>	26.19 b

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

#### 2.3.4. Desarrollo y maduración

El medio de maduración que contenía 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA (MD2) permitió que un mayor número de embriones globulares pasara a la etapa cotiledonar (Cuadro 2.8; Figura 2.1d); en tanto que el porcentaje de embriones en estado de torpedo inicial que llegaron a la etapa cotiledonar no fue significativamente diferente en ninguno de los medios probados (Cuadro 2.8; Figura 2.1d). Los resultados muestran que incluir en el medio de desarrollo auxinas y citocininas en proporción 1:1 promovió la diferenciación de los embriones somáticos y que 0.25 mg L<sup>-1</sup> de ambos reguladores de crecimiento fue suficiente para inducir esta respuesta.

Asimismo, fue posible observar que los embriones en etapa globular pueden llegar a la etapa cotiledonar al cultivarse en un solo medio y que no es necesario separar los embriones en las diferentes etapas (globular y torpedo) para promover su desarrollo, ya que el medio MD2 funciona para ambas etapas, con lo que se puede disminuir tiempo, reactivos y mano de obra.

Cuadro 2.8. Porcentaje de embriones globulares y torpedo que alcanzaron la madurez (etapa cotiledonar) después de 30 días de cultivo en los medios de desarrollo.

Medio de cultivo	Embriones globulares	Embriones torpedo
	Maduración (%)	Maduración (%)
MD1	39.24 b	40.90 a
MD2	51.72 a	45.41 a

MD1: Cinetina, 0.5 mg L<sup>-1</sup>; AIA, 0.5 mg L<sup>-1</sup>; MD2: BAP, 0.25 mg L<sup>-1</sup>; AIA, 0.25 mg L<sup>-1</sup>. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).



### 2.3.5. Conversión

El porcentaje de conversión de los embriones en plántulas fue significativamente mayor cuando éstos se colocaron en la mezcla de sustrato perlita:vermiculita (21.5 %) que cuando se cultivaron en medio de cultivo semisólido (7.2%) (Figura 2.1e, f). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Georget *et al.* (2017) quienes encontraron que la tasa de conversión promedio de los embriones somáticos de los híbridos H1 (T5296 x RS), H3 (Caturra x ET 531), H10 (T5296 x RS), H16 (T5296 x ET01A1), H17 (Catuai x ET59A2), otros híbridos de *Coffea arabica* solo fue de 37 %. Etienne *et al.* (2013) observaron que en promedio 54.8 % de los embriones de *C. arabica* del híbrido F1 T5296 x Rume Sudan lograron convertirse en plántulas. Lo anterior, indica que la baja conversión de embriones a plántulas aún es un cuello de botella para la micropropagación de plantas de café mediante embriogénesis somática; se requiere más investigación al respecto con el objeto que la propagación *in vitro* de café sea una técnica rentable y reproducible (Etienne *et al.*, 2013; Georget *et al.*, 2017).

Las plántulas obtenidas en el medio semisólido fueron más pequeñas que las regeneradas en la mezcla de sustratos; además, se aclimataron con mayor facilidad a las condiciones *ex vitro*. Se ha comprobado que el uso de sustratos en la conversión de embriones a plántulas tiene ventajas sobre los medios de cultivo, ya que el costo de los sustratos es menor que el del agente gelificante (agar, phytigel, gelrite), el cual llega a representar hasta el 70 % del costo de las plantas propagadas *in vitro* (Flores-Hernández *et al.*, 2017; Jiménez-Montiel *et al.*, 2018). Otra de las ventajas de los sustratos son sus características físicas, como la porosidad que ayuda a mantener un mejor balance de agua y oxígeno, mejorando la difusión de nutrientes, lo que ayuda a la formación y desarrollo de un sistema radical vigoroso en menor tiempo (Jiménez-Montiel *et al.*, 2018).

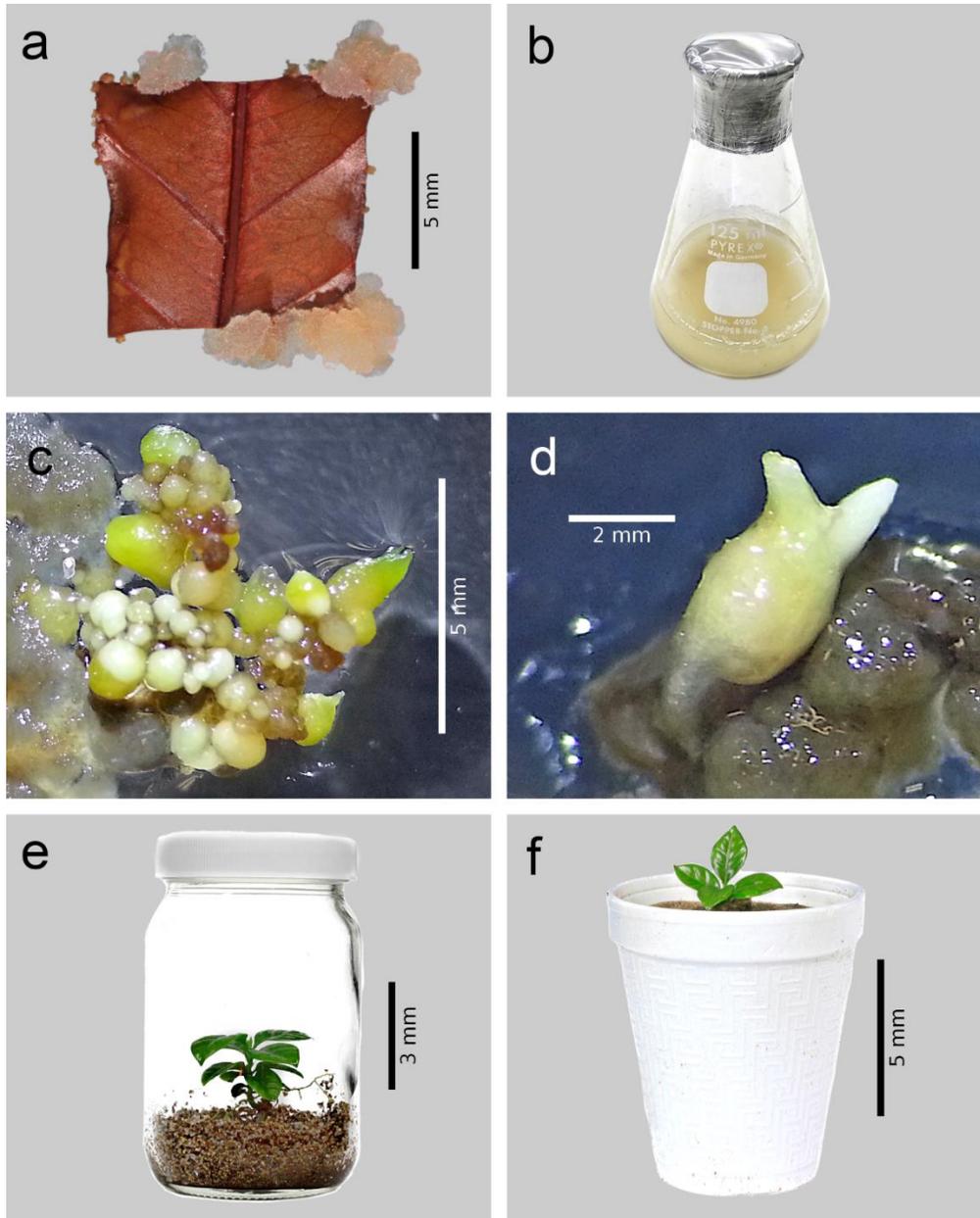


Figura 2.1. Embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). (a) Callo embriogénico generado en medio de inducción a partir de explantes de hoja después de ocho semanas de cultivo. (b) Multiplicación de callo embriogénico en medio líquido después de 12 semanas. (c) Embriones en distintas fases de desarrollo. (d) Embriones germinados después de un mes de cultivo en medio de desarrollo. (e) Vitroplanta de café cultivada en vermiculita:perlita. (f) Planta de café regenerada *in vitro* cultivada en condiciones de invernadero.



Asimismo, a diferencia de las raíces formadas *in vitro*, las que se generaron en los sustratos fueron ramificadas y tenían pelos radicales, características que fueron observadas por otros autores en vitroplantas de café (Etienne *et al.*, 2002).

### **2.3.6. Análisis histológico de la embriogénesis somática**

Después de 30 días de cultivo en el medio de inducción de callo, los explantes comenzaron a formar callo en la periferia y en la nervadura central principalmente (Figura 2.2a). El callo estuvo conformado básicamente de células de parénquima grandes, con vacuolas, núcleos poco evidentes y espacios intercelulares abundantes, tal como lo observaron Torres *et al.* (2015) y Ardiyani (2015) en *C. arabica* var. Catiguá y *C. liberica*, respectivamente. Durante los 30 días siguientes, las células del callo sufrieron divisiones continuas que permitieron aumentar su biomasa. Después de ocho semanas de que los callos se transfirieron al medio de diferenciación de embriones, en su superficie comenzaron a formarse células pequeñas, con citoplasma denso, núcleos evidentes, pocos espacios intercelulares, similares a células meristemáticas, que mostraban cierto grado de organización (masas proembriogénicas) (Figura 2.2a). Estructuras similares fueron observadas por Gatica *et al.* (2008) y Ribas *et al.* (2011) en cultivos embriogénicos de *C. arabica* var. Caturra y Catuaí. Las masas proembriogénicas formadas comenzaron a acumular compuestos fenólicos en alta concentración, después de 12 semanas de cultivo; la presencia de dichos compuestos provocó el oscurecimiento de dichas masas (Figura 2.2a); solo aquellas masas celulares que producían fenoles lograron formar embriones. Estos resultados coinciden con los de Martins *et al.* (2016) quienes observaron que la presencia de fenoles en los callos de *Arbutus unedo* y *A. canariensis* fue un requisito previo a la formación de embriones somáticos. Este es el primer reporte en el que se asocia la producción de fenoles con la capacidad embriogénica en café.



Tonietto *et al.* (2012) indican que durante las primeras etapas de la embriogénesis somática se generan gran cantidad de sustancias reactivas de oxígeno (SRO). Para defenderse de las SRO, las células desarrollan distintos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que catalizan la descomposición de dichas moléculas de oxígeno, entre los que se incluyen tocoferoles, carotenoides, compuestos fenólicos, entre otros (Kulbat, 2016). Además, compuestos fenólicos como los fenilpropanoides pueden llegar a formar lignina y suberina, misma que dan fuerza mecánica a las paredes celulares (Michalak, 2006).

A las 16 semanas de cultivo en el medio de diferenciación, embriones en estado globular se formaron a partir de las masas proembriogénicas; dichos embriones mostraron una protodermis que cubría la periferia del embrión (Figura 2.2c). Cuando los embriones globulares se cultivaron en el medio de maduración, alcanzaron la fase de corazón (18 semanas de cultivo) (Figura 2.2d) y torpedo (19 semanas) (Figura 2.2e). Por otro lado, en los embriones en estado de torpedo y cotiledonar fue posible observar un grupo de células alargadas y con núcleos visibles que se distribuían a lo largo del embrión y que constituía la zona del procambium vascular, tal como lo reportaron Bartos *et al.* (2018) en *C. arabica* var. Catuaí (Figura 2.2e, f).

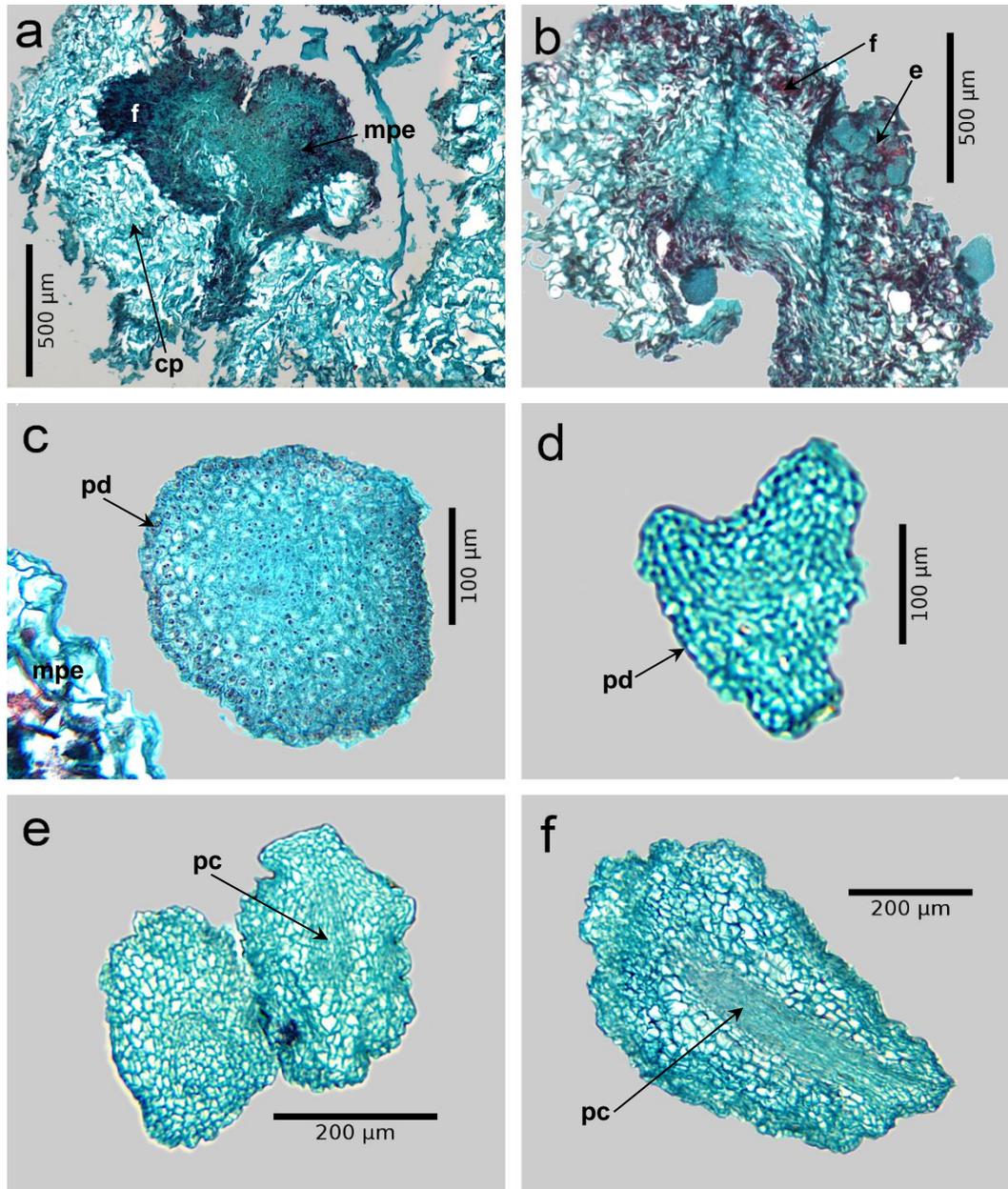


Figura 2.2 Histología de la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. var Colombia. (a) Masa proembriogénica formándose a partir de un callo primario. (b) Embriones somáticos diferenciados sobre la masa proembriogénica que produce fenoles. (c) Embrión globular a las 16 semanas de cultivo en el medio de diferenciación. (d) Embrión en etapa de corazón después de 18 semanas de cultivo en medio de diferenciación. (e) Embrión en etapa torpedo después de 19 semanas de cultivo en el medio de diferenciación. (F) Embrión en etapa cotiledonar en el que se observa la protodermis y el procambium. Cp: callo primario; mpe: masa proembriogénica; f: fenoles; e: embriones; pd: protodermis; pc: procambium.



## 2.4. CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo establecidas en la presente investigación permitieron inducir la embriogénesis somática indirecta en la variedad Colombia de *C. arabica*, a partir de explantes de hoja. El estrés osmótico generado por la alta concentración de phytigel en el medio aumentó la capacidad de los explantes para formar embriones. Es posible multiplicar los cultivos embriogénicos con baja concentración de nutrimentos y sistemas en los que las células estén en contacto con el medio temporalmente. Los embriones regenerados pudieron convertirse en plántulas y establecerse en condiciones *ex vitro*.

## 2.5. LITERATURA CITADA

- Alvarado-Alvarado G, Puerta-Quintero GI (2002) La variedad Colombia y sus características de calidad física y en taza. Cenicafé. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Ardiyani F (2015) Morphological Characterization and Identification of *Coffea liberica* Callus of Somatic Embryogenesis Propagation. Pelita Perkebunan 31(2): 81-89. <https://doi.org/10.22302/icri.jur.pelitaperkebunan.v31i2.168>
- Bartos PMC, Gomes HT, Gomes SM *et al* (2018) Histology of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Biologia* 73(12): 1255–1265. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0131-5>
- Bobadilla LR, Cenci A, Guyot R *et al* (2015) Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122: 517-531. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0772-9>
- Campos NA, Panis B, Carpentier SC (2017) Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Front Plant Sci* 8: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>



- Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during somatic embryogenesis - Recent advances. *Current Science* 83(6): 715-730
- Curtis WR (2005) Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81: 255-264. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6646-1>
- Davis PA (2011) *Psilanthus mannii*, the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. *Nord J Bot* 29: 471–472. <https://doi:10.1111/j.1756-1051.2011.01113>
- de Feria M, Jimenez E, Barbon R, Capote A, Chavez M, Quiala E (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72: 1–6. <https://doi:10.1023/A:1021202305692>
- de Rezende CJ, de Carvalho SCH, Pasqual M, Santos RAC, de Carvalho MS (2011) Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. *Ciência Rural Santa Maria*. 41: 384–389.
- Ducos JP, Labbe G, Lambot C, Petiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43: 652-659. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9075-0>
- Etienne H, Bertrand B, Georget F, Lartaud M, Montes F, Dechamp E *et al* (2013) Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiol* 33: 640-653. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt034>
- Etienne H, Bertrand B, Montagnon C, Déchamp E, Jourdan I, Alpizar E *et al* (2012) Un exemple de transfert technologique réussi en micropropagation: la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. *Cah Agric* 21: 115–124. <https://doi:10.1687/agr.2012.0553>
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta* 1849: 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plants cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 74: 201-228. <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- Flores-Hernández LA, Robledo-Paz A, Jimarez-Montiel MJ (2017) Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento *in vitro* de orquídeas. *Rev Mex Cienc Agríc* 8(6): 1315-1328. <https://doi:10.29312/remexca.v8i6.297>



- Gatica-Arias AM, Arrieta-Espinoza G, Espinoza-Esquivel AM (2008) Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimization of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. Electron J Biotechnol 11: 1-12. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582008000100010>
- Georget F, Courtel P, Garcia EM, Hidalgo M, Alpizar E, Breitler JC *et al* (2017) Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. Sci Hortic 216: 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.017>
- Huang Y, Begum M, Chapman B, Hocking AD (2010) Effect of reduced water activity and reduced matric potential on the germination of xerophilic and non-xerophilic fungi. Int J Food Microbiol 140(1): 1-5. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.026>
- Huang Y, Chapman B, Wilson M, Hocking AD (2009) Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. Int J Food Microbiol 133(1-2): 179-85. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.024>.
- Jimarez-Montiel MJ, Robledo-Paz A, Ordaz-Chaparro VM *et al* (2018) Protocol for the reduction of costs in habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.) micropropagation. Phyton 87: 94-104.
- Karami O, Saidi A (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. Mol Biol Rep 37:2493-2507. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9764-3>
- Kulbat K (2016) The role of phenolic compounds in plant resitance. Biotechnol Food Sci 80(2): 97-108. <http://www.bfs.p.lodz.pl>
- López CMA, Márquez GJ, Murguía SG (2005) Técnicas para el estudio del desarrollo de angiosperamas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2 ed. 177 p.
- López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L, Castellanos-Juárez M *et al* (2010) Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. Rev Fitotec Mex 33: 205-213.
- Martins JF, Santos T, Correia SI, Canhoto JM (2016) Somatic embryogenesis in *Arbutus unedo* L. and other *Ericaceae*. Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science, Online Edition 673p.



- Menéndez-Yuffá A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H (2010) A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 297-307. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9734-4>
- Michalak A (2006) Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J of Environ Stud* 15(4): 523-530.
- Molina DM, Aponte ME, Cortina H, Moreno G (2002) The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 71: 117-123. <https://doi.org/10.1023/A:1019965621041>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- Pádua SM, Paiva VL, da Silva CL *et al* (2014) Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. *Ciênc. Rural* 44: 660–665. <https://doi: 10.1590/S0103-84782014000400014>
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H *et al* (2002) The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. *Plant Physiol* 129(4): 1807-1819. <https://doi:10.1104/pp.000810>
- Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20: 1141–1149. <https://doi:10.1007/s00299-002-0464-x>
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86: 285–301. <https://doi: 10.1007/s11240-006-9139-6>
- Ribas AF, Dechamp E, Champion A, Bertrand B, Combes M *et al* (2011) Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biol*. 11: 92. <https://doi:10.1186/1471-2229-11-92>
- SADER (2018) México, onceavo productor mundial de café. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/sader/es/articulos/mexico-onceavo-productor-mundial-de-cafe>



- SAGARPA (2017) Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Café mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)
- Santana-Buzzy N, Rojas-Herrera R, Galaz-Ávalos RM *et al* (2007) Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *Vitro Cell Dev Biol Plant* 43: 507-520. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9074-1>
- SAS Institute (2002) SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1) Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- SIAP (2018) Atlas agroalimentario 2012-2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- Silva AT, Barduche D, do Livramento KG *et al* (2015) A putative baby boom-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cell Dev Biol- Plant* 51: 93-101. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9643-z>
- Song Y (2014) Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 106–113. <https://doi.org/10.1111/jipb.12131>
- Tonietto A, Sato JH, Teixeira, de Souza EM, Pedrosa FO, Franco OL, Mehta A (2012) Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Mol Biol Report* 30: 1393-1399. <https://doi.org/10.1007/s11105-012-0425-7>
- Torres LF, Diniz LEC, Do Livramento KG *et al* (2015) Gene expression and morphological characterization of cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Catiguá MG2 in different cultivation stages. *Acta Physiol Plant* 37: 175. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1924-6>
- USDA (2012) Production Flat with Quality Exports and Robusta Bean Imports Both Rising. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-14-2012.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-14-2012.pdf)
- USDA (2016) Mexico Launches New Policies as Rust Continues to Impact Production. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-13-2016.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-13-2016.pdf)



- USDA (2017) Mexico Launches New Policies as Rust Continues to Impact Production. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-13-2016.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-13-2016.pdf)
- USDA (2018) Coffee Plan on Track to Achieve Goals. United States Department of Agriculture. [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-15-2018.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-15-2018.pdf)
- van Boxtel J, Berthouly M, Carasco C, Dufour M, Eskes A (1995) Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Reports* 14: 748-752. <https://doi.org/10.1007/BF00232915>
- Wintgens JN (2012) "The coffee plant," in *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*, ed. W. J. Nicolas (Weinheim: Wiley-VCH). pp: 3–24.
- Workia A, Tileye F, Disasa T (2013) Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88: 469-475. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512993>
- Yang X, Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 36-57. <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electron J Biotechnol* 13: 1-9. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582010000100012>
- Zeng YA, Rahnema, M, Wang S, Sosu-Sedzorme W, Verheyen EM (2007) *Drosophila* Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation. *Development* 134(11): 2061-2071. <https://doi.org/10.1242/dev.02853>



### CAPÍTULO III. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA E INDIRECTA EN *Coffea arabica* var. Colombia

#### RESUMEN

México es uno de los diez principales productores de café en el mundo; sin embargo, el estado actual de sus plantaciones enfrenta problemas de índole genético y fitosanitario, lo cual requiere que los cafetales sean renovados o repoblados con plantas de calidad. El cultivo de tejidos mediante la micropropagación es una técnica que puede contribuir a cubrir dicho requerimiento. El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones de cultivo para inducir la embriogénesis somática en *Coffea arabica* var. Colombia a partir de tejidos de hoja. Segmentos de hoja fueron cultivados durante 0, 3, 5, 8 o 10 días en medios de cultivo que contenían las sales de Yasuda *et al.* o Murashige y Skoog (MS), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.6 mM de sorbitol. El medio que contenía las sales de Yasuda *et al.*, 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.6 mM de sorbitol, promovió la formación de embriones sin una fase de callo (embriogénesis directa). El medio de cultivo compuesto por las sales MS, 0.6 mM de sorbitol, 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-D indujo la embriogénesis somática indirecta en los explantes de hoja. El porcentaje de explantes que formaron embriones fue superior en la embriogénesis directa (77.8) respecto a la indirecta (55); el número de embriones por explante formados mediante embriogénesis indirecta (153.2) fue significativamente mayor que aquellos generados por embriogénesis directa (10.3). Las condiciones de cultivo establecidas en este trabajo permitieron la formación de embriones somáticos en la variedad Colombia.

**Palabras clave:** *Coffea arabica*, café, cultivo de tejidos, embriogénesis somática, sorbitol



## DIRECT AND INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Coffea arabica* var.

### Colombia

#### ABSTRACT

Mexico is one of the top ten coffee producers in the world; however, the current state of its plantations faces genetic and phytosanitary problems that require for coffee plantations to be renewed or repopulated with high quality plants. Tissue culture by micropropagation could help meet this requirement. The aim of this study was to establish culture conditions to induce somatic embryogenesis in *Coffea Arabica* Colombia variety from leaf tissues. Leaf segments were cultured for 0, 3, 5, 8 or 10 days on media containing Yasuda *et al.* or Murashige and Skoog salts (MS), 1.12 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and 0.6 mM sorbitol. The culture medium containing the Yasuda *et al.* salts, 1.12 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.6 mM sorbitol promoted the formation of embryos without a callus phase (direct embryogenesis). The medium composed of MS salts, 0.6 mM sorbitol, 1.12 mg L<sup>-1</sup> BAP, and 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D acid induced indirect somatic embryogenesis in explants. The percentage of explants that formed embryos was higher in direct embryogenesis (77.8) compared to indirect embryogenesis (55); the number of embryos per explant formed by indirect embryogenesis (153.2) was significantly higher than those generated by direct embryogenesis (10.3). The culture conditions established in this study allowed the formation of somatic embryos in Colombia variety.

**Key words:** *Coffea arabica*, coffee, tissue culture, somatic embryogenesis, sorbitol



### 3.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de café arábica (*Coffea arabica* L.) en México representa una actividad estratégica que involucra más de tres millones de empleos, de los cuales el 70% está vinculado a productores y familias de comunidades indígenas del país (AMECAFE, 2012). Los estados de Chiapas y Veracruz aportan 72 % de la producción nacional y constituyen del 20 al 35 % de superficie sembrada de este producto (SIAP, 2013).

Factores como la falta de prácticas agrícolas adecuadas y la presencia de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) afectan de manera significativa este cultivo en México (SENASICA, 2013). Asimismo, las plantaciones presentan problemas de índole genético y fitosanitario, por lo que es necesario renovarlas o repoblarlas con plantas de buena calidad. Los métodos convencionales de propagación, como esquejes o semillas, pueden enfrentarse al alto costo de la mano de obra requerida, baja tasa de enraizamiento o rápida pérdida de la viabilidad (Etienne *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2015). Por otro lado, la incidencia de la roya en el cultivo del café impacta no sólo en la cantidad y la calidad de la producción, sino también en el costo que representa implementar las medidas de control en los cultivares susceptibles (CABI, 2013).

La variedad Colombia, cuyos progenitores son el “Híbrido de Timor” y la variedad “Caturra”, presenta cualidades como alto rendimiento, buena adaptación y calidad de taza, además de tolerancia a la roya (Santana *et al.*, 2004; Santos- Briones y Hernández-Sotomayor, 2006).

Herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos, ha permitido la propagación masiva de distintas especies de importancia económica (Venkataiah *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016; Georget *et al.*, 2017), por lo que puede ser una técnica útil en la propagación de genotipos sobresalientes de café.



Una de las vías morfogénicas que permite la regeneración de plantas *in vitro* es la embriogénesis somática, que consiste en la formación de embriones, a partir de células somáticas, los cuales son morfológica y fisiológicamente similares a los cigóticos. La formación de los embriones somáticos puede involucrar una fase de callo previa (embriogénesis indirecta) o formarse sin requerir que se forme callo (embriogénesis directa) (Yang y Zhang, 2010).

Aun cuando existen protocolos para la propagación de distintas variedades e híbridos de café mediante embriogénesis somática (Etienne, 2006; Ahmed *et al.*, 2013), hasta donde se tiene conocimiento, para la variedad Colombia no existe un protocolo de regeneración por embriogénesis somática, y dado que la respuesta *in vitro* está en función del genotipo, es necesario desarrollar protocolos específicos para cada especie o variedad (Silva *et al.*, 2015).

El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para inducir la embriogénesis somática en *C. arabica* var. Colombia a partir de tejidos de hoja.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Desinfestación del material vegetal**

El primer par de hojas jóvenes obtenidas de plantas de seis meses de edad de *Coffea arabica* var. Colombia, se colocaron en una solución fungicida al 1 % (Promyl<sup>®</sup>) durante 15 min y luego en una solución de hipoclorito de sodio con 1.8 % de cloro activo (Cloralex<sup>®</sup>) por 20 min; para finalmente, enjuagarlas con agua destilada esterilizada.

### **3.2.2. Embriogénesis somática directa**

Segmentos de 1 cm<sup>2</sup> provenientes de hojas (explantes) previamente desinfectadas se cultivaron durante 0, 3, 5, 8 y 10 días en el medio nutritivo que consistió de las sales de Yasuda *et al.* (1985), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytagel, 100 mg



L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 0.6 mM de sorbitol (medio 1) después, los explantes se transfirieron a un medio con la misma composición, pero sin sorbitol. El pH del medio se ajustó a 6.3 y se esterilizó durante 15 min en una autoclave a 121 °C.

### **3.2.3. Embriogénesis somática indirecta**

Los explantes se cultivaron durante 0 y 10 días en un medio que contenía las sales basales de Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionadas con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytagel, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 0.6 mM de sorbitol (medio 2); transcurrido este tiempo los explantes se subcultivaron en el mismo medio, pero carente de sorbitol. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y se esterilizó durante 15 min en una autoclave a 121 °C.

### **3.2.4. Condiciones de cultivo**

Los cultivos se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25 ± 2 °C en oscuridad total.

### **3.2.5. Variables de respuesta y diseño experimental**

Después de seis meses de cultivo se cuantificó el porcentaje de explantes que produjeron embriones y el número de embriones que se formaron en cada explante o gramo de callo. El diseño experimental para la embriogénesis directa consistió en uno completamente al azar con cinco tratamientos y 10 repeticiones cada uno, se consideró una caja Petri con seis explantes como una repetición. Para la embriogénesis indirecta el diseño experimental fue completamente al azar con dos tratamientos y 10 repeticiones cada uno, una caja Petri con seis explantes se consideró como una repetición. Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias se llevó a cabo mediante la

prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los datos expresados en porcentaje se transformaron con la función arcoseno.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Embriogénesis somática directa

Se formaron masas proembriogénicas en los márgenes de los explantes de todos los tratamientos después de cuatro semanas de cultivo (Figura 3.1a). Las masas proembriogénicas sufrieron una serie de divisiones organizadas que dieron lugar a la diferenciación de embriones somáticos (Figura 3.1b-d), tal como lo observaron Gatica *et al.* (2007) en *Coffea arabica* variedad Caturra y Catuaí.

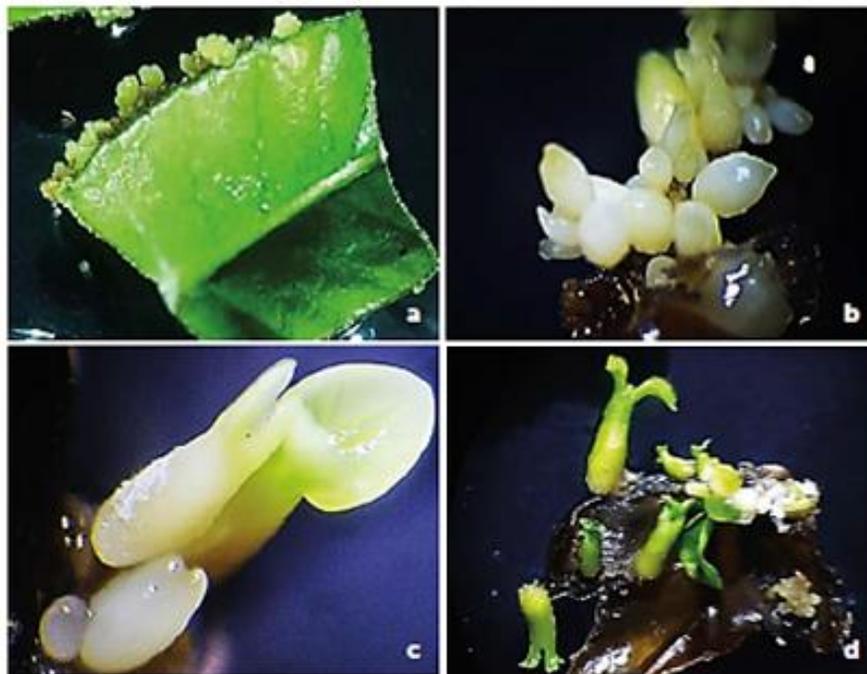


Figura 3.1. Embriogénesis somática directa de *Coffea arabica* var. Colombia. (a) Masas proembriogénicas. (b) Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. (c) Embriones somáticos en etapa cotiledonar. (d) Embriones somáticos germinados.



Después de seis meses de cultivo el porcentaje más alto de explantes que formaron callo embriogénico (77.8) y el número máximo de embriones por explante (10.3) se obtuvo en el medio 1 sin sorbitol; los valores más bajos para ambas variables se registraron en los explantes que permanecieron en sorbitol durante 10 días (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Embriogénesis somática directa en *Coffea arabica* var. Colombia después de seis meses de cultivo.

Tiempo en exposición al sorbitol (días)	Explantes que formaron embriones (%)	Número de embriones por explante
0	77.8 a	10.3 a
3	33.3 b	3.6 b
5	44.4 b	3.8 b
8	33.3 b	3.5 b
10	0.0 c	0.0 c

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

Al respecto, Cueva-Agila *et al.* (2015) indican que la exposición de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl a 0.4 M de sorbitol por más de cuatro horas en medio líquido, inhibió la formación de callos y causó la muerte de los explantes (protocormos). Por su parte, Ghane y Nikam (2014) observaron bajo número de embriones somáticos en *Guizotia abyssinica* Cass cuando agregaron 0.01, 0.04 y 0.06 M de sorbitol al medio de cultivo.



### 3.3.2. Embriogénesis somática indirecta

No se observaron diferencias significativas para el porcentaje de explantes que formaron callo embriogénico ni para el número de embriones que se formó en un gramo de callo cuando se cultivaron en el medio 2 con y sin sorbitol (Cuadro 3.2). Es posible que la concentración o el tiempo de exposición al sorbitol utilizados generaran un nivel de estrés por arriba del que los explantes tenían la capacidad de soportar, afectando negativamente la embriogénesis somática indirecta.

Cuadro 3.2. Embriogénesis somática indirecta en *Coffea arabica* var. Colombia después de seis meses de cultivo.

Tiempo en exposición al medio 2 (días)	Explantes que formaron callo (%)	Número de embriones por gramo de callo
0	55.0 a	153.2 a
10	35.0 a	114.4 a

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

El estrés osmótico afecta el contenido de agua disminuyendo el potencial hídrico extracelular y la turgencia, lo cual puede repercutir en la supervivencia de las células y en su capacidad morfogénica (Lee y Huang, 2013; Odjakova y Conger, 1999).



Después de ocho semanas de cultivo fue posible observar la formación de callo friable (disgregable) y compacto (no disgregable) en los márgenes de los explantes, a partir de los cuales se formaron masas de proembriónicas que dieron lugar a la diferenciación de los embriones somáticos (Figura 2a, b).

Los callos generados por los explantes expuestos durante 10 días al sorbitol, así como aquellos que no lo fueron, formaron embriones somáticos después de seis meses de cultivo (Figura 2c), mismos que se convirtieron en plántulas cuatro semanas más tarde (Figura 2d). Los resultados obtenidos indican que la composición medio de cultivo (sales nutritivas, reguladores de crecimiento, agente gelificante, pH) puede determinar la ruta morfogénica (directa o indirecta) que las células de un explante siguen para formar embriones somáticos. Pasternak *et al.*, (2002) y Ötvös *et al.* (2005) postulan que las auxinas como el 2,4-D y factores que causan estrés abiótico, son factores clave en la adaptación celular, reprogramación de la expresión genética, el metabolismo y la fisiología celular, que se traduce en totipotencia celular y adquisición de la capacidad para formar embriones somáticos. Asimismo, se ha propuesto, que la dediferenciación celular y la embriogénesis somática son procesos asociados al estrés (Dutis *et al.*, 1995). De igual manera, Davletova (2001) encontró que varios genes relacionados con el estrés se inducen durante los primeros estados de la embriogénesis somática de alfalfa (*Medicago sativa*).

Considerando que el callo generado durante seis meses a partir de un explante (un gramo aproximadamente) produjo hasta 153.2 embriones (embriogénesis indirecta), mientras que, en el mismo periodo, los explantes que siguieron la vía directa de la embriogénesis sólo formaron un máximo de 10.3 embriones, se infiere que la embriogénesis somática indirecta es una ruta morfogénica más eficiente que la embriogénesis directa, bajo las condiciones de cultivo probadas en esta investigación.

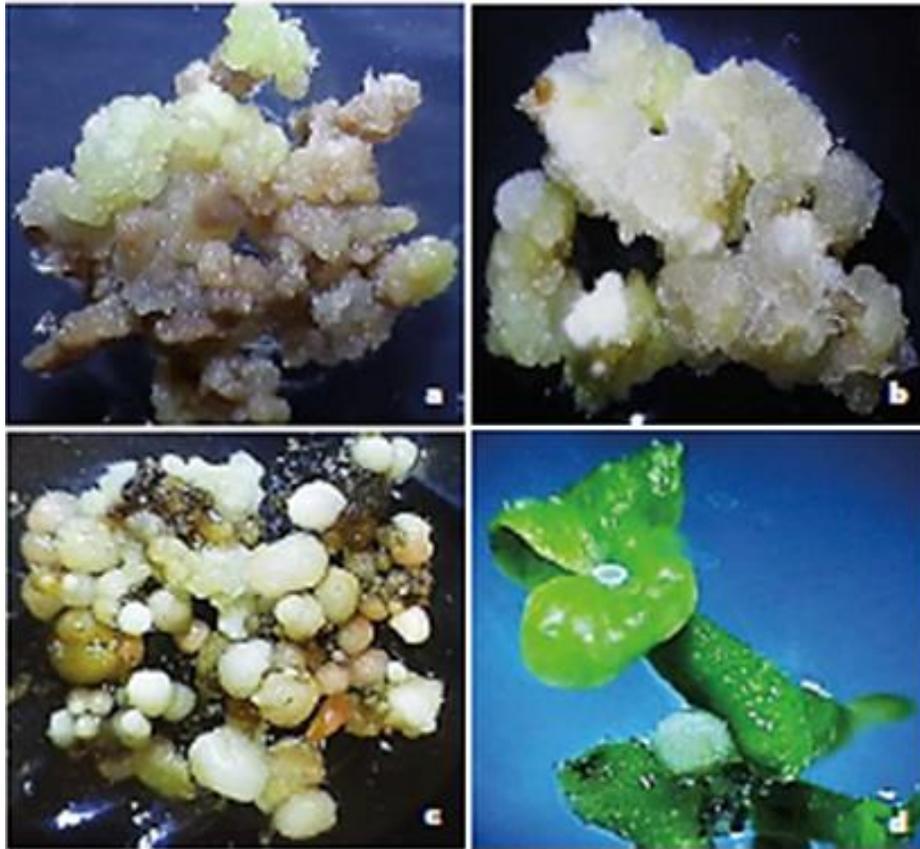


Figura 3.2. Embriogénesis somática indirecta en explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Colombia. (a) Callo compacto. (b) Callo friable. (c) Embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo. (d) Embrión somático germinado.

Mediante embriogénesis somática directa, es posible producir plantas fieles al tipo en un tiempo relativamente corto, pero su tasa de multiplicación generalmente es baja; en tanto que la embriogénesis indirecta, podría causar algunas variaciones genéticas, no obstante, hace factible la propagación masiva (Jayanthi *et al.*, 2011; Bobadilla *et al.*, 2013).



La capacidad de formación de embriones mediante embriogénesis indirecta y las características de los callos embriogénicos obtenidos en la presente investigación, hacen factible su uso en la producción de plantas de café a gran escala por medio de biorreactores.

### 3.4. CONCLUSIONES

La formación de embriones somáticos por la vía directa o indirecta, estuvo en función de las sales nutritivas, reguladores de crecimiento, agente gelificante y pH utilizados en el medio de inducción. El sorbitol mostró un efecto negativo tanto en la embriogénesis directa como en la indirecta. Las condiciones de cultivo probadas en la presente investigación permitieron establecer un protocolo de propagación *in vitro* de la variedad Colombia mediante embriogénesis somática.

### 3.5. LITERATURA CITADA

- Ahmed W., Tileye F., Tesfaye D. 2013. Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. J. Hort. Sci. Biotech. 88: 469-475.
- Alves-dos Santos M.R., Augusto-de Souza C., Felix-da Rocha J., Ventura-de Araujo L., Curitiba- Espindula M. 2015. Comparison of economic efficiency between *in vitro* and field methods for vegetative propagation of *Coffea canephora*. Austr. J. Basic Appl. Sci. 9: 1-7.
- AMECAFE. 2012. Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café. Plan Integral de Promoción del Café de México.
- Bobadilla L.R., Cenci A., Georget F., Bertrand B., Camayo G., Dechamp E., Simpson J., Herrera J.C., Santoni S., Lashermes P., Etienne H. 2013. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. PLOS One 8: e56372.
- CABI. 2013. Centre for Agriculture and Biosciences International. Crop Protection Compendium. CAB International, Walling-Ford, UK.



- Cueva-Agila A.Y., Guachizaca I., Cella R. 2015. Combination of 2,4-D and stress improves indirect somatic embryogenesis in *Cattleya maxima* Lindl. Plant Biosyst. 149: 235-241.
- Davletova S., Mészáros T., Miskolczi P., Oberschall A., Torok K., Magyar Z., Dudits D., Deák M. 2001. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. J. Exp. Bot. 52: 215-221.
- Dudits D., Gyorgyey J., Bogre L., Bako L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. *In vitro* embryogenesis in plants. In: Thorpe T.A. (ed) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 267-308.
- Etienne H. 2006. Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.) In: Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. S.M. Jain and P.K. Gupta (eds.). Springer. Dordrecht, Netherlands. pp. 167-179.
- Etienne H. Anthony F., Dussert S., Fernandez D., Lashermes P., Bertrand B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant 38: 129-138.
- Gatica A.M., Arrieta E.G., Espinoza A.M. 2007. Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. Agron. Costar. 3: 85-94.
- Georget F., Courtel P., Malo G.E., Hidalgo M., Alpizar E., Breitler J.C., Bertrand B, Etienne H. 2017. Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. Sci. Hort. 216: 177-185.
- Ghane S.G., Nikam T.D. 2014. Influence of osmotic stress, physicochemical factors and nitrogen supplements on embryogenesis and plantlet formation in *Guizotia abyssinica* Cass. Ind. J. Plant Physiol. 19: 263-272.



- Jayanthi M., Mohan N.M., Mandal P.K. 2011. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 249-251.
- Lee S.T., Huang W.L. 2013. Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. *Plant Growth Regul.* 73: 193-204.
- McCook S., Vandermeer J. 2015. The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. *Phytopathol.* 105: 1164-73.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Odjakova M.K., Conger B.V. 1999. The influence of osmotic pretreatment and inoculum age on the initiation and regenerability of switchgrass suspension cultures. *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant* 35: 442-444.
- Ötvös K., Pasternak T.P., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Szucs A., Bottka S., Dudits D., Fehér A. 2005. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J.* 43: 849-860.
- Pasternak T.P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Vanonckelen H.A., Dudits D., Fehér A. 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfafa. *Plant Physiol.* 129: 1807-1819.
- Santana N., González M.E., Valcárcel M., Canto-Flick A., Hernández M.M., Fuentes-Cerda C.F.J., Barahona F., Mijangos-Cortés J., Loyola-Vargas V.M. 2004. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant* 40: 95-101.
- Santos-Briones C.D., Hernández-Sotomayor S.M. 2006. Coffee biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 217-227.



- SENASICA. 2013. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Manual operativo de la campaña preventiva contra la roya del cafeto. Ciudad de México.
- SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de Producción de Cultivos Cíclicos y Perennes 2011. Ciudad de México.
- Silva A.T., Barduche D., do Livramento K.G., Paiva L.V. 2015. A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant 51: 93-101.
- Venkataiah P., Bhanuprakash P., Kalyan S.S., Subhash K. 2016 Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. J. Gen. Engin. Biotech. 14: 55-60.
- Verma S.K., Das A.K. Cingoz G.S. Uslu E., Gurel E. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. Biotech. Rep. 10: 66-74.
- Yang X., Zhang X. 2010. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Crit. Rev. Plant Sci. 29: 36-57.
- Yasuda T. Fujii Y., Yamaguchi T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol. 26: 595-597.



## CONCLUSIONES GENERALES

- Tanto los callos friables como los compactos obtenidos a partir de explantes foliares de la variedad Colombia generaron embriones somáticos.
- Cultivar los callos en un medio de cultivo con 5.0 g L<sup>-1</sup> de phytigel permitió obtener el número más alto de embriones somáticos por gramo de peso fresco de callo.
- La maduración de los embriones ocurrió en presencia de 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA.
- Un mayor número de embriones somáticos pudieron convertirse en plantas cuando se utilizó una mezcla de perlita:vermiculita que cuando se cultivaron en agar.
- Fue posible regenerar plantas de la variedad Colombia mediante embriogénesis somática directa e indirecta, siendo más eficiente la indirecta.