

Influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta

Raúl Barbón-Rodríguez*, Elio Jiménez González y Alina Capote Pérez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830. e-mail: barbon@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

Se establecieron las condiciones para la fase de diferenciación de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares embriogénicas en los genotipos Caturra rojo (*Coffea arabica*) y Robusta (*Coffea canephora*). Para ello, se emplearon suspensiones celulares con elevados potenciales embriogénicos y coeficientes de multiplicación estables. Al estudiar la densidad de inoculación para la fase de diferenciación para las dos variedades se presentaron diferencias en la capacidad embriogénica entre estas, alcanzándose un total de 556 500 ES.l⁻¹ para el Caturra rojo y 298 670 ES.l⁻¹ para el Robusta. El mayor número de embriones en etapa torpedo, se obtuvo con una densidad de inoculación de 0.5 gMF.l⁻¹ para la variedad Caturra rojo y 5.0 gMF.l⁻¹ para la variedad Robusta.

Palabras clave: células embriogénicas, embriogénesis somática, potencial embriogénico, suspensiones celulares

ABSTRACTS

The conditions were established for the differentiation of somatic embryos from cell suspensions in the genotype Caturra rojo (*Coffea arabica*) and Robusta (*Coffea canephora*). Cell suspensions with high embryogenic potentials and stable coefficients of multiplication were used. While studying the density of inoculation, for the phase of differentiation for both varieties, differences appeared in the embryogenic capacity among them, being reached a whole of 556 500 ES.l⁻¹ for the variety Caturra rojo and 298 670 SE.l⁻¹ for the variety Robusta. The biggest number of embryos in torpedo state, were obtained with a density of inoculation of 0.5 gFW.l⁻¹ for the variety Caturra rojo and 5.0 gMF.l⁻¹ for the variety Robusta.

Key Words: cell suspensions, embryogenic potential, somatic Embryogenesis, embryogenic cells

INTRODUCCIÓN

El café es un cultivo de gran importancia para muchos países en los cuales constituye uno de los principales productos de exportación. La búsqueda de nuevas características de importancia económica y tecnológica, como la resistencias a plagas y enfermedades, es un proceso largo, a causa del ciclo biológico de las especies perennes, tanto autógamias o alógamas (Santana, 1993).

La embriogénesis somática del café en *Coffea canephora* P. ex Fr fue descrita por primera vez por Starisky (1970). A partir de entonces han sido múltiples las referencias de embriogénesis somática en café. La regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas. La naturaleza del proceso embriogénico consiste en la formación de un embrión viable a partir de células aisladas y con lo cual se logran altos coeficientes de multiplicación con respecto al proceso de organogénesis. Este proceso permite manejar grandes cantidades de propágulos en volúmenes reducidos de medio de cultivo.

A partir de la última década del siglo XX, han sido desarrollados métodos de regeneración de embriones somáticos en medios de cultivo líquidos y su escalado en biorreactores (Jiménez *et al.*, 1995; de Fera, 1995) en la especie *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. El desarrollo de sistemas de regeneración eficientes y métodos para su transformación genética en cultivares de interés económico como Caturra rojo (*C. arabica*) y Robusta (*C. canephora*) es una prioridad en la estrategia de mejoramiento genético de este cultivo.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas establecidas y multiplicadas, según la metodología descrita por de Fera (1995) de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo y *Coffea canephora* cv. Robusta.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la densidad de inóculo sobre el proceso de diferenciación de las

suspensiones celulares se estudiaron diferentes densidades. Las densidades de inoculación empleadas fueron 0.5, 1.0 y 5.0 g de masa fresca por litro de medio de cultivo (gMF.l⁻¹). Cada tratamiento estaba compuesto por cinco réplicas y el medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Zamarripa *et al.* (1991). Se realizó la renovación del 50.0% del medio de cultivo con una frecuencia de siete días y el cultivo se realizó en agitador orbital a una temperatura de 26°C, una velocidad de agitación de 110 r.p.m. y en condiciones de oscuridad.

Para ambos genotipos, se determinó el momento de aparición de los embriones somáticos, el número total, así como su clasificación por etapas de desarrollo después de nueve semanas de cultivo; además se monitoreó del comportamiento del pH y al final del proceso se evaluó también la masa fresca y masa seca expresado este último en gramos de masa seca por litro (gMS.l⁻¹), después de haber colocado las muestras en una estufa durante 12 horas a 105°C.

Los resultados fueron procesados estadísticamente empleando un análisis de varianza de clasificación simple y el grado de significación fue determinado mediante la prueba el test de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

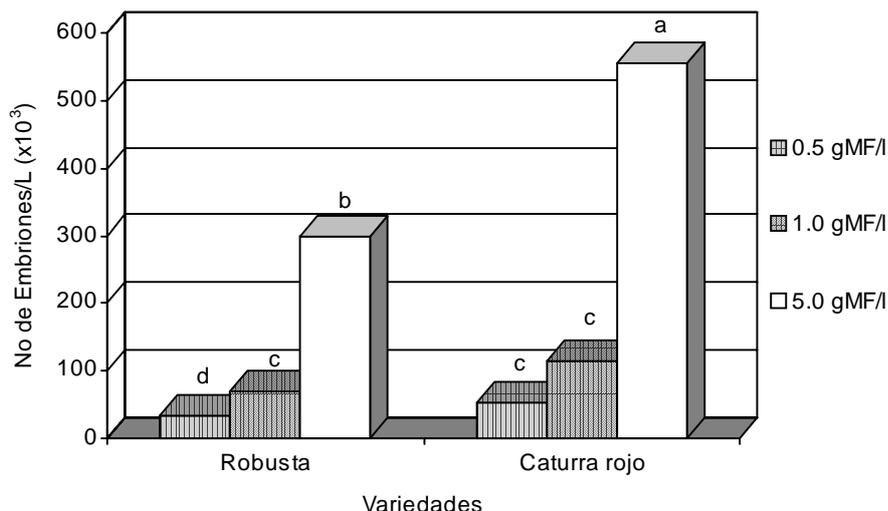
En todas las densidades de inoculación estudiadas (0.5, 1.0 y 5.0 gMF.l⁻¹) y en ambos genotipos se observó la formación de embriones somáticos. Sin embargo, hubo diferencias en cuanto al aspecto morfológico de las suspensiones celulares en las dos variedades estudiadas.

Los primeros embriones somáticos se observaron a partir de los 21 días de cultivo. Al cabo de los 28 días se incrementó la presencia de los embriones somáticos, siendo con mayor en el cultivar Caturra rojo. En todas las suspensiones celulares se presentaron las distintas etapas de desarrollo características: globular, corazón y torpedo.

Las suspensiones celulares de Caturra rojo presentaban un color carmelita oscuro con agregados celulares embriogénicos de gran tamaño. Los embriones se agrupaban en forma de ramilletes y con un tamaño mayor (3.0-5.0 mm) que los embriones somáticos de la variedad Robusta (2.0-3.0 mm), cuyas suspensiones celulares mostraban un color amarillo y la individualidad de sus embriones somáticos.

Al analizar el efecto de las densidades de inoculación en los dos genotipos estudiados, se apreciaron diferencias significativas con respecto al número total de embriones somáticos entre los distintos tratamientos (Figura 1).

En ambas variedades se alcanzó la mayor producción de embriones somáticos en la densidad más alta (5.0 gMF.l⁻¹), 298 670 ES.l⁻¹ en Robusta y 556 500 ES.l⁻¹ en Caturra rojo, lo que demostró que esta segunda variedad fue mucho más reactiva, bajo las mismas condiciones de cultivo, a la respuesta del proceso de diferenciación de embriones somáticos. Esto corroboró los resultados de Van Boxtel (1996) el cual encontró que la mejor respuesta en suspensiones celulares embriogénicas en *C. canephora* al proceso de diferenciación se obtuvo a altas densidades.



* Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Figura 1. Influencia de diferentes densidades de inóculo en el número total de embriones somáticos de *C. canephora* (Robusta) y *C. arabica* (Caturra rojo) a las nueve semanas de cultivo.

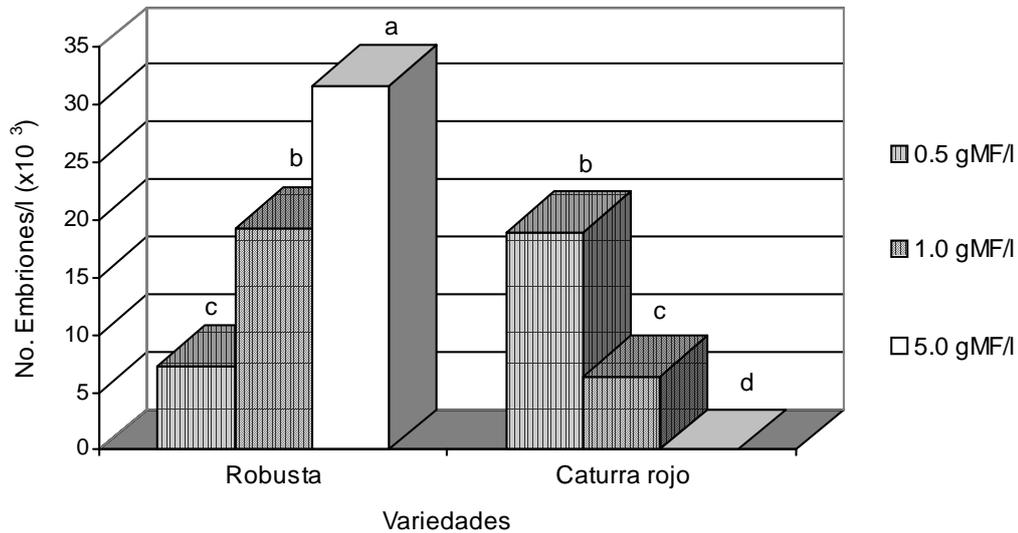
Sin embargo, en el número de embriones somáticos en etapa de torpedo se encontró una respuesta

diferencial de los genotipos en dependencia de la cantidad inicial de masa fresca inoculada (Figura 2).

En el caso de la variedad Robusta coincidió que una masa fresca inicial de 5.0 gMF.l⁻¹ fue mayor la cantidad de embriones en etapa de torpedo se produjeron (32 670 ES.l⁻¹) y también mayor valor de embriones somáticos totales; con un comportamiento superior a la variedad Caturra rojo. En esta última se obtuvo el mayor incremento de embriones somáticos en etapa de torpedo con la densidad más baja (0.5 gMF.l⁻¹) y no con la biomasa inicial de 5.0 gMF.l⁻¹ donde fue superior

el número de embriones somáticos totales que se obtuvo aunque los embriones somáticos no alcanzaron la etapa de torpedo.

de Feria (1995) encontró en la variedad Catimor 9722 (*C. arabica*) la mejor respuesta embriogénica utilizando una masa fresca inicial de de 1.0 gMF.l⁻¹ con una renovación semanal del medio de cultivo y observó una inhibición del proceso de diferenciación con inóculos mayores de 5.0 gMF.l⁻¹.



* Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.01$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Figura 2. Influencia de la densidad de inóculo en el número de embriones somáticos en etapa de torpedo obtenidos en *Coffea canephora* cv. Robusta y *Coffea arabica* L. Caturra rojo.

Según Zamarripa *et al.* (1991) en la especie *C. canephora* la densidad de 0.5 gMF.l⁻¹ es la óptima para la producción de embriones somáticos, manifestándose un efecto de autoinhibición de la embriogénesis ligado al aumento de la densidad de inoculación. Estos autores en 1994 trabajando con el híbrido Arabusta (*C. canephora* x *C. arabica*) logró la mayor producción de embriones somáticos (518 000 ES.l⁻¹) a una densidad de 1.0 gMF.l⁻¹ mientras que Van Boxtel (1996) al estudiar distintas densidades de inoculación en la especie *C. canephora* obtuvo los mejores resultados al emplear una densidad entre 3.0 y 5.0 gMF. l⁻¹.

Según Osuga (1993), embriones somáticos en etapa globular y corazón se formaron en un mayor porcentaje (80-90%) a altas densidades celulares de 1.0×10^3 ó 2.0×10^3 agregados celulares por mililitro (AC.ml⁻¹) comparado con las condiciones normales de diferenciación de 5.0×10^3 AC.ml⁻¹. Al parecer la densidad celular no influyó en el desarrollo de las células embriogénicas a embriones en etapa globular y de corazón.

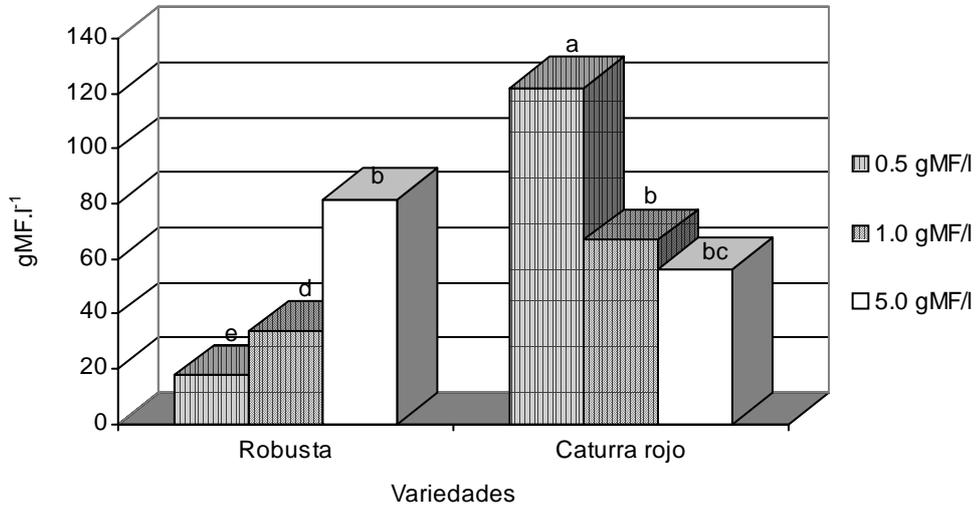
De acuerdo con de Jong *et al.* (1992), el nivel de formación de embriones somáticos es expresado como

el número de embriones en etapa de torpedo con respecto al número de embriones globulares iniciales en el cultivo. El número de embriones somáticos en etapa de torpedo disminuye por el incremento de la densidad de embriones globulares en la suspensión por los siguientes factores: a) concentración de factores de acondicionamiento, que son liberados por los embriones somáticos en el medio de cultivo. Lo Schiavo (1990), planteó que la quitinasa glicosilada es liberada en el medio de cultivo y tiene una importante función en el proceso en el cual los embriones somáticos en etapa globular diferencian a embriones en etapa de torpedo. Existen varias razones que pudieran explicar este fenómeno de autoinhibición, por ejemplo, la acumulación de moléculas inhibitorias del proceso de diferenciación, como las glicoproteínas que fueron descritas por de Vries (1996) al trabajar con zanahoria y/o un desbalance en el medio de cultivo entre los niveles de elementos estimuladores y elementos inhibidores que han sido secretados por las células y de cuyo balance depende el desarrollo de la embriogénesis somática. También puede ser explicado por la acumulación de gases volátiles como el CO₂, el C₂H₄ y el C₂H₅OH en suspensiones celulares embriogénicas con alta densidad celular, lo que produce una inhibición del proceso

embriogénico (Roustan *et al.*, 1989). b) Cantidad de nutrientes que un embrión puede tomar del medio de cultivo y c) Probable interacción entre los embriones.

entre los tratamientos para ambas variedades, donde existió una marcada diferencia entre las densidades de 0.5 y 5.0 gMF.l⁻¹ en Caturra rojo. La primera alcanzó mayor masa fresca y se correspondió con un mayor número de embriones en etapa de torpedo, fundamentando lo anteriormente mencionado.

Al analizar la masa fresca al final del proceso de diferenciación (Figura 3), se apreciaron diferencias



* Medias con letras distintas difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Figura 3. Incremento en masa fresca de las suspensiones celulares obtenidas al final de la diferenciación de embriones somáticos en *Coffea canephora* L cv. Robusta y *Coffea arabica* cv. Caturra rojo.

Con el análisis de la dinámica del pH a lo largo de los 70 días del proceso en las dos variedades (Figuras 4 y 5), se observó de forma general un comportamiento semejante. Se notó un descenso gradual hasta los 28 - 35 días, alcanzó valores de pH que oscilaron entre 4.0 - 4.7. A partir de

entonces comenzó a ascender el pH, esto coincidió con el momento a partir del cual comenzaron a aparecer de forma generalizada los embriones somáticos en la suspensión celular. Al finalizar el proceso o fase de diferenciación el pH se mantuvo entre 4.5 - 6.0.

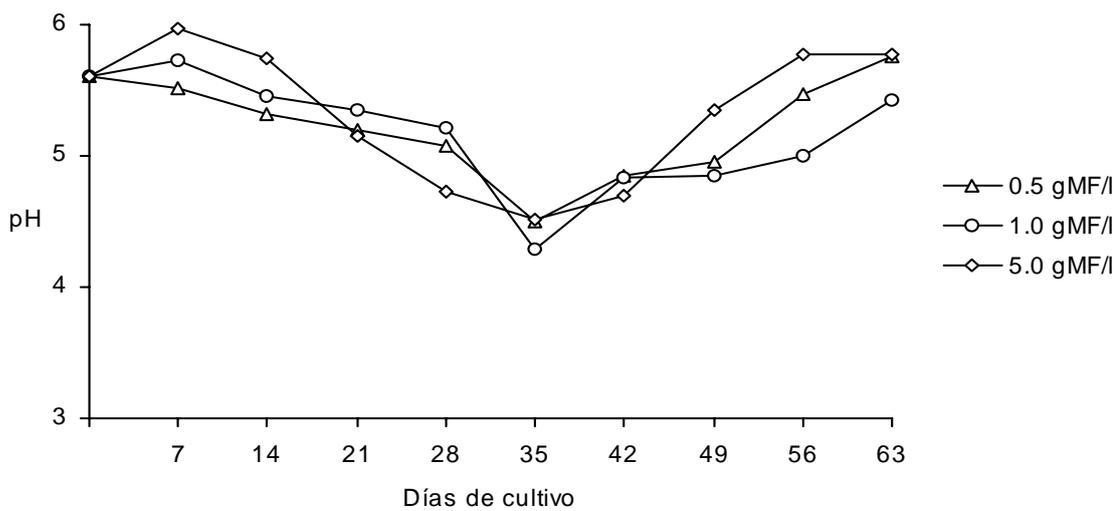


Figura 4. Curva de comportamiento del pH durante la diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea canephora* cv. Robusta.

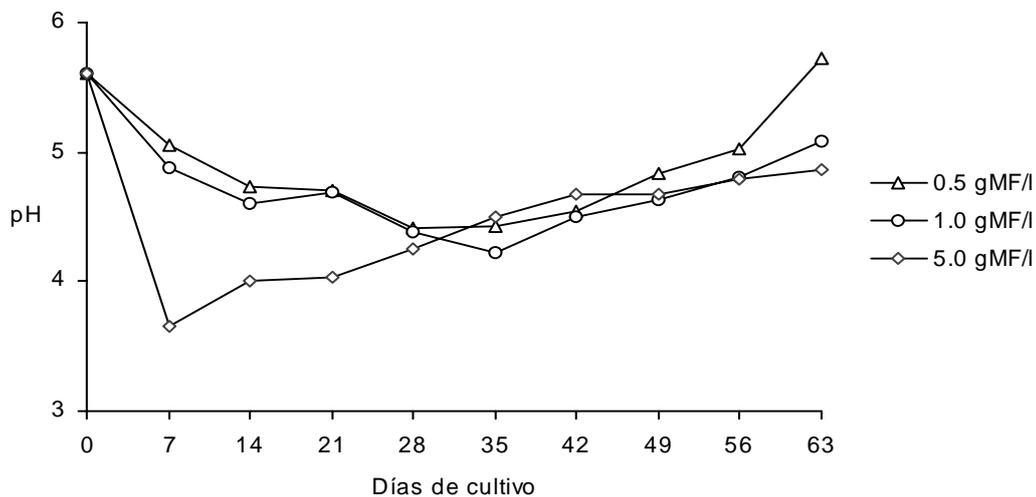


Figura 5. Curva de comportamiento del pH durante la diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo.

Para la variedad Caturra rojo fue característico un descenso brusco del pH en las densidades más altas (5.0 gMF.l⁻¹), en los primeros siete días, a partir de los cuales comenzó a aumentar lentamente. En la variedad Robusta el comportamiento para esta densidad fue distinto, cuando hubo un aumento del pH en los primeros siete días y luego comenzó a descender hasta los 28 - 35 días donde volvió a ascender nuevamente. Además se apreció en las dos variedades que las densidades que produjeron el mayor número de embriones somáticos, al final del proceso presentaban los valores más altos de pH. Según estos resultados, todo parece indicar que la formación de los embriones somáticos coincide y está ligada a un incremento en los niveles de pH aspecto que fue señalado anteriormente por de Feria (1995) para la variedad Catimor 9722 (*C.arabica*).

Smith y Krikorian (1990), demostraron los cambios de pH en el cultivo de suspensiones celulares al trabajar con suspensiones embriogénicas de zanahoria. Estos autores comprobaron que con un pH cercano a 4.0 en un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento se producía la proliferación y multiplicación de proembriones en etapa preglobular y cuando el pH era mantenido entre 5.0 - 6.0 todos pasaban a la etapa globular, desarrollándose posteriormente los restantes etapas de la embriogénesis somática.

Estos cambios del pH pueden estar relacionados con las variaciones en el balance amonio-nitrato en el medio de cultivo. Un comportamiento similar del pH plantearon Archambault *et al.* (1995), al desarrollar el proceso de diferenciación en zanahoria y donde el valor inicial de pH (5.40), disminuyó hasta 4.80 después de 12 días de cultivo y luego con la aparición de los embriones somáticos comenzó a incrementarse lentamente hasta llegar a 5.35 al finalizar el cultivo (29 días).

Todos los resultados confirmaron la influencia del genotipo en la respuesta embriogénica y su relación con la densidad de inoculación, aspectos que deben tomarse en consideración para la optimización del

proceso de la embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos para cada especie o cultivar en particular.

REFERENCIAS

- Archambault, J, Volesky B, Kurz WGW (1995) Development of biorreactors for the culture of surface immobilized plant cells. *Biotechnol Bioeng* 35: 702-711
- de Feria, M (1995) Embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.) empleando medio de cultivo líquido. Escalado en biorreactores. Tesis de maestría. IBP.UCLV.90 p.
- de Jong, AJ, Cordewener J, LoShiavo F, Tersi M y Van Kammen A (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4:425-428
- De Vries (1996) Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot culture. *Planta* 180: 203-214
- Jiménez E, de Feria M, Barbón R, Capote A y Chávez M (1995) Empleo de biorreactores para la producción de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* cv. Catimor.). En: *Avances en biotecnología moderna, libro de reportes cortos*, vol.13. p. II.1 - II.2
- Lo Schiavo F, Giuliano G, De Vries SC y Genga A (1990) A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Mol Gen Genet* 223: 385-393
- Osuga K, Kamada H y Komamine A (1993) Cell density is an important factor for synchronization of the late stage of somatic embryogenesis at high frequency. *Plant Cell Culture Letters* 10 (2): 180-183
- Roustan JP, Latche A y Fallot J (1989) Stimulation of *Daucus carota* L. somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthetic: cobalt and nikel. *Plant Cell Report* 8: 182-185
- Santana, N (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del caféto (*Coffea* spp.). Tesis de doctorado. INCA. 230 p.
- Smith DL y Krikorian AD (1990) Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D initiated embryogenic cells of carrot. *Physiol plant* 80: 329-336
- Staritsky G (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19: 509-514
- Van Boxtel J y Berthouly M (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 7-17
- Zamarripa, A, Ducos JP, Tesserou H, Bollon H, Dufour M y V Pétiard (1991) Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide. Effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao The.* 35: 233-244