

## Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos

María Esther González<sup>1\*</sup>, María Margarita Hernández<sup>1</sup>, Luis Miguel Mazorra<sup>1</sup>, Yohana Rodríguez<sup>2</sup>, Mireya Cabrera<sup>2</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). San José de Las Lajas, Gaveta Postal 1. CP. 32 700. La Habana, Cuba. e-mail: esther@inca.edu.cu

<sup>2</sup>Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC). Tercer Frente. Santiago de Cuba, Cuba.

### RESUMEN

El cambio estacional es uno de los factores a considerar en la respuesta embriogénica de diversos cultivos ya que las variaciones de temperatura, humedad y precipitaciones provocan fluctuaciones en las plantas que influyen en la respuesta *in vitro* de los explantes. Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la época del año en que fueron tomados los explantes foliares sobre la respuesta *in vitro* de genotipos de *Coffea canephora* var. Robusta. Se realizaron muestreos durante todos los meses del año, los explantes fueron cultivados en un medio de cultivo contenido de las sales MS suplementado con mio-inositol, vitaminas de Morell, cisteína-HCl y sacarosa y 0.5 y 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y kinetina, respectivamente. Se observó que la época del año en que se tomó la muestra ejerció un marcado efecto en la respuesta de los explantes. Para las condiciones estudiadas resultó favorable la toma de las muestras foliares en los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre- diciembre, dado los bajos índices de actividad peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un elevado porcentaje de formación de callos y mayor contenido de proteínas en los mismos. Se determinó que la actividad enzimática peroxidasa pudiera constituir un importante marcador para la selección de muestras en el café.

Palabras clave: actividad peroxidasa, contaminación fúngica, oxidación fenólica

### ABSTRACT

The seasonal change is one from the factors to consider in the embryogenic answer of diverse crops, the variations of temperature, humidity and precipitations cause fluctuations in the plants that influence in the behavior *in vitro* of the explants. This study was carried out with the objective of evaluating the influence of the time of the year in which the explants were taken on the answer *in vitro* of Robusta genotypes. Samples were carried out during every month of the year, the explants were cultivated in a culture medium with the mineral salts MS, and 0.5 and 2.0 mg.l<sup>-1</sup> of 2,4-D and kinetina, respectively. It was observed that the time of the year in that the samples were selected exercised a marked effect in the answer of the explants. For the studied conditions was favorable to take the leaves samples in the periods May - June, January - February and November - December, due to the few index of peroxidases activity, phenolic oxidation and fungous contamination, as well as a high percentage of callus formation and bigger content of proteins in the same ones. It was determined that the enzymatic peroxidases activity could constitute an important marker for the selection of samples in coffee.

Key words: fungous contamination, peroxidases activity, phenolic oxidation

### INTRODUCCIÓN

A la regeneración de plantas vía embriogénesis somática indirecta en el café le precede la inducción y formación de callos *in vitro*; posteriormente, al igual que en otros cultivos, este proceso incluye varias fases: inducción, proliferación, maduración, germinación y conversión de los embriones somáticos (Gómez, 1998). En la especie *Coffea canephora* P. variedad Robusta caracterizada por su autoincompatibilidad y alogamia estricta, se ha comprobado la importancia de esta técnica de cultivo de tejidos,

ya que permite la reproducción uniforme de los genotipos seleccionados (Cevallos, 2000; González, 2004).

Durante la morfogénesis *in vitro* del café se ha demostrado la capacidad que tienen las plantas para responder de forma diferenciada a la formación de nuevas estructuras u órganos. Es de destacar, que el proceso de embriogénesis somática es afectado por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan la respuesta del material vegetal *in vitro*, entre los que se puede citar el genotipo, el estado fisiológico de la planta

y del explante, los reguladores del crecimiento y las condiciones de cultivo (Berros *et al.*, 1997). Aunque todos los tejidos tienen la capacidad de formar callos *in vitro*, no todos resultan embriogénicos (Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996).

Styer y Chin (1983) señalaron que los requerimientos nutricionales y de reguladores del crecimiento difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas. Así, Santana (1993), al evaluar la influencia de la edad fisiológica de la hoja de café, como fuente de explante, en tres variedades de café: Robusta, Caturra y Catimor 9722, en la formación de callos embriogénicos, observó que las hojas del tercer y cuarto nudo, en Caturra y Catimor 9722, mostraron mayor capacidad de respuesta, mientras que la Robusta respondió a la inducción de este tipo de callo, en explantes de hojas ubicadas desde el segundo al cuarto nudo de ramas ortotrópicas.

La respuesta *in vitro* también puede estar determinada por el tamaño del explante (Castro *et al.*, 1998). Explantes muy pequeños requieren del empleo de medios de cultivo mucho más complejos y la vitalidad y capacidad regenerativa tienden a ser bajas. Explantes grandes son más difíciles de desinfectar (Surga y Guevara, 1994), pero generalmente poseen un potencial regenerador considerablemente mayor.

Otro factor a considerar en la respuesta a la embriogénesis somática es el cambio estacional, ya que las variaciones de temperatura, humedad y precipitaciones provocan fluctuaciones en las plantas que influyen en el comportamiento *in vitro* de los explantes (Pírela y Mogollón, 1996). Es por ello que el presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar a través de diferentes indicadores, la influencia de la época del año en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de café empleados para la formación de callos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron los genotipos promisorios M-229, K-234 y M-28 de la especie *C. canephora* P. variedad Robusta. Como fuente de explantes se emplearon hojas de plantas establecidas en campo de dos años de edad, pretratadas con el fungicida Benomyl (1.5 g.l<sup>-1</sup>) periódicamente durante 15 días antes del muestreo. Las muestras se seleccionaron desde el segundo al cuarto nudo, atendiendo a la parte media y superior de la planta. Para la desinfección, la disección de las hojas y el tamaño de los explantes se tuvo en cuenta lo recomendado en la metodología propuesta por Santana (1993).

### Condiciones experimentales generales

En los bioensayos se utilizó como medio de cultivo basal las sales minerales del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), a una concentración de 10 ml.l<sup>-1</sup>, suplementado con mio-inositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), vitaminas de Morell (4.0 mg.l<sup>-1</sup>), cisteína-HCl (25 mg.l<sup>-1</sup>) y sacarosa (30 g.l<sup>-1</sup>). Se empleó como agente gelificante Gelrite (2.0 g.l<sup>-1</sup>). Como reguladores del crecimiento se utilizó la kinetina (2.0 mg.l<sup>-1</sup>) y el ácido diclorofenociacético (2,4-D) (0.5 mg.l<sup>-1</sup>). El pH fue ajustado a 5.7 y la esterilización se realizó en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos y 1.2 kg.cm<sup>-2</sup>. El volumen de medio de cultivo por tubo de ensayo fue de 15 ml.

Los explantes se colocaron en el medio de cultivo de formación de callos descrito anteriormente por un período de 12 semanas. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, se utilizaron 100 explantes por tratamiento y se incubaron en la oscuridad a temperatura de 27 ± 1 °C. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento y tres repeticiones del experimento en el tiempo.

### Evaluación de la influencia de la época del año en la respuesta de los explantes

Con la finalidad de evaluar el efecto de la época del año en la respuesta de los explantes cultivados se realizaron muestreos en los tres genotipos estudiados durante todos los meses del año.

En el momento de la colecta se seleccionaron muestras foliares para determinar la actividad enzimática peroxidasa, para lo cual se tomaron discos de hojas de aproximadamente 0.25 g, se congelaron en Nitrógeno líquido y se homogenizaron en 2 ml de tampón fosfato 50 Mm pH 7.8 que contenía 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 1.5 % (p/v) de PVPP y 0.1 % (v/v) de Triton X 100. El homogenato se centrifugó a 10 000 g y 4 °C durante 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se guardó a -20 °C hasta el momento del análisis. La actividad peroxidasa se determinó según Mazorra *et al.* (2002).

A los 60 días de cultivo se determinó la formación de callos (%) y el contenido de proteínas totales por gramo de masa fresca de callo (mg.g<sup>-1</sup>). Para el estudio de este último indicador, se tomaron 25 callos por cada tratamiento. Se maceraron en un mortero con sílice a 0 °C, luego se le añadió 1 ml de solución amortiguadora tris-125 Mm, pH 6.8, Na Cl-50 Mm. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos, se tomó el sobrenadante y se guardó a -20 °C en tubos Eppendorf hasta el momento del análisis. La cuantificación del contenido de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (1976). La lectura de la absorbancia de las muestras se realizó a 595 nm en un fotolorímetro Spekoll 11, para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a partir de una solución de 1 mg.ml<sup>-1</sup>.

A los 90 días de cultivo se evaluó la contaminación fúngica (%) y el porcentaje de oxidación fenólica. En el caso de las determinaciones bioquímicas se conformaron tres muestras por tratamiento y a cada muestra se le hicieron las determinaciones por triplicado. El resto de los indicadores se evaluó en 50 explantes por tratamiento.

A todas las variables se les comprobó su normalidad por el método de Shapiro y Francia (1972). Para el análisis estadístico, los datos originales de las variables expresadas en porcentaje (%) se transformaron mediante la fórmula  $\arcsen \sqrt{\frac{\%}{100}}$ . A los valores de las diferentes variables se les realizó un análisis de varianza bifactorial, mediante el procesador estadístico Start (Ver 4.10) y se consideraron los factores genotipo y mes. En los casos en que se observaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 %, para la comparación de las medias, mediante el programa STATGRAPHICS (1996).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación de la influencia de la época del año en la respuesta de los explantes

En relación con la formación de callos, se detectó interacción significativa entre los meses del año y los genotipos (Tabla 1).

Los porcentajes de este indicador resultaron superiores en el genotipo M-229 en los meses de mayo y junio, con valores que difirieron de lo alcanzado en el resto de las combinaciones, seguido por el K-234 para estos mismos meses.

Para los meses de abril, julio y agosto y los genotipos estudiados, la formación de callos resultó inferior al 43 %, difiriendo estadísticamente del resto. De ello puede inferirse que estos meses no resultaron favorables para la selección de las muestras procedentes de los genotipos estudiados. Las combinaciones restantes mostraron valores que superaron el 57 % de formación de callos.

En los meses de enero, febrero, marzo, julio, septiembre, octubre, noviembre y diciembre, los genotipos M-229 y K-234 no difirieron entre sí. Sin embargo, el genotipo M-28 evidenció una menor respuesta morfogénica de forma general, con diferencias significativas con los otros dos genotipos, excepto para los meses de abril y octubre. Estos resultados evidencian la importancia de tener en cuenta no solo la influencia del genotipo en la respuesta morfogénica de los explantes empleados para la formación de callos sino también en la época que estos sean tomados.

Los resultados favorables obtenidos al evaluar la formación de callos fueron corroborados por las características de los callos en relación con el color y la consistencia, predominando para los períodos de más altos porcentajes, la tonalidad blanco-cremoso y amarillo, así como una textura friable, aspectos que facilitan la selección de explantes de mayor calidad y por tanto, la posibilidad potencial de obtener callos de alta capacidad embriogénica. Otros autores, al emplear callos con características semejantes, han logrado establecer eficientes protocolos de regeneración de embriones somáticos en varios genotipos de *C. canephora* y *C. arabica* (Van Boxtel y Berthouly, 1996; Santana, 1999).

La evaluación del posible efecto de los factores genotipo y época del año sobre la actividad de la enzima peroxidasa en las muestras foliares, mediante un análisis bifactorial, arrojó la existencia de diferencias significativas en su interacción (Figura 1), lo que permitió la comparación entre las variantes estudiadas.

Los mayores valores de actividad peroxidasa en el primer semestre se obtuvieron en el mes de marzo y el genotipo M-229, valores que difirieron estadísticamente de los obtenidos en K-234 y M-28 para este momento. El genotipo K-234 en los meses de marzo y abril mostró valores que no difirieron entre sí, pero que se diferenciaron significativamente de los valores alcanzados en M-28 para ambos meses y de M-229 para el mes de abril.

Tabla 1. Porcentaje de formación de callos de tres genotipos de *C. canephora* var. Robusta a partir de explantes foliares en diferentes épocas del año.

Genotipo	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
M-229	95.1 c	94.7 c	60.1 f	43.4 h	97.1 a	97.9 a	42.8 h	43.3 h	61.1 f	60.1 f	89.7 d	88.3 d
K-234	95.0 c	95.3 c	61.3 f	40.7 i	96.3 b	96.1 b	42.7 h	40.1 i	60.9 f	61.3 f	89.3 d	89.7 d
M-28	76.8 e	77.9 e	57.1 g	41.5 i	79.3 e	80.1 e	40.2 i	42.9 h	57.0 g	60.5 f	77.2 e	77.8 e
ES $\bar{x}$ ( $\pm$ )	0.93 **											

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para  $p < 0.05$ .

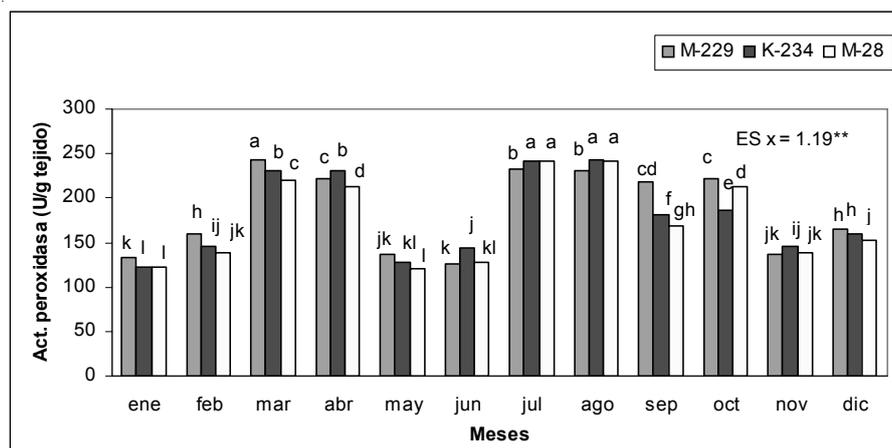


Figura 1. Actividad Peroxidasa en muestras foliares de *C. canephora* var. Robusta utilizadas para la inducción y formación de callos *in vitro*.

Es de destacar que los genotipos M-229 y M-28, durante estos 2 meses mostraron un comportamiento similar ante la variable evaluada. Los máximos valores de actividad enzimática, coincidieron con la época de floración y fructificación temprana de las plantas, al parecer, los procesos fisiológicos que tienen lugar durante estas fases del cultivo hacen que se incremente el grado de activación de esta enzima que desempeña un papel fundamental en los procesos relacionados con el crecimiento (Paterson *et al.*, 1990) y la lignificación de los frutos (Alba, 1998). Para este semestre los meses de enero, febrero, mayo y junio favorecieron la selección de los explantes, al caracterizarse por los valores más bajos de actividad peroxidasa.

Estas variaciones observadas en los niveles de la actividad enzimática, se corresponden con las obtenidas por Marinescu *et al.* (2000), que encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad peroxidasa en muestras foliares de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), procedentes de plantas en diferentes fases de cultivo. Por otra parte, Penel *et al.* (2001) al realizar la caracterización bioquímica del proceso de inducción floral en espinaca (*Spinacia oleracea*) obtuvieron un incremento significativo de la actividad peroxidasa, el cual se relacionó directamente con las variaciones observadas para el sistema peroxidasa en hojas.

Durante el segundo semestre se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, para  $p < 0.01$ . Los mayores niveles de actividad enzimática se presentaron en los meses de julio y agosto para los genotipos K-234 y M-28, valores que difirieron de los alcanzados durante estos meses en el genotipo M-229 y similares a los observados para este mismo material en el mes de marzo, observándose una considerable variación en el comportamiento de los genotipos evaluados con relación con la época del año. El incremento de la actividad peroxidasa en este período, pudiera estar asociado al desarrollo de otros estados fisiológicos de la planta, como la maduración

y senescencia de los frutos. Algunos autores han informado acerca del papel de las peroxidases en estos procesos (Quiroga *et al.*, 2000), y destacan la existencia de fluctuaciones en los valores de su actividad.

Se observó, que para el resto de los meses y los tres genotipos, los valores de actividad enzimática resultaron inferiores, con valores en noviembre y diciembre de 137.5 y 164.3 U.g<sup>-1</sup> de tejido, los que se diferenciaron de los obtenidos en julio y agosto y lo que favoreció la calidad de los explantes.

Los resultados permitieron establecer la interrelación entre componentes genéticos y ambientales y su influencia en la fisiología y modificaciones que muestran las plantas en su desarrollo, en este caso expresado a través de la actividad peroxidasa (Brownleader *et al.*, 1994). Este pudiera constituir un importante indicador para definir la época de selección de las muestras, a fin de garantizar una mejor respuesta en los explantes, conociendo el papel de las enzimas peroxidases en las reacciones de oscurecimiento.

En relación con el contenido de proteínas totales a los 60 días de cultivo en las muestras de callos procedentes de los tres genotipos se detectaron diferencias significativas para la interacción de los factores analizados (Figura 2). Se observaron los máximos valores en el período de mayo- junio y los tres genotipos los que no difirieron entre sí. Los mismos se diferenciaron con los obtenidos en el resto de las combinaciones, exceptuando el genotipo K-234 en el mes de febrero que no mostró.

Las concentraciones de proteínas en los diferentes genotipos en los meses de agosto, septiembre y octubre se caracterizaron por ser los más bajos, oscilando entre 1.11 y 2.75 mg.g<sup>-1</sup>. Es de destacar, que el genotipo M-28 en los meses de julio y octubre mostró valores de proteínas que difirieron de los observados para los genotipos M229 y K-234.

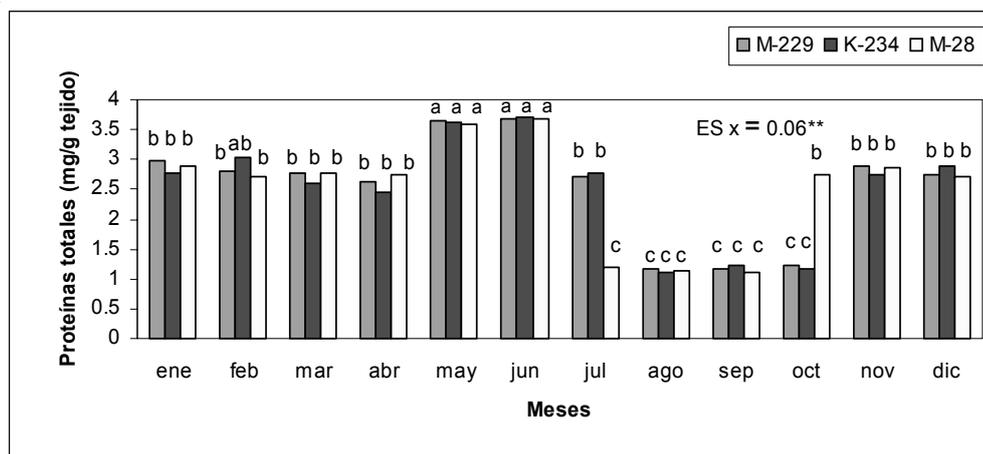


Figura 2. Concentración de proteínas totales en callos *C. canephora* var. *Robusta* cultivados *in vitro* en diferentes épocas del año.

Los mayores valores de proteínas, en los meses y genotipos señalados, pudieran ser atribuidos a que se lograron explantes, que por las características fisiológicas de la fuente de procedencia, contenían mayor nivel proteico ante determinadas condiciones nutritivas *in vitro*, lo cual a su vez se correspondió con la elevada multiplicación y división celular que tuvo lugar, en la etapa de cultivo señalada. Smith (1992) señaló que de esta forma se asegura la formación de las nuevas estructuras celulares, condiciones que garantizan índices aceptables de regeneración de embriones somáticos en etapas posteriores. Los resultados obtenidos fueron similares a los alcanzados por Cevallos (2000) al evaluar este indicador en callos de igual tiempo de cultivo en las especies *C. arabica* var. 9723 y *C. canephora* var. *Robusta*, donde se alcanzaron valores promedio de 3.57 y 3.82 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

En relación con la contaminación fúngica, se obtuvieron los valores más bajos (5.3-7.9 %) en los meses de enero, febrero, mayo, junio, octubre, noviembre y diciembre, para los tres genotipos, los que se diferenciaron estadísticamente ( $p < 0.01$ ) del resto de los porcentajes y resultaron los más favorables en el establecimiento de los explantes *in vitro*. Los índices de contaminación más elevados, para los tres genotipos, se presentaron en el mes de abril, seguido por agosto que aunque presentó diferencias significativas con respecto a los valores alcanzados en abril para los genotipos M-229 y K-234, los valores mostrados difirieron de los encontrados en los restantes meses. La contaminación en los meses de abril y agosto, osciló entre 17.2 y 20.9 % (Figura 3). La presencia de estas afectaciones en el material vegetal, durante los meses señalados, pudiera deberse a la influencia de las condiciones ambientales, asociado a incrementos de la humedad relativa y la temperatura, respectivamente, lo que pudo haber acentuado y favorecido la proliferación de microorganismos contaminantes.

Los menores índices de contaminación fúngica en este estudio pudieran atribuirse al tratamiento de las plantas

donantes con el fungicida Benomyl, antes de la toma de las muestras. Algunos autores han destacado la importancia de esta práctica dada la alta concentración de microorganismos contaminantes en especies leñosas y semileñosas (De Winnaar, 1997), así como la dificultad, que en ocasiones se presenta, para su control con el empleo de protocolos convencionales de desinfección.

La oxidación fenólica es otro de los inconvenientes que se presenta durante el cultivo de tejidos de cafeto, ya que los compuestos fenólicos se enlazan a las proteínas, las inactivan e inhiben el crecimiento de los tejidos del explante. En este caso, hubo diferencias significativas para los factores analizados y la interacción. Los índices más bajos se presentaron para los genotipos M-229, K-234 y M-28 y los meses de mayo y junio, los que oscilaron entre 12 y 15.3 % y difirieron significativamente ( $p < 0.01$ ) de los alcanzados en el resto de las combinaciones (Figura 4), exceptuando el genotipo M-28 en el mes de noviembre, que mostró porcentajes de oxidación que no difirieron del comportamiento descrito anteriormente; estos resultados facilitaron la obtención de explantes de mayor calidad.

Los valores de oxidación obtenidos en los meses de noviembre y diciembre y los genotipos M-229 y K-234, se diferenciaron de los antes mencionados, pero fueron considerados como favorables. Durante enero y febrero, M-229 y K-234 mostraron un comportamiento similar, con porcentajes que no superaron el 23 %. El genotipo M-28 difirió de lo observado ya que mostró valores de oxidación superiores.

Los porcentajes más altos de oxidación fenólica se observaron en los meses de marzo y abril y los tres genotipos (38.9 - 46.2 %) durante el primer semestre, así como en julio y agosto (39.1 - 45.9 %) y los diferentes genotipos para el segundo semestre del año. A su vez, hubo correspondencia entre estos resultados y los del análisis para la actividad peroxidasa en igual época del año, indicativo de que para las condiciones estudiadas estos meses no resultaron adecuados para la selección de las fuentes de los explantes, dado las afectaciones observadas.

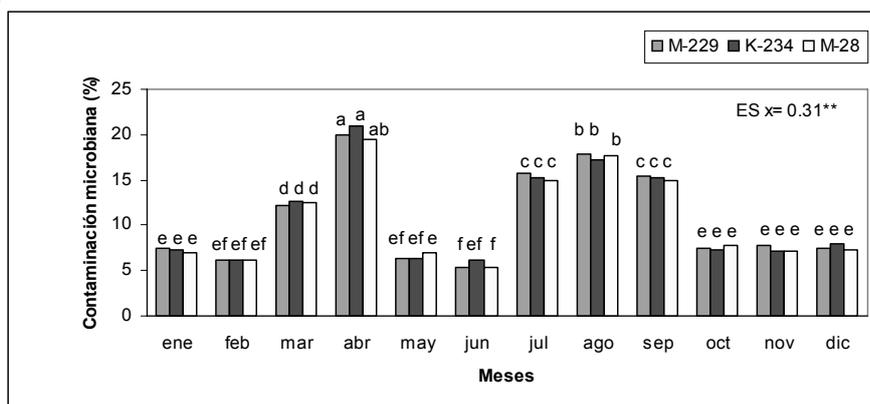


Figura 3. Contaminación fúngica en el establecimiento *in vitro* de explantes de *C. canephora* var. Robusta para la formación de callos en diferentes épocas del año.

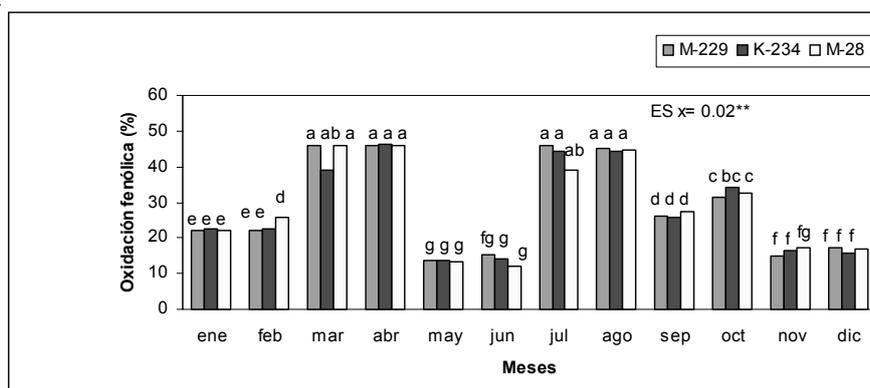


Figura 4. Porcentaje de callos de *C. canephora* var. Robusta con oxidación fenólica durante su cultivo *in vitro* en diferentes épocas del año.

Los índices de oxidación fenólica obtenidos pudieran deberse a que el cultivo del café se caracteriza por presentar alto contenido de compuestos fenólicos, tales como ácido cafeico y ácido clorogénico, que al oxidarse por acción de las peroxidasas originan la producción de quinonas, polimerizaciones que a su vez dan lugar a compuestos oscuros conocidos como melanodionas e influyen en la proliferación del material vegetal cultivado (Takahama *et al.*, 2002). Otros autores han informado similares afectaciones por oxidación fenólica en el café, así Van Boxtel y Berthouly (1996), cuando trabajaron con *C. canephora* genotipo 202, señalaron una disminución considerable en el porcentaje de callos con embriogénesis somática de alta frecuencia de formación de embriones, debido a la oxidación del material vegetal. Estos autores señalaron, además, que el grado de oxidación fenólica puede llegar a determinar en el proceso de embriogénesis somática.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que para la selección de explantes foliares de esta especie vegetal para la formación de callos, varios aspectos deben ser considerados a fin de lograr una respuesta adecuada en los explantes, que garantice una elevada multiplicación celular. Aunque pocos resultados relacionados con esta temática han sido publicados en los últimos años, estos constituyen aspectos a tener presente en la propagación *in vitro*,

ya que al considerar estos factores desde las etapas tempranas del proceso, se contribuye a garantizar una mayor eficiencia en la multiplicación.

Al analizar los resultados de forma integral se evidenció que para los genotipos evaluados, la época del año influyó en la respuesta de los explantes cultivados *in vitro*. Murashige y Skoog (1974) destacaron que el estado de la planta madre y la estación del año en la cual el explante es tomado influyen en el potencial morfogénico del material vegetal cultivado.

Lograr optimizar la fase inicial de callogénesis en las especies sometidas al proceso de embriogénesis somática, a través del estudio de la influencia de la época del año, resulta de gran interés ya que contribuye a obtener callos de calidad y alto potencial embriogénico, siendo esta la base principal para la obtención de los embriones somáticos que posteriormente regenerarán plantas.

## CONCLUSIONES

La época del año en que se tomaron los explantes foliares para la formación de callos ejerció un marcado efecto en su respuesta morfogénica y bioquímica en los genotipos evaluados. Se comprobó que los períodos mayo - junio, enero - febrero y noviembre-

diciembre resultaron más favorable dado un elevado porcentaje de formación de callos, bajos índices de actividad enzimática peroxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un mayor contenido de proteínas totales.

La actividad enzimática peroxidasa pudiera constituir un importante marcador de selección en la etapa inicial de selección de las muestras.

## REFERENCIAS

- Alba, CM (1998) Isoperosidases and laccase like enzymes related with indole-acetic oxidation activity and lignification on peach fruits (*Prunus persica* L. Batsch cv. Red-haven). Plant Perox Newslett 11: 47- 52
- Berros, B, Álvarez C y Rodríguez R (1997) Effect of putrescine-synthesis inhibitors on somatic embryogenesis in hazelnut. Journal of Experimental Botany 71: 85-90
- Berthouly, M y Michaux – Ferriere M (1996) High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. Plant Cell Org. Cult. 44: 169-176
- Braddford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein Dye Binding. Analytical Biochemistry 12: 248-254
- Brownleader, MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin M y Dey PM (1994) A study of extensin and extensin peroxidase. Plant Perox Newslett 4: 3-15
- Castro, V, Carner R y Ruiz G (1998) Micropropagación de Olivo (*Olea europaea* L.). En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO-98. La Habana 1-5 junio, 516 p.
- Cevallos, M (2000) Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. INCA, San José de las Lajas. 186 p.
- De Winnaar, W (1997) Micropropagation of *Carica papaya* L. J. American Society Horticulture Science 156: 735-738
- Gómez, R (1998) Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed). Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología, pp. 57-77. IBP, Santa Clara.
- González, M (2004). Micropropagación de café (Coffea canephora P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos bacterianos. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. INCA, San José de las Lajas. La Habana. Cuba, 97 p
- INCA. START: Sistema automático para Análisis Estadístico, (Versión 4.10, 1998) INCA.
- Marinescu, G, Badea E, Babeanu C y Glodeanu W (2000) Peroxidase system activity in leaves of *Annona cherimola* as marker of growth stimulant treatment. Disponible en <http://www.ecom5.slu.se./ABSTRACTS/abstract.htm>. Rev: 21/09/02
- Mazorra, LM, Núñez M, Hechavarría M, Coll F y Sánchez-Blanco MJ (2002) Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. Biología Plantarum 45: 593-596
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497
- Murashige, T y Skoog F (1974) Plant propagation through tissue cultures. Ann. Plant Physiol 25: 135-166
- Paterson, AH, Bouthyette PY y Sorrells ME (1990) Variation in peroxidase isozymes during grain maturation in wheat genotypes near-isogenic for grain dormancy factors. Cereal Res Commun 18: 209-215
- Penel, C, Diogon T, Simon P y Greppin H (2001) Characterization of peroxidase genes in *Spinacia oleracea*. <http://www.gene.co.ge>. Rev: 11/03/03.
- Pirela, M y Mogollón N (1996) *In vitro* propagation of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Mara-7 from stem shoots of cv. Mara-7. Acta Horticulturae 452: 47-52
- Quiroga, M, Guerrero C, Botella M, Barcelo A, Amayi I, Medina M, Alonso F, Forchetti S, Tigier H, Valpuesta V y Forchetti SM (2000) A tomato peroxidase involved in the sintesis of lignin and suberin. Plant-Physiology 122: 1119-1127
- Santana, N (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del café (Coffea sp.) Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. INCA, San José de las Lajas. 124 p.
- Santana, N (1999) Avances y perspectivas en la obtención de la semilla artificial de café. En: I Simposio Internacional de Café y Cacao CUBACAFÉ' 99, Santiago de Cuba (25-27 Nov.), 94 p.
- Shapiro, SS y Francia RS (1972) An approximate Analysis of Variance Test for Normality. Journal of the American Statistical Association. 67: 215-216
- Smith, RH (1992) Plant tissue culture, techniques and experiments. 2<sup>nd</sup> ed, Academic Press.
- Styer, DJ. y Chin CK (1983) Meristem and shoot tip culture for propagation, patogen elimination and germoplasm preservation. En: J Janick (ed.) Horticultural. Reviews Volume 5, pp. 221-277. AUI Publishing Co. Connecticut.
- Surga, JG y Guevara Y (1994) Pruebas de desinfección para controlar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de Banano (*Musa AAA*). Fitopatología Venezuela 7: 14-17
- Takahama, U, Hirotsu M y Oniki T (2002) Mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast on aging of Tobacco leaves. <http://www.physiol.se./abstract.htm>. Rev: 11/03/03
- Van Bostel, J y Berthouly M (1996) High frequency somatic embryogenesis from Coffee leaves factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. Plant Cell Tiss. Org. Cul. 44: 7-17