

Multiplicación del Híbrido Natural de Café (*Coffea arabica*) Caturra X Maragotype vía Embriogénesis Somática



Investigadores: Ing. José E. Tejada Torres, MSc, Dr. Genaro A. Reynoso Castillo, Ing. Jorge L. Del Villar Tió, MSc, Ing. Esclaudys Pérez González, MSc

I. INTRODUCCIÓN

El mejoramiento de las áreas cafetaleras es una meta que se han trazado las autoridades dominicanas de este sector. Para lograrlo, buscan reemplazar los cultivares viejos y de mala calidad por otros que reúnan cualidades físicas, organolépticas y de producción ideales. El híbrido natural de café Caturra x Maragotype, encontrado en Jarabacoa, La Vega, República Dominicana, reúne estas características. Sin embargo, tiene como limitante el hecho de ser una planta adulta y en deterioro por la inclemencia de quienes han tratado de clonarla vegetativamente.

En la República Dominicana, el café se propaga por semillas o vegetativamente, por medio de injertos y estacas. La segregación que ha presentado el híbrido al intentar propagarlo por vía sexual y la poca disponibilidad de esquejes debido al dimorfismo característico en este cultivo, ha limitado considerablemente el proceso de multiplicación.

La técnica más utilizada en la propagación de híbridos y plantas élites de café involucra la embriogénesis somática, siendo los explantes foliares los que mejor responden a la misma. Este método es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Pérez, 1998).

La embriogénesis somática, es un proceso que construye el cuerpo básico del sistema de las plantas. Durante la misma, los cigotos sufren una serie de cambios morfológicos, dando como resultado la formación de un embrión maduro compuesto de un eje embriogénico con polos de brotes, raíces y cotiledones (West y Harada, 1993).

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática permite obtener volúmenes de producción superior en menor tiempo y a un costo más bajo, lo cual convierte a este sistema en una vía de regeneración potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Thorpe, 1991).

Este método de micropropagación que ha sido utilizado en Francia, Costa Rica, Cuba, Brasil, entre otros países, se empleó en esta investigación con el objetivo de producir grandes volúmenes de plantas en menos tiempo y sin poner en peligro de extinción a la planta madre.

III Resultados y Discusiones

El mayor porcentaje (66.67 %) de los callos de cicatrización brotaron a partir de la segunda semana de cultivo (Gráfico 3.1); el restante 33.33% de los callos brotaron a la tercera semana de cultivo. A partir de esta, los segmentos que no formaron callos se tornaron de color marrón oscuro, característica de las hoja de café cuando se secan.

La auxina 2,4-D a 0.5 mg/l combinada con la citoquinina Kinetina a 2.0 y 3.0 mg/l surtieron el mismo efecto durante las primeras dos semanas; mientras que la citoquinina kinetina a 1.0 y 2.0 mg/l (K1 y K2) mantuvo una dependencia de la auxina a 1.0 mg/l en la inducción de callos tanto en la primera como en la segunda semana. Como se muestra en el gráfico 3.1, la kinetina cuando no se combina con la auxina 2,4-D (A0K0, A0K1, A0K2 y A0K3), no induce la formación de callos en segmentos foliares del híbrido de café. La formación de callos, de acuerdo con las observaciones, está influenciado por la acción del 2,4-D que, como auxina, se considera el elemento neoformador o activador de la dediferenciación celular.

Los primeros embriones somáticos se observaron a las 39 semanas de cultivo en el medio de diferenciación que contenía 5.0 mg/l de BAP (B5, Cuadro 2.2) y se presentaron como una estructura de color blanco que contrastaba con la coloración marrón oscuro de la masa callosa que le dio origen (Foto 3.1-B). Los embriones formados no mostraron sincronización en su desarrollo, ya que se podían distinguir desde el estado globular hasta el cotiledonar en la misma estructura.

La embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) surgió en el mismo tratamiento a las 52 semanas de cultivo en el medio de diferenciación. A diferencia de la ESBF, esta mostró sincronización en su desarrollo debido a que todos los embriones se mostraron en estado globular. (Foto 3.1 - A)

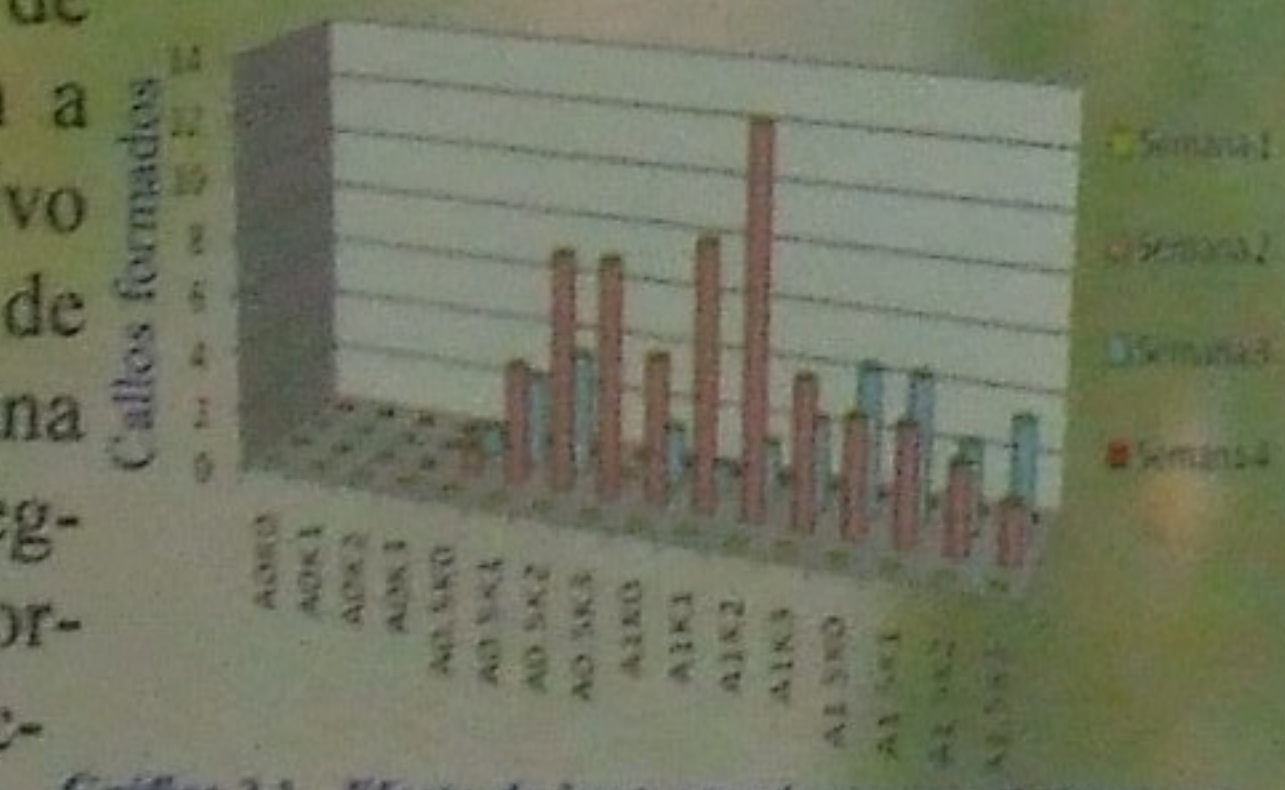


Gráfico 3.1. Efecto de los tratamientos en el tiempo de aparición de callos en los segmentos foliares del híbrido de café (*Coffea arabica*) multiplicado por Embriogénesis somática. Santiago, República Dominicana, 2008.



Foto 3.1. Callos embriogénicos. A - Estructura del callo de alta frecuencia ideal para el establecimiento de suspensiones celulares. B - Embriogénesis Somática de baja frecuencia. C - ES en etapa cotiledonar.

Cuadro 2.1. Concentraciones de kinetina y 2,4-D empleadas en la inducción de callos a partir de segmentos foliares del híbrido natural de café

A 2,4-D (mg/l)	Kinetina (mg/l)			
	0	1	2	3
0.0	A0K0	A0K1	A0K2	A0K3
0.5	A0.5K0	A0.5K1	A0.5K2	A0.5K3
1.0	A1K0	A1K1	A1K2	A1K3
1.5	A1.5K0	A1.5K1	A1.5K2	A1.5K3

Cuadro 2.2. Concentraciones de Benzilaminopurina (BAP) y kinetina empleadas en la diferenciación de los embriones somáticos del híbrido natural de café

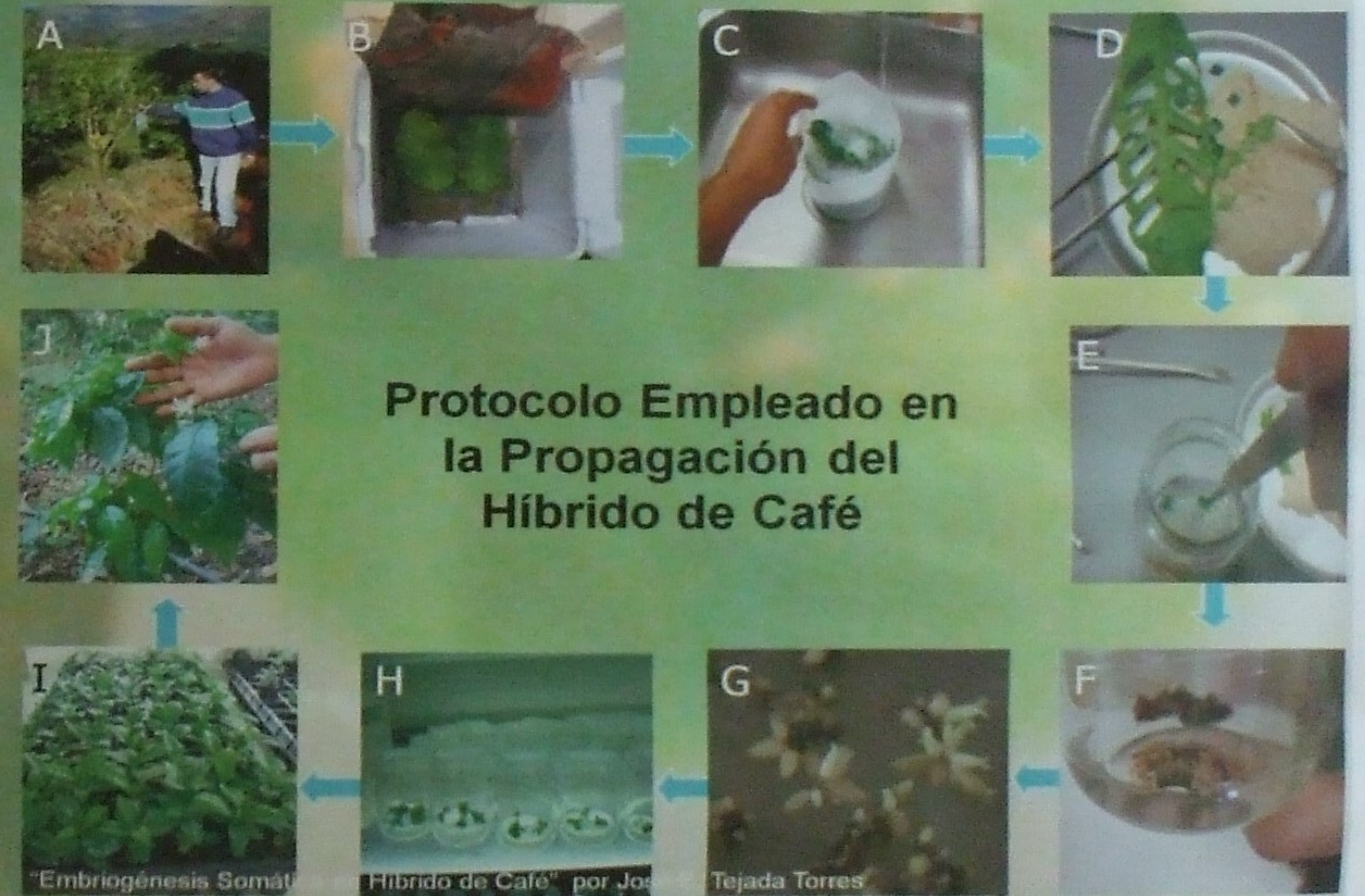
Tratamiento	Citoquininas	
	BAP (mg/l)	Kinetina (mg/l)
B0	0	0
B4	4	0
B5	5	0
B6	6	0
K2	0	2
K4	0	4
K5	0	5
K6	0	6

Cuadro 2.3. Concentraciones de Benzilaminopurina (BAP) y sacarosa empleadas en la germinación de embriones somáticos del híbrido natural de café

BAP (mg/l)	Sacarosa (g/l)			
	20	30.0	40.0	50.0
0.0	B0S20	B0S30	B0S40	B0S50
0.1	B1S20	B1S30	B1S40	B1S50
0.2	B2S20	B2S30	B2S40	B2S50
0.3	B3S20	B3S30	B3S40	B3S50

II. Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ISA, en Santiago, República Dominicana, financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF). Se realizaron tres bioensayos: el primero consistió en inducir la formación de callos embriogénicos a partir de segmentos foliares del híbrido (Imágenes D, E), previo tratamiento a la planta madre (Imagen A) y desinfección de las hojas colectadas (Imagen B). Los segmentos de hojas se inoculaban en medio de cultivo de Murashigue y Skoog (MS), al cual se le adicionó combinaciones de 2,4-D y Kinetina (Cuadro 2.1). La incubación fue en oscuridad a 27±2°C. En el segundo Bioensayo, se tomaron callos con características embriogénicas obtenidos en el primero, se inoculaban en medio MS con diferentes dosis de BAP y Kinetina (Cuadro 2.2) para inducir la diferenciación de los embriones (Imágenes E, F). La tercera y última etapa consistió en germinar y desarrollar los embriones (Imágenes I, J) obtenidos en el bioensayo dos, para lo cual se inoculaban (Imagen H) en el mismo medio de cultivo, suplementado con diferentes dosis y combinaciones de sacarosa y BAP (Cuadro 2.3) e incubados en fotoperíodo de 16 horas y 27±2°C. Los resultados de los tres bioensayos se analizaron con el Sistema de Análisis Estadístico (SAS) y la separación de media se realizó con Tukey, con una probabilidad de error de 5%.



Cuadro 3.1. Separación de medias para el efecto de los tratamientos en la germinación de embriones del híbrido de café (*Coffea arabica*). Santiago, República Dominicana, 2008.

Tukey Grouping	MEDIAS	TRATAMIENTOS	
		No.	BAP (mg/l) SACAROSA (g/l)
A	4.0000	B2S20	0.2 20
A B	3.7500	B3S20	0.3 20
A B	3.7500	B1S20	0.1 20
A B	3.5000	B3S40	0.3 40
A B	3.2500	B2S30	0.2 30
B C	2.7500	B3S30	0.3 30
B C	2.7500	B3S50	0.3 50
C D	2.0000	B1S30	0.1 30
C D E	1.7500	B2S40	0.2 40
D E F	1.2500	B1S40	0.1 40
E F G	0.7500	B1S50	0.1 50
E F G	0.7500	B2S50	0.2 50
F G	0.5000	B0S20	0.0 20
F G	0.0000	B0S30	0.0 30
G	0.0000	B0S40	0.0 40
G	0.0000	B0S50	0.0 50

IV Conclusiones

- Las combinaciones de 0.5 y 1 mg/l de 2,4-D y 2.0 mg/l de kinetina en el medio de cultivo MS inducen la formación de callos embriogénicos en los segmentos foliares del híbrido natural de café cuando se incuban en oscuridad y a 27± 2 °C.
- El uso de 5.0 mg/l de BAP en el medio de cultivo MS induce la embriogénesis somática de alta y de baja frecuencia a partir de callos provenientes de segmentos foliares del híbrido natural de café.
- La Kinetina (2.0 a 6.0 mg/l) en el medio de cultivo MS no estimuló la diferenciación de los embriones somáticos.
- Los embriones somáticos del híbrido de café en estado torpedo germinan antes de los 15 días cuando se inoculan en el medio de cultivo MS suplementado con 0.1 a 0.3 mg/l de BAP y de 20 a 30 g/l de sacarosa.
- La presencia de BAP en el medio de cultivo MS estimula la germinación de los embriones somáticos del híbrido de café.