

## Efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en Sistemas de Inmersión Temporal RITA®

Raúl Barbon<sup>1\*</sup>, Hien Nguyen Thi<sup>1,2</sup>, Alina Capote<sup>1</sup>, Manuel de Feria<sup>1</sup>, Elisa Quiala<sup>1</sup>, Anabel Pérez<sup>1</sup>  
\*Autor para correspondencia

<sup>1</sup>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 54 830. e-mail: raulb@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

### RESUMEN

El desarrollo de la embriogénesis somática de café (*Coffea* spp.) en medios de cultivo líquido es una alternativa viable para la propagación de esta especie. El empleo de medios de cultivo líquido y sistemas de inmersión temporal, podría incrementar la germinación de los embriones somáticos y mejorar la calidad de las plantas. Para ello se propuso como objetivo determinar el efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®. Se emplearon 40, 50, 60, 70 y 80 embriones somáticos por RITA® como densidades de inóculo. A los 90 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos germinados, síntomas de hiperhidricidad, número de hojas verdaderas, longitud y desarrollo radical. Con la densidad de inóculo de 70 embriones somáticos por RITA®, se logró el mayor porcentaje de germinación (60%) con buen desarrollo foliar y de longitud de las plantas obtenidas.

Palabras clave: embriogénesis somática, germinación parcial, germinación total, hiperhidricidad, medio de cultivo líquido

### Effect of the inoculation density in *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' somatic embryos germination in RITA® Temporary Immersion System

#### ABSTRACT

The development of somatic embryogenesis of coffee (*Coffea* spp.) in liquid culture medium is a viable alternative for the propagation of these species. The use of liquid culture medium and temporary immersion systems could increase the germination of somatic embryos and improve the quality of plants. The objective of this work was to determine the effect of inoculation density on germination of somatic embryos of *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' in temporary immersion systems RITA®. It were used as inoculum densities 40, 50, 60, 70 and 80 somatic embryos per RITA®. After 90 days of culture the number of somatic embryos germinated, hyperhydricity symptoms, number of true leaves, length and root development was quantified. With inoculum density of 70 somatic embryos per RITA®, it was obtained a highest germination percentage (60%) with good leaf development and length of the plants.

Key words: hyperhydricity, liquid culture medium, partial germination, total germination, somatic embryogenesis

#### INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes, ocupa el segundo lugar en el comercio internacional después del petróleo. Como cultivo las plantaciones de café (*Coffea* spp.) abarcan aproximadamente 10.2 millones de hectáreas en más de 80 países sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y América Latina.

La economía de muchos países productores de café depende en gran medida de las ganancias de este cultivo. Más de 100 millones de personas obtienen sus ingresos directa o indirectamente de las áreas cultivadas de café (ICO, 2013).

El cultivo de células y tejidos vegetales desempeña un papel importante en la biotecnología agrícola. La embriogénesis

somática como método de regeneración de plantas se ha logrado en un gran número de familias y especies y se ha usado para los estudios básicos de fisiología vegetal y en aplicaciones más prácticas, como la micropropagación y la transformación genética.

El cultivo de tejidos aplicado al café es un tema que ocupa a varios laboratorios en todo el mundo. La producción de embriones somáticos en biorreactores, su germinación en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), la crioconservación y el mejoramiento genético han sido y continúan estando entre las principales temáticas de investigación (Santana-Buzzy *et al.*, 2007). En este sentido, la multiplicación acelerada de plantas de café a través de embriogénesis somática busca establecer la producción de plantas de gran potencial y reducir los costos de producción de posturas (de Rezende *et al.*, 2012).

En la década de los 90, del siglo XX, se lograron importantes avances hacia la implementación comercial de la embriogénesis somática de café en medio de cultivo líquido (Zamarripa *et al.*, 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992; Zamarripa *et al.*, 1993; Van Bostel y Berthouly, 1996).

El desarrollo de la embriogénesis somática de café en medio de cultivo líquido es una alternativa viable con respecto a la propagación en medios de cultivo semisólido

según se ha demostrado al trabajar con *Coffea canephora* P. ex F. (Robusta) e híbridos F1 de *Coffea arabica* L. (Ducos *et al.*, 2007).

El empleo de medios de cultivo en estado líquido combinado con sistemas de cultivos basados en la inmersión temporal de los explantes, podría disminuir los plazos de tiempo, incrementar los porcentajes de germinación y mejorar la calidad de las plantas para su conversión en condiciones *ex vitro*. Es por ello, que se propone como objetivo de este trabajo: determinar el efecto de la densidad de inóculo en la germinación de embriones somáticos de café en Sistemas de Inmersión Temporal RITA®.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se utilizaron embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en etapas avanzadas de desarrollo (torpedo y cotiledonal) (Figura 1). Los embriones somáticos fueron obtenidos a partir de suspensiones celulares embriogénicas en fase de diferenciación según la metodología descrita por de Feria *et al.* (2005). Se empleó el medio de cultivo propuesto por Zamarripa *et al.* (1991) para la germinación de los embriones somáticos de café. Se dosificaron 200 ml de medio de cultivo por Sistema de Inmersión Temporal RITA®.



Figura 1. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en etapas de torpedo y cotiledonal empleados para inocular los Sistemas de Inmersión Temporal RITA®.

### Efecto de la densidad de inoculación

Para determinar el efecto de la densidad de inoculación en la germinación de los embriones somáticos se conformaron cinco tratamientos con 40, 50, 60, 70 y 80 ES por RITA®. Para cada tratamiento se establecieron cuatro réplicas y el sistema fue programado para transferir el medio de cultivo y sumergir los embriones somáticos durante un minuto cada doce horas.

La fase de germinación de los embriones somáticos de café en Sistema de Inmersión Temporal RITA® se realizó en una cámara de crecimiento con luz solar con un flujo fotosintético de fotones que osciló entre 48.0 – 62.5  $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$  con una duración del período luminoso máximo y mínimo de 14h y 10h, y una temperatura de  $25.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ . A los 90 días de cultivo se cuantificó el número de embriones somáticos con germinación total y el número de embriones somáticos con germinación parcial por tratamiento, así como el número de embriones somáticos con síntoma de hiperhidricidad. Además, se describieron las características morfológicas de las plantas obtenidas a través del número de hojas, la longitud de la planta (cm) y desarrollo radical.

### Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos se realizó la prueba de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa

comprobación del no cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los Sistemas de Inmersión Temporal RITA® las primeras señales del desarrollo de los embriones somáticos ocurrieron alrededor de los quince días de cultivo después de ser colocados en el medio de cultivo para la germinación, cuando cambiaron de un color crema a verde brillante (Figura 2).

Los resultados revelaron que existió una relación entre la densidad de inóculo y el número de embriones somáticos germinados en los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) RITA®. A los 90 días de cultivo se observó la presencia de embriones somáticos germinados en los diferentes tratamientos (Figura 3).

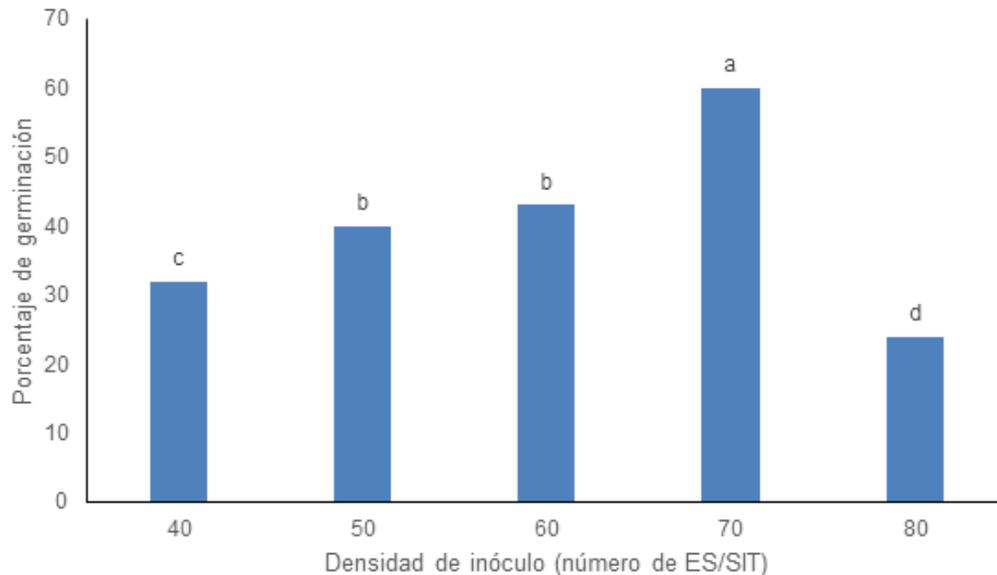
Los mayores valores de porcentaje de germinación (60%) se obtuvieron con una densidad de 70 embriones somáticos por SIT (Figura 4). Estos resultados fueron similares a los descritos por Etienne *et al.* (2002), pero en otro cultivar de *Coffea arabica* L.



Figura 2. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en Sistemas de Inmersión Temporal RITA® durante la fase de germinación.



Figura 3. Germinación de embriones somáticos de café en Sistemas de Inmersión Temporal RITA® con una densidad de 70 embriones somáticos a los 90 días de cultivo.



Barras con letras desiguales indican diferencias entre los rangos medios según prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para  $p < 0.05$

Figura 4. Efecto de la densidad de inóculo en la germinación de embriones somáticos de café en Sistemas de Inmersión Temporal RITA® a los 90 días de cultivo.

A través de la caracterización visual y por la respuesta morfológica observada, las plantas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos en los Sistemas de Inmersión Temporal RITA® no presentaron síntomas de hiperhidricidad (Figura 5), aspecto también señalado por Cabasson *et al.* (1997), en embriones somáticos de *Citrus deliciosa* L. y por Escalona (2003), en brotes de *Ananas comosus* (L.) Merr multiplicados en SIT.

En los tratamientos con una densidad de inóculo inferior a 70 embriones somáticos por SIT se obtuvo un menor porcentaje de germinación con respecto a este tratamiento. La densidad de inóculo como variable tuvo su fundamento en la cantidad de volumen de medio de cultivo disponible por explante, además del espacio físico para su desarrollo. Teniendo esto como base es posible que en el tratamiento con menor densidad de inóculo (40 ES), el cual se corresponde con

el mayor volumen de medio de cultivo por explante, estos estaban expuestos a condiciones de cultivo que provocaron estrés. En dependencia de la magnitud del estrés, los explantes pueden normalizarse por un incremento en su desarrollo morfofisiológico (Joyce *et al.*, 2003). Sin embargo, si se exceden los límites de tolerancia se observan daños permanentes en el desarrollo y crecimiento e incluso la muerte de los embriones somáticos como pudo haber sucedido en el tratamiento con una menor densidad de inóculo (Figura 6).

Autores como Lorenzo *et al.* (1998) en el cultivo de *Saccharum* spp. en SIT, sugirieron

que la influencia negativa de mayores volúmenes de medio de cultivo por explante se debe a que sustancias químicas que se secretan al medio de cultivo y estimulan el desarrollo de brotes son diluidas en el mismo. Al respecto, Escalona *et al.* (2003) informaron de la influencia negativa de mayores volúmenes de medio de cultivo en el desarrollo y crecimiento de brotes de *Ananas comosus* (L.) Merr en SIT. El proceso morfogenético en las plantas está controlado por una interacción entre el material vegetal, el medio de cultivo y el ambiente *in vitro*, aspecto que es muy importante en los Sistemas de Inmersión Temporal.



Figura 5. Plantas *in vitro* obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en SIT RITA® después de 90 días de cultivo.



Figura 6. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo no germinados en los sistemas de inmersión temporal RITA®.

En el tratamiento con 80 embriones somáticos como densidad de inóculo hubo una mayor competencia por los nutrientes, lo que se evidenció en el menor desarrollo foliar y una mayor presencia de germinación parcial de los embriones somáticos (Figura 7). Esto pudiera ser el resultado de la interrupción y la no sincronización de señales de inducción en la secuencia normal de los eventos de organización celular (Ziv, 2000).

La densidad de inoculación tuvo influencia en la longitud de las plantas que disminuyó significativamente con la mayor densidad (80 ES/SIT). Sin embargo, el mayor número de hojas por planta se obtuvo en las variantes con densidades de inóculo de 50 y 60 embriones somáticos por SIT (Tabla 1).

Las características morfológicas de las plantas obtenidas en los Sistemas de Inmersión Temporal RITA®, no difirieron de las propagadas en medios de cultivo semisólido en estudios previos (de Feria *et al.*, 2005). Los

embriones somáticos germinaron de forma individualizada en los SIT y tenían una morfología parecida a la de los embriones cigóticos, aspectos descritos anteriormente por Etienne y Berthouly (2002). En ninguno de los tratamientos se encontró presencia de hiperhidricidad, ni en los embriones somáticos ni en las plantas germinadas a partir de ellos. Todas las ventajas de estos sistemas parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son: la permanencia de una película superficial de medio de cultivo líquido sobre los tejidos que puede ser una de las principales razones de éxito de este sistema, pues no solamente asegura una disponibilidad nutritiva fuera de los períodos de inmersión, sino también interrumpe mucho menos los intercambios gaseosos que la inmersión total. Esta permanencia de medio de cultivo explica también la ausencia de daños y desecación de los embriones somáticos, incluso en el caso de una inmersión muy ocasional y breve, lo cual también fue descrito por Etienne y Berthouly (2002).



Figura 7. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' con germinación parcial en Sistemas de Inmersión Temporal RITA®.

Tabla 1. Efecto de la densidad de inóculo en Sistemas de Inmersión Temporal RITA® sobre la longitud y número de hojas en las plantas procedentes de la germinación de los embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo'.

Tratamientos (No. ES/SIT)	Longitud (cm)	Número de hojas
40	2.10 a	2.40 b
50	2.10 a	2.70 ab
60	2.00 a	2.98 a
70	1.97 a	2.40 b
80	1.70 b	2.00 c

Otra variable ligada con las condiciones físicas que parece significativa es la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo líquido cuyo efecto en los fenómenos *in vitro* es conocido desde hace muchos años (Teisson y Alvard, 1995). En el Sistema de Inmersión Temporal esta concentración alcanza la saturación solo un minuto después del burbujeo. En el caso de Erlenmeyers agitados sin tejido vegetal y sin consumo de oxígeno, la concentración de este gas disuelto nunca sobrepasa el 95% de saturación. Todos estos puntos significan que, en tal aparato, las condiciones físicas de nutrición, de intercambios de gases y de relaciones con el agua de los tejidos vegetales son completamente diferentes de las que se encuentran en las técnicas tradicionales. Estas condiciones fisiológicas conducen a un crecimiento totalmente diferente (Cabasson *et al.*, 1997).

## CONCLUSIONES

La densidad de inoculación tuvo efecto sobre la germinación de embriones somáticos de café cv. 'Caturra rojo' en SIT RITA®. Con 70 embriones somáticos/SIT se logró el mayor porcentaje de germinación (60%) con un buen desarrollo foliar y de longitud de las plantas obtenidas.

## REFERENCIAS

Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C (1997) Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 50: 33 - 37

De Feria, M, Jimenez E, Barbón R, Capote A, Chavez M, Quiala E (2005) Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9772 obtenidos en agitador orbital. *Biotecnología vegetal* 5(2): 95 – 101

De Rezende J, De Carvalho C, Carolina R, Pasqual M, Batista J (2012) Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá* 34(1): 93 - 98

Ducos, J, Lambot C, Pétiard V (2007) Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1(1): 1 - 12

Escalona, M, Samson G, Borroto C, Desjardins Y (2003) Physiology of the effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 39: 651

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. Dev. Biol. Plant* 38: 129 – 138

Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215 - 231

ICO (International Coffee Organization) (2013) Trade Statistics. [En línea] En: [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp). Consultado el 16 de septiembre de 2013

Lorenzo J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 54: 197-200

Neuenschwander B, Baumann T (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 10: 608 - 612

Santana - Buzzy N, Rojas - Herrera R, Galaz - Ávalos R, Ku - Cauich J, Mijangos - Cortés J, Gutiérrez-Pacheco L, Adriana C, Quiroz - Figueroa F, Loyola - Vargas V (2007) Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43: 507–520

Teisson C, Alvard D (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. En: Terzi M, Cella R, Falavigna A (Eds.) *Current plant science and biotechnology in agriculture*, 22: current issues in plant molecular and cellular biology, pp. 34-56. Kluwer Academic Publ. Dordrecht

Van - Boxtel J, Berthouly M (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44: 7 - 17

Zamarripa A (1993) Study and development of somatic embryogenesis in liquid medium of coffee. PhD Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 120 p

Zamarripa A, Ducos J, Tesserau H, Bollon H, Dufour M, Petiard V (1991) Production d'embryons somatiques de café en milieu liquide. Effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao Thé* 35: 233-244

Ziv M (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. *Hortic Rev* 24: 1-30

Recibido: 12-02-2014  
Aceptado: 28-03-2014