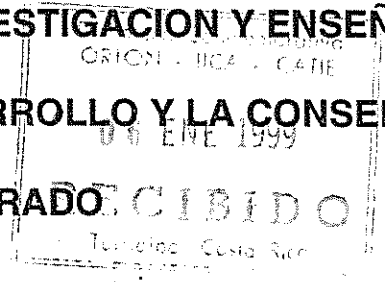


CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSTGRADO. CIBIDO



**DESARROLLO Y MADURACION DE EMBRIONES SOMATICOS
DE HIBRIDOS F1 DE *COFFEA ARABICA*
PARA UNA PRODUCCION MASAL**

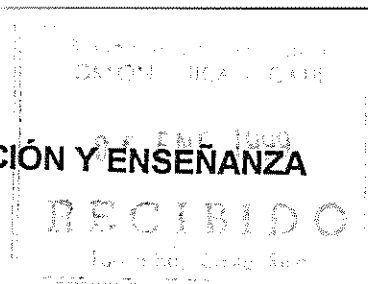
POR

IVETTE ESTHER GIRON VELADO



Turrialba, Costa Rica
1998

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
(CATIE)



PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACION
ESCUELA DE POSTGRADO

**“Desarrollo y Maduración de Embriones Somáticos de Híbridos
F₁ de *Coffea arabica* para una producción masal”**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Postgrado del Programa de
Enseñanza para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico
Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de :

Magister Scientiae

Por

IVETTE ESTHER GIRON VELADO

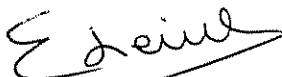
Turrialba, Costa Rica

1998

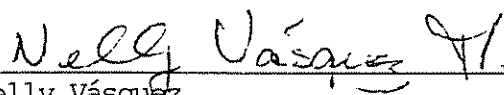
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



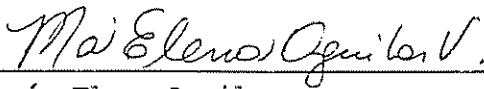
Hervé Etienne
Profesor Consejero



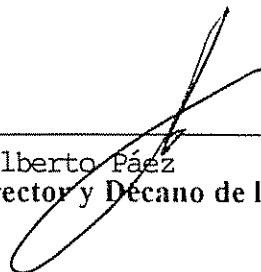
Nelly Vásquez
Miembro Comité Asesor



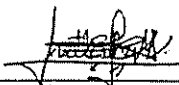
Francois Cote
Miembro Comité Asesor



María Elena Aguilar
Miembro Comité Asesor



Gilberto Páez
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Ivette Girón
Candidato

A Mi Padre Celestial por su infinita misericordia.

A mi familia , amigos y todas
aquellas personas que de una u otra manera cambiaron mi
vida.

Toette

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros y profundos agradecimientos a la fundación COSUDE/FUNDATROPICOS, por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de maestría.

A Hervé Etienne, mi profesor consejero, por el gran apoyo brindado durante estos dos años, por compartir conmigo sus conocimientos y estar siempre dispuesto a colaborar incondicionalmente a la realización de mi proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité : Nelly Vásquez, María Elena Aguilar y Francois Côte, por la colaboración brindada durante mi estadía en CATIE. Mil gracias.

Al personal de biotecnología, porque gracias a cada uno de ellos fue posible realizar mi investigación y por hacer de las horas arduas de trabajo, momentos especiales de verdadero compañerismo.

A mis amigos Ana, Juanjo (El Che) y Emelda, con quien compartí momentos valiosos de mi vida, porque siempre estuvieron ahí , sobre todo en mis momentos de flaqueza.

A Jhonny Pérez, por su valiosa ayuda en la parte estadística, gracias por su paciencia y buen humor.

Agradezco de manera especial a MACHO (Francisco Solano), por su ayuda tan valiosa y espontánea , gracias a él fue posible una buena ayuda visual.

Al personal de postgrado por su trabajo tan arduo en beneficio de todos nosotros, especialmente a Thomas, que siempre mostró mucho espíritu de colaboración.

Al Señor Eduardo Molina, por su paciencia antes mis múltiples molestias y porque siempre encontró una solución a mis problemas dados en la elaboración de la tesis.

Al personal de la biblioteca Orton, por desempeñar una gran labor en beneficio nuestro, porque siempre me lleve aparte de un libro "una gran sonrisa" que me alegró el día.

A Susana, Juanita, Ana, Martha, los Botero y Flores, por los momentos lindos vividos.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros y demás amigos de las otras maestrías y de primer año y todas aquellas personas que hicieron posible la elaboración de este trabajo. Muchas Gracias !!!

CONTENIDO

Resumen	ix
Summary	x
Lista de figuras	xi
Lista de cuadros	xv
INTRODUCCION	1
1.1. OBJETIVOS.....	4
1.1.1. Objetivo general.....	4
1.1.2. Objetivos específicos.....	4
2. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1 Características generales de <i>Coffea</i>	5
2.1.1. Origen y datos históricos.....	5
2.1.2. Botánica.....	7
2.2. Tipos de Propagación del café.....	7
2.2.1. Propagación sexual.....	7
2.2.2. Propagación asexual.....	8
2.2.2.1. Cultivo de Tejidos.....	8
2.2.2.1.1. Microestacas.....	10
2.2.2.1.2. Embriogénesis somática.....	11
A Tipos de embriogénesis somática.....	11
A.1.Embriogénesis somática de baja frecuencia (LFSE) o embriogénesis somática directa.....	12
A.2. Embriogénesis somática de alta frecuencia (HFSE) o embriogénesis somática indirecta.....	12
B Etapas de la embriogénesis somática de alta frecuencia o indirecta.....	12
B.1. Inducción.....	12
B.2. Proliferación del callo embriogénico en suspensiones celulares.....	14
B.3. Expresión embriogénica y desarrollo de los embriones somáticos.....	14
B.4. Maduración.....	15
C. Mecanismos fisiológicos de desarrollo y maduración de los embriones somáticos.....	16
C.1. Acido Abscísico (ABA).....	17
C.2. Sacarosa.....	18
C.3. Aminoácidos como la glutamina.....	21
C.4. Tratamientos con luz.....	21
C.5. Osmolaridad.....	21
C.6. Desecación.....	23
C.7. Temperatura.....	24
3. MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1. Localización del ensayo.....	25
3.2. Material Experimental.....	25
3.2.1 Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA).....	25
3.2.1. Material vegetal.....	25

3.3. Medios de cultivo	25
3.4. Condiciones físicas de crecimiento.....	26
3.5. Protocolos.....	26
3.5.1 Protocolo estándar	26
i/. Suspensión celular.....	26
ii/. Regeneración en inmersión temporal.....	26
iii/. Conversión de los embriones en plantas	27
3.5.2. Experimentaciones	27
3.5.2.1. Efecto de algunos parámetros físicos sobre la regeneración de embriones somáticos	28
i/. Densidad de cultivo en bioreactor durante las fases tardías de la embriogénesis somática.....	29
ii/. Efecto del sistema de cultivo utilizado (medio gelificado/bioreactor) sobre la germinación.....	29
iii/. Efecto del soporte de cultivo sobre la regeneración de embriones somáticos	29
3.5.2.2. Ensayos para introducir una fase de maduración.....	29
3.5.2.2.1. Ensayos de maduración en presencia de altas concentraciones de sacarosa.....	30
3.5.2.2.2. Ensayos de maduración en presencia de ácido abscísico (ABA).....	30
3.5.2.3. Ensayo para provocar un estado de quiescencia en los embriones somáticos.....	30
3.6. Análisis histológicos.....	31
3.7. Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS	35
4.1. Producción masiva de embriones somáticos en bioreactor.....	35
4.2. Efecto de algunos factores físicos sobre la regeneración de embriones somáticos.....	36
4.2.1. Densidad de cultivo y germinación	36
4.2.2. Sistema de cultivo : bioreactor vrs medio gelificado	38
4.2.3. Tipo de soporte utilizado (RITA ®) y producción de embriones somáticos.....	39
4.3. Ensayos de maduración con sacarosa.....	41
4.3.1. Efectos sobre la producción de embriones somáticos.....	41
4.3.2. Efecto sobre la morfología de los embriones somáticos.....	43
4.3.3. Efecto sobre la germinación	43
4.3.4. Efectos sobre la conversión en planta	44
4.4. Ensayos de maduración con ácido abscísico (ABA).....	46
4.4.1. Efectos sobre la producción de embriones somáticos.....	46
4.4.2. Efecto sobre la morfología de los embriones somáticos.....	47
4.4.3. Efecto sobre la germinación	48
4.4.4. Efecto sobre la conversión en planta.....	50
4.5. Ensayos de Quiescencia	52
4.5.1. Evaluación del contenido de humedad a diferentes tiempos sin inmersión.....	53
4.5.2. Efecto sobre la germinación en bioreactor	53
4.5.3. Producción de embriones adventicios	54
4.5.4. Efectos sobre el PF y la conversión en planta en medio gelificado.....	55
4.5.5. Aspecto morfológico e histológico de los embriones a lo largo del período sin inmersión.....	63

5. DISCUSION	63
5.1. Efecto de algunos factores físicos sobre la regeneración de embriones somáticos	63
5.1.1. Densidad de cultivo y germinación	63
5.1.2. Sistema de cultivo : bioreactor con inmersión temporal vrs medio gelificado	64
5.2. Ensayos de maduración	68
5.2.1. Maduración con sacarosa	70
5.2.2. Maduración con ácido abscísico	72
5.2.3. Comparación de las acciones de sacarosa y ABA	73
5.3 Ensayos de Quiescencia	74
6. CONCLUSIONES	77
7. RECOMENDACIONES	79
8. BIBLIOGRAFIA	80
9. APENDICE	89

GIRON, I.E. 1998. Desarrollo y maduración de Embriones Somáticos de Híbridos F₁ de *Coffea arabica* para una producción masal. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 92p.

Palabras claves : *Coffea arabica*, embrión somático, híbridos F₁, desarrollo, maduración, quiescencia, producción masal, *in vitro*, embriogénesis somática, desecación, sacarosa, ácido abscísico (ABA), inmersión temporal, bioreactor, germinación.

RESUMEN

El café es una especie originaria de África del este y más precisamente de las tierras altas de Etiopía y Sudán. Esta planta se introdujo al Continente Americano a principios del siglo XVIII proveniente de Yemen (centro de dispersión) y en la actualidad constituye uno de los productos agrícolas de mayor importancia a nivel mundial.

En América Central se está desarrollando un programa de mejoramiento de *Coffea arabica* con el afán de producir híbridos F₁ más resistentes a enfermedades, mayor producción, mejor calidad y adaptabilidad de las mejores variedades cultivadas. Debido a su carácter heterocigótico, se debe desarrollar un proceso de producción vegetativa para multiplicar los mejores candidatos. Una técnica de cultivo de tejidos utilizada para cumplir este objetivo, es la embriogénesis somática, que apareció como la mejor alternativa para permitir la propagación a gran escala.

Se ha logrado hasta el momento, la introducción de todos los híbridos F₁ seleccionados. Sin embargo se ha presentado el problema de la falta de vigor y homogeneidad de los embriones somáticos durante la fase de germinación y conversión en planta. En tal sentido, el trabajo se orientó a buscar las condiciones de cultivo que mejoraran el desarrollo y maduración de los embriones, con el fin de aumentar la sincronización de este desarrollo y mejorar la tasa de conversión en planta. Para ello, se modificaron los protocolos ya establecidos de la embriogénesis somática, incluyendo una fase maduración en donde se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa y ácido abscísico. De los resultados obtenidos se encontró que las altas concentraciones de sacarosa (80, 100, 120, y 140 g/l) inhibieron el desarrollo de los embriones, siendo la concentración de 40g/l la que dió los mejores resultados. Por otro lado la maduración con ABA (independientemente de la concentración usada) promovió la acumulación de reservas (lípidos, proteínas y almidón), aumentando el vigor y preparando de esa manera a los embriones para su posterior germinación. Además se evaluó el efecto de la inducción de un estado quiescente en los embriones para prepararlos a la germinación. De los resultados obtenidos se observó, que se pudo mejorar el aspecto morfológico de los mismos, logrando terminar el proceso de desarrollo (ontogénesis).

Por otro lado, se midió el efecto de algunos factores físicos sobre la regeneración de los embriones, tales como: la densidad, el sistema de cultivo y el tipo de soporte utilizado en el bioreactor, encontrándose que la densidad y el sistema de cultivo influyen sobre todo en la morfología de los embriones y no en el comportamiento *in vitro* de estos. Respecto al soporte, se analizaron 3 tipos: el de tela de nylon que indujo a la proliferación de agregados proembrionarios sin desarrollo, el de espuma de poliuretano con densidad 24, que indujo el desarrollo de los embriones y callo, pero estos murieron o se vitrificaron, y finalmente la espuma de poliuretano a malla abierta que produjo el desarrollo normal de los embriones. En este trabajo se evaluó también la factibilidad de usar medio líquido para la producción masal de los embriones en todas sus fases, encontrándose que se pueden lograr cantidades hasta de 1500 embriones por bioreactor, de los cuales el 60% logra germinar en condiciones de invernadero.

GIRON, I.E. 1998. Development and maturation of somatic embryos of F₁ hybrids of *Coffea arabica* for a mass production.

Keywords : *Coffea arabica*, somatic embryos, F₁ hybrids, development, maturation, quiescence, mass production, *in vitro*, somatic embryogenesis, deshydration, sucrose, abscisic acid (ABA), temporary immersion, bioreactor, germination.

SUMMARY

Coffea is a specie originated in East of Africa , and in fact of high lands of Etiopía and Sudán. This plant was introduced to the American Continent at the beginning of the XVIII century from Yemen (dispersion center) and presently constitutes one of the agricultural products of great importance worldwide.

In Central America an improvement program in *Coffea arabica* is being developed, with the objective to produce F₁ hybrids more resistant to diseases, high production, better quality and adaptability of the best cultivated varieties. Due to their heterozygous character, a vegetative production process showed be developed to multiply the best varieties. A tissue culture technique used to fulfill this objective is by somatic embryogenesis; this appeared to be the best alternative that allows a large scale production.

Until the moment, the introduction of all the selected F₁ hybrids has been achieved. However it has presented the problem of lack of vigour, homogeneity of the embryos during the germination phase and plant conversion. In such sense, this work was oriented to look for cultivated conditions that improved the development and improves the plant conversion rate. For it, the somatic embryogenesis protocol already established were modified, including a maturation phase, wereby different sucrose concentration and abscisic acid were used. The results obtained showed that high sucrose concentrations (80, 100, 120, 140 g/l), inhibit embryo development, the concentration of 40 g/l gave the best results. On the other hand, maturation with ABA (independently on the concentration used), promoted reserves accumulation (lipids, proteins and starch), increasing vigour, preparing the embryos for their latter germination for the latter germination. Also the effect of the induction quiescence state, of the embryos were evaluated in order to prepare them for germination. The results researched that the morphological aspect was also improved by achieving the ending of the development process (ontogenesis).

On the other side, the effect of some physical factors of the regeneration of the embryos was measured such as : density, cultivation systems and the type of support used in the bioreactor. It was found that the density and the cultivation influences the morphology of the embryos and not in the *in vitro* behaviour. With respect to the support, 3 types were analyzed. Nylon cloth induced the proliferation of proembryos aggregates but did not influence on development. Polyurethane foam with density 24, induced the development of embryos and callus but these died and were vitrified. Polyurethane foam open mesh produced the normal development of the embryos. In this work, the factibility of the utilization of liquid medium for mass embryos production in all their phases showed that, 1500 embryos per bioreactor could be achieved of which 60% is able to germinate under greenhouse conditions.

Fig.1 Protocolo de embriogénesis somática de alta frecuencia utilizado el presente ensayo.....28

Fig.2 Ensayo de maduración con diferentes concentraciones de sacarosa. Efecto sobre la producción de nuevos embriones somáticos en bioreactor. Las diferentes concentraciones se mantuvieron cuatro semanas ,los conteos fueron realizados después de 12 semanas en medio de germinación. Las barras muestran el error estándar de las medias. Cada valor representa un promedio de por lo menos 5 bioreactores por tratamiento, cada réplica tuvo 1500 embriones. No se encontraron diferencias según la prueba F, $P>0.2954$ a un nivel de significancia del 0.05.....42

Fig.3 Ensayo de maduración con diferentes concentraciones de sacarosa : Efecto sobre el PF medido después de 12 semanas en medio de germinación. Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica tuvo 5 bioreactores con 500 embriones cada uno o 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. No existen diferencias significativas según la prueba F, $Pr<0.2145$ a un nivel de significancia de 0.05.....43

Fig.4 Ensayos de maduración de embriones con diferentes concentraciones de sacarosa : efecto sobre la germinación en bioreactor. Las diferentes concentraciones de sacarosa se mantuvieron un mes. Las frecuencias de germinación y mortalidad fueron observadas después de un mes de germinación. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica tuvo 5 bioreactores con 500 embriones cada uno. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p<0.05$).....44

Fig 5. Ensayo de maduración de embriones con diferentes concentraciones de sacarosa : efecto sobre la conversión de los embriones somáticos en plantas proveniente de bioreactores inoculados a alta (1500) y baja (500) densidad de cultivo. Las concentraciones de sacarosa fueron mantenidas por 4 semanas. La frecuencia de conversión en planta fue observada después de 12 semanas de germinación en medio gelificado. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica conteniendo por lo menos 20 frascos con 10 embriones cada uno. No existen diferencias significativas entre la interacción densidad*concentración por la prueba Lsmeans (Least Squares Means) ($p<0.05$).....45

- Fig 6. Ensayo de maduración de embriones con diferentes concentraciones de sacarosa: efecto sobre el crecimiento de las plántulas en medio gelificado, proveniente de bioreactores inoculados a alta (1500) y baja (500) densidad de cultivo. Las concentraciones de sacarosa fueron mantenidas por 4 semanas. El crecimiento fue observado después de 12 semanas de germinación en medio gelificado. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica conteniendo por lo menos 5 frascos con 10 embriones cada uno. No existen diferencias significativas por la prueba LS means (Least Squares Means) ($p < 0.05$).....46
- Fig. 7 Ensayo de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA. Efecto la producción de nuevos embriones somáticos en el bioreactor, mantenidos por cuatro semanas, los conteos fueron realizados después de 12 semanas en medio de germinación. Las barras muestran el error estándar de las medias. Cada valor representa un promedio de por lo menos 4 réplicas por tratamiento, cada réplica tuvo 1500 embriones al principio del tratamiento. No existen diferencias según la prueba F, $P > 0.1999$ a un nivel de significancia del 0.05.....47
- Fig. 8 Ensayo de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA: Efecto sobre el PF medido después de 12 semanas en medio de germinación. Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por cada tratamiento, cada réplica consistió de un bioreactor con 500 embriones y 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. No existen diferencias según la prueba F, $P > 0.3257$ a un nivel de significancia del 0.05.....48
- Fig. 9 Ensayos de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA: efecto sobre la germinación en bioreactor. Las diferentes concentraciones de ABA se mantuvieron por un mes. Las frecuencias de germinación y mortalidad fueron observadas después de 15 días de desecación y 12 semanas de germinación. Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento. Cada réplica consistió de un bioreactor con 500 embriones cada uno. Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....49
- Fig. 10 Ensayos de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA: efecto sobre la conversión de los embriones somáticos en plantas. Los embriones provienen de bioreactores inoculados a alta (1500) y baja (500) densidad de cultivo. Las concentraciones de ABA fueron mantenidas por un mes sobre embriones al estado torpedo. La frecuencia de conversión en planta fue observada después de 12 semanas de germinación en medio gelificado. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento, cada réplica conteniendo por lo menos 5 frascos con 10 embriones cada uno. Distintas letras representan diferencias significativas por Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....51

- Fig. 11 Ensayos de maduración de los embriones con ABA ($1 \times 10^{-6} M$) y sin ABA (testigo): efecto sobre la conversión de los embriones somáticos en plantas en el suelo. Los embriones provienen de bioreactores inoculados a alta densidad (1500) de cultivo. La maduración con ABA fue mantenida por un mes sobre embriones al estado torpedo. La frecuencia de conversión en planta fue observada después de dos meses de la siembra en vivero, la cual fue realizada después de 12 semanas de germinación en bioreactor. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de 15 bandejas por tratamiento, cada bandeja conteniendo por lo menos 200 embriones cada una. Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....52
- Fig 12 Efecto de la ausencia de inmersión en el bioreactor sobre el contenido de agua (%) en los embriones, evaluado a diferentes tiempos (semanas). Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor representa por lo menos un promedio de 3 bioreactores por tratamiento. No existen diferencias la prueba F, $P > 0.0839$ a un nivel de significancia del 0.05.....53
- Fig 13. Efecto de la ausencia de inmersión en el bioreactor, sobre la germinación (%) de los embriones, evaluado a diferentes tiempos (semanas). Las barras indican el error estándar de las medias. Cada valor representa por lo menos un promedio de 3 bioreactores por tratamiento, cada bioreactor tuvo 1500 embriones. Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....54
- Fig.14. Efecto del tiempo sin inmersión en el bioreactor después de la fase de desarrollo, en la producción de embriones adventicios. Con tres réplicas o bioreactores por semana, cada una conteniendo hasta 1500 embriones somáticos/bioreactor.....54
- Fig 15. Efecto de la ausencia de inmersión en el bioreactor sobre el PF (g) y conversión en plantas (%) de los embriones en medio gelificado, evaluados a diferentes tiempos (semanas). Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor representa por lo menos un promedio de 7 frascos por tratamiento, cada uno tuvo 10 embriones. Distintas letras indican diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....55
- Fig.16. Algunas etapas de la regeneración de embriones somáticos utilizando el bioreactor RITA (A) proliferación del callo embriogénico, (B) expresión embriogénica, (C) desarrollo de los embriones somáticos, (D) germinación, (E) conversión de plantas en vivero.....57

- Fig.17 Aspectos morfológicos de embriones somáticos de café producidos en medio gelificado y bioreactor con inmersión temporal RITA ®. (A) embriones sin germinar y (B) embriones germinados en medio gelificado. (C) embriones sin germinar y (D) embriones germinados en bioreactor.....58
- Fig. 18. Incidencia del soporte de cultivo utilizado en el bioreactor de inmersión temporal RITA®, sobre la morfología de los embriones somáticos. (A) Regeneración de embriones en espuma poliuretano. (C) Desarrollo normal de embriones en espuma poliuretano a malla abierta y (E) Agregados proembrionarios sin desarrollo en tela de nylon. (B), (D) y (F) embriones correspondientes a cada uno de los soportes , observados al microscopio electrónico..... 59
- Fig. 19. Efecto de una fase de maduración con sacarosa y ABA (A) embrión proveniente de una fase de maduración con sacarosa (20X x 1.6) y (B) después de haber sido desecado durante dos semanas (20X). (C) producción de embriones adventicios a partir de embriones sometidos a la maduración con ácido abscísico (ABA) (4X). (al : almidón).....60
- Fig. 20. Ensayo de maduración de embriones somáticos de café en bioreactor, producción y aspectos morfológicos (A) y (B) embriones en presencia de 40 g/l de sacarosa, (C) y (D) 140 g/l de sacarosa, (E) y (F) 5×10^{-6} M ABA.....61
- Fig. 21 Ensayo de maduración en bioreactor, aspectos histológicos después de un mes con (A) 40 g/l de sacarosa, (C) 140 g/l de sacarosa y (E) 5×10^{-6} M ABA. Después de un período de desecación de dos semanas (B) 40 g/l de sacarosa, (D) 140 g/l de sacarosa y (F) 5×10^{-6} M ABA. (pr : proteínas, l : lípidos, al : almidón, n : núcleo).
62

Cuadro 1: Análisis de la producción de 200,000 embriones somáticos de café, utilizando el sistema de inmersión temporal automatizado con respecto al proceso completo de regeneración.....	36
Cuadro 2. Influencia de la densidad de cultivo sobre la morfología (tamaño y peso fresco(PF)), la mortalidad, la germinación, la conversión en planta y el crecimiento de embriones somáticos de café. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento, cada réplica consistió de 500 - 1500 embriones por bioreactor o 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....	37
Cuadro 3 : Influencia del sistema de cultivo la morfología (tamaño y peso fresco(PF)), la mortalidad y la germinación de los embriones somáticos de café. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento, cada réplica consistió de 500 - 1500 embriones por bioreactor o 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).....	38
Cuadro 4 Incidencia del soporte de cultivo utilizado en el bioreactor de inmersión temporal (RITA®) sobre algunos parámetros de cultivo tales como : morfogénesis, contenido de agua y número de embriones producidos. Las observaciones fueron realizadas después de 3 meses de regeneración.....	40
En el apéndice	
Apéndice 3.1 Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados en el experimento (mg/l).....	91
Apéndice 3.2. Composición del medio de maduración.....	91
Apéndice 3.3. Composición del fijador FAA (Formalina, alcohol, ácido acético).....	91
Apéndice 3.4. Aclimatación en tierra.....	91
Apéndice 3.5. Composición del fijador para suspensiones celulares.....	92

1. INTRODUCCION

El café actualmente constituye uno de los productos comerciales de mayor importancia mundial y es el cultivo perenne más extendido en las regiones tropicales; varios países de América Latina como Colombia, Brasil y El Salvador, dependen en gran medida de su producción para la obtención de divisas (Rivera *et al.*, 1989).

Este cultivo posee una producción mundial de 5603 MT (toneladas métricas) (Colecciones FAO, 1995), de la cual el 75% es de *Coffea arabica* en sus dos variedades: *Coffea arabica* L. var. *typica* Cramer y *C. arabica* L. var. *bourbon* (B. Rodr.) Choussy. La segunda es probablemente un mutante de la primera y se dice, de acuerdo con algunos informes que da una mayor producción y un licor de mejor calidad (Zuluaga *et al.*, 1989).

El Caturra una variedad de Bourbon, se ha cultivado ampliamente en los últimos años por su gran producción y su muy buena adaptación en el medio ambiente en la zona cafetalera. Se cultiva principalmente en América Latina y es muy consumida en el mundo debido a su alta calidad de la bebida y productividad.

La especie *Coffea canephora*, debido a su aceptable resistencia a la roya del cafeto y a su mejor adaptación al clima cálido húmedo, tiene cierta importancia a nivel mundial y hoy en día constituye un 23% del café exportado (Colecciones FAO, 1995).

El café es comúnmente propagado por reproducción sexual y asexual. En especies alógamas como por *C. canephora*, podrían no obtener las características deseadas debido a la variación genética que se da en la reproducción sexual. La reproducción por estacas hortícolas es entonces una práctica muy desarrollada para multiplicar masivamente árboles seleccionados y aprovechar una mayor productividad en comparación con variedades provenientes de semillas (Capot, 1975).

La reproducción sexual se practica con éxito en casi todas las variedades comerciales de *Coffea arabica* la cual es autógama. La propagación vegetativa se utiliza poco. Las variedades son vendidas en forma de semillas después de un

proceso de selección genealógico relativamente largo, unos veinte años como mínimo. Esta selección permite obtener una variedad generalmente estable y homocigótica para los caracteres buscados. La propagación vegetativa presenta a pesar de todo un interés en *C. arabica*. En efecto, la superioridad de los híbridos F₁ de *C. arabica* sobre las variedades ha sido demostrada (Van der Vossen y Walyaro, 1981) en Kenia, en Etiopía (Ameha, 1983) y más recientemente en América Central (Bertrand *et al.*, 1997). Es en estos casos donde los métodos de reproducción asexual cobran importancia, ya que la selección de individuos heterocigotas con características deseables, permite reproducirlos rápidamente, conservando su identidad genética. Ahora bien, se han realizado pruebas de explotación de híbridos F₁ multiplicados por los métodos de propagación vegetativa hortícolas, no obstante, han tenido poco éxito, debido a que han permitido bajas tasas de multiplicación (Van der Vossen, 1985).

Como resultado de lo anterior se han desarrollado una serie de tecnologías de cultivo *in vitro* de células y tejidos del cafeto, que han abierto posibilidades, tanto para el mejoramiento como para la propagación, conservación e intercambio de materiales promisorios híbridos o cultivares heterocigóticas, con características de resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades (Santana, 1989a). Las técnicas de cultivo de tejidos tienen como objetivo fundamental, multiplicar a gran escala las plantas élites provenientes de los programas de hibridación, así como aquellas logradas por otras vías biotecnológicas como la fusión de protoplastos y la transformación genética (Montes *et al.*, 1995).

Dentro de estas técnicas se encuentra la embriogénesis somática, en la cual, se pueden obtener grandes cantidades de embriones somáticos de cafeto a partir de suspensiones celulares (Sondal y Sharp, 1977; Staritsky, 1970) cuyo desarrollo es parecido a los embriones cigóticos. Esto representa una mayor oportunidad de propagación masal en el campo de la biotecnología (Berthouly y Etienne, 1999; Etienne *et al.*, 1999).

Actualmente en Costa Rica se está desarrollando un programa de mejoramiento de café arabica a través del CATIE, PROMECAFE y la Cooperación Francesa (CIRAD, ORSTOM, MAE), con el afán de producir híbridos F₁ más resistentes a enfermedades y de una mejor calidad y adaptabilidad que las mejores variedades cultivadas. Se ha

logrado hasta el momento, la introducción de todos los híbridos seleccionados, de los cuales se ha obtenido callo embriogénico y la multiplicación de éste en suspensiones celulares embriogénicas. También, se ha logrado la regeneración de grandes cantidades de embriones somáticos en medio líquido con inmersión temporal para los primeros candidatos (Etienne *et al.*, 1997), demostrando de esta manera la posibilidad de una producción masal de embriones. Sin embargo, se han presentado diferentes problemas; entre ellos se encuentra el hecho de que los embriones somáticos obtenidos poseen poco vigor durante la germinación y conversión en plantas, lo que es atribuido a problemas durante la fase de desarrollo o más probablemente a una fase de maduración inadecuada.

La deficiencia en las fases de germinación y conversión en plantas así como la dificultad de obtener callo embriogénico con todos los genotipos cultivados (para establecer cultivos mantenidos a largo plazo en muchas especies), son todavía uno de los mayores obstáculos para la aplicación industrial de la embriogénesis somática en las diferentes especies.

El bajo vigor o pobre calidad morfológica de los embriones provoca dos problemas durante el crecimiento del embrión somático; en primer lugar un cierto porcentaje de embriones anormales durante la fase de desarrollo y en segundo lugar un desarrollo poco vigoroso después de la germinación (Leucouteux *et al.*, 1993). La reducción del vigor resulta en un pobre almacenaje de reservas, proteínas y carbohidratos, disponibles para la germinación de las plántulas (Leucouteux *et al.*, 1993), y también en la falta de una fase corta de deshidratación similar a la observada en cualquier semilla (Etienne *et al.*, 1993; Carman, 1988, 1989).

Debido a lo anterior, uno de los pasos críticos en la producción de embriones, es el proceso de maduración, porque afecta la viabilidad de los embriones somáticos desarrollados, específicamente la habilidad para germinar y producir plántulas (Lelu *et al.*, 1994).

Estudios realizados demuestran que factores como el ácido abscísico (ABA) (Von Arnold y Hakman, 1986; Boulay *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1990), la concentración de sacarosa (Lu y Thorpe, 1987), el tipo de carbohidrato (Tremblay y

Tremblay, 1991) y la deshidratación (Senaratna *et al.*, 1990), mejoran grandemente la eficacia de los pasos de maduración, pero aún más importante, la calidad de los embriones somáticos (Lelu *et al.*, 1994). La alta calidad de los embriones somáticos se refiere generalmente a la mayor semejanza a los embriones cigóticos maduros y a la producción de plantas que sean fenotípicamente similares a la planta que les dio origen (Lelu *et al.*, 1994).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Optimizar la fase de desarrollo y establecer condiciones para estimular un proceso de maduración en los embriones somáticos de café, con el fin de mejorar la sincronización del desarrollo y la tasa de conversión en planta.

1.1.2. Objetivos específicos

-Determinar el papel de los factores físicos de cultivo en el bioreactor con inmersión temporal, tales como la densidad de cultivo y el soporte de cultivo en el bioreactor y comparar los resultados obtenidos en el bioreactor con los encontrados tradicionalmente en medio gelificado.

-Eliminar el problema de hiperhidricidad observado en los embriones somáticos.

- Estudiar la posibilidad de obtener la maduración de los embriones con el ácido abscísico (ABA) o la sacarosa. Determinar las concentraciones adecuadas para mejorar el desarrollo de los embriones somáticos y obtener una mayor tolerancia a la desecación.

- Estudiar la posibilidad de establecer condiciones de quiescencia y/o de desecación en el bioreactor con inmersión temporal con el objetivo de preparar los embriones a la germinación.

-Establecer las condiciones de producción masal de vitroplantas de café, de tal manera que se puedan obtener resultados repetitivos y un material muy homogéneo.

-Seguir la ontogénesis, la acumulación de reservas y el desarrollo de los tejidos en los embriones somáticos, mediante un estudio histológico.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Características generales de *Coffea*

Para tener un conocimiento adecuado del cultivo de café, es de fundamental importancia conocer la planta, su forma, constitución y funcionamiento básico de las partes principales y de las estructuras que la conforman (Sotomayor y Duicela, 1993).

2.1.1. Origen y datos históricos

El café se originó en Africa del este y más precisamente a altitudes mayores a los 1000 msnm en Etiopía y Sudán (Anthony *et al.*, 1999). Hace más de mil años que el café se usa como bebida en el mundo. Según Montealegre (1933) el escrito más antiguo que habla de su empleo en esta forma data del año 900 de la presente era. El café se introdujo al Continente Americano a principios del siglo XVIII proveniente de Yemen (Centro de Dispersión), pasando por Indonesia, Holanda y Francia. Su distribución abarca desde México hasta el Trópico de Capricornio en Brasil y Paraguay (Rivera *et al.*, 1989).

Según Carvalho (1946) todo el café sembrado en América proviene de una única planta de la variedad "Typica" sembrada en el Jardín Botánico de Amsterdam en 1706, la cual por sucesivas autofecundaciones dió origen a una población del "Typica" caracterizada por una gran uniformidad genética (Echeverry, 1988). Sin embargo, para Anthony *et al* (1999) todas las plantas de América provienen de aproximadamente 10 árboles de café (4 \ 5 Typica, 2 Bourbon y 2 híbridos de Timor). Ya sea que el café provenga de una o de diez plantas, estos autores están en discrepancia para afirmar que todo el café sembrado en América tiene un mismo origen y son genéticamente iguales.

El género *Coffea* reúne aproximadamente unas 60 especies originarias del trópico Africano e Indomalayo (Campos, 1989). La mayoría del café consumido en el mundo proviene de dos especies: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. El *Coffea arabica* cultivado especialmente en América Latina ($2n=44$) es autógama y por lo tanto se puede reproducir fielmente por semillas. Su mejoramiento hasta ahora ha llevado a

la creación varios cultivares (Caturra, Mundo Novo) que son relativamente homogéneos.

El café *canephora* ($2n=22$) cultivado en Africa es autoincompatible y su mejoramiento comprende dos orientaciones: vía generativa que conduce a poblaciones muy heterogéneas y vía vegetativa, que es la más utilizada (Berthouly y Etienne, 1999).

Desde hace varios años, tanto en Africa como en América, el mejoramiento de los cafetos ha estado orientado hacia la creación de híbridos interespecíficos para enfrentar los problemas que amenazan la caficultura. La tendencia actual en América es la creación de híbridos Intra e Interespecíficos, con exigencias agronómicas y ecológicas similares o mejores a las variedades comerciales actuales (Berthouly, 1989).

La creación de una variedad estable, para ser distribuída al productor necesita de 30 a 40 años. Frente a este plazo tan largo y debido a problemas fitosanitarios importantes (roya y nemátodos) existentes o potenciales, así como el deseo de ampliar la base genética del *C. arabica*, se hace necesaria la creación de tales híbridos cuyo aprovechamiento debe de ser rápido, a través de técnicas que permitan conservar la identidad genética (Berthouly, 1989). Los numerosos trabajos realizados en cultivo de tejidos en café desde 1970, demuestran que las especies cultivadas de *C. arabica* y *C. canephora* responden favorablemente a las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, muy poco se conoce acerca de los factores genéticos de estas especies. Podría decirse que la más estudiada es *Coffea canephora*, la cual, presenta mucha variabilidad entre árboles, en el tamaño de la semilla, en su productividad y en su vigor (Berthouly, 1989). Los programas realizados desde entonces en cultivo de tejidos, abren nuevas perspectivas a los investigadores utilizando la multiplicación asexual *in vitro* para multiplicar variedades heterocigotas mejoradas.

En cuanto a la variedad Caturra, fue encontrada en Minas Gerais, Brasil y es considerada como una mutación del café Bourbon. Comprende dos cultivares: Caturra rojo y Caturra amarillo. Los nombres rojo y amarillo se han dado con base en la coloración de los frutos. Las plantas de caturra son de porte bajo, de aspecto

vigoroso y compacto, de entrenudos cortos y con una coloración verde de sus brotes tiernos. La variedad caturra es considerada como de amplio rango de adaptabilidad, alta producción, buenas características agronómicas y organolépticas (Duicela y Sotomayor, 1993).

2.1.2. Botánica

El cafeto es una planta provista de un eje central, que presenta en su extremo una parte meristemática en crecimiento activo permanente que da lugar a la formación de nudos y entrenudos. Las ramas laterales o plagiotrópicas se alargan en forma permanente, lo que sumado al crecimiento vertical le da una forma piramidal a la planta. Las ramas primarias son aquellas que condicionan el crecimiento lateral de los cafetos, conociéndose también con el nombre de "bandolas". En tanto que, las ramas ortotrópicas permiten el crecimiento vertical de las plantas y sólo producen yemas vegetativas y nunca flores (Sotomayor y Duicela, 1993).

La fructificación de café de cada año, se va formando en nudos nuevos, en tejido vegetal de un año y por una sola vez. En otras palabras, el área productiva de las plantas o cosecha del año se forma en los nudos que se desarrollan el año precedente (Sotomayor y Duicela, 1993). La flor del cafeto es hermafrodita y en cuanto a la semilla, se caracteriza por tener un embrión bastante pequeño y de color blanquecino, localizado en la parte dorsal y basal de esta; este consiste en un cuerpo cilíndrico que tiene los cotiledones superpuestos que miden de dos a cinco milímetros. Durante la fase de germinación de la semilla, brota la radícula que se curva luego hacia la tierra o arena para producir raicillas laterales. El hipocotilo se desarrolla levantando los cotiledones que se encuentran envueltos en el pergamino. La película plateada y el resto del endospermo posteriormente se destruyen.

2.2. Tipos de Propagación del Café

2.2.1. Propagación sexual

En *C. arabica* (planta autógama), las variedades son propagadas por semillas después de haber realizado un proceso de selección genealógica. La semilla, que es el óvulo fecundado y maduro, está encerrada en una cubierta fina, de color amarillo pálido, el endocarpio, llamado comúnmente pergamino a causa de su textura esclerosa. En cuanto a su forma, es más o menos alargada, a veces ligeramente

acuminada. Cuando por cualquier razón, uno de los óvulos aborta, otro se desarrolla libremente, dando un grano ovoide. El color fluctúa de gris amarillento a gris azulado o gris verdoso según la variedad, región, modo de preparación y tiempo de conservación.

La semilla está constituida por un albúmen córneo, de superficie lisa, cuya cara plana está marcada en su gran eje por un profundo surco más o menos rectilíneo (Menas *et al.*, 1978). El embrión es corto y situado en la base del grano, comprende una raicilla cónica y dos pequeños cotiledones orbiculares.

2.2.2. Propagación asexual

La reproducción por vía sexual (generativa) no es el único modo de reproducción del cafeto. Se puede recurrir a los sistemas de reproducción asexual (vegetativa), usando con frecuencia el injerto y la estaca (Menas *et al.*, 1978).

El injerto fue utilizado fundamentalmente como medio de lucha contra los parásitos radiculares o para la multiplicación de híbridos resistentes a ciertas enfermedades criptogámicas (Menas *et al.*, 1978). En América Central (sobre todo, El Salvador y Guatemala) se utiliza el injerto de *C. arabica* sobre *C. canephora*, ya que este último tiene una alta tolerancia a los nemátodos.

La reproducción por estacas hortícola se utiliza con gran frecuencia para la multiplicación de *C. canephora* que es alógama. Actualmente este método de multiplicación permite la obtención de plantaciones clonales de los mejores individuos (Menas *et al.*, 1978).

2.2.2.1. Cultivo de Tejidos

Los primeros trabajos sobre la propagación vegetativa *in vitro* del café, se deben a Staritsky en 1970, quien dió la apertura de esa vía de multiplicación, por su descubrimiento de varios casos de embriogénesis somática, en fragmentos de entrenudos de tallos ortotrópicos jóvenes de diferentes especies (*C. canephora*, *C. arabica*, *C. liberica*) en el medio de Linsmaier y Skoog; y fué él quien observó los primeros embriones somáticos en *C. canephora*. Estos trabajos demostraron que esta especie se adapta a la técnica de cultivo de tejidos (Berthouly, 1989). Desde entonces varios autores (Sondahl, 1977; Dublin, 1980) han obtenido resultados tanto en *C. arabica* y *C. canephora* como en híbridos interespecíficos.

En 1971 Dublín, obtuvo brotes adventicios de segmentos de entrenudos de tallos ortotrópicos y plagiotrópicos jóvenes de *C. arabica* sembrando verticalmente en el medio de Murashige y Skoog (1967) complementado con AIA y Kinetina.

Hermann y Hass (1975), inducen por primera vez la formación de embriones somáticos a partir de secciones de hojas en *C. arabica*.

En 1977, Sondahl y Sharp reportan investigaciones sobre embriogénesis en *C. arabica* que a la fecha son las de mayor trascendencia. Usando secciones de diferentes órganos de plantas (hojas, tallos, pecíolos, frutos inmaduros, etc.) en el medio de Murashige y Skoog en el que adicionaron diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, ellos demostraron la gran capacidad de embriogénesis somática de las secciones de hojas. Descubrieron que los conglomerados de células que se producen después de la siembra de la sección de la hoja "callos" tienen la capacidad de producir una alta o baja frecuencia de embriones somáticos.

Dublín (1980), desarrolló la técnica de multiplicación vegetativa por microestacas de un híbrido producto del cruzamiento entre *C. arabica* y *C. canephora*, conocido con el nombre común de Arabusta. En 1981, logró la formación de yemas adventicias y embriones somáticos de entrenudos de tallos de Arabusta.

En ese mismo año, Lanaud, usando óvulos de *C. canephora* en investigaciones sobre ginogénesis, obtuvo varios embriones somáticos que probablemente se iniciaron de los tegumentos.

Berthouly (1985) utilizó la técnica del cultivo de microestacas en la multiplicación de híbridos F₁ producto de cruces intervarietales.

El cultivo *in vitro* ha permitido la aplicación de diferentes metodologías, para la micropropagación de genotipos de café, especialmente de aquellos que no pueden perpetuarse por semilla, como las variedades no fijadas que son los híbridos F₁ de *Coffea arabica* (Etienne *et al.*, 1997) y las descendencias de cruces interespecíficos de *C. arabica* y *C. canephora* (Dublin, 1984; Zok, 1986). Estas técnicas ofrecen a los fitomejoradores, la posibilidad de disminuir las restricciones de tiempo, que el hábito

perenne del café impone para el análisis y selección de nuevos cultivares (Sondhal y Sharp, 1977), y de aprovechar rápidamente de las calidades (heterosis) de un material híbrido o alógamo.

El cultivo *in vitro* es realizado partiendo de fragmentos del vegetal completo. Estos pedazos de tejidos son llamados comúnmente explantes, y la parte de la planta de la cual son obtenidos va a depender de la metodología utilizada y del volumen de plantas que se deseen producir.

Estas técnicas disponibles en el café son:

2.2.2.1.1. Microestacas

La propagación vegetativa *in vitro* mediante microestacas, consiste en obtener a partir de un nudo portador de yemas preexistentes una microplanta cuyos nudos pueden ser utilizados como microestacas *in vitro* y así sucesivamente para obtener un gran número de individuos. Dicha metodología incluye los siguientes pasos (Berthouly, 1989):

- Cultivo de segmentos de tallos ortotrópicos y obtención *in vitro* de nuevos tallos ortotrópicos.

- Multiplicación clonal *in vitro*.

- Enraizamiento y aclimatación (paso de condiciones *in vitro* a condiciones *in vivo*).

El explante con sus yemas axilares ortotrópicos preexistentes se toma de un tallo ortotrópico joven clorofílico. Generalmente se utilizan los tres primeros nudos (Berthouly, 1989).

La alta contaminación por bacterias y hongos es uno de los problemas más importantes, también la oxidación fenólica que se manifiesta mediante la aparición de un color café en el medio, en el cual se encuentran sembrados los explantes, es muy frecuente en este tipo de material. Estas dos etapas de la metodología son las más difíciles de superar (Berthouly, 1989).

Una vez establecido el cultivo se constituye un banco de germoplasma *in vitro* a partir del cual se puede iniciar la multiplicación masiva del material. Generalmente las microestacas que han alcanzado un desarrollo de aproximadamente 4 ó 6 pares de

hojas se separan del esqueje original y se dividen en micronudos o microestacas y se colocan en un nuevo medio de regeneración. Luego se producirán nuevos tallos que se dividirán en nuevas microestacas y así sucesivamente (Berthouly, 1989).

2.2.2.1.2. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática tuvo su origen en el concepto de totipotencia enunciado por Haberlandt en 1902. Totipotencia significa que todas las células vegetales tienen la misma capacidad de formar plantas completas, y se debe a la particularidad que tiene cualquier célula vegetal de perder su diferenciación (desdiferenciación). Los primeros resultados de esta teoría fueron obtenidos por Reinert en 1958 y Steward *et al.* en 1958. Estos investigadores lograron inducir la formación de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria.

A la fecha se han realizado miles de estudios con diferentes plantas confirmando los resultados anteriores y la posibilidad de aplicar esta técnica a cualquiera de las especies.

La embriogénesis somática es un proceso biológico en el cual a partir de células somáticas, se llega a la formación de embriones perfectamente organizados, con características morfológicas idénticas a las encontradas en los embriones sexuales (Michaux y Carron, 1989). Estos embriones se caracterizan porque no provienen de la fusión de gametos. Es un proceso semejante al de la embriogénesis cigótica, pero aquí solo una o un grupo de células somáticas de la planta son los precursores de los embriones (Ammirato, 1983). La embriogénesis somática es la técnica capaz de producir el mayor número de plantas a bajo costo y en un tiempo reducido, además permite el acceso a las técnicas modernas de ingeniería genética, constituye una alternativa prometedora para la propagación de cafetos híbridos F_1 y genotipos heterocigóticos y la difusión rápida de variedades mejoradas (Zamarripa, 1995).

A. Tipos de embriogénesis somática

Dependiendo de su origen, son posibles dos tipos de embriogénesis en café:

A.1. Embriogénesis Somática de Baja Frecuencia (LFSE) o embriogénesis somática directa

Esta forma de embriogénesis fué escrita por primera vez por Yasuda y luego Dublin. En este caso las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos sin que haya una etapa de callo. Este hecho se puede describir mejor, como una formación accidental del embrión, ya que evoca situaciones similares que ocurren en el cuerpo intacto de la planta *in situ*, como es el caso de la formación del embrión nucelar en los cítricos (Roca y Mroginski, 1993).

A.2. Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia (HFSE) o embriogénesis somática indirecta

Fue descrita por primera vez por Sondahl y luego Berthouly. Este tipo de embriogénesis produce un callo secundario, llamado callo embriogénico de alta frecuencia, porque permite obtener la producción de una alta cantidad de embriones somáticos. Además, este callo puede permitir el establecimiento de suspensiones celulares mantenidas a largo plazo y así, obtener una tasa de multiplicación muy alta y con una mano de obra muy limitada.

Cualquiera que sea la tecnología, el embrión somático al término de su diferenciación comprende una zona radicular con hipocotilo y una zona caulinar con dos hojas cotiledonales. Los embriones somáticos completamente diferenciados pueden pasarse a un medio de regeneración donde se desarrollan las raíces y los tallos, hasta la formación de plántulas de 4 o 5 pares de hojas aptas para ser transferidas a condiciones *in vivo* (Berthouly, 1989).

B. Etapas de la embriogénesis somática de alta frecuencia o indirecta

B.1. Inducción

Esta etapa representa la transición de células somáticas ($2n$ cromosomas) en células embriogénicas capaces de producir embriones somáticos. Es la fase más importante del proceso y a la vez la más difícil y menos conocida. La inducción incluye dos etapas, la primera de ellas, es la desdiferenciación de la célula somática o especializada en una célula no diferenciada de tipo meristemático. Entre más joven sea (estado juvenil poco diferenciado) el tejido utilizado, más fácil será desviarlo de su programa genético para así obtener la desdiferenciación hacia la formación de

embriogénesis somática.

Un elemento importante es que muchas veces dentro de una misma especie, las distintas variedades pueden tener diferentes reacciones. Así, un método establecido por un cultivar o variedad no podrá aplicarse a otro individuo de la misma especie.

Esto contribuye a que la inducción sea la etapa más difícil de resolver en el proceso porque no se conocen los factores genéticos o fisiológicos responsables de la competencia a la embriogénesis somática (estados embriogénicos) y es muy difícil encontrar condiciones de cultivo favorables a todos los genotipos.

De igual forma que el cigoto en su medio ambiente natural, la inducción de la célula somática totipotente exige de condiciones especiales creadas por un medio artificial y condiciones de cultivo:

- Aislamiento o liberación de las interacciones fisiológicas e inhibiciones existentes entre el tejido aislado y la planta de que proviene.
- Aporte de un conjunto de sustancias nutritivas y reguladoras de crecimiento (equivalentes al albúmen en el caso de la semilla).

La fase de inducción requiere de la presencia de reguladores del crecimiento exógenos y más especialmente de auxina o combinaciones auxina-citocinina.

Esta etapa se realiza en la oscuridad porque la luz es un factor de diferenciación que se opone a la formación de células juveniles.

Virtualmente, todos los tejidos vegetales tienen la capacidad de formar callos *in vitro*, sin embargo, pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes partes de plántulas como cotiledones, hipocotilos y embriones; y en forma adicional ápices caulinares, segmentos de tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras. Según Ammirato (1983), estos explantes se han usado con éxito para obtener callos embriogénicos en varias especies de la mayoría de familias de plantas.

Sin embargo, la respuesta embriogénica del callo depende también del genotipo de la planta (Roca y Mroginski., 1993), y por eso se presenta una de las mayores

dificultades para establecer un proceso de embriogénesis somática, aplicable a todos los genotipos y que sea reproducible.

B.2. Proliferación del callo embriogénico en suspensiones celulares

La presencia de una fase de proliferación en suspensión embriogénica (células libres y agregados celulares en un medio líquido en movimiento) aumenta fuertemente las potencialidades del proceso de embriogénesis somática (Etienne *et al.*, 1997). El callo se puede multiplicar a largo plazo, lo que permite aumentar la tasa de multiplicación del proceso. Además, la ruta de suspensión permite también homogeneizar el desarrollo del material vegetal y así obtener un crecimiento sincronizado de los embriones y plantas regeneradas. También la suspensión se puede conservar a largo plazo en nitrógeno líquido (-196 °C), esto evita los riesgos de pérdida del material por contaminación o degeneración de cepas de callo embriogénico en especies de donde este material es de difícil obtención (Engelmann y Dereuddre, 1988).

B.3. Expresión embriogénica y desarrollo de los embriones somáticos

Esta fase corresponde a la evolución de las masas proembriogénicas, células embriogénicas o células predeterminadas en embriones somáticos viables. Estos embriones se manifiestan inicialmente en estado globular, luego en estado corazón y finalmente en estado torpedo, como lo hacen los embriones cigóticos. En la mayoría de las plantas esta fase es estimulada por una disminución de la concentración de auxina en el medio. Halperin y Welherell (1965), caracterizaron el "choque auxínico" como el estímulo decisivo de la embriogénesis somática.

Bajo la presencia continua de la auxina, las masas proembriogénicas sintetizan todos los productos de los genes necesarios para completar el estado globular. Muchos cultivos de zanahoria son capaces de desarrollar embriones globulares pero sólo en presencia de auxina (Halperin y Wetherell, 1965); eso indica que la actividad de nuevos genes son necesarios para la transición al estado de corazón y que nuevos productos genéticos son sintetizados solamente cuando la auxina exógena es eliminada.

Durante el desarrollo de los embriones somáticos ("ontogénesis") el papel de la auxina continúa siendo muy importante. Se ha demostrado que los embriones son capaces de sintetizar su propia auxina (Michalczuk *et al.*, 1992). Además, muchos estudios muestran que el transporte polar de la auxina precede a la polarización de los embriones cigóticos (Fry y Wangermann, 1976), y la expresión anatómica de la embriogénesis somática (Chee y Cantliffe, 1989; Fujimura y Komamine, 1979).

B.4 Maduración

Esta etapa es un período de transición entre las fases de desarrollo y de germinación del embrión, para lo cual participan grupos de genes muy distintos. Durante esta fase, se da la acumulación de reservas de proteínas, glúcidos, lípidos y se realiza la desecación (Etienne *et al.*, 1993). Las relaciones hídricas entre el embrión y su ambiente *in vitro* o *in vivo* juegan un papel de regulador determinante a nivel del desarrollo del embrión, y en particular sobre su maduración (Adams y Rinne, 1980).

Debido a lo anterior esta fase es de suma importancia, sobre todo porque se ha presentado el problema de que los embriones somáticos no poseen muchas reservas y esto hace que al ser ocupados como semillas artificiales, den plantas que no puedan sobrevivir bajo condiciones de invernadero, o lo que es peor, que no lleguen ni siquiera a germinar. La producción de estas plantas es muy pobre y representa un problema para la utilización comercial de esta tecnología (Tautorus *et al.*, 1991).

Redenbaugh y Walker (1986), reconocieron las relaciones entre el grado de maduración de los embriones somáticos y el vigor de las plántulas resultantes. Las plántulas derivadas de embriones somáticos que poseen altos niveles de almacenamiento de proteínas son más vigorosas, y las proteínas almacenadas son un buen indicador de la calidad del embrión (Lai y Mckersie, 1993).

La calidad de los embriones somáticos, se refiere al hecho de que éstos tengan una gran semejanza con los embriones cigóticos maduros y que produzcan plantas que sean genotípicamente similares a la planta que les dió origen (Lelu *et al.*, 1994 y Carman, 1988, 1989). En muchos casos se ponen en condiciones de germinación embriones somáticos que no terminaron su desarrollo. Así, se van a observar

problemas para germinar, bajo vigor y anomalías morfológicas, que se enmarcan bajo el nombre de "germinación precoz" (Etienne *et al.*, 1997).

Un método para incrementar el vigor de las plantas que provienen de embriones somáticos es de proveerles un endospermo sintético, a manera de revestimiento de los embriones; esto ha sido investigado en zanahoria, cereales y alfalfa (Lai y Mckersie, 1993). Se cree, que uno de los factores que influyen en la falta de almacenamiento de sustancias de reserva en los embriones, se deba probablemente a la lixiviación de los nutrientes adicionados durante la etapa de la germinación o la pobre toma de nutrientes por el eje embrionario. Una alternativa para mejorar la deposición de las reservas almacenadas en el embrión, es a través de la manipulación del medio de cultivo (Lai y Mckersie, 1993).

El medio de cultivo suplementado con compuestos orgánicos de nitrógeno, tales como la arginina, urea, glutamina, aspargina y prolina, dan como resultado incrementos en el número y tamaño de los embriones producidos. Por otra parte, los niveles elevados de nutrientes obtenidos a través de diferentes factores como: volumen del medio, frecuente transferencia de los embriones a cultivos nuevos, etc., han incrementado el tamaño, el contenido total de proteínas de los embriones, y han mejorado la conversión de éstos a plantas de semillero con un mayor vigor, este tipo de estudios han sido investigados en alfalfa (Lai y Mckersie, 1993).

Factores como el ácido abscísico (ABA), la concentración de sacarosa, el tipo y concentración de carbohidratos y el nitrato de amonio, promueven la eficiencia de los pasos de maduración, y lo más importante, la calidad de los embriones somáticos (Lelu *et al.*, 1994).

C. Mecanismos fisiológicos de desarrollo y maduración de los embriones somáticos

Para explicar algunos mecanismos involucrados en el proceso de maduración de los embriones somáticos, se presenta a continuación, el papel de las diferentes moléculas fuertemente involucradas. Mucha de esta información ha sido obtenida sobre la maduración del embrión cigótico en la semilla, que representa el modelo de desarrollo del embrión somático.

C.1. Acido Abscísico (ABA)

A nivel de la planta el ácido abscísico es un importante inhibidor natural. Cuando los árboles son expuestos a estrés, ellos responden produciendo el ABA. El ABA es sintetizado a nivel de las raíces y transportado por la savia bruta hacia las hojas. Este compuesto promueve el cierre de los estomas, de esta manera induce un mecanismo de protección en caso de estrés hídrico; estimula la acumulación de prolina en tejidos y mantiene la estabilidad de la membrana cuando las células son expuestas a estrés. Los niveles endógenos de ABA pueden ser inferiores con aplicaciones de fluridona, un inhibidor de carotenoides y de la biosíntesis del ABA. El ABA es químicamente inestable cuando es expuesto en una solución a la luz. En algunos casos tiene un papel en la morfología de las plantas (Bonga y Von Adegas, 1992).

De acuerdo a estudios realizados, se ha encontrado que el ABA, juega un papel muy importante en lo que es la fase de maduración de los embriones somáticos (Carman 1988 y 1989; Lelu *et al.*, 1994), en donde los embriones entran en un período de quiescencia (Roberts *et al.*, 1990).

Otros efectos beneficiosos que da el ABA, son el hecho de incrementar las reservas de proteínas, triglicéridos y lípidos en el embrión (Lelu *et al.*, 1994), suprimir el desarrollo anormal (Attre *et al.*, 1991; Dunstan *et al.*, 1991; Etienne *et al.*, 1993), incrementar la habilidad de los embriones somáticos a tolerar la desecación, esto ha sido demostrado en zanahoria (Kitto y Janick, 1985) y soya (Obendorf y Slawinska, 1988), y en abeto ha sido utilizado para obtener embriones bipolares y de esa manera promover un desarrollo íntegro de los embriones somáticos (Roberts *et al.*, 1990).

Redenbaugh y Walker (1986) reconocieron una relación entre el grado de maduración de embriones somáticos y el vigor de las plántulas resultantes. Se encontró que plántulas derivadas de embriones somáticos que contenían altos niveles de proteínas almacenadas fueron mas vigorosas y por lo que se propuso que las proteínas almacenadas podrían ser usadas como un marcador de la calidad del embrión (Roberts *et al.*, 1990). Por lo tanto, la formación de embriones somáticos de alta calidad depende para diferentes especies de la presencia o ausencia de ABA en los tratamientos de maduración. Tratamientos sin ABA dan como resultado una germinación precoz, mientras que tratamientos con ABA, dan como resultado

embriones somáticos con una morfología similar a los embriones cigóticos y retrasan la germinación (Lelu *et al.*, 1994). La habilidad del ABA para inhibir la germinación precoz de embriones cigóticos esta bien documentada (Finkelstein y Crouch., 1983) y ha sido informada por las características de los embriones somáticos (Ammirato y Steward, 1971).

La mayoría de los estudios no aclaran los métodos que fueron usados y los resultados que fueron obtenidos. Por ejemplo, a través de solventes utilizados para disolver el ABA ha sido mostrado que estos tienen un efecto en la maduración de los embriones somáticos (Dunstan *et al.*, 1991), pocos autores han informado acerca de sus métodos de preparación del ABA. Se ha encontrado que este compuesto es esencial en embriones somáticos de alfalfa (*Medicago sativa*), estos embriones maduros en presencia de ABA pueden ser deshidratados al 10% de humedad, almacenados por varios meses y luego ser embebidos y germinados (Lecouteux *et al.*, 1993).

El vigor de las plántulas de semillero provenientes de estos embriones ha sido mucho menor que el de las plántulas provenientes de semillas verdaderas. El bajo vigor o la baja calidad de los embriones se debe aparentemente a dos aspectos del crecimiento de las plántulas: el bajo porcentaje del desarrollo y el desarrollo anormal después de la germinación. La disminución del vigor puede resultar de un bajo almacenamiento de proteínas y carbohidratos, disponibles para la germinación de las plántulas. Debido a que el ABA es conocido como un potente inhibidor de la germinación de la semillas (como ya se mencionó anteriormente), el bajo vigor puede resultar de altas aplicaciones de ABA o de la inadecuada inducción de tolerancia a la desecación (Lecouteux *et al.*, 1993).

C.2. Sacarosa

El éxito de la embriogénesis somática para muchos cultivos (Café, banano, etc.) depende de la fuente de carbohidratos, hasta que las plantas estén listas para la aclimatación. Las concentraciones de carbohidratos juegan un papel decisivo. Con frecuencia altas concentraciones son requeridas para la maduración normal de los embriones (Bonga y Von Aderkas, 1992); así por ejemplo, en embriones somáticos de alfalfa, las altas concentraciones de sacarosa en el medio, promueven el desarrollo y la

maduración, y son las responsables del mejoramiento de la calidad de los mismos, y esto puede deberse a que estas sustancias ejercen un efecto nutritivo y osmótico, además de que conducen a la tolerancia a heladas y a la desecación (Lecouteux *et al.*, 1993).

Las altas concentraciones de sacarosa pueden utilizarse para mantener los cultivos en una condición latente ("quiescencia") por largos períodos, ya que éstas presentan efectos inhibitorios pero no tóxicos sobre los tejidos (Schenk y Hildebrandt, 1972), a diferencia de los agentes osmóticos tales como el manitol, sorbitol, polietilén glicol (PEG), etc. Aparentemente la acción de las concentraciones altas de sacarosa se debe a un efecto osmótico, sin embargo, su ausencia también puede inhibir el crecimiento de plántulas o la germinación de los embriones somáticos (Jones, 1974), al mismo tiempo que mantiene la viabilidad de los tejidos (Guzman, 1989). Los tejidos cultivados *in vitro*, aún aquellos que presentan actividad fotosintética, no son autotróficos respecto al carbono, por lo que requieren de un aporte exógeno de este elemento (Thorpe, 1985). La sacarosa, principal azúcar transportado por el floema de las plantas, y las hexosas que la forman (glucosa y fructosa), constituyen las mejores fuentes de energía para los tejidos cultivados *in vitro* (Guzman, 1989).

En la mayoría de los tejidos, la sacarosa penetra a la célula como molécula intacta, donde es desdoblada por la acción de dos sistemas enzimáticos: invertasa soluble y, en menor grado, por la sacarosa fosfato sintetasa (Guzman, 1989). La glucosa entra al metabolismo como glucosa 6-fosfato, reacción catalizada por la hexoquinasa, la cual regula el flujo de glucosa hacia la glicólisis y a la vía de las pentosas fosfato (Thorpe, 1985).

Varios autores han atribuido la superioridad de la sacarosa como fuente nutricional, comparativamente con otros carbohidratos, a los resultados de Doudoroff *et al.* (1943), quienes demostraron la mayor facilidad de fosforilación de este azúcar, respecto a la glucosa, fructosa o una mezcla de ellas. El papel de la sacarosa no sólo es nutricional en el sentido de proveer energía y carbono para las vías metabólicas; sino también algunos autores sugieren un papel sobre la regulación del nivel hormonal (Butcher y Street, 1960).

Además, por constituir la mayoría de las sustancias osmóticamente activas del medio de cultivo, algunos de sus efectos sobre el crecimiento, se atribuyeron, desde los inicios del cultivo de tejidos, a los cambios que provoca en el potencial osmótico del medio (Gautheret, 1955).

Los niveles relativamente altos de sacarosa incrementan el número de embriones somáticos (Lu y Thorpe, 1987; Engelmann y Dereuddre, 1988). Sin embargo, en otros sistemas, el aumento de la concentración de sacarosa sobre los niveles normalmente utilizados, disminuye la eficiencia de la embriogénesis somática (Lazzeri *et al.*, 1987; Meijer y Brown (1987). Lu y Thorpe (1987) demostraron el efecto osmótico de las altas concentraciones de azúcar, no así Engelmann y Dereuddre (1988).

Ammirato y Stewart (1971) demostraron que las altas concentraciones de sacarosa (12%) afectan negativamente el crecimiento de los embriones, debido a la elevación de la presión osmótica del medio. Sin embargo, en varias especies, la sacarosa al 6% estimula el mejor desarrollo de los embriones (Lu *et al.*, 1983) y evita la germinación precoz (Vasil *et al.*, 1983).

A partir de estudios comparativos sobre la utilización de varias fuentes de carbono, se ha concluido que la sacarosa es superior para el crecimiento de embriones *in vitro* (Burghardtova y Tupy, 1980; Raghavan, 1980). Esta superioridad especialmente en embriones inmaduros, puede atribuirse a la aparición más temprana de las hidrolasas (UDP- y ADP- sintetasas) respecto a las sintetasas de la sacarosa (Duffus y Rosie, 1975). La concentración óptima de sacarosa a ser utilizada, es aquella que permite alcanzar un potencial osmótico del embrión *in vitro* similar al que lo rodea *in situ* (Wang *et al.*, 1987).

En proembriones y embriones jóvenes las concentraciones altas de sacarosa también inhiben la germinación precoz y deben reducirse progresivamente para permitir la continuación del crecimiento embrionario (Monnier, 1980). La inhibición de la germinación precoz se asocia al efecto provocado por la reducción del potencial osmótico (Finkelstein y Crouch, 1986).

En la prevención de la germinación precoz, la concentración efectiva del

osmorregulador aumenta con la edad del embrión y los embriones maduros no responden aún a altas concentraciones de producto (Guzman, 1989).

C.3. Aminoácidos como la glutamina

Debido a que los aminoácidos se presentan en fuertes concentraciones en el embrión cigótico y los tejidos de la semilla, durante el proceso de maduración *in vivo*, varios de ellos han sido provados para mejorar los medios de maduración.

La glutamina en las semillas parece desempeñar un papel regulatorio y nutritivo en lo que es la síntesis de las proteínas de almacenamiento. En los procesos de embriogénesis somática es usada para incrementar los niveles de aminoácidos libres y el porcentaje de proteínas. La suplementación con glutamina da un tamaño especial a los embriones cuando hay bajo volumen de medio y además, mejora su tamaño y su frecuencia de conversión (Lai y Mckersie, 1993).

La aplicación de glutamina en las primeras fases de maduración de los embriones, antes de la inducción de la tolerancia a la desecación, incrementa los niveles de proteínas y esto resulta en un incremento en el vigor de las plántulas resultantes (Lai y Mckersie, 1993; Leucouteux *et al.*, 1993). Este tipo de tratamientos casi siempre requiere de un largo proceso de maduración y que la germinación precoz sea inhibida por altas concentraciones de azúcar (Lecouteux *et al.*, 1993).

C.4. Tratamientos con luz

Michler y Lineberger (1987) encontraron que los tratamientos con luz promueven la maduración (formación de cotiledones) en zanahoria, entonces habría al menos un efecto indirecto de la luz que provoca la síntesis de ABA. Sin embargo, en muchas plantas la maduración se practica a la oscuridad porque se supone que durante esta fase el embrión cigótico casi no recibe luz en la semilla; no obstante muy pocos estudios fueron desarrollados sobre este parámetro .

C.5. Osmolaridad

El camino convencional para estresar las células vegetales que crecen bajo condiciones *in vitro* es incrementar la concentración osmótica en el medio de cultivo. Por ejemplo, el incremento en la concentración de sacarosa es un factor comúnmente

utilizado para promover la maduración de los embriones somáticos en muchas especies de plantas (Ammirato, 1983). Un pequeño incremento de sacarosa de 1 a 3% fue previamente considerado como óptimo para lograr la maduración de embriones somáticos de abetos (Von Arnol y Hakman, 1986), ya que altas concentraciones reprimen el desarrollo de los embriones (Attree *et al.*, 1991).

Los compuestos que causan el efecto osmótico, tales como la sacarosa, manitol o diversas sales, son absorbidas por el simplasto de las células vegetales. La absorción facilita el ajuste del tejido ante el potencial osmótico, sin disminuir el contenido de agua en el tejido, además, puede ocurrir un efecto metabólico directo o indirecto por la utilización del soluto o sus posibles efectos tóxicos. Una alternativa es usar compuestos de alto peso molecular como el polietilen glicol (PEG, peso molecular mayor a 1500). Este realiza un efecto de estrés no plasmótico a nivel celular. A causa de su gran tamaño molecular, no puede pasar a través de las paredes celulares y por lo tanto no logra un efecto plasmótico (Attree *et al.*, 1991).

Los tratamientos osmóticos de los embriones hacen que estos acumulen más reservas (por ejemplo proteínas y lípidos); es así como en experimentos realizados con alfalfa, los embriones somáticos incrementaron su peso seco. El estrés hídrico puede conducir al ajuste osmótico y mantenimiento del turgor por la acumulación de solutos tales como la sacarosa en la célula durante la maduración (Attree *et al.*, 1991).

Sin embargo, una elevada osmolaridad podría afectar la inducción y el crecimiento de los embriones así como la maduración de éstos. Por ejemplo, un potencial osmótico alto producido por adiciones de sacarosa o hexosas, como inositol, sorbitol o PEG, promueven la embriogénesis somática, previenen una germinación precoz (Taurus *et al.*, 1991), dando como resultado el desarrollo normal en embriones somáticos de zanahoria y de una leguminosa llamada *Sium suave* (Ammirato, 1983), pero no previene la formación de los embriones secundarios de sus ejes como lo hace el ABA. También un alto potencial osmótico, afecta los niveles endógenos de ABA, lo que limita la toma de agua, afecta la expresión de los genes y resulta en un desarrollo continuado del embrión e inhibición de la germinación precoz (Morris *et al.*, 1988; Skriver y Mundy 1990).

Una fase de maduración muy larga, puede llevarse a cabo a través del estrés osmótico, el cual puede obtenerse con 50 g/l de sacarosa y 7.3 g/l de glutamina en el medio de maduración, el potencial osmótico disminuye y la germinación precoz tarda. Por otra parte, el elevado nivel de nutrientes incrementa las proteínas almacenadas y la acumulación de carbohidratos (Leucouteux, *et al.*, 1993).

C.6. Desección

La desecación juega un papel muy importante en el cambio de la semilla desde un programa de desarrollo a uno que es necesario para promover la germinación y el crecimiento (Kermode, 1990) ya que los embriones cigóticos sufren desecación durante su desarrollo dentro de las semillas maduras. En el estado de quiescencia, los embriones cigóticos secos permanecen viables por muchos años (Senaratna *et al.*, 1990).

Casi siempre la adquisición de la tolerancia a la desecación en el desarrollo de las semillas, es todavía un proceso poco entendido y no ha sido estudiado plenamente.

Con angiospermas (e.g., *Medicago sativa*), tratamientos de embriones somáticos con ABA en el estado cotiledonal, produjeron quiescencia y simultáneamente indujeron la tolerancia a la desecación (Senaratna *et al.*, 1990). También, choques de calor, estrés al frío, estrés osmótico y la privación de nutrientes, pueden ser usados para inducir respuestas similares. Si la tolerancia a la desecación es inducida en embriones somáticos, entonces el potencial de usar embriones somáticos como semillas artificiales, en términos de lograr su almacenaje y manipulación, podría ser grandemente facilitado (Senaratna *et al.*, 1990). Al ser desarrollada la tolerancia a la desecación, ésta podría inducir una señal exógena en el tejido cultivado en el medio que incluye el ABA y numerosos tratamientos que inducen el estrés, como el potencial osmótico o las bajas temperaturas (una corta exposición de tres días a estrés por el frío dan solamente bajos porcentajes de sobrevivencia de embriones después de la desecación). Las respuestas a estas señales, es que los embriones podrían estar en la etapa apropiada de desarrollo, es decir, después del estado de torpedo y antes de la germinación precoz (Lecouteux *et al.*, 1993).

Puestas las condiciones favorables para la germinación de los embriones maduros, los embriones inmaduros pueden germinar tan pronto como adquieran la simetría bilateral. Los diversos factores que fomentan la continuidad de la embriogénesis, son físicos (pH, presión osmótica), nutricionales y hormonales, que simultáneamente inhiben la germinación precoz (Prevost y Page-Degivry, 1985).

C.7. Temperatura

En alfalfa se ha demostrado que un tratamiento corto de los embriones somáticos en condiciones frías después de su desarrollo y antes de su encapsulación, madura los embriones somáticos e incrementa el porcentaje de germinación (Redenbaugh y Walker, 1986).

El tratamiento con bajas temperaturas requiere de un tiempo considerable para despertar el efecto, quizás como un resultado del bajo metabolismo a 4°C (Lecouteux *et al.*, 1993). El tratamiento con frío es valioso, sobre todo para las especies provenientes de países templados.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del ensayo

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Turrialba, Costa Rica, durante el período de Agosto de 1997 a Noviembre de 1998.

3.2. Material Experimental

3.2.1 Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA ®)

Se utilizó un bioreactor simplificado RITA desarrollado por el CIRAD (Montpellier, Francia) que permite aprovechar la inmersión temporal como una técnica adaptada al cultivo de tejidos en medio líquido. El sistema de inmersión temporal RITA® (Recipiente de inmersión temporal automatizada) fue ampliamente descrito por Teisson *et al.*, (1995). Este bioreactor tiene dos compartimientos. El medio es puesto en el compartimiento inferior y una sobrepresión creada por una bomba de aire viene a sumergir el material vegetal en el compartimiento superior (Apéndice 1). Los cambios de medio se realizan con un simple reemplazo de recipiente sin manipular el material vegetal (Apéndice 2).

3.2.2 Material vegetal

Se utilizaron suspensiones celulares de un híbrido F₁ de *Coffea arabica*, Caturra 7x E 531 producido a partir de un cruce de una variedad muy cultivada en América Latina (Caturra) y un individuo espontáneo de Etiopía. Estos híbridos presentan las características de ser resistentes a enfermedades y tener una alta producción.

3.3. Medios de cultivo

Se utilizaron medios de cultivo establecidos a partir del medio básico de Murashige y Skoog (1962). Estos medios son presentados en el Apéndice 3. Todos los medios líquidos y sólidos fueron ajustados a un pH de 5.6, y luego se le añadió el agente solidificante (al medio gelificado). Posteriormente fueron autoclavados a una presión de 1.2 bares a 121°C, por un período de 20 minutos.

Los medios usados, fueron los siguientes:

IND= Medio de inducción de la embriogénesis somática.

EXP= Medio de expresión de la embriogénesis somática.

MUL= Medio de multiplicación del callo embriogénico.

REG= Medio de regeneración de los embriones somáticos.

DEV = Medio de desarrollo de los embriones somáticos.

MAT= Medio de maduración de los embriones somáticos.

GER= Medio de germinación de los embriones somáticos.

3.4. Condiciones físicas de crecimiento

Los materiales vegetales utilizados (suspensiones celulares y embriones somáticos inmaduros) se colocaron en cuartos de crecimiento por el período de tiempo establecido en cada uno de los protocolos, bajo un fotoperíodo de 12 horas, con intensidades lumínicas de 2000 lux, una temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $87\pm 3\%$.

3.5. Protocolos

3.5.1 Protocolo estándar

El protocolo estándar para el desarrollo y la germinación de los embriones somáticos de café, se da a continuación:

i/. Suspensión celular.

El mantenimiento de las suspensiones celulares ocurrió en el medio de proliferación MUL. Después de la fase de establecimiento, el cultivo se realizó en erlenmeyers de 250 ml a 100 r.p.m. y a 27°C . Se hizo sub-cultivos cada 6 semanas.

ii/. Regeneración en inmersión temporal

Los agregados embriogénicos procedentes de la suspensión celular así como 200 ml de medio de regeneración REG fueron puestos a la sexta semana del ciclo de multiplicación en el bioreactor RITA, para permitir el desarrollo de los embriones somáticos. El medio de expresión se reemplazó después de 12 semanas por el medio DEV utilizado para el desarrollo de los embriones somáticos. La frecuencia de inmersión utilizada durante estas primeras etapas fue de 2 veces al día durante un minuto. El desarrollo completo del estado "torpedo" fue obtenido después de 2 ciclos

de cultivo de 3 semanas. La germinación de los embriones fue obtenida con el medio de germinación GER. Esta se pudo realizar en un bioreactor a una frecuencia de inmersión de 4 veces por día durante 5 min en medio gelificado (Fig. 16).

iii/. Conversión de los embriones en plantas

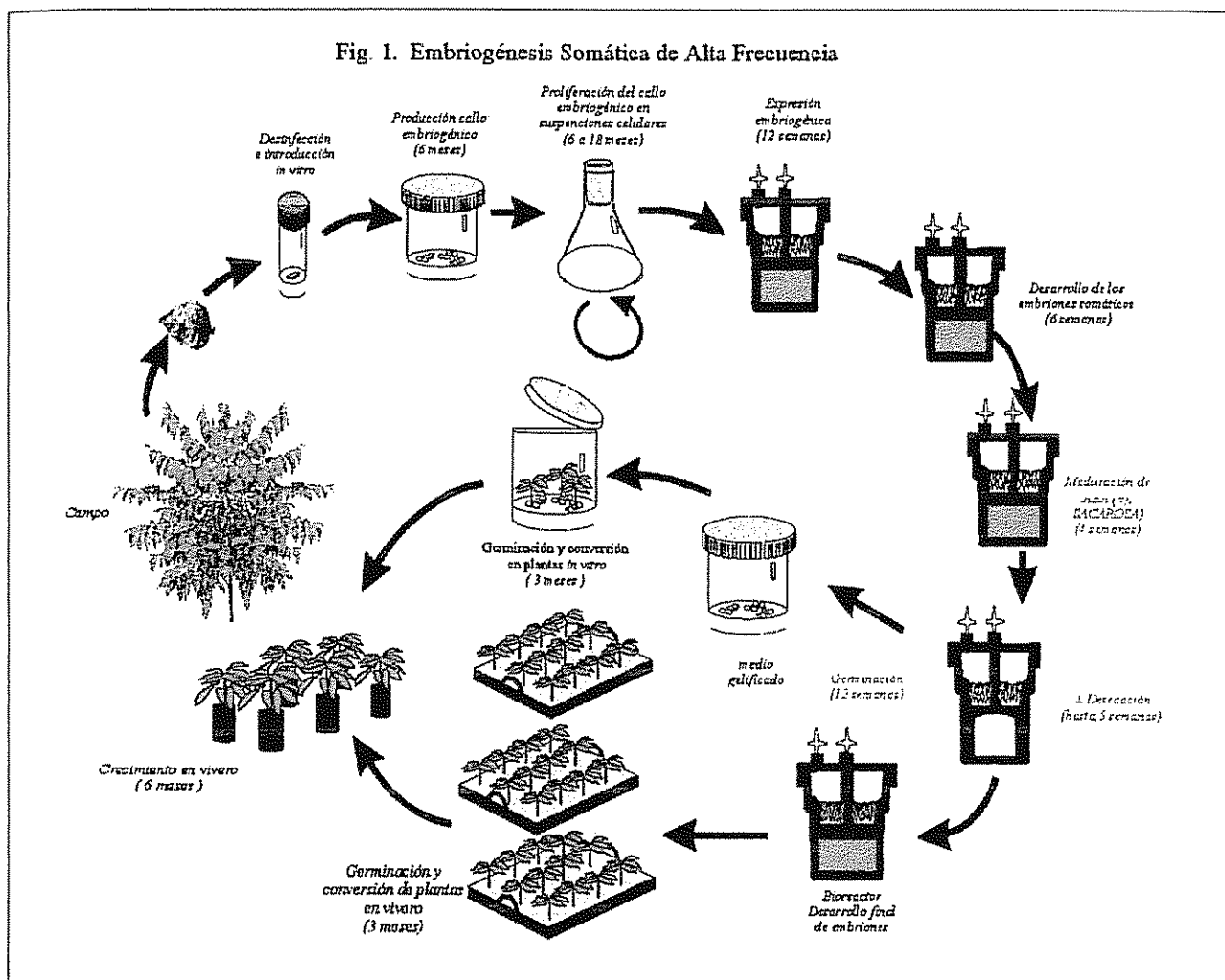
Se caracterizó por el desarrollo de una planta presentando al menos una par de hojas. Se pudo obtener de dos maneras diferentes, las cuales se presentan a continuación :

En medio gelificado: Esta etapa duró 12 semanas realizando una transferencia individual de todos los embriones a un medio nuevo después de seis semanas. Al final de esta etapa, las plantas más desarrolladas pueden ser aclimatadas en el invernadero.

En bioreactor con inmersión temporal y luego siembra directa: Después de 12 semanas de germinación en el bioreactor, los embriones somáticos en el "estado cotiledonar" fueron directamente sembrados de manera vertical en un sustrato hortícola en el invernadero (tierra 2/arena 1/broza 1). Este sustrato fue previamente esterilizado por tratamiento químico (basamid). La conversión de los embriones en plantas fue obtenida después de un mes.

3.5.2. Experimentaciones

El método de embriogénesis somática que se utilizó es presentado en la Figura 1. Además, este esquema muestra los diferentes experimentos realizados en el trabajo.



3.5.2.1 Efecto de algunos parámetros físicos sobre la regeneración de embriones somáticos.

i) Densidad de cultivo en el bioreactor durante las fases tardías de la embriogénesis somática

Durante la fase de germinación (12 semanas) realizada en bioreactor se compararon las densidades de, 500 y 1500 embriones/bioreactor. Al final de esta fase, los embriones fueron comparados en su morfología, capacidad germinativa y habilidad de regenerar plantas.

ii) Efecto del sistema de cultivo utilizado (medio gelificado/ bioreactor) sobre la germinación

El sistema convencional (medio gelificado) donde se realizó la germinación y la conversión de plantas *in vitro* se comparó con un nuevo proceso donde los embriones germinan en el bioreactor (12 semanas) y luego se siembran directamente en un suelo hortícola. Los embriones germinados en los dos sistemas de cultivo fueron comparados para su morfología, su capacidad germinativa y su habilidad de regenerar plantas.

iii) Efecto del soporte de cultivo sobre la regeneración de embriones somáticos

Con el fin de determinar la eficiencia en la producción de embriones, se compararon tres tipos de soporte de cultivo (tela de Nylon, poliuretano con densidad de 24 y poliuretano con malla abierta) utilizados en el bioreactor RITA. La eficacia de cada soporte fue evaluada después de 3 meses de regeneración, a través del número de embriones producidos, su calidad y el contenido de agua del material vegetal. Además se hicieron comparaciones histológicas y de microscopía electrónica.

Para las tres experimentaciones, se utilizó 4 RITA's por tratamiento los cuales se consideraron como repeticiones.

3.5.2.2. Ensayos para introducir una fase de maduración

Antes de la fase de germinación se introdujo una etapa donde se aplicó diferentes condiciones para estimular el proceso de maduración en los embriones somáticos desarrollados. La duración de este proceso fue de cuatro semanas. Estos ensayos se realizaron en bioreactores RITA en los cuales se colocaron aproximadamente 1500 embriones somáticos en estado de torpedo al inicio del tratamiento.

Se utilizó dos densidades, 500 y 1500 embriones/ bioreactor.

Para el de baja densidad (500 embriones /bioreactor), se aplicó después del tratamiento de maduración un período de desecación con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento de maduración en la tolerancia a la desecación. Esta desecación lenta se realizó durante 15 días mediante la desconexión del bioreactor RITA de la bomba

de aire. El medio fue eliminado de la parte inferior del bioreactor lo que permitió lograr una desecación (1% PF /día).

Cada repetición estuvo compuesta de 3 ó 4 bioreactores por tratamiento.

3.5.2.2.1 Ensayos de maduración en presencia de altas concentraciones de sacarosa

Se evaluó la eficacia de distintas concentraciones de sacarosa (40, 60, 80 ,100 , 120 y 140 g/l), utilizando el medio DEV y con un pH de 5.6.

3.5.2.2.2. Ensayos de maduración en presencia de ácido abscísico (ABA)

Se evaluó las eficacia de diferentes concentraciones de ABA (0, 1×10^{-7} ; $5 \cdot 10^{-7}$; 1×10^{-6} ; 5×10^{-6} ; 1×10^{-5} M), utilizando el medio DEV y con un pH de 5.6.

Al final de cada tratamiento de maduración y desecación se comparó el aspecto histológico de los embriones. Además se evaluó la morfología de los embriones obtenidos al final de la fase de germinación, su capacidad germinativa, su sobrevivencia al tratamiento de desecación, su tendencia a producir embriones adventicios y su aptitud para regenerar plantas.

3.5.2.3. Ensayo para provocar un estado de quiescencia en los embriones somáticos

Al final de la fase de desarrollo se trató de provocar la quiescencia (detener el desarrollo) de los embriones somáticos utilizando el bioreactor RITA. Este experimento consistió en utilizar períodos de 0 (muestra testigo), 2, 4 y 8 semanas sin inmersión, para lo cual se conservó el medio de cultivo en la parte inferior del RITA, pero sin aplicar la sobrepresión. La humedad relativa obtenida de esta manera fue casi saturante. Después de este período sin absorción de los nutrientes, se agregó el medio de germinación. La densidad de cultivo fue de 1500 embriones/bioreactor.

El efecto de los diferentes períodos sin inmersión fue evaluado a través del análisis histológico de los embriones, de la capacidad germinativa en el bioreactor, la medición del vigor de los embriones germinados y de su capacidad para regenerar plantas en medio gelificado.

3.6. Análisis histológicos

El procesamiento histológico se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología de La Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

Se tomaron muestras de embriones somáticos después de las fases de maduración y desecación durante 2 semanas, así como también muestras de embriones para cada uno de los períodos sin inmersión en el ensayo de quiescencia. Estos embriones fueron fijados en FAA o glutaraldehído por un período de 24 horas. Luego se colocaron en una cámara de vacío por aproximadamente 15 minutos, con la finalidad de extraer el aire de los tejidos. Los embriones se deshidrataron en una serie ascendente de etanol (50-70-80-90-95-100-100) a razón de una hora en cada alcohol. Posteriormente se infiltraron en historresina a 4°C durante 12 horas y luego se prepararon los bloques para realizar los cortes en micrótono de resina, en secciones de 3 μm de grosor. Los cortes fueron colocados sobre portaobjetos a las cuales previamente se les había colocado unas gotas de agua destilada. Después fueron puestos en una plancha eléctrica a 65°C para que el material se estirara y fijara a la lámina. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina y reactivo de Shiff con la finalidad de resaltar las reservas de las células.

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió principalmente en un análisis de comparación de medias por la prueba de Tukey y por el criterio Lsmeans (Least Squares means) en el caso de la existencia de interacciones entre los factores. Se utilizó el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis System) para analizar los datos. Las variables analizadas durante los ensayos, fueron las siguientes :

- **Morfología de los embriones somáticos al final de la germinación**
-**Medición del PF de 10 embriones (10 lotes de 10 embriones)**

Esta variable se evaluó al final de 12 semanas de germinación en medio líquido o gelificado, y consistió en determinar el peso fresco de 10 embriones germinados, utilizando una balanza semí analítica, el peso fue expresado en gramos.

-Medición de la longitud del eje de los embriones

La longitud del eje de los embriones fue medida solamente para el ensayo de maduración con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA), con la finalidad de verificar el tamaño de los embriones producidos. Consistió en la medición del eje embrionario de cada embrión germinado, haciendo uso de una regla graduada en milímetros. Se realizaron 390 medidas.

• Capacidad germinativa

_Tasa de germinación

Se consideró como embriones germinados, todos aquellos que fueron capaces de producir cotiledones al final de 12 semanas en medio de germinación (líquido o gelificado). Esta variable se evaluó como el porcentaje de embriones germinados con respecto a los embriones totales (embriones germinados, no germinados y muertos).

Tasa de germinación= (embriones germinados x 100)/ embriones totales.

-Tasa de mortalidad

Esta variable fue considerada como el porcentaje de embriones muertos con respecto al número de embriones totales (embriones germinados, no germinados y muertos).

Tasa de mortalidad=(embriones muertos x 100)/embriones totales.

-Aptitud a la producción de embriones adventicios

Esta aptitud fue evaluada en función de todos aquellos embriones de color blanco, no desarrollados completamente, que surgieron después de aplicar el tratamiento de maduración correspondiente.

Se evaluó según el número de embriones adventicios producidos/bioreactor, es decir /1500 embriones desarrollados

-Número de embriones totales

Los embriones muertos, germinados y no germinados producidos en cada uno de los bioreactores (RITA's) y frascos (en el caso de medio gelificado), fueron contados. Los embriones adventicios no se incluyeron por haberse producido después de aplicarse los tratamientos.

-Número de embriones no germinados

Se consideró como embriones no germinados aquellos que no lograron producir cotiledones, y que permanecieron en un estado de torpedo.

-Conversión en plantas en medio gelificado

Esta variable se determinó al final de la fase de germinación en medio gelificado y en un caso particular se determinó a nivel de invernadero para el ensayo de maduración con ABA. Se calculó al hacer la relación entre el número de plantas con hojas verdaderas con respecto al número total de embriones al inicio del ensayo.

-Crecimiento

Al final de doce semanas en medio de germinación, se evaluó la cantidad de plantitas que produjeron de 1 a 6 pares de hojas. Esta variable sólo se evaluó para el sistema de cultivo en medio gelificado. Posteriormente se determinó el promedio de hojas producidas en cada frasco a través de la fórmula :

$$N^{\circ}php = ((1ph \times n_1) + (2ph \times n_2) + (3ph \times n_3) + \dots + (6ph \times n_6)) / (n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_6)$$

Donde :

$N^{\circ}php$ = número promedio de pares de hojas.

ph = pares de hojas verdaderas.

$n_1, n_2, n_3, \dots, n_6$ = cantidad de embriones correspondientes a 1, 2, 3, ..., 6 pares de hojas verdaderas respectivamente.

• Contenido de Agua

Esta variable permitió determinar el estado hídrico de los embriones, y fue calculada mediante la siguiente fórmula :

$$\text{Contenido de agua} = \frac{(\text{Peso fresco emb} - \text{Peso seco emb})}{\text{Peso fresco emb}} \times 100$$

Modelo estadístico

El modelo estadístico para los ensayos en los cuales se utilizó el diseño factorial fue :

$$Y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + E_{ijkl} + ab_{ij} + ac_{ik} + bc_{jk} + abc_{ijk} + \beta_{ijklm}$$

El modelo estadístico para los ensayos en los cuales se utilizó el diseño completamente al azar fue :

$$Y_{ij} = \mu + a_i + E_{ij}$$

Donde :

Y_{ijkl} = k-ésimo valor observado en nivel i del factor A y del nivel j del factor B.

Y_i = variable aleatoria de respuesta.

μ = media general.

a_i = efecto del nivel i del factor A (o i-ésimo tratamiento).

b_j = efecto del nivel j del factor B.

E_{ijk} = error experimental.

E_{ij} = error experimental.

ab_{ij} = efecto de la interacción entre los tratamientos A_i y B_j .

ac_{ik} = efecto de la interacción entre los tratamientos A_i y C_k .

bc_{jk} = efecto de la interacción entre B_j y C_k .

abc_{ijk} = efecto de la interacción entre A_i , B_j y C_k .

β_{ijklm} = efecto del submuestreo.

4. RESULTADOS

4.1 Producción masiva de embriones somáticos en bioreactor

La investigación sobre la producción de embriones somáticos de café utilizando medios líquidos es de suma importancia, sobre todo si se pretende desarrollar el proceso industrialmente. Por el momento no existe un protocolo de embriogénesis somática en café a nivel comercial ; se sabe que para lograr esto es necesario realizar todo el proceso en medio líquido para reducir los costos de producción.

Hasta el momento sólo se ha utilizado el medio líquido para la proliferación de los tejidos embriogénicos y la producción de embriones en estado torpedo, lo que representa las etapas iniciales del desarrollo. El objetivo de la presente investigación, fue por lo tanto, incorporar todas las fases de la embriogénesis somática (iniciales y tardías) en medio líquido, para lograr una producción masiva de embriones e investigar cuales son las fases fuertes y débiles de todo el proceso (Fig. 16).

En base a lo anterior, fue necesario hacer una miniproducción de embriones somáticos, para luego analizar su desempeño (Cuadro 1).

En el estudio fue posible la producción de casi 200,000 embriones aclimatables , de los cuales aproximadamente el 60% fueron capaces de regenerar plantas, una vez trasladados a tierra. Los resultados fueron similares a los encontrados paralelamente por el equipo de Barry-Etienne, *et al.*, 1999. La producción de embriones en el estudio a partir de suspensiones celulares necesitó 39 semanas, la utilización de 123 bioreactores (RITA's) , 88 horas de mano de obra y 43 litros de medio.

Como se observa en el cuadro 1 la fase de germinación es la más crítica, bastante lenta y ocupa un mayor número de bioreactores (ya que se debe de bajar la densidad de cultivo). Esta fase necesitó aproximadamente el 60% de la mano de obra total del proceso de regeneración. También se puede decir que la fase de desarrollo de los embriones, requiere de mucho tiempo (18 semanas), sin embargo, esta etapa puede optimizarse.

Cuadro 1 : Análisis de la producción de 200,000 embriones somáticos de café, utilizando el sistema de inmersión temporal automatizado con respecto al proceso completo de regeneración.

Parámetros de cultivo	Etapas de la producción de embriones somáticos en bioreactores					
	Expresión embriogénica	Desarrollo de los embriones	Maduración	Quiescencia	Germinación	Total
Duración (semanas)	12	6	4	5	12	39
Nº RITA's	12	24	24	48	123	123
Medio (l)	3	5	5	5	25	43
Nºemb/RITA	(200 mg de suspensión celular)	4000	2000	2000	1500/2000	1,500/2000
Mano de obra (horas)	7	16	8	1	56	88
Intervención necesaria (en la cámara de transferencia)	Inoculación de la suspensión en el bioreactor	Selección de las partes embriogénicas, división del material y cambio de medio	Cambio de medio	Desconexión del bioreactor	Cambio de medio	-

4.2 Efecto de algunos factores físicos sobre la regeneración de embriones somáticos.

Se ha tratado de investigar a través de diferentes ensayos , cual puede ser la influencia de algunos factores físicos (densidad, sistema de cultivo utilizado y tipo de soporte en bioreactor), en el éxito de la regeneración de embriones somáticos de café

4.2.1. Densidad de cultivo y germinación

La densidad de cultivo es un factor muy importante para la producción de embriones. Esta importancia es tanto en medio gelificado como para las primeras etapas de la regeneración, en los diferentes sistemas de cultivo en medio líquido. Debido a esto fue necesario, medir el efecto de la densidad de cultivo sobre el comportamiento de los embriones durante la fase de germinación. Lo anterior nunca

ha sido reportado en la literatura. El sistema de RITA nos ofrece la oportunidad de estudiar el efecto de la densidad de cultivo en medio líquido.

Los resultados presentados en el cuadro 2, muestran que la densidad no afectó el peso fresco (PF) de los embriones cultivados en el bioreactor. No obstante, se pudo observar que los embriones que se cultivaron a una densidad promedio de 500 embriones/bioreactor, tendieron a germinar en un período de tiempo menor. Esto se debe a que alcanzaron más rápidamente el vigor necesario que les permitió producir cotiledones y por lo tanto, germinar. Es decir, si el vigor final fue el mismo, la densidad de cultivo afectó la rapidez en el desarrollo.

Cuadro 2. Influencia de la densidad de cultivo sobre la morfología (tamaño y peso fresco(PF)), la mortalidad, la germinación, la conversión en planta y el crecimiento de embriones somáticos de café. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento, cada réplica consistió de 500 - 1500 embriones por bioreactor o 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).

Densidad Nºemb/bior	Morfología		Comportamiento de los Embriones somáticos después de 12 semanas en germinación.			
	Longitud eje (mm)	PF (g)	Mortalidad (%)	Germinación (%)	Conv.planta (%)	Crecimiento (Nºnph)
500	4,7 ±2,1 ^a	0,140 ± 0,06 ^a	29,7±19,2 ^a	51,1±12,4 ^a	31,4 ±23,6 ^a	2,3 ± 0,5 ^a
1500	7,0 ± 2,4 ^b	0,160 ± 0,07 ^a	32,9±22,0 ^a	43,5±32,5 ^a	26,4 ±11,7 ^a	2,1 ± 0,5 ^a

En lo que respecta al tamaño de los embriones (longitud del eje), pudo observarse que la densidad de cultivo tuvo un impacto significativo y es a altas densidades donde se obtuvo los mayores tamaños (Cuadro 2). Las bajas densidades produjeron embriones cortos con cotiledones bien desarrollados, mientras que a alta densidad se produce el efecto contrario debido a que la competencia física es mayor y se opone al desarrollo de los embriones. Los porcentajes de germinación y mortalidad fueron semejantes en los dos tipos de densidades evaluadas.

Al realizar los ensayos de conversión de los embriones en planta utilizando medio gelificado (Ver Capítulo 3), se observó que no hay efecto de la densidad de cultivo

utilizada para la germinación en bioreactor. La conversión en planta y el crecimiento de las vitroplantas no son afectadas por la densidad.

4.2.2. Sistema de cultivo : bioreactor vrs medio gelificado

Casi la totalidad de los trabajos desarrollados sobre las etapas tardías de la embriogénesis somática en cultivo *in vitro*, han sido realizados en medios gelificados. Sin embargo, ante la necesidad de reducir los costos de producción y obtener un mayor número de embriones somáticos, se llevó a cabo una comparación entre ambos sistemas de cultivo (Cuadro 3), con la finalidad de determinar su influencia en la germinación de los embriones.

Cuadro 3 : Influencia del sistema de cultivo la morfología (tamaño y peso fresco(PF)), la mortalidad y la germinación de los embriones somáticos de café. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento, cada réplica consistió de 500 -1500 embriones por bioreactor o 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).

Sistema de cultivo	Morfología de los embriones después de 12 semanas de germinación.				Comportamiento de los embriones somáticos	
	PF embrión (g)	PF eje (g)	PF cotiledón (g)	Tamaño eje (mm)	Mortalidad (%)	Germinación (%)
Medio gelificado	0,79±0,26 ^a	0,21 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,07 ^a	6,8 ± 2,2 ^a	10,2 ± 5,4 ^a	75,4 ± 10,4 ^a
Bioreactor	0,16±0,07 ^b	0,13 ± 0,03 ^b	0,04 ± 0,02 ^b	10,3 ± 2,1 ^b	10,3 ± 9,9 ^a	73,1 ± 19,5 ^a

El método de cultivo utilizado durante la germinación afecta mucho la morfología de los embriones durante esta fase de cultivo, sin que ese efecto se pueda observar sobre el comportamiento de los embriones al realizar pruebas de germinación y mortalidad *in vitro* (Cuadro 3).

Se observó que el medio gelificado permite la producción de embriones con un mayor peso fresco, pero a la vez provocó la mayor heterogeneidad en el material. Esta asincronía en el desarrollo, apareció muy rápido en el medio gelificado después de haber utilizado material bastante homogéneo, producido en el bioreactor. Se

observaron embriones con un marcado incremento en el tamaño de los cotiledones, muchos de los cuales presentaron características morfológicas anormales, tales como la presencia de hasta cuatro cotiledones en un mismo embrión, fusión de los ejes y presencia de cotiledones deformados.

En el cuadro 3 se observa claramente que la utilización del medio gelificado durante la fase de germinación, provoca un gran efecto en el PF de las embriones somáticos, en donde una gran parte del peso se concentra en el cotiledón (46%), a diferencia de lo ocurrido en el bioreactor, en donde el 75% del peso total se distribuye a lo largo del eje embrionario. A pesar de que el medio gelificado produce embriones con mayor vigor (PF), estos embriones son más cortos, lo que se explica al observar un limitado alargamiento del eje radical. Mientras que con la utilización del bioreactor se obtuvo embriones de mayor tamaño (10,3 mm), además, la producción fue mucho más homogénea (Figura 17). El embrión germinado en el medio gelificado es muy comparable a nivel morfológico al embrión obtenido a baja densidad en bioreactor (Cuadro 2).

Independientemente del sistema se observó, que a nivel de germinación y conversión en planta se presentaron comportamientos similares. Sin embargo, las cantidades producidas fueron considerablemente diferentes, variando desde miles de embriones por bioreactor, hasta una decena por frasco con medio gelificado. Tomando como base la cantidad de medio de cultivo necesaria, la comparación también es favorable al bioreactor: 2000 embriones/200 ml medio por bioreactor y 120 embriones/200 ml medio gelificado. Haciendo la conversión a un litro de medio, se estaría obteniendo 10000 embriones/l medio líquido en 5 bioreactores y solamente 600 embriones/l de medio gelificado en 60 frascos.

4.2.3. Tipo de soporte utilizado (RITA®) y producción de embriones somáticos

El soporte de cultivo utilizado en bioreactor con inmersión temporal tiene un impacto mayor sobre el éxito de la regeneración de los embriones somáticos a partir de suspensiones celulares (Cuadro 4). Sólo la espuma poliuretano con malla abierta permite un mejor drenaje, es conveniente para la expresión de la embriogénesis somática y también para el desarrollo de los embriones. Esta espuma posibilita el

proceso de regeneración de embriones muy eficiente tanto sobre el número de embriones producidos como sobre su calidad (Fig. 18C y 18D).

Una espuma normal con más densidad (N° hilo poliuretano/ $m^3=24$) permite la regeneración de los embriones somáticos pero se acompaña de un problema fuerte de vitrificación (Fig. 18A y 18B).

La tela de nylon permite la expresión embriogénica, es decir, la formación de proembriones, pero éstos no logran desarrollarse, solamente se multiplican bajo la forma de paquetes de proembriones (Fig. 18E y 18F). Esta tela al referirse al contenido de agua parece filtrar demasiado. Esta baja disponibilidad de agua posibilita los primeros eventos de la regeneración, pero no el desarrollo de los embriones. La utilización de espuma de poliuretano provoca contenidos de agua muy altos en el embrión (similares en los tejidos vegetales). La estructura misma de la espuma influye sobre el fenómeno de vitrificación. El uso de una espuma de malla abierta permite la eliminación de la película de agua que se observa sobre la superficie de una espuma normal. Sin embargo, el síntoma de vitrificación no se traduce en un contenido de agua más alto, sino más bien este debe provocarse por la acumulación de esta agua dentro de los tejidos de la célula, lo que afecta su fisiología.

Cuadro 4 Incidencia del soporte de cultivo utilizado en el bioreactor de inmersión temporal (RITA®) sobre algunos parámetros de cultivo tales como: morfogénesis, contenido de agua y número de embriones producidos. Las observaciones fueron realizadas después de 3 meses de regeneración.

Características del material embriogénico (después de 3 meses de regeneración)	Tela de Nylon	Espuma poliuretano (densidad 24)	Espuma poliuretano a malla abierta (Bulprene 45)
Morfogénesis	Proliferación de agregados de proembriones sin desarrollo	Desarrollo de embriones y callo, pero vitrificados o muertos	Desarrollo normal de embriones somáticos.
Contenido de agua (%)	77±5,3	87±1,5	90±0,6
Nº de embriones producidos/200mg de suspensión celular	10	400 ±100	2760±240

4.3 Ensayos de maduración con sacarosa

El aporte en el medio de cultivo de fuentes de azúcares en altas concentraciones, puede provocar un proceso de maduración en los embriones somáticos, con acumulación de reservas de almidón, lípidos y proteínas. En base a lo anterior y observando que la sacarosa ha sido uno de los azúcares más utilizados, por muchos investigadores en una diversidad de cultivos, se tuvo como objetivo investigar el efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa durante la maduración de embriones somáticos de café, con la finalidad de introducir esta fase de maduración en el protocolo original de la embriogénesis somática referente a esta especie. Las concentraciones de sacarosa utilizadas en el estudio, fueron de 40, 60, 80, 100, 120 y 140 g/l.

4.3.1. Efectos sobre la producción de embriones somáticos

Embriones somáticos de diferentes estados de desarrollo fueron subcultivados en un medio de maduración líquido con diferentes concentraciones de sacarosa, por un período de 4 semanas, estos embriones se caracterizaron por ser de color blanco en un inicio.

Al final de la fase de maduración, se observó la presencia de pequeños grupos de embriones blancos en estado globular y de diferente tamaño, así como también, embriones amarillos en estado torpedo, sobre todo en la presencia de bajas concentraciones de sacarosa (40 y 60 g/l). Mientras que a altas concentraciones se presentó una gran cantidad de embriones no desarrollados, muy pequeños y de tonalidad amarillenta.

Luego de haber transcurrido la fase de maduración, los embriones fueron transferidos a un medio de germinación. Al final de esta fase, se observó que la mayor producción de embriones somáticos se obtuvo cuando estos fueron tratados con la concentración de sacarosa más baja (40 g/l) en la fase previa de maduración (Fig. 2). La aparición y el desarrollo de los embriones durante la fase de germinación no fue sincrónica, con frecuencia se pudo observar en un mismo recipiente todas las etapas de desarrollo del embrión, este hecho fue debido a la aparición de embriones adventicios, los cuales se originaron a partir de los embriones presentes.

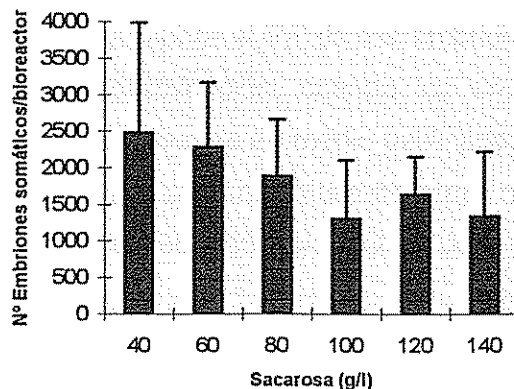


Fig.2 Ensayo de maduración con diferentes concentraciones de sacarosa. Efecto sobre la producción de nuevos embriones somáticos en bioreactor. Las diferentes concentraciones se mantuvieron cuatro semanas, los conteos fueron realizados después de 12 semanas en medio de germinación. Las barras muestran el error estándar de las medias. Cada valor representa un promedio de por lo menos 5 bioreactores por tratamiento, cada réplica tuvo 1500 embriones. No se encontraron diferencias según la prueba F, $P > 0.2954$ a un nivel de significancia del 0.05.

El estudio histológico de los embriones somáticos obtenidos al final de esta fase de maduración, indican la acumulación de gránulos de almidón dentro de las células (Fig. 19A). Se observó que el contenido de almidón fue independiente del tamaño del embrión. Los embriones se caracterizaron por presentar una región radical bien definida, distinguida por la formación de tejido vascular. Las células en general presentaron núcleos grandes, a veces conteniendo hasta 3 nucleólos. Las más cercanas a la epidermis y a la región cotiledonar se caracterizaron por poseer un contenido celular más denso, en dichas células, la mayoría de los núcleos estuvieron ubicados en regiones cercanas a la pared celular. Se observó una gran división celular.

Para todas las concentraciones evaluadas de sacarosa, la producción de embriones adventicios se mantuvo constante. Estadísticamente, se verificó, que no hay efecto de la sacarosa (al incrementar su concentración) sobre la estimulación de la producción de embriones adventicios.

4.3.2. Efecto sobre la morfología de los embriones somáticos

Las variaciones en el contenido de sacarosa en el medio de maduración, no ejercen un efecto significativo sobre el PF de los embriones medido después de 12 semanas en el medio de germinación, cuando los embriones son cultivados en bioreactor, pero sí cuando el cultivo es en medio gelificado. Es en este último sistema en donde se presentan las mayores fluctuaciones del PF. Concentraciones superiores a 80g/l de sacarosa reducen mucho el PF de los embriones.

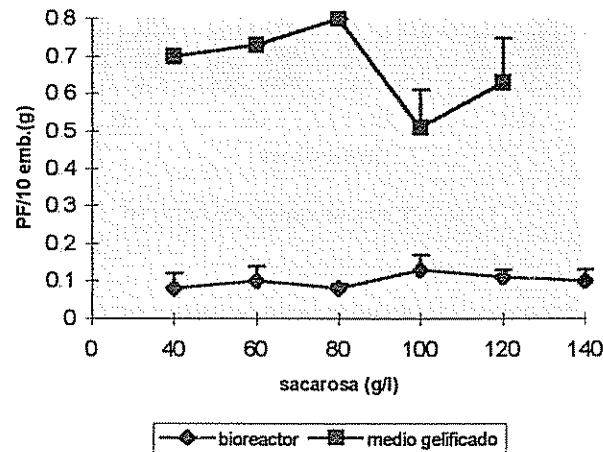


Fig.3 Ensayo de maduración con diferentes concentraciones de sacarosa : Efecto sobre el PF medido después de 12 semanas en medio de germinación. Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica tuvo 5 bioreactores con 500 embriones cada uno o 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. No existen diferencias significativas según la prueba F, $Pr < 0.2145$ a un nivel de significancia de 0.05.

4.3.3. Efecto sobre la germinación

La mejor germinación en bioreactor fue obtenida después de un cultivo en presencia de 40 g/l de sacarosa, es decir, la concentración más baja utilizada (Fig. 4). El aumento de la concentración de sacarosa durante cuatro semanas de maduración influyó negativamente en el índice de germinación (de 50% hasta 15% ,para 40 y 140 g/l de sacarosa respectivamente), acompañándose de un aumento en la tasa de mortalidad , con valores hasta del 90% (casi llegando a la muerte total de los embriones) a partir de concentraciones iguales o superiores a 100g/l de sacarosa (Fig. 20A, 20B, 20C y 20D).

La frecuencia de embriones no germinados se mantuvo sin sufrir muchas variaciones en todo el rango de concentraciones.

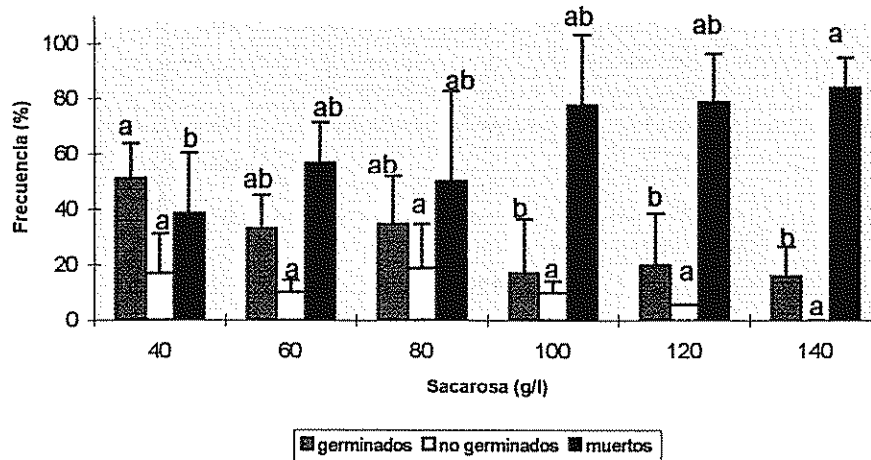


Fig 4 Ensayos de maduración de embriones con diferentes concentraciones de sacarosa : efecto sobre la germinación en bioreactor. Las diferentes concentraciones de sacarosa se mantuvieron un mes. Las frecuencias de germinación y mortalidad fueron observadas después de un mes de germinación. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica tuvo 5 bioreactores con 500 embriones cada uno. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).

4.3.4. Efectos sobre la conversión en planta

La aptitud de regeneración de plantas en medio gelificado se vió directamente influenciada por la concentración de sacarosa en el medio de maduración (Fig. 5). Presentándose la mayor conversión cuando los embriones fueron madurados en un medio conteniendo 40 g/l de sacarosa. El aumento del contenido de sacarosa en el medio de maduración provocó una disminución proporcional de la eficacia de conversión en planta.

La concentración de sacarosa tuvo una influencia comparable sobre la conversión de los embriones en plantas con las dos densidades de cultivo utilizadas. Sin embargo, el efecto negativo del aumento de sacarosa fue más marcado a baja densidad que a alta densidad, donde apareció solamente a partir de 100 g/l de sacarosa.

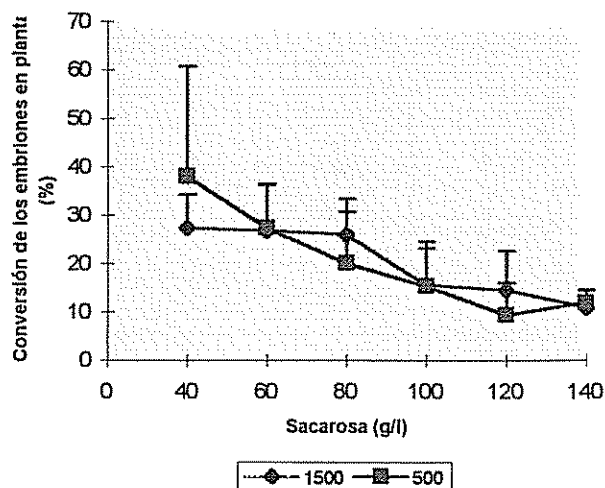


Fig 5. Ensayo de maduración de embriones con diferentes concentraciones de sacarosa : efecto sobre la conversión de los embriones somáticos en plantas proveniente de bioreactores inoculados a alta (1500) y baja (500) densidad de cultivo. Las concentraciones de sacarosa fueron mantenidas por 4 semanas. La frecuencia de conversión en planta fue observada después de 12 semanas de germinación en medio gelificado. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica conteniendo por lo menos 20 frascos con 10 embriones cada uno. No existen diferencias significativas entre la interacción densidad*concentración por la prueba Lsmeans (Least Squares Means) ($p < 0.05$).

El crecimiento de las plantas no fue afectado drásticamente por la variación de la concentración de sacarosa en el medio de maduración (Fig. 6). Se pudo observar que los embriones provenientes de una alta densidad de cultivo en el bioreactor , no presentaron diferencias significativas estadísticamente a nivel del crecimiento de las plantas, sino, una tendencia a un crecimiento más bajo para concentraciones superiores o iguales a 100g/l.

Las plantas obtenidas con embriones que maduraron a baja densidad presentaron un desarrollo más heterogéneo (ver barras de desviación estándar), y para las fuertes concentraciones de sacarosa (mayores de 100 g/l) se observó una estimulación del desarrollo.

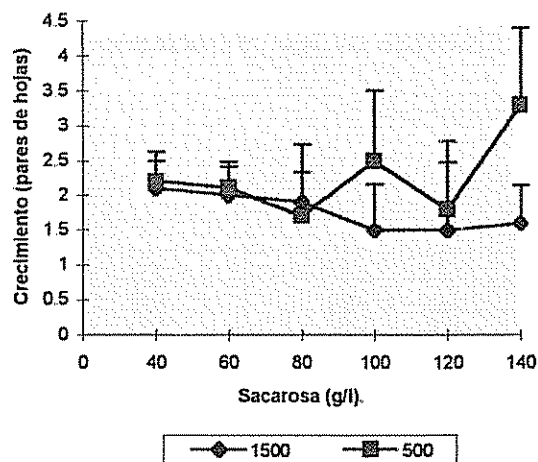


Fig 6. Ensayo de maduración de embriones con diferentes concentraciones de sacarosa : efecto sobre el crecimiento de las plántulas en medio gelificado, proveniente de bioreactores inoculados a alta (1500) y baja (500) densidad de cultivo. Las concentraciones de sacarosa fueron mantenidas por 4 semanas. El crecimiento fue observado después de 12 semanas de germinación en medio gelificado. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cinco réplicas por cada tratamiento, cada réplica conteniendo por lo menos 5 frascos con 10 embriones cada uno. No existen diferencias significativas por la prueba LS means (Least Squares Means) ($p < 0.05$).

4.4 Ensayos de maduración con ácido abscísico (ABA)

La maduración necesaria después del desarrollo de los embriones somáticos puede ser estimulada por diferentes sustancias. Diferentes investigadores han encontrado que una de estas sustancias es el ácido abscísico (ABA), caracterizado por ser un fuerte promotor del desarrollo de embriones y más particularmente por participar en la acumulación de proteínas de reserva. De acuerdo a lo anterior, se tuvo como objetivo investigar el efecto del ABA en el comportamiento de los embriones somáticos de café. Para realizar el estudio, se evaluó diversas concentraciones mantenidas 4 semanas en el medio de maduración: muestra testigo (0M), 1×10^{-7} , 5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 5×10^{-6} y 1×10^{-5} M.

4.4.1. Efectos sobre la producción de embriones somáticos

Una alta producción de embriones fue inducida por la adición de ácido abscísico (ABA) al medio de maduración en el bioreactor (Fig. 7). A partir de bioreactores inoculados con aproximadamente 1500 embriones desarrollados se obtuvieron cantidades hasta de 7,000 embriones/bioreactor al final de la fase de germinación. El número de embriones adventicios fue estimulado por este regulador del crecimiento

(ABA) . Sin embargo, esta estimulación no es continua, sino que se mantiene constante en la fase de germinación, así se observa una producción normal de los embriones adventicios.

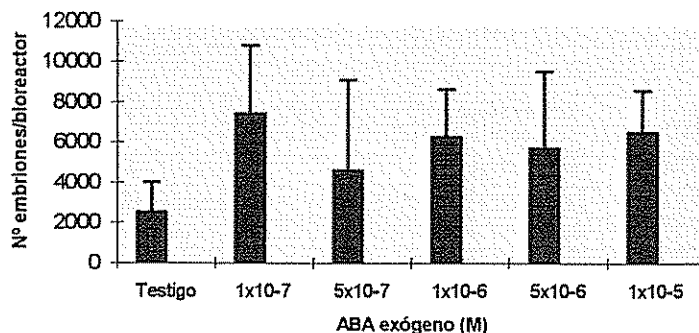


Fig. 7 Ensayo de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA. Efecto la producción de nuevos embriones somáticos en el bioreactor, mantenidos por cuatro semanas, los conteos fueron realizados después de 12 semanas en medio de germinación. Las barras muestran el error estándar de las medias. Cada valor representa un promedio de por lo menos 4 réplicas por tratamiento, cada réplica tuvo 1500 embriones al principio del tratamiento. No existen diferencias según la prueba F, $P > 0.1999$ a un nivel de significancia del 0.05.

La concentración de ABA que estimuló la mayor producción de embriones somáticos fue la de 1×10^{-7} M y esta misma concentración se caracterizó por presentar también la mayor cantidad de embriones adventicios (Fig. 7), lo que fue corroborado por estudios histológicos (Fig. 19C).

Resultados indican entonces que la maduración con ABA parece ser más efectiva en la producción de embriones.

4.4.2. Efecto sobre la morfología de los embriones somáticos

En el bioreactor no se observó el efecto del ABA sobre el vigor de los embriones en el transcurso de su germinación (Fig. 8). El bioreactor posibilita la producción de un material miniaturizado y mucho más homogéneo, esta homogeneidad puede observarse en la baja amplitud de desviaciones; mientras que en medio gelificado se presentan embriones con mucho más desarrollo pero heterogéneos, llegando a obtenerse pesos hasta de 0,88 g/10 embriones somáticos, cuatro veces más altos que los obtenidos en bioreactor. Sin embargo, en medio gelificado, se observa un

efecto mayor del ABA sobre el aumento del PF de los embriones para la mayoría de las concentraciones utilizadas.

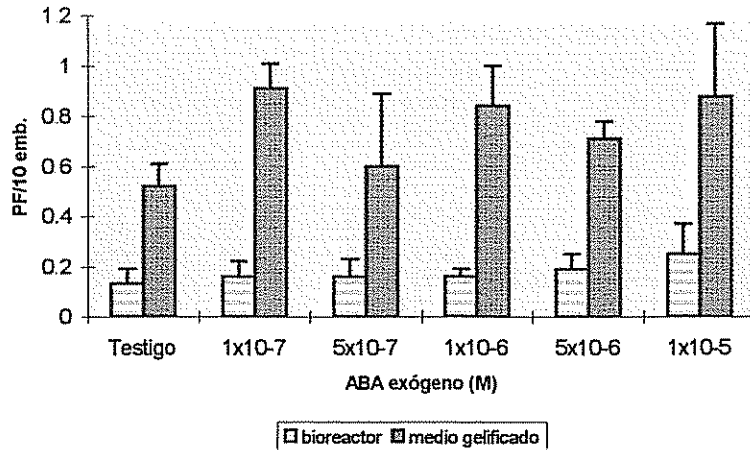


Fig. 8 Ensayo de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA : Efecto sobre el PF medido después de 12 semanas en medio de germinación. Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por cada tratamiento, cada réplica consistió de un bioreactor con 500 embriones y 5 frascos con 10 embriones cada uno en el caso del medio gelificado. No existen diferencias según la prueba F, $P > 0.3257$ a un nivel de significancia del 0.05.

4.4.3. Efecto sobre la germinación

En presencia de ABA, se observó un leve aumento de la germinación (10%) y a la vez una disminución más marcada de la mortalidad de los embriones, después de un período de desecación, mostrando la estimulación de la tolerancia a la desecación por el ABA. Sin embargo, no se observó una concentración óptima de ABA para el proceso de germinación, la frecuencia de germinación no varía cualquiera que sea la concentración de ABA utilizada.

Para comprender porqué la frecuencia de los embriones no germinados no varía, es necesario tomar en cuenta la disposición de los embriones dentro del bioreactor. Durante todo el ensayo pudo notarse que eran los embriones no germinados los que se mantuvieron en contacto con el soporte del recipiente, es decir, siempre estuvieron abajo de los embriones que lograron germinar, esto hizo que su número se mantuviera constante, independientemente de la concentración de ABA empleada, y que estas cantidades, por lo tanto, dependieran del área superficial del

bioreactor. Este es un ejemplo en donde un parámetro de cultivo físico, se opone o baja la eficacia de una estimulación del desarrollo de los embriones por un factor químico.

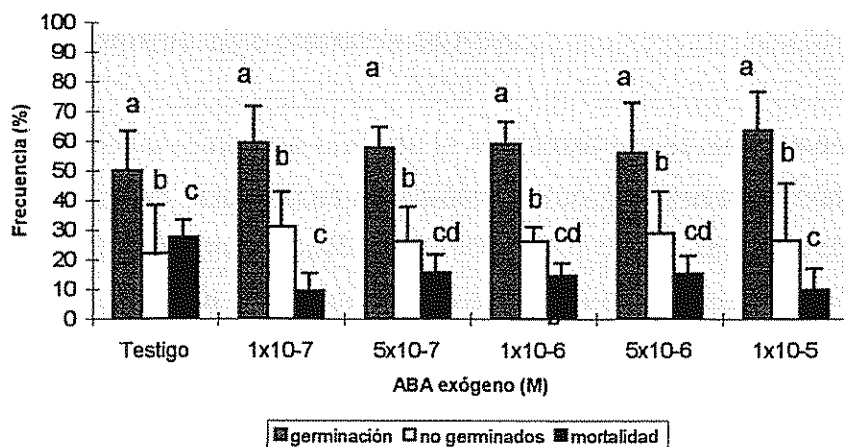


Fig. 9 Ensayos de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA : efecto sobre la germinación en bioreactor. Las diferentes concentraciones de ABA se mantuvieron por un mes. Las frecuencias de germinación y mortalidad fueron observadas después de 15 días de desecación y 12 semanas de germinación. Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento. Cada réplica consistió de un bioreactor con 500 embriones cada uno. Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$)

Los resultados indican que ABA ejerce un efecto protector contra el estrés hídrico sobre los embriones, disminuyendo la mortalidad después de un período de desecación fuerte (disminución del 15% del contenido de agua, después de 15 días).

Desde el punto de vista morfológico, los embriones germinados en presencia de ABA se caracterizaron por ser más homogéneos, presentando un alargamiento del eje y cotiledones bien formados y verdes (Fig. 20E y 20F), además, algunos de ellos poseían raíces blancas de aproximadamente 2 cm. Las fotos 23E y 23F muestran un corte transversal de un embrión expuesto al ABA, observándose que la mayoría de las células presentan un contenido citoplasmático mayor, es decir, la presencia de gran cantidad de sustancias de reservas, las cuales no se pueden observar en células provenientes de una maduración sin ABA (Fig. 20A y 20B).

El estudio histológico también reveló que el ABA no modifica el contenido de reservas de almidón, los embriones de todos los tratamientos presentaron una

cantidad alta de granos de almidón. Además, fue muy notoria la presencia de proteínas a nivel citoplasmático y nuclear, se observó también la presencia de lípidos.

Los embriones pequeños poseen poco contenido citoplasmático, mientras que los embriones grandes presentan un mayor contenido de almidón, demostrando que este tipo de reserva se acumuló al final del período de desarrollo, pero independientemente de la presencia de ABA.

No se observó daño a nivel de la epidermis en los embriones madurados con ABA. Las células epidérmicas se caracterizaron por presentar núcleos en posición central y con un contenido mayor de almidón. Por otra parte, la mayoría de las células centrales del embrión contienen grandes vacuolas y núcleos desplazados hacia la pared. El efecto del ABA a nivel histológico es claramente demostrado, ya que al analizar la muestra testigo, se encontró en la periferia del embrión una capa de células dañadas, sin contenido de almidón. De la misma forma, se nota la presencia de pequeñas áreas de paredes dañadas, y no se aprecia ningún tipo de precipitados a nivel del citoplasma en los embriones que no estuvieron expuestos al ABA. En algunas regiones de estos embriones las células son colapsadas y vacías.

4.4.4. Efectos sobre la conversión en planta

El efecto de una maduración con ABA sobre la capacidad de los embriones a regenerar plantas, fue estudiado mediante pruebas a nivel *in vitro* y a través de pruebas más drásticas, que consistieron en una siembra directa en el suelo de los embriones producidos en el bioreactor.

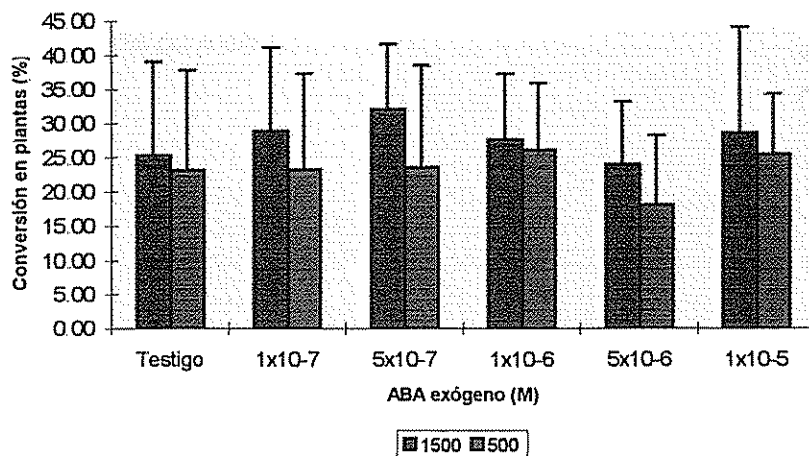


Fig. 10 Ensayos de maduración de los embriones con diferentes concentraciones de ABA : efecto sobre la conversión de los embriones somáticos en plantas. Los embriones provienen de bioreactores inoculados a alta (1500) y baja (500) densidad de cultivo. Las concentraciones de ABA fueron mantenidas por un mes sobre embriones al estado torpedo. La frecuencia de conversión en planta fue observada después de 12 semanas de germinación en medio gelificado. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de cuatro réplicas por tratamiento, cada réplica conteniendo por lo menos 5 frascos con 10 embriones cada uno. Distintas letras representan diferencias significativas por Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$)

De todas las concentraciones de ABA analizadas, se observó que el número promedio de pares de hojas fue similar en embriones provenientes de alta y baja densidad de cultivo (durante la fase de desecación en bioreactor).

Este comportamiento concuerda con el observado en el porcentaje de conversión de los embriones en plantas (fig 10). No fue posible observar el efecto del ABA con una prueba de conversión en planta sobre un medio gelificado bajo condiciones *in vitro*. Para las dos densidades de cultivo, la eficiencia de regeneración de las plantas no fue estimulada por el tratamiento de maduración con ABA utilizado, además, no se observaron diferencias a nivel del crecimiento de las plantas (resultados no presentados).

Sin embargo, con una prueba de conversión en planta realizada directamente en el suelo y en el vivero, se observó una estimulación significativa del ABA sobre la producción de plantas (Fig.11). Este resultado confirma que las condiciones de germinación *in vitro* representan un ambiente muy favorable (control, temperatura, humedad, nutrientes, etc.), que no permitieron poner en evidencia todos los cambios

fisiológicos en los embriones somáticos establecidos por tratamientos de maduración, tales como el aporte de ABA.

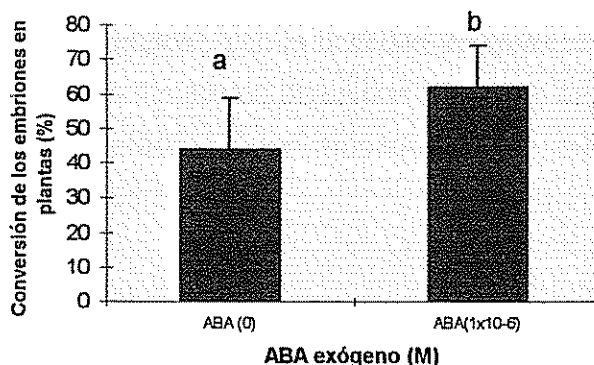


Fig 11 Ensayos de maduración de los embriones con ABA ($1 \times 10^{-6} M$) y sin ABA (testigo): efecto sobre la conversión de los embriones somáticos en plantas en el suelo. Los embriones provienen de bioreactores inoculados a alta densidad (1500) de cultivo. La maduración con ABA fue mantenida por un mes sobre embriones al estado torpedo. La frecuencia de conversión en planta fue observada después de dos meses de la siembra en vivero, la cual fue realizada después de 12 semanas de germinación en bioreactor. Las barras representan el error estándar de las medias. Cada valor es un promedio de 15 bandejas por tratamiento, cada bandeja conteniendo por lo menos 200 embriones cada una. Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).

4.5 Ensayos de Quiescencia

Para llevar a cabo este ensayo, los embriones somáticos fueron sometidos a un período sin alimentación, mediante la supresión de la inmersión temporal en los bioreactores para obtener un estado de baja actividad metabólica. Lo anterior se realizó simplemente mediante la desconexión de los bioreactores de la bomba de aire. Este proceso se llevó a cabo durante un período de tiempo comprendido entre 0 y 8 semanas.

Los efectos de un tiempo sin inmersión fueron evaluados a las 2, 4 y 8 semanas respectivamente, llevando como parámetro de comparación una muestra testigo, la cual no fue suspendida en ningún momento de la inmersión temporal. Posteriormente, el material fue directamente colocado en un medio de germinación durante 3 meses para determinar el efecto del estado quiescente en el comportamiento de los embriones durante las etapas de germinación y conversión en planta.

4.5.1. Evaluación del contenido de humedad a diferentes tiempos sin inmersión

Embriones somáticos fueron privados de la inmersión con el medio nutritivo a diferentes intervalos de tiempos, con la finalidad de crear un estado de quiescencia en ellos. De acuerdo a los resultados obtenidos (Fig. 12), el tiempo sin inmersión no logró la desecación esperada en los embriones, sino más bien, favoreció una tendencia hacia la hidratación.

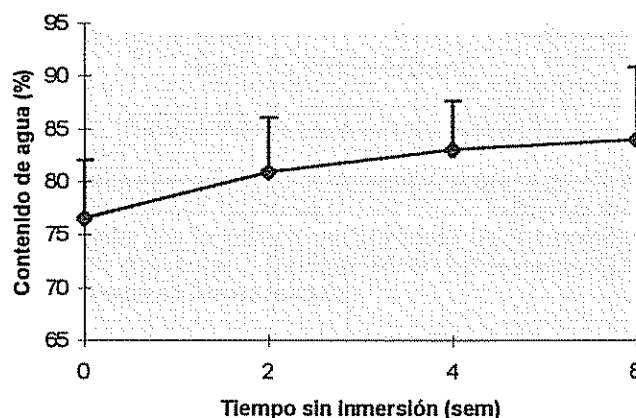


Fig 12 Efecto de la ausencia de inmersión en el bioreactor sobre el contenido de agua (%) en los embriones, evaluado a diferentes tiempos (semanas). Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor representa por lo menos un promedio de 3 bioreactores por tratamiento. No existen diferencias la prueba F, $P > 0.0839$ a un nivel de significancia del 0.05.

4.5.2. Efecto sobre la germinación en bioreactor

Al final del período de germinación en bioreactor, se observó la respuesta de los embriones en cada uno de los tratamientos, en base a los porcentajes de germinación, mortalidad y de embriones no germinados. Los resultados indicaron (Fig. 13) que la mayor producción de embriones germinados se obtuvo cuando éstos permanecieron sin inmersión durante 2 semanas, debido a lo anterior, dicho tratamiento se caracterizó por tener índices de mortalidad bajos. Con 4 semanas sin inmersión, se mantuvo una estimulación de la germinación pero a un nivel inferior a las 2 semanas sin inmersión. Se encontraron cantidades equivalentes de embriones germinados y no germinados, manteniéndose siempre una proporción baja de mortalidad. Después de 8 semanas se incrementó el porcentaje de mortalidad y el índice de germinación disminuyó en aproximadamente un 20% con referencia al de 2 semanas.

Haciendo referencia a la muestra testigo, se pudo observar que esta presentó la mayor cantidad de embriones no germinados y las tasas de germinación obtenidas estuvieron entre un 30%.

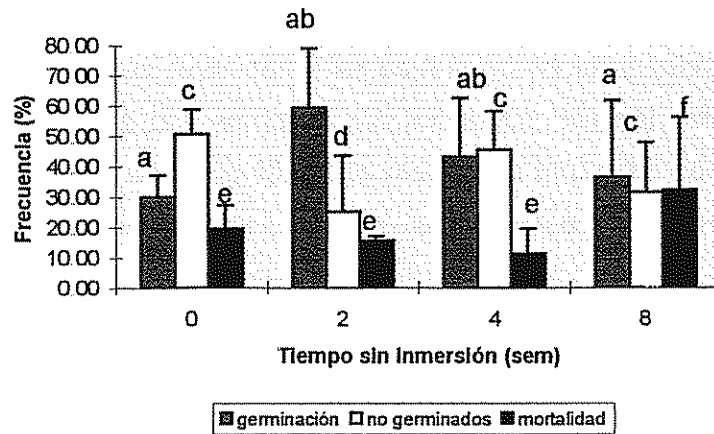


Fig 13. Efecto de la ausencia de inmersión en el bioreactor, sobre la germinación (%) de los embriones, evaluado a diferentes tiempos (semanas) Las barras indican el error estándar de las medias. Cada valor representa por lo menos un promedio de 3 bioreactores por tratamiento, cada bioreactor tuvo 1500 embriones. Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$)

4.4.3. Producción de embriones adventicios

La falta de inmersión de los embriones en el medio de cultivo perjudica la formación de embriones adventicios, existiendo una disminución de aproximadamente 40% con respecto al total de embriones que siempre estuvieron sometidos a inmersiones diarias (Fig. 14).

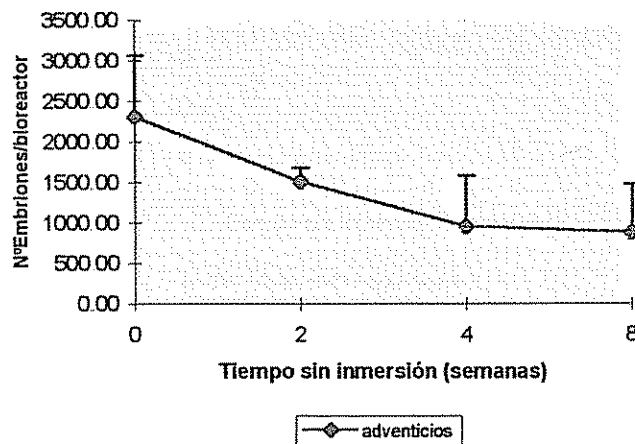


Fig.14. Efecto del tiempo sin inmersión en el bioreactor después de la fase de desarrollo, en la producción de embriones adventicios. Con tres réplicas o bioreactores por semana, cada una conteniendo hasta 1500 embriones somáticos/bioreactor

4.5.4. Efectos sobre el PF y la conversión en planta en medio gelificado

Para analizar el efecto de la ausencia de inmersión sobre la capacidad de los embriones de convertirse en plantas, se utilizó medio gelificado. Los diferentes tiempos sin inmersión, ejercen un efecto sobre la conversión de los embriones en plantas, una vez que estos son puestos a germinar un medio gelificado (Fig.15). Se pudo apreciar que dos semanas sin inmersión, también es el mejor tiempo que favorece la conversión (Fig.15). Los resultados muestran además, que después de este tiempo, disminuye drásticamente la capacidad de los embriones de regenerar plantas.

Estos resultados indican además que no necesariamente los embriones con más vigor son capaces de convertirse en plantas. Los datos muestran una reducción muy importante del PF de los embriones germinados que fueron sometidos a largos períodos sin inmersión con referencia a la muestra que no fue sometida a dicho proceso (Fig.15).

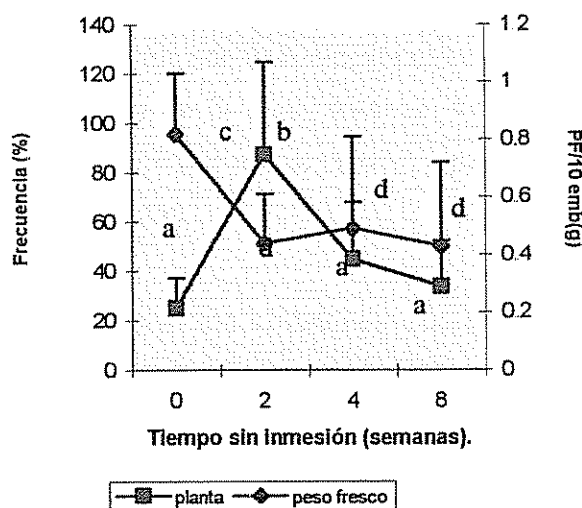


Fig 15 Efecto de la ausencia de inmersión en el bioreactor sobre el PF (g) y conversión en plantas (%) de los embriones en medio gelificado, evaluados a diferentes tiempos (semanas). Barras representan el error estándar de las medias. Cada valor representa por lo menos un promedio de 7 frascos por tratamiento, cada uno tuvo 10 embriones. Distintas letras indican diferencias significativas por la prueba Tukey's Studentized Range ($p < 0.05$).

4.5.5. Aspecto morfológico e histológico de los embriones a lo largo del período sin inmersión

Se observó una continuación del crecimiento aunque no hubo absorción de nutrientes a partir del medio de cultivo. Los embriones sometidos a dos semanas sin inmersión, fueron mucho más homogéneos y poseían cotiledones mucho más estructurados.

A nivel histológico la muestra testigo presentó células de núcleos grandes en división celular, con reserva de almidones. Se observó una activa división celular y hasta la presencia de dos nucleólos por núcleo y muchas áreas embriogénicas.

Por otra parte, los embriones sometidos a dos semanas sin inmersión, se caracterizaron por ser de muy buena calidad, con células bien turgentes con mucho contenido de almidón. Además, se observó la presencia de núcleos grandes y de precipitado citoplasmático. En estos embriones, se pudo apreciar la presencia de un meristemo radical bien formado. Los cotiledones contenían muchas reservas y no se pudo diferenciar el mesófilo empojosado del empalizado.

Los embriones correspondientes a un tratamiento con cuatro semanas sin inmersión, se caracterizaron por una disminución de sus reservas de almidón y se pudo apreciar cierto daño en la parte externa del embrión, donde las células que componen las capas subepidérmicas fueron colapsadas. No se observó zonas meristemáticas bien definidas.

Finalmente, al observar los embriones con 8 semanas sin inmersión, se pudo analizar que la característica, más importante fue una drástica disminución en el contenido de almidón. También se pudo observar algunos embriones con células deterioradas.

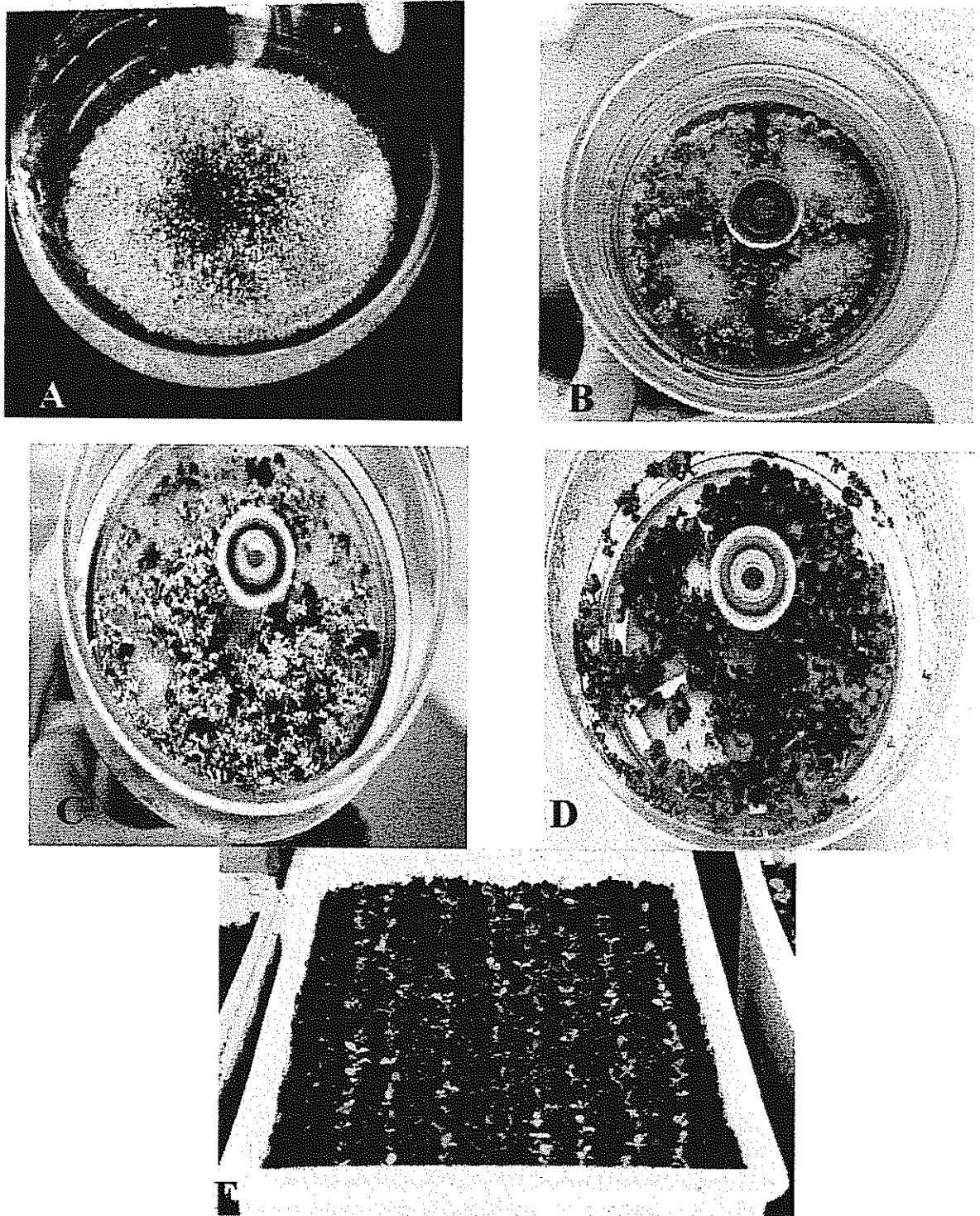


Fig.16. Algunas etapas de la regeneración de embriones somáticos utilizando el bioreactor RITA (A) proliferación del callo embriogénico, (B) expresión embriogénica, (C) desarrollo de los embriones somáticos, (D) germinación, (E) conversión de plantas en vivero.

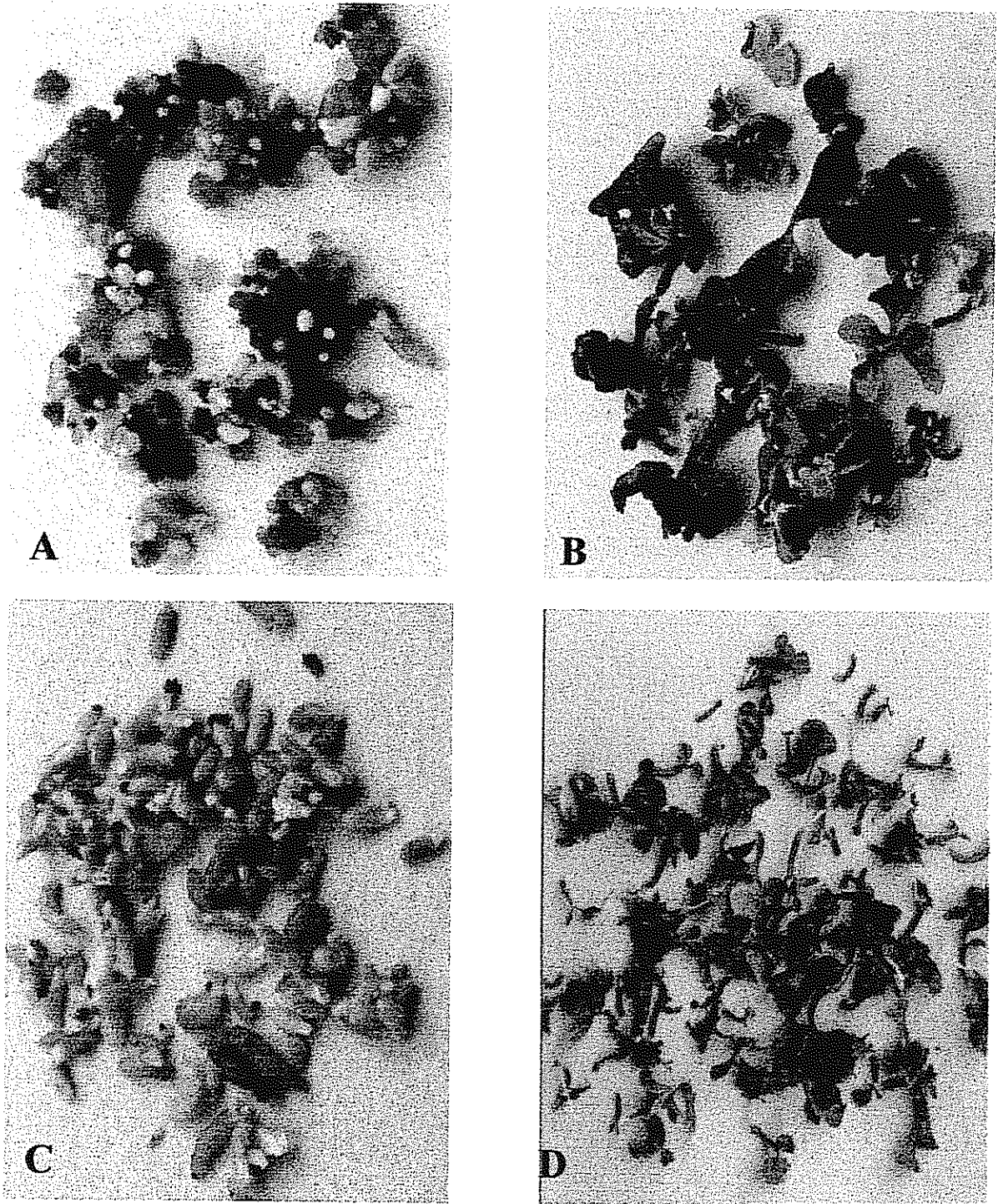


Fig.17 Aspectos morfológicos de embriones somáticos de café producidos en medio gelificado y bioreactor con inmersión temporal RITA ®. (A) embriones sin germinar y (B) embriones germinados en medio gelificado. (C) embriones sin germinar y (D) embriones germinados en bioreactor.

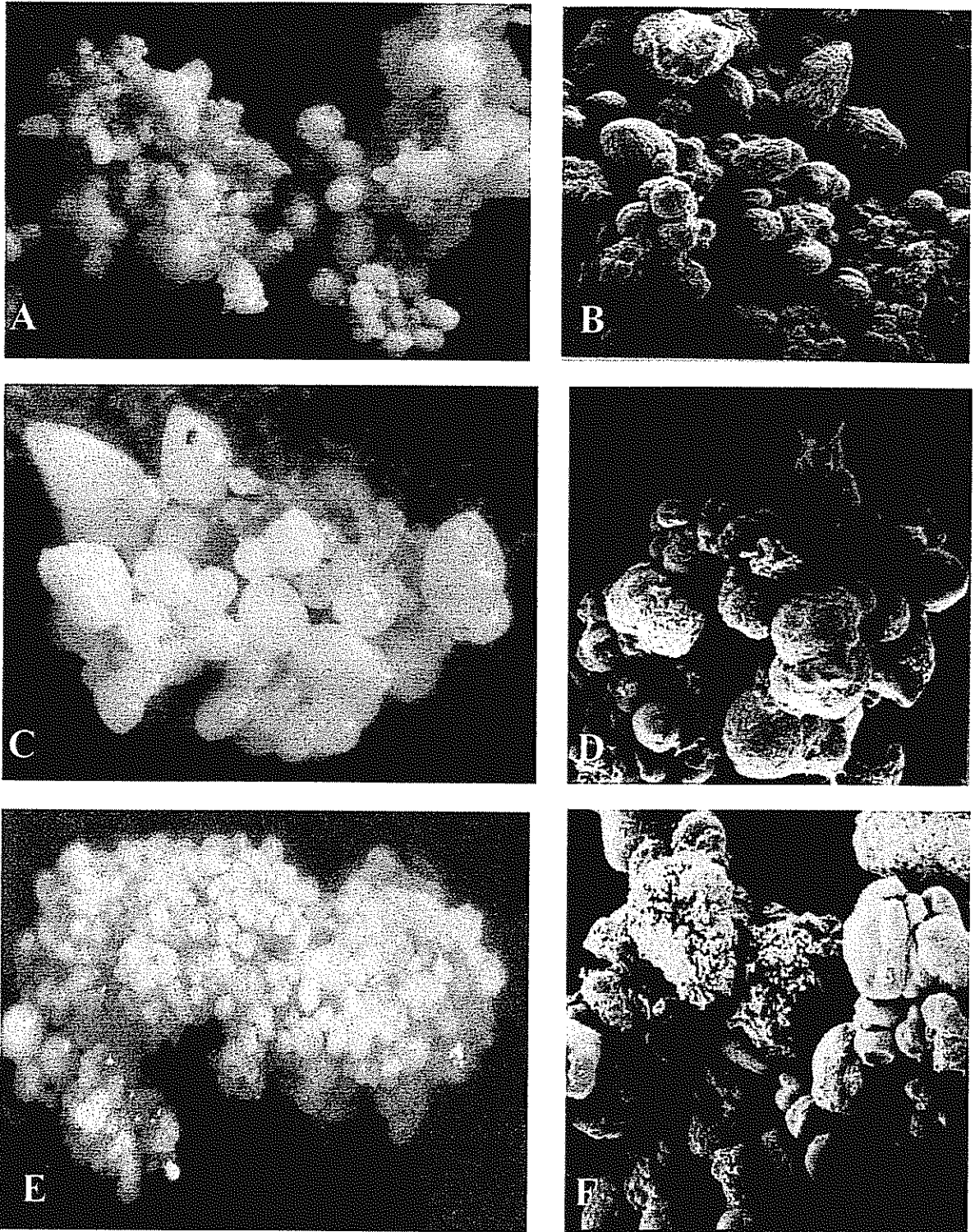


Fig. 18. Incidencia del soporte de cultivo utilizado en el bioreactor de inmersión temporal RITA®, sobre la morfología de los embriones somáticos. (A) Regeneración de embriones en espuma poliuretano. (C) Desarrollo normal de embriones en espuma poliuretano a malla abierta y (E) Agregados proembrionarios sin desarrollo en tela de nylon. (B), (D) y (F) embriones correspondientes a cada uno de los soportes, observados al microscopio electrónico.

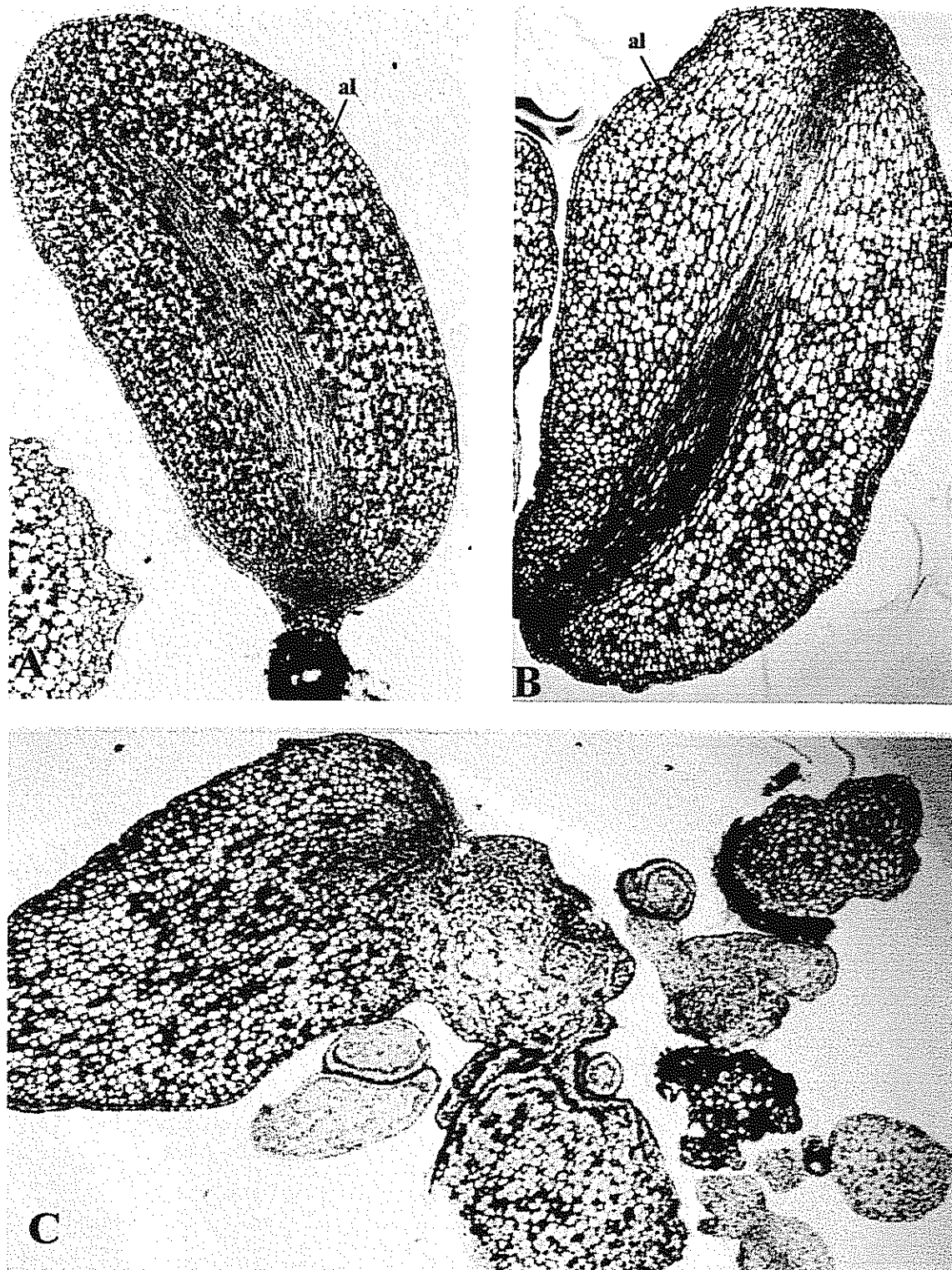


Fig. 19. Efecto de una fase de maduración con sacarosa y ABA (A) embrión proveniente de una fase de maduración con sacarosa (20X x 1.6) y (B) después de haber sido desecado durante dos semanas (20X). (C) producción de embriones adventicios a partir de embriones sometidos a la maduración con ácido abscísico (ABA) (4X). (al : almidón).

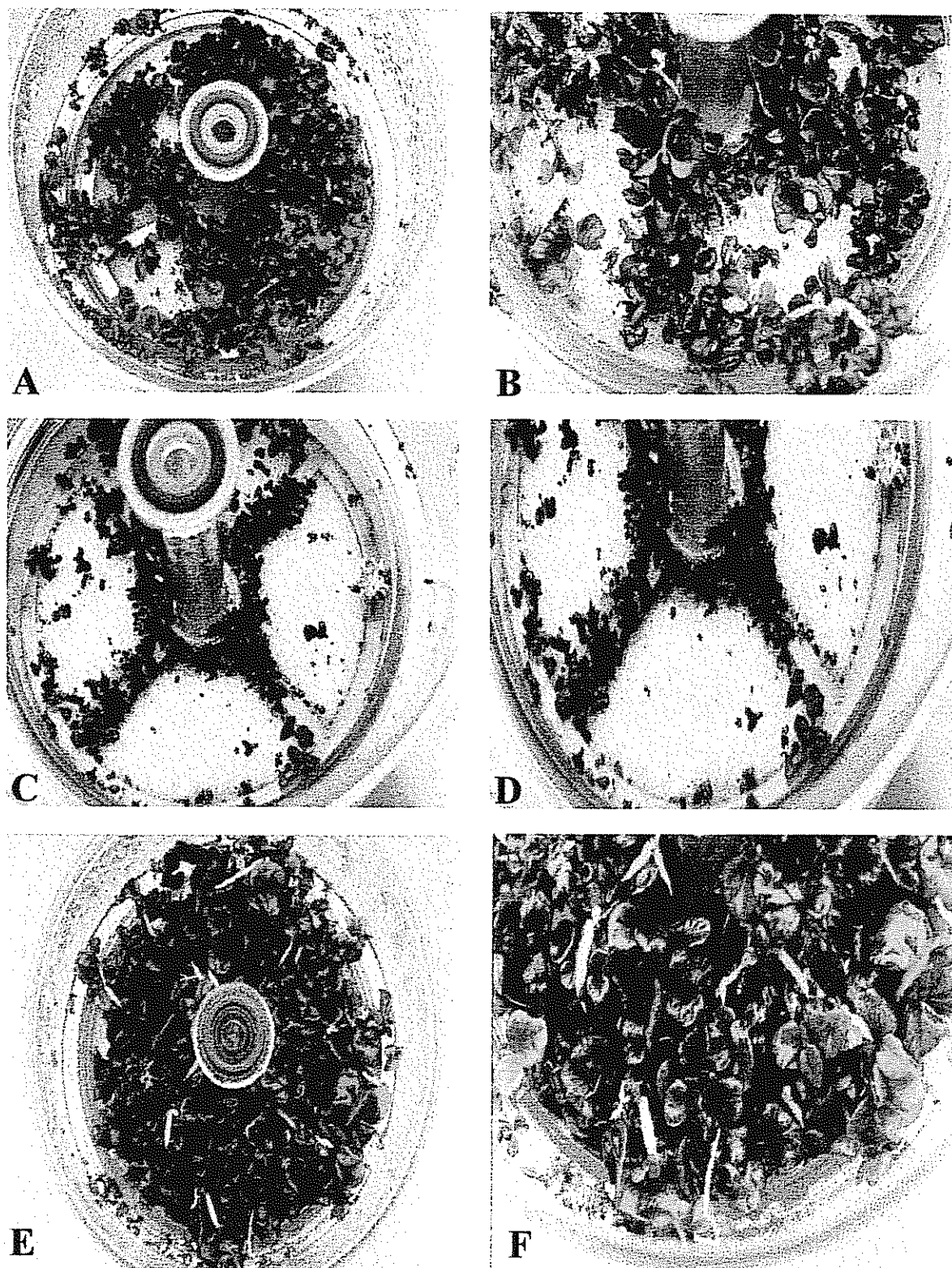


Fig. 20. Ensayo de maduración de embriones somáticos de café en bioreactor, producción y aspectos morfológicos (A) y (B) embriones en presencia de 40 g/l de sacarosa, (C) y (D) 140 g/l de sacarosa, (E) y (F) 5×10^{-6} M ABA.

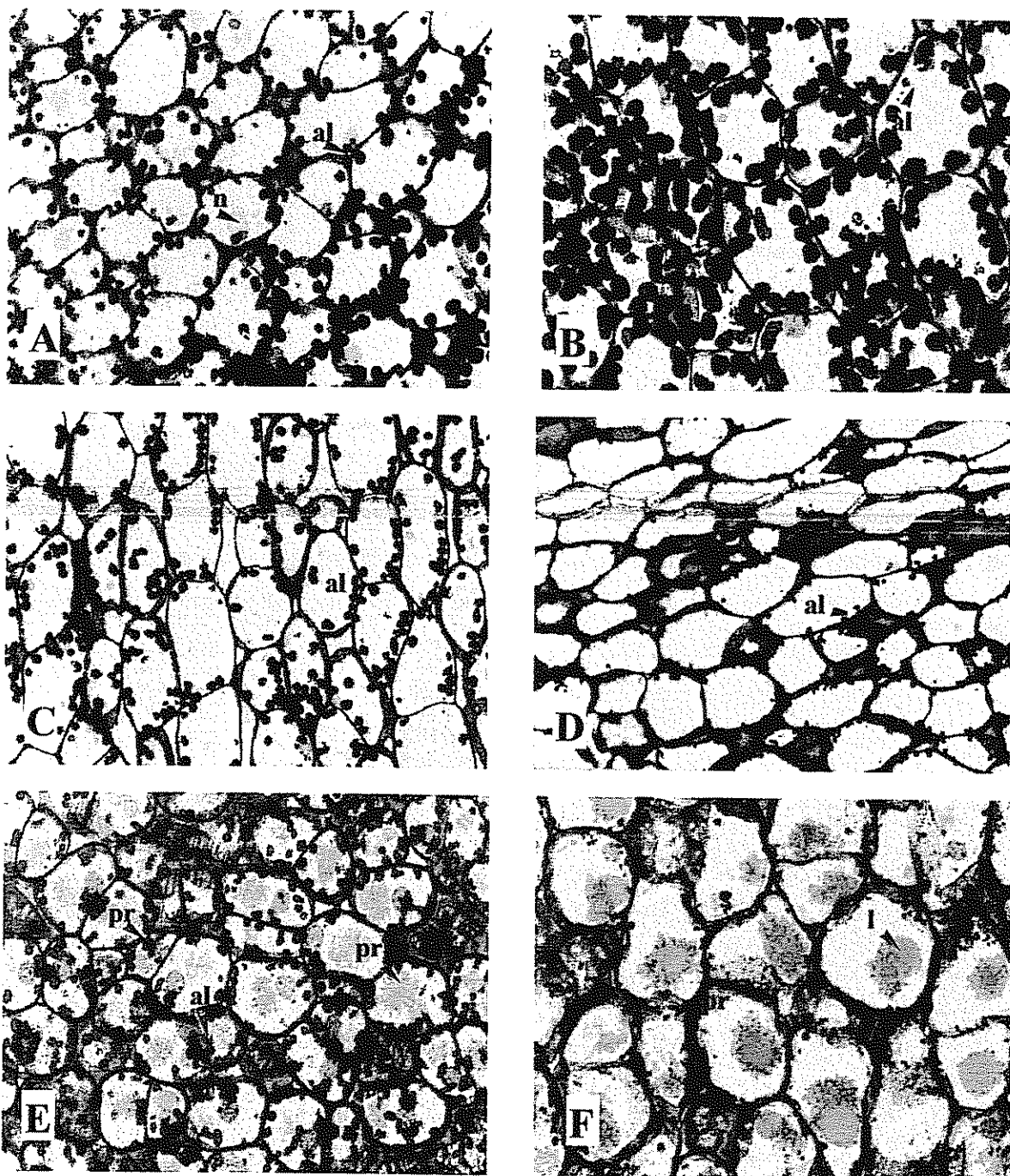


Fig. 21 Ensayo de maduración en bioreactor, aspectos histológicos después de un mes con (A) 40 g/l de sacarosa, (C) 140 g/l de sacarosa y (E) 5×10^{-6} M ABA. Después de un periodo de desecación de dos semanas (B) 40 g/l de sacarosa, (D) 140 g/l de sacarosa y (F) 5×10^{-6} M ABA. (pr : proteínas, l : lípidos, al : almidón, n : núcleo).

5. DISCUSION

5.1 Efecto de algunos factores físicos sobre la regeneración de embriones somáticos

5.1.1 Densidad de cultivo y germinación

En la investigación se analizó el impacto del factor densidad de cultivo durante la germinación, con el fin de lograr una producción masal de vitroplantas de híbridos F₁ de café (*Coffea arabica*). El efecto de la densidad de cultivo sobre las etapas tardías de la embriogénesis somática (maduración y germinación), nunca ha sido reportado en la bibliografía, la razón de esto, se encuentra en el hecho de que no había un sistema de cultivo en medio líquido, que permitiera el desarrollo y la sobrevivencia de los embriones durante estas etapas. La bibliografía describe el papel importante de la densidad durante las etapas iniciales de la regeneración en frascos erlenmeyers o en bioreactores, hasta la producción de embriones en el estado torpedo. La densidad ha sido identificada como el controlador de la producción de embriones bien formados y capaces de convertirse en plantas, es decir, producción de embriones en el estado torpedo, Zamarripa *et al* (1995) confirmaron este papel determinante de la densidad de cultivo en café.

Nuestros resultados indican que la determinación del PF de los embriones cultivados no se ve influenciado a dos densidades de cultivo distintas ; a diferencia del tamaño de los embriones, en donde a mayor densidad presentaron mayor elongación. Estos dos factores se pueden relacionar, si tomamos en cuenta que los embriones sometidos a bajas densidades de cultivo tendieron a desarrollar más sus cotiledones, y se caracterizaron por tener un hipocotilo relativamente corto. Caso contrario se observa a altas densidades. Por lo tanto, el PF obtenido es equilibrado en los embriones provenientes de ambas densidades de cultivo.

Finalmente, la conversión de los embriones en plantas en un medio gelificado, tiene una respuesta similar, independientemente de la densidad a la cual fueron sometidos. En un medio gelificado los factores de competencia por los nutrientes, disponibilidad de espacio, etc, desaparecen, eliminando una gran parte de las

diferencias de calidad existentes en los embriones. Este fenómeno fue observado en los trabajos de Fujii *et al* (1989).

Los resultados reportados indicaron que aproximadamente la cuarta parte del material logró convertirse en planta. Por otra parte hay mayor crecimiento en las plántulas obtenidas a bajas densidades, eso significa que tenían un desarrollo más adelantado y probablemente más reservas para crecer debido a la ausencia de competencia por nutrientes y a la baja densidad de cultivo en bioreactor.

5.1.2. Sistema de cultivo : bioreactor con inmersión temporal vrs medio gelificado

La totalidad de los trabajos realizados sobre las etapas tardías de la embriogénesis somática han sido hechos en medios gelificados, tales como los métodos de maduración de embriones cigóticos de pino (Lelu *et al.*, 1994), Hevea (Etienne *et al.*, 1993), alfalfa (Fujii *et al.*, 1989), trigo (Carman, 1989) y pino (Dunstan, 1991).

Sin embargo, ante la necesidad de reducir los costos de mano de obra, de reactivos (gelificante), etc., recientemente se ha introducido el uso de medios líquidos en hule (Etienne, 1997) y café (Berthouly, 1996 ; Etienne, 1997). Lograr un protocolo de embriogénesis somática realizado en medio líquido, parece ser la única vía para obtener un proceso de producción industrial para la mayoría de las especies, ya que hasta el momento solo las especies ornamentales que se caracterizan por tener un alto valor agregado son reproducidas por esta vía.

El uso de medio líquido tiene muchas ventajas y es considerado como una técnica ideal para la producción en masa y simplifica los cambios de medio (Apéndice 2). Además, es el sistema de regeneración más eficiente y de más ventaja para el futuro (Teisson *et al.*, 1995), debido a que puede facilitar la automatización para reducir los costos y elevarla a gran escala. Por otra parte, a nivel fisicoquímico la difusión de los elementos nutritivos es aproximadamente de 2 a 4 veces más alta que el medio gelificado. Esta mejor disponibilidad permite obtener un crecimiento más intenso y homogéneo.

Bhagyalakshmi y Singh (1995), han demostrado que el medio líquido comparado con el medio gelificado, permite una multiplicación más rápida y se ha admitido, que el proceso más caro en la producción de plantas por cultivo de tejidos, es la fase de multiplicación, que en medios semisólidos requiere de repetidos subcultivos y por lo tanto el uso substancial de mano de obra. Además, la preparación y distribución de medios, espacio y mantenimiento de los cuartos de crecimiento representan una parte importante de los costos de producción de las vitroplantas (Levin y Vasil, 1992).

Debido a las ventajas que presenta el medio de cultivo líquido, varios sistemas han sido investigados, entre los que se encuentran el sistema de membranas para la micropropagación en medio líquido (Kosai *et al.*, 1995), frascos fermentadores para la micropropagación de papa (Akita y Takayama, 1994), uso de bioreactores en producciones industriales de cultivos como la zanahoria (Teng *et al.*, 1994) y *Stevia rebaudiana* (Akita y Takayama, 1994). No obstante, la mayor desventaja de emplear un sistema de cultivo líquido es la hiperhidricidad, un exceso de agua en los tejidos que causa un desarrollo anormal del material (Chu *et al.*, 1993). Esta perturbación de la morfología y de la fisiología de los tejidos encontrada casi en forma sistemática en los diferentes sistemas de cultivo de medio líquido provados, es lo que ha causado el retraso en el desarrollo de la micropropagación.

Ante este inconveniente, se ha creado un sistema de inmersión temporal automatizado (RITA®), el cual se caracteriza por reducir este problema. Este sistema funciona con éxito en la micropropagación de diferentes especies, tales como el banano (Alvard *et al.*, 1992), para la embriogénesis en hule (Etienne *et al.*, 1997) y café (Berthouly, 1995; Etienne *et al.*, 1997).

En el caso del café (*Coffea sp*) la embriogénesis somática ha sido realizada en medios gelificados por muchos años y más recientemente en medios líquidos, es así como suspensiones de células de *Coffea robusta* han sido establecidas en frascos erlenmeyers (Hammerschlag y Litz, 1992).

En esta investigación, se evaluó el efecto de la inmersión temporal durante el desarrollo y germinación de los embriones somáticos. Dicho efecto, fue comparado con un medio gelificado en la fase de germinación.

Como la composición química del medio y el material vegetal utilizados fueron idénticos en los dos sistemas de cultivo, las diferencias encontradas en el material vegetal corresponden únicamente a parámetros físicos. El bioreactor con inmersión temporal tuvo un efecto positivo para la germinación de los embriones somáticos.

Al comparar ambos sistemas de cultivo se puede observar, que si bien es cierto, el medio gelificado origina embriones con mayor PF, una gran parte de este peso se encuentra concentrada en los cotiledones, los cuales se caracterizan por ser extremadamente grandes (resultados similares se obtuvieron en embriones producidos en bioreactores a baja densidad de cultivo, ver apartado densidad). A diferencia de lo anterior, el sistema de cultivo en bioreactor origina embriones miniaturizados mucho más homogéneos y de menor peso, pero con la particularidad de que el mayor porcentaje de este peso (75%) se encuentra distribuido en todo lo largo del eje, lo cual es de suma importancia, ya que es en el eje en donde interesa obtener la mayor acumulación de reservas, las cuales parecen más disponibles para la conversión en plantas que las almacenadas en los cotiledones. Dicho eje se caracterizó por presentar longitudes mayores a las encontradas en medio gelificado. Efectivamente los embriones con cotiledones grandes tienen una mayor fragilidad a la aclimatación y una pobre capacidad de regenerar plantas (Etienne-Barry *et al.*, 1999).

Es un hecho que el medio gelificado juega un papel muy importante en el desarrollo de los embriones, debido a sus condiciones de cultivo: baja densidad, no existen competencias físicas entre los embriones (no se encuentran en contacto), no hay competencia por los nutrientes y el sistema de alimentación es permanente a través de solo una parte del embrión.

Entre las ventajas observadas al utilizar bioreactores, se encontró que los embriones se encontraron inmersos en el medio de cultivo por períodos de tiempo definidos y a la vez, todo el material estuvo en contacto con el medio y en movimiento, este hecho puede explicar en parte la mejor homogeneidad de los embriones cultivados a través de este sistema.

Según Teisson, *et al* (1995), la humedad relativa en el compartimiento se mantiene cercana a la de saturación, este estado se debe especialmente a la presencia del medio líquido en el compartimiento inferior y a la retención del medio por capilaridad en la superficie del material vegetal. Este principio de inmersión temporal (solamente de 1 hasta 20 minutos por día) perturba menos el intercambio gaseoso y la polarización de los embriones que una inmersión total con agitación. Esta alta humedad permite frecuencias de inmersión muy cortas pero suficientes para la nutrición del material y evita la aparición de la vitrificación.

Desde el punto de vista morfológico, los embriones producidos en medio sólido se caracterizaron por presentar una gran heterogeneidad y anomalías en su estructura, tal como el crecimiento exagerado de cotiledones, uno o cuatro cotiledones por embrión, embriones fusionados, etc. . A diferencia de éstos, los embriones producidos en medio líquido tienen mayor homogeneidad en su estructura y no se observaron anomalías. En estudios realizados con *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg) por Etienne *et al* (1997), se encontró que la inmersión temporal sincroniza el desarrollo de los embriones somáticos y reduce el número de embriones anormales. En este trabajo el cultivo en medio gelificado dió como resultado embriones con un desarrollo extremo de los sistemas radicales a expensas del hipocotilo, el cual logra un crecimiento pobre o nulo.

Alvard *et al* (1992), en su trabajo con meristemas de banano utilizando los diferentes sistemas de cultivo líquido comparado con el gelificado, encontraron que al usar el sistema líquido con inmersión temporal se obtienen las tasas más altas de multiplicación de los explantes (5.2%) comparadas con los otros sistemas líquidos y el gelificado que sirvió de referencia (2.2%). Su investigación demostró que el tipo de aplicación del medio líquido influye grandemente en el desarrollo de los explantes de banano micropropagados, ya que con inmersión temporal, el desarrollo de las hojas fue considerable, no hubo necrosis ni hiperhidricidad a diferencia de los otros sistemas.

En nuestro trabajo se obtuvo mejores resultados a nivel de la conversión en planta utilizando el bioreactor el mayor tiempo posible, es decir, iniciando la germinación dentro del recipiente y sembrando los embriones directamente en suelo en

invernadero. Esto permitió el 60% de conversión en planta, conservando la alta homogeneidad del material producido en el bioreactor. Este resultado se debe comparar con el obtenido *in vitro* (30%) en medio gelificado.

Nuestros resultados difieren de los encontrados por Fujii *et al* (1989), en sus investigaciones en alfalfa, quienes encontraron que cuando los embriones fueron madurados en presencia de ABA (1 μ M) bajo condiciones *in vitro*, aproximadamente el 80% logró convertirse en planta, mientras que cuando fueron transplantados a nivel de invernadero, sólo se logró obtener tasas de conversión hasta del 64%.

5.2 Ensayos de maduración

La germinación precoz o prematura fue observada inicialmente en los embriones cigóticos extraídos de su ambiente natural y transferidos sobre un medio artificial *in vitro*. Es un fenómeno bien descrito y la mayoría del tiempo eliminado por intervenciones muy variadas, tales como, la disminución de la presión de oxígeno, aumento del contenido de sacarosa o potencial osmótico alto, aporte de ácido abscísico (ABA), de luz o aumento de temperatura (Roberts *et al*, 1990).

La germinación precoz ocurre cuando la fase de maduración es interrumpida y cuando el estado fisiológico de los embriones no permite una germinación normal. De esta manera la maduración aparece como un período transitorio pero indispensable para acabar con el desarrollo embrionario y preparar la fase germinativa (Quatrano, 1987).

Las palabras "germinación precoz" y "maduración" son también aplicadas para los embriones somáticos. Algunos estudios en *Brassica napus* (Crouch y Sussex, 1981), uva (Rajasekaran *et al.*, 1982) y soya (Slawinska y Oberdoy, 1991), mostraron que la ontogénesis y más particularmente la maduración de los embriones somáticos, imita a nivel bioquímico, la de los embriones cigóticos. La simulación de las condiciones de desarrollo *in ovulo* fue entonces aconsejada por Rangaswamy (1986), Carman (1988), y luego por Ammirato (1989) para optimizar el ambiente hormonal, nutricional y fisicoquímico de los embriones somáticos.

Este enfoque, que no había sido todavía realizado en café fue aplicado en nuestra investigación con la finalidad de establecer un proceso de maduración de los embriones somáticos.

Para Carman (1988-1989) los estudios del modelo cigótico han revelado la necesidad de inducir una fase de maduración previa a la germinación en el embrión somático, con el fin de mejorar la eficacia de la germinación y conversión en planta observada en el embrión cigótico. Esto permite en primer lugar completar la formación de los meristemas caulinar y radical, la acumulación de almidón y proteínas de reserva, y establecer el mecanismo de tolerancia a la desecación.

La maduración por lo tanto, es una fase transitoria, frecuentemente indispensable entre la fase de desarrollo y de germinación del embrión cigótico (Quatrano, 1987), lo que permite la acumulación de reservas a nivel celular.

La maduración fue considerada por Redenbaugh, *et al.*(1986) como un paso muy importante para obtener embriones de alta calidad, es decir, con una mayor similitud a los embriones cigóticos maduros y conversión en plantas fenotípicamente originales a sus padres. La primera vez que se introdujo en los embriones somáticos una fase de maduración fue en trigo, en trabajos realizados por Carman (1986), debido a que la mayoría de los procesos de la embriogénesis somática habían dado hasta ese momento una baja germinabilidad y problemas de geminación precoz. La originalidad de la investigación de Carman, fue estudiar de manera muy detallada la maduración de los embriones cigóticos, para luego optimizar las condiciones de cultivo, y de esa manera, mejorar la capacidad de germinación y conversión en planta. Su investigación sirvió de ejemplo para muchas especies.

En la mayoría de los casos la maduración es obtenida a través de sustancias como los azúcares, el polietilen glicol (PEG), manitol, sorbitol, ácido abscísico, etc.

Nosotros hemos probado los dos tratamientos más comunes en la mayoría de las investigaciones, la sacarosa y el ácido abscísico. Es particularmente conocido que la adición de ABA y altas concentraciones de sacarosa mejoran la maduración, creando un aumento en el potencial osmótico. Sin embargo, el ABA tiene la

particularidad de favorecer la estructura del embrión (desarrollo cotiledonal, organización del meristemo, y la acumulación de proteínas de reserva) (Etienne et al, 1993).

Los procesos biológicos involucrados en la maduración del embrión cigótico de café dan como resultado embriones bipolarizados, extremadamente ricos en almidón, lípidos y proteínas de reserva , que al ser deshidratados (55%) pueden germinar con un gran vigor y muy rápidamente. Los embriones somáticos de café no disponen de estas características al final de su desarrollo, de ahí su inconveniencia para la germinación y subsecuente conversión en planta.

5.2.1 Maduración con Sacarosa

El aumento de la concentración de sacarosa no permitió provocar los síntomas de maduración de los embriones somáticos de café. En lo que respecta a la modificación del aporte de sacarosa en la fase de maduración, se ha observado que ésta afecta la cantidad de embriones producidos, así como también, su calidad , en donde la mayor producción de embriones se logró con las concentraciones más bajas. Desde el punto de vista histológico, los embriones sometidos a altas concentraciones de sacarosa lograron almacenar muchas reservas de almidón, no así de proteínas y lípidos.

Estos resultados difieren de lo expuesto por Leucouteux *et al* (1993), quien encontró que altas concentraciones de sacarosa promueven la maduración. Aparentemente estas altas concentraciones representan mucho más que las cantidades requeridas para el metabolismo de los tejidos.

Sin embargo, nosotros encontramos que los embriones al no sufrir una fase de quiescencia apropiada, ellos mismos consumieron las reservas que habían acumulado durante la exposición a altas concentraciones de sacarosa, por lo que el resultado fue una inadecuada preparación para la germinación y talvez reduce la eficiencia de las altas concentraciones de sacarosa. Observaciones histológicas muestran una reducción significativa en el contenido de almidón dentro de las células durante el período sin inmersión (5 semanas), llegándose a observar cierto daño a nivel de la pared celular en la gran mayoría de los embriones.

Anandarajah y Mackersie (1990) encontraron que incrementos en la concentración de sacarosa en el medio de maduración han sido responsables del mejoramiento de la calidad de los embriones somáticos deshidratados de alfalfa, lo que puede atribuirse al efecto nutritivo y osmótico.

Independientemente de la inapropiada fase de desecación llevada a cabo, es un hecho que en nuestro estudio las altas concentraciones de sacarosa influyeron en forma negativa en la producción de embriones. Esto se debe posiblemente al largo período de exposición (4 semanas). En investigaciones realizadas por Lecouteux *et al* (1993), se observó que altas concentraciones de sacarosa (0.4M o 137 g/l) son efectivas para inducir la tolerancia a la desecación y alta calidad de embriones de zanahoria, si se aplica por sólo tres días. Prolongadas exposiciones a altas concentraciones reducen la calidad de los embriones somáticos y la acumulación de proteínas almacenadas.

Por otra parte, Lelu *et al* (1994) en estudios realizados sobre híbridos de pino, encontró que la habilidad de proliferación de los embriones fue afectada por la concentración de 0.2M de sacarosa y observó una total inhibición del crecimiento con 0.4M, después de un mes. En la presencia de 0.1M de sacarosa todos los embriones somáticos fueron verdes, con hipocotilos elongados, con cotiledones y con el comienzo del crecimiento de la radícula. Para Tremblay y Tremblay (1991), las mejores concentraciones de sacarosa en la obtención de embriones somáticos maduros de abeto se encuentran entre el 4 y 6%, concentraciones arriba de este 6% inhiben dicha maduración; esto ha sido corroborado en estudios hechos por Yong-Hwan (1989) en cereales, en donde concentraciones mayores al 6% inhiben el desarrollo de los embriones somáticos.

Esto contrasta con lo reportado por Finer *et al* (1989), quienes encontraron que son las altas concentraciones de sacarosa las que producen un mejoramiento de embriones somáticos de Pino. Por otro lado Kitto y Janick (1985), encontraron que concentraciones del 12% incrementan la supervivencia después de la desecación de embriones somáticos de zanahoria

Desde el punto de vista de la germinación, los embriones sometidos a altas concentraciones de sacarosa por un período de 4 semanas, redujeron su potencial germinativo y aumentaron las tasas de mortalidad. Anandarajah y Mackersie (1990) encontraron que la conversión y el vigor de los embriones somáticos deshidratados fueron óptimos si las concentraciones de sacarosa fueron de 60 g/l por 2 semanas, ya que altas concentraciones reducen la calidad. Resultados similares se obtuvieron a concentraciones de 40 y 60 g/l de sacarosa en cuanto a la conversión en planta (tanto en bioreactor como en medio gelificado).

5.2.2. Maduración con ácido abscísico

La simulación de un evento bioquímico en el ambiente del óvulo por la adición al medio de cultivo de una sustancia osmóticamente activa como el ácido abscísico (ABA) ha sido encontrada ser efectiva, especialmente en trigo (Carman, 1988) y Pino (Attree *et al.*, 1991) para estimular la maduración de embriones somáticos y prevenir la germinación precoz. Se ha encontrado que el ABA suprime la síntesis y el transporte del ARN mensajero encargado de fabricar las enzimas de la germinación (liala isocitrata o proteasa) (Ihle y Dure, 1972).

El ABA regula también, aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Milborrow, 1974)

Nuestro experimento demuestra que el ABA estimula el crecimiento y acumulación de proteínas, lípidos y almidones en embriones somáticos de café. De acuerdo a los resultados obtenidos, el ABA incrementó el vigor de los embriones cuando estos fueron cultivados en bioreactor, independientemente de la concentración empleada. Esto demuestra que hubo suficientes reservas almacenadas disponibles para la germinación. Análisis histológicos demuestran claramente el nivel de reservas dentro de la vacuola (Fig. 21E y 21F). Esta mejor fisiología establecida a través de la maduración con ABA permitió lograr una alta eficiencia de conversión en planta *ex vitro* directamente en un suelo hortícola.

En lo que respecta a la producción de embriones por bioreactor, nosotros encontramos que ABA estimula fuertemente el surgimiento de nuevos embriones. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en pino (Lelu *et al.*, 1994), en donde

se observó que el efecto favorable del ABA en la producción de embriones se debe a que incrementa las reservas almacenadas.

Además se pudo observar, el efecto protector que ejerce ABA sobre los embriones contra un período de desecación, pues se pudo apreciar que los índices de mortalidad se mantuvieron constantes independientemente de la concentración utilizada, mientras que en la muestra testigo dicha mortalidad tendió a incrementar. Este papel del ABA sobre el establecimiento de un mecanismo de tolerancia a la desecación fue ampliamente reportado en la literatura. En estudios realizados en zanahoria se encontró que el ABA promueve la tolerancia a períodos de desecación (Kitto y Janick, 1985), también se ha encontrado que prepara los embriones de soya (Oberdorf y Slawinska, 1988) y abeto para la desecación, en donde además, ayuda a la producción de embriones bipolares y de esa manera promueve un desarrollo íntegro de los embriones somáticos (Roberts *et al.*, 1990).

Quatrano (1987) trato de definir los mecanismos bioquímicos a través de los cuales el ABA protege los embriones contra la deshidratación.

Crouch y Sussex (1981) demostraron que el ABA promueve el desarrollo y acumulación de proteínas en embriones de colza cuando se encuentra a bajas concentraciones, ya que a altas concentraciones (100 μ M) no se estimula el crecimiento. Para Capuana y Debergh (1997), las concentraciones de 40 a 80 μ M de ABA parecen ser las mejores para el mejoramiento de la viabilidad, germinación y porcentaje de conversión en planta de embriones somáticos de castaño

5.2.3. Comparación de las acciones de sacarosa y ABA

Etienne *et al* (1993), investigaron el efecto de la desecación de embriones somáticos de Hevea después de un proceso de maduración con ABA y sacarosa y su posterior germinación. Ellos encontraron que una fase de maduración con 351 mol/m³ de sacarosa suplementado con 1mmol/m³ de ABA mejoran grandemente la germinación y la conversión de embriones en planta, además se incrementó el vigor y estimuló la formación del meristemo radical y apical así como la síntesis y acumulación de almidón y proteínas de reserva.

Lelu *et al* (1994), en estudios realizados con pino, encontraron que un medio sin ABA y con incrementos en la concentración de sacarosa de 0.1M a 0.4M resulta en una

inhibición del desarrollo del embrión. En general ellos encontraron que 0.1M de sacarosa, e incrementando la concentración de ABA (20,40 y 60 μM) da como resultado una gran cantidad de embriones somáticos maduros.

En nuestra investigación ABA parece jugar un rol muy importante en el desarrollo de los embriones somáticos.

Se pudo observar que bajo las mismas condiciones de cultivo y variando únicamente la sustancia inductora de la maduración (ABA y sacarosa), los tratamientos con ABA originaron embriones más vigorosos. Desde el punto de vista de la producción de embriones/bioreactor, el ABA también ejerció un efecto significativo, ya que partiendo de una densidad inicial (igual en ambas experimentaciones), se llegó a obtener el triple de embriones de los obtenidos con sacarosa. Este hecho se aprecia mejor al observar la gran cantidad de embriones adventicios obtenidos con ABA.

5.3 Ensayos de Quiescencia

Los eventos que ocurren durante la maduración y la germinación del embrión cigótico son muy conocidos gracias a las muchas investigaciones realizadas sobre semillas de cereales en particular. Los procesos de ontogénesis divergen a partir del estado de torpedo. Los embriones cigóticos alcanzan el estado cotiledonar, seguido por una etapa de maduración. Durante este período se incrementa la síntesis de proteínas de reserva, seguido por la preparación a la desecación y a la dormancia. El embrión maduro es deshidratado, seguido por un período de quiescencia para dar inicio a un nuevo programa de desarrollo post-germinativo (Quatrano, 1987).

El proceso de maduración/desecación es un período de transición entre las fases de desarrollo del embrión y de germinación, para lo cual participan grupos de genes muy distintos. (Quatrano, 1987). La desecación es una fase que comprende la reducción metabólica, detiene la acumulación de reservas protéicas, frena el desarrollo, permite la adaptación a la deshidratación y preparación para la germinación.

Debido a la importancia tan enorme de la desecación en los embriones, diversos investigadores han tratado de imitar este proceso natural de diferentes maneras. Etienne *et al* (1993), en sus estudios sobre embriones somáticos de *Hevea*

brasiliensis, realizaron la desecación exponiendo los embriones a un flujo de aire estéril por 14 horas, o poniéndolos en una atmósfera confinada y sumergiéndolos a un medio de maduración (321m/m³ de sacarosa) por solamente un minuto por semana. Por otra parte, Ming y Cornu (1992), lograron la desecación de embriones somáticos de nueces por medio de la utilización de altas concentraciones de sales minerales, y el tiempo que sometieron los embriones a las sales fue de solamente 3 a 5 días. La velocidad de deshidratación parece ser determinante en la eficacia del proceso (Roberts *et al.*, 1990-1991 ; Senaratna *et al.*, 1989). Velocidades lentas realizadas a humedades relativas bastante altas parecen ser las mas eficientes.

En base a todo lo anterior, nuestro estudio se enfocó con la idea de realizar un proceso similar en los embriones somáticos, es decir, de propiciar las condiciones necesarias para llevar a cabo un proceso de desecación, de tal manera de que se pudieran preparar los embriones para la germinación. Pero también pensabamos que la ausencia de inmersión podría tener dos efectos eventualmente positivos : en primer lugar la eliminación de la agitación de los embriones somáticos que ocurriré con cada inmersión y que puede interferir en el establecimiento de su polarización y en segundo lugar la ausencia de la absorción del medio nutritivo, que puede favorecer la entrada en una fase de baja actividad metabólica, cercana de la quiescencia.

Los resultados en el contenido de agua, indicaron que lo que ocurrió en realidad fue la hidratación de los embriones. Este hecho se debió en parte a que el medio de cultivo puesto en la parte inferior del bioreactor mantuvo una alta humedad relativa. En esta condición se sabe que la atmósfera dentro del recipiente, siempre esta cercana a la saturación (Teisson *et al.*, 1995). A pesar de no haberse obtenido una verdadera desecación , fue muy notorio el mejoramiento en el desarrollo de los embriones. Se obtuvieron embriones totalmente organizados al estado cotiledonar que nunca fueron obtenidos sin realizar este período sin inmersión. Además, esta intervención permitió homogeneizar fuertemente el material vegetal imponiendo una sincronización del desarrollo que se mantuvo durante la fase de germinación. Dicho desarrollo se llevó a cabo a expensas de las reservas almacenadas en los embriones, ya que éstos al no estar en contacto con el medio de cultivo, ocuparon sus propias reservas para continuar su desarrollo sin que su metabolismo se detuviera, es decir, que no se logro mantener los embriones en un verdadero estado de quiescencia.

Al detener la inmersión por un período de tiempo de dos semanas, se obtuvieron los mejores resultados en germinación. Sin embargo, independientemente del estado hídrico de los embriones, el factor que más influyó en la respuesta a la germinación fue el tiempo. Ya que a medida que aumentó el número de semanas sin inmersión, hubo más tiempo para que los embriones consumieran sus propias reservas, reduciendo de esa manera la posibilidad de alcanzar la germinación. Estos resultados concuerdan al analizar la producción de embriones adventicios, ya que se da el hecho que a medida que disminuyeron las reservas, hubo menos posibilidad de originar embriones adventicios. Entonces, en cierta manera, este tipo de hidratación mejora la homogeneidad del cultivo al no permitir la aparición de nuevos embriones, pero no así el almacenamiento de reservas.

En otros estudios realizados independientemente a este ensayo, se encontró que una desecación a nivel de bioreactor es posible, si se elimina completamente el medio de cultivo de la parte inferior del recipiente y además si se utiliza un soporte seco. Bajo estas condiciones es posible la reducción de un 15% de humedad en un período de tiempo de 15 días y la obtención hasta de un 60% de germinación.

Gray (1987) encontró que los tratamientos de desecación promueven la germinación de los embriones somáticos de uva y Ming *et al* (1992), lograron alcanzar un 45% de germinación en embriones de nueces previamente desecados.

De acuerdo a Kermode (1985), la desecación puede remitir el metabolismo de un modo de maduración a uno de germinación.

Finalmente, cuando los embriones somáticos fueron sometidos a un medio de cultivo gelificado, para observar su capacidad de conversión en planta e incremento en peso fresco, se pudo ver que la conversión en planta fue afectada por el tiempo sin inmersión, y esto era de suponerse, puesto que no había disponibilidad de suficientes reservas para dicha conversión. Además se demostró que la ganancia en peso a partir de las últimas 6 semanas fue debida más que todo al incremento en el contenido de humedad y no al almacenamiento de sustancias de reserva.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante la maduración y desarrollo de embriones somáticos de café (*Coffea arabica*) para una producción masal, se concluye :

1. Para lograr una producción masal de embriones somáticos de café, es necesario pasar todas las etapas del proceso a medio líquido con la finalidad de reducir los costos de producción.
2. Una comparación de la productividad entre los resultados obtenidos en medio gelificado y líquido, indica que fue altamente favorable el uso de bioreactor (se logró la producción de 200,000 embriones somáticos).
3. El uso de medio líquido ayuda a mejorar la homogeneidad del material vegetal, ya que permite la obtención de embriones con morfología adaptada a la siembra directa en semillero, con ejes grandes y cotiledones pequeños.
4. La germinación es la fase más costosa durante la producción de embriones somáticos de café, ya que requiere de aproximadamente el 60% de la mano de obra total, un mayor número de bioreactores y medio de cultivo.
- 5 La influencia de los factores físicos, tales como la densidad, sistema de cultivo y el soporte en el bioreactor, juegan un papel muy importante en la producción y comportamiento de los embriones.
6. El sistema de cultivo utilizado, afecta mucho la morfología de los embriones durante la fase de germinación.
7. Los soportes de cultivo utilizados en bioreactores con inmersión temporal, influyen grandemente en el éxito de la regeneración de los embriones somáticos a partir de suspensiones celulares.

8. La espuma de poliuretano a malla abierta (Bulprene 45) constituyó el tipo de soporte que eliminó el problema de hiperhidricidad observado en los embriones somáticos presentes en el bioreactor con inmersión temporal.
9. La maduración es una etapa indispensable entre el desarrollo del embrión y la subsecuente germinación.
10. Las altas concentraciones de sacarosa en el medio de maduración, ejercen un efecto negativo en el comportamiento de los embriones, cuando el período de exposición es de un mes.
11. La mejor concentración de sacarosa, utilizada en el ensayo de maduración fue la de 40 g/l.
12. ABA fue el mejor estimulador de la maduración de los embriones somáticos de café, ya que permitió un buen almacenaje de sustancias de reserva, tales como : lípidos, proteínas y almidón.
13. No se reportaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de ABA empleadas durante el ensayo de maduración.
14. Los ensayos en medio gelificado no permitieron ver diferencias entre los tratamientos con ABA y sin ABA, ya que son condiciones demasiado protegidas, que favorecen la germinación de los embriones. Sin embargo al sembrar los embriones directamente en el suelo para la conversión en planta si se pudieron observar diferencias significativas.
15. No es posible inducir una desecación de los embriones somáticos dentro del bioreactor, si este permanece con el medio de cultivo en la parte inferior. Los procesos metabólicos continúan y como resultado de eso, los embriones consumen sus propias reservas, obteniéndose al final un embrión con buena morfología pero vacío. Sin embargo, se puede obtener siempre y cuando se elimine completamente el medio de cultivo y se utilice un soporte seco.

7. RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones se recomienda:

1. Para mejorar la eficiencia de la maduración de embriones somáticos, se pueden combinar factores como las concentraciones de ABA y sacarosa en orden de explorar totalmente el potencial embriogénico del café. Concentraciones mas altas de ABA, más extremas podrían ser analizadas y de tal manera observar diferencias más marcadas.
2. Continuar investigando el papel de las altas concentraciones de sacarosa en la maduración de los embriones somáticos, pero en un período de tiempo menor.
3. Optimizar una verdadera desecación, con el fin de llevar el contenido de agua del embrión hasta un 55%, como lo observado en la semilla, para esperar obtener una germinación más eficiente, es decir, más rápida y con mayores tasas de conversión en planta. Para lograr ésto, sería necesario ocupar un bioreactor vacío y con soporte seco, el cual podría ser utilizado como un desecador.
4. Realizar los ensayos de maduración en otros tipos de híbridos de café, para investigar su respuesta y de esa manera ver si el proceso puede generalizarse a todos los genotipos.
5. Evaluar el comportamiento de las plantas obtenidas con los tratamientos mencionados, a nivel de campo.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, C.A. AND RINNE, R.W. 1980. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. *International Review of Cytology*. 68 : 1-8.
- AKITA, M. ; TAKAYAMA, S. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports*, 13 : 184-187.
- ALVARD, D. ; COTE, F. AND TEISSON, C. 1993. Comparison of methods of liquid culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32 : 55-60.
- AMEHA M., 1983. Heterosis in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease. I. First bearing stage. *Acta Horticultura*. 140: 155-161.
- AMMIRATO, P.V. ; STEWARD, F.C. 1971. Some effects of environment of the development of embryos from cultured free cells. *Botanical Gazette (EE.UU.)* 132(2) : 149-158.
- AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis : In : *Handbook of plant cell culture*. Vol.1. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y.Yamada, eds. pp. 82-123. Macmillan, New York.
- ANANDARAJAH, K., AND MACKERSIE, B.D. Enhanced vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. *Plant Sci.*, 71 (1990) 261-266.
- ANTHONY, F. ; ASTORGA, C. Y BERTHOULY, J. 1999. Los recursos genéticos. Las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In : *Desafíos de la caficultura latinoamericana (proyecto no publicado)*.
- ATREE, S.M., MOORE, D., SAWHNEY, V.M. AND FOWKE, L.C. 1991. Enhanced Maturation and Desiccation Tolerance of White Spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) Somatic Embryos : Effects of a Non-plasmolysing Water Stress and Abscisic Acid. *Annals of Botany* 68, 519-525.
- BERTHOULY, M. 1985. VIII Simposio sobre Caficultura Latinoamericana.
- BERTHOULY, M. 1989. Micropropagación del Café. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agricultura Cafetalera. Xalapa, ver., México del 12 al 15 de Abril de 1989. Compiladores : Roussos, R. ; Licon, R. ; Gutierrez, M. Memorias, pag. 17-28.
- BERTHOULY, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44 : 7-17.

- BERTHOULY, M. ; ETIENNE H., 1999. Somatic embryogenesis in coffee. In : Somatic Embryogenesis in Woody Plants. S.M. Jain, Pramod K., Gupta P., Newton R.J. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. En prensa.
- BERTRAND, B. 1997. Propositiones para la consolidación del proyecto de mejoramiento genético del café arabica en América Central. pp 1-9.
- BHAGYALAKSHMI ; SINGH, N.S. 1995. Role of liquid versus agar gelled media in mass propagation *ex vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 41 : 71-73.
- BONGA, J.M. and ADERKAS, P.VON. 1992. *In Vitro* culture of trees, Kluwer Academic Publishers. pp : 1-68. (Forestry Sciences, N.38).
- BOULAY, M.P. ; GUPTA, P.K. ; DURZAN, D.J. 1988. Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce. Plant Cell Report. 7 : 134-137.
- BURGHARDOVA, K. ; TUPY, J. 1980. Utilization of exogenous sugars by excised maize embryos in culture. Biología Plantarum (Checoslovaquia) 22(1) : 57-64.
- BUTCHER, D.N. ; STREET, H.E. ; 1960. The effects of gibberellins on the growth of excised tomato roots. Journal of Experimental Botany (G.B.) 11(32) :206-216.
- CAMPOS, M.F. . 1989. El cultivo del café. Universidad Estatal a Distancia (C.R). Serie Cultivos Mayores No. 1. 60p.
- CAPOT J., 1975. Obtention et perspectives d'un nouvel hybride de cafeier en Cte d'Ivoire: L'Arabusta. In : 7/coloquio científico internacional sobre el café, Hambourg, Alemania, 9-14 de junio 1975. Vevey, Suiza, ASIC, p. 449-457.
- CAPUANA, M. AND DEBERGH, P.C. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 48 : 23-29.
- CARMAN, J.G. 1988. Improved somatic embryogenesis in wheat by partial simulation of the *in ovulo* oxygen, growth regulator and desiccation environments. Planta 175 , 417-24.
- CARMAN, J.G. 1989. The *in ovulo* environment and its relevance to cloning wheat via somatic embryogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. 25 : 1155-1162.
- CARVALHO, A. Distribuição geográfica e classificação Botânica do Género *Coffea* com referencia especial *arabica*. Separata dos Boletines do superintendencia dos Serviços do café, ns 226 a 230, Dez 1945 a Abril 1946. Brasil.
- CHU, C.Y. ; SMITH, M.A.L. 1993. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa Chinensis* Jacq. "Minima"). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32 : 329-334.

- CHEE, R.P. AND CANTLIFFE, D.J. 1989. Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Impomoea batatas* (L.) Lam. Cultured *in vitro*. J. Plant Physiol. 135 : 398-403.
- COLLECCIONES FAO. 1995. Estadística Nº 130, 49 :171.
- CROUCH, M.L. AND SUSSEX, I.M. 1981. Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. Planta, 153, 64-74.
- DOUDOROFF, M. ; KAPLAN, N. ; HASSID, W.J. 1943. Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation. The journal of Biological Chemistry (E .E.U.U.) 48(1) : 67-75.
- DUBLIN, P. 1980. Multiplication végétative *in vitro* de l'arabusta. Café, Cacao, Thé, vol XXIV, nº4, Oct-Déc. Pp.281-290.
- DUBLIN, P. 1981. Introduction de bourgeons néoformés et embryogénèse somatique. Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. Café, cacao, thé. Vol. 25(4) : 237-242.
- DUBLIN, P. 1984. Techniques de reproduction *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. Café, Cacao, Thé (France) 28(4) : 231-244.
- DUFFOS, C.M. ; ROSIE, R. 1975. Biochemical changes during embryogeny in *Hordeum distichum*. Phytochemistry(G .B.) 14(2) :319-323.
- DUICELA, L. ; SOTOMAYOR, I. 1993. Principales variedades. Manual del cultivo del café, Quevedo, Ecuador. pp.43-48.
- DUNSTAN, D.I. ; BETHUNE, T.D. and ABRAMS, S.R. 1991. Racemic abscisic acid and abscisic alcohol promote maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. Plant Science 76 : 219-228.
- ECHEVERRY, J.H. 1988. Aprovechamiento de la variabilidad genética del café por medio de la técnica del cultivo de tejidos. Memoria, simposio avances científicos y tecnológicos en caficultura, 25-26 de Julio de 1988. Guatemala, C.A. pp 29-33.
- ENGELMANN, F. ; DEREUDDRE, J. 1988. Cryoconservation of oil palm somatic embryos : importance of the freezing process. Cryo-Letters (G.B.) 9 :220-235.
- ETIENNE, H. ; MONTORO, P. ; MICHAUX-FERRIERE, N. AND CARRON, M.P..1993. Effects of Dessication, Medium Osmolarity and Abscisic acid on the Maturation of *Hevea brasiliensis* Somatic Embryos. Journal of Experimental Botany, Vol. 44, Nº 267, pp. 1617-1619, October.
- ETIENNE, H. ; LARTAUD, M. ; MICHAUX-FERRIERE, N. ; CARRON, M.P. ; BERTHOULY, M. AND TEISSON, C. 1997. Improvement of Somatic Embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. ARG.) using the temporary immersion technique. In vitro Cell. Dev. Biol. _ Plant 33 :81-87.

- ETIENNE, H. ; ETIENNE-BARRY D., VASQUEZ N., BERTHOULY M., 1999. Aportes de las biotecnologías al mejoramiento genético del Café : El ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F₁ en América Central. In : Desafíos de la Caficultura Centroamericana, Capítulo 13. Publicación CIRAD/PROMECAFE. IICA (Ed.), San José, Costa Rica. En prensa.
- FINER, J.J. ; KRIEBEL, H.B. and BECWAR, M.R. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* c.). Plant Cell Rep. 8 : 2203-206.
- FINKELSTEIN, R.R. ; CROUCH, M.L. 1986. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. Plant Physiology (EE.UU.) 81(3) :907-912.
- FRY, S.C. AND WANGERMANN, E. 1976. Polar transport of auxin through embryos. New Phytol. 77 : 313-317.
- FUJII, J.A. ; SLADE, D. ; REDENBAUGH, K. 1989. Maturation and Greenhouse Planting of Alfalfa Artificial Seeds. In Vitro Cell. Dev. Biol. 25 : 1179-1182.
- FUJIMURA, T. AND KOMAMINE, A. 1979. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol. 95 : 13-19.
- GAUTHERET, R.J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology (EE.UU.) 6 :433-484.
- GRAY, D.G. 1987. Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. HortScience 22 :810-814.
- GUZMAN, N. 1989. Estudio de Alternativas para la conservación *in vitro* de café (*Coffea spp*). Tesis, Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 4-35 p.
- HABERLANDT, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber-Math-Naturwiss-Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien. 111 : 69-92.
- HALPERIN, W. ; WETHERELL, D.F., 1965. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro* Nature (Lond.), pp. 205, 519-520.
- HAMMERCHLAG, F.A. AND LITZ, R.E. 1992. Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Biotechnology in Agriculture, N°8. P.401-420.
- HERMANN, E.B. ; HASS, G.H. 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. Hortscience (St. Joseph, Mich.) vol. 10 n°6, Déc., pp 588-589.
- IHLE, J. AND DURE, L.S.,III, 1969. Synthesis of a protease in germinating cotton cotyledons catalyzed by mRNA synthesized during embryogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 36 : 705-10.
- JONES, L.H. 1974. Long term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Science Letters (Holanda) 2(4) : 221-224.

- KERMODE, A.R. AND BEWLEY, J.D. 1985. The role of Maturarion Drying in the Transition from Seed Development to Germination. *Journal of Experimental Botany*, 36(173) : 1906-1915.
- KERMODE, A.R. 1990. Regulatory mechanisms in involved in the transition from seed development to germination. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9 : 155-194.
- KITTO, S.L. AND JANICK, J, 1985. Hardening treatment increased survival of synthetically-coated asexual embryo of carrot. *J. Amer. Sor. Hort. Sci.* 110 : 283-286.
- KOSAI, T. ; KITAYA, Y. ; FUJIWARA, K. ; ADELBERG, J. 1995. Enviromental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In : Terzi, M ; Cella, R. ; Falavigna, A. Current issues in plant molecular and cellular biology. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 669-667.
- LAI, F.M. AND MCKERSIE, B.D. 1993. Effect of nutrition on maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Science.* 91 :87-95.
- LANAUD, C. 1981. Production de plantule de *C. canéphora* par embryogénèse somatique réalisée a partir de culture *in vitro* d ovules. *Café, Cacao, Thé, XXV* (4) pp. 231-236.
- LAZZERI, P.A. ; HILDEBRAND, D.F. AND COLLINS, B.C. 1987. Soybean somatic embryogenesis : Effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 10 : 197-208.
- LECOUTEUX, C.G. ; LAI, F.M. AND MCKERSIE, B.D. 1993. Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embruos by abscisic acid, sucrose and chillingstress. *Plant Science* 94 : 207-213.
- LELU, M.A. ; BASTIEN,C. ; KLIMASZEWSKA, K. ; WARD, C. ; CHAREST, P.J. 1994. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix X leptopaea*) : Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 : 107-115.
- LESHEN, B. ; GILBOA, N. ; IZHAR, S. ; FRANKEL, R. 1990. Acquired Tolerance to Exogenous Cytokinin during the Maturation of Tomato Embryos. *Journal Plant Physiology* 136 : 122.125.
- LEVIN, R. ; VASIL, IK. 199 . Progress in reducing the cost of micropropagation. *Newsletter.*
- LU, C. ; VASIL., V. ; VASIL, I.K. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics (Alemania)* 66(3-4) : 285-289.
- LU, C. ; THORPE, T.A. 1987. Somatic Embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. *Journal of Plant Physiology (Alemania)* 128(3) :297-302.

- MEIJER, E.G.M. ; BROWN, D.C.W. 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 10(1) : 11-19.
- MENAS, O. ; FERRER, G. ; GIRARTE, R. ; RODRIGUEZ, I. ; DURAN, A. ; VALDES, M.C. 1978. Fitotecnica del Café. Editorial Pueblo y Educación. Cuba. Pp 15-60.
- MICHAUX-FERRIERE, N. AND CARRON, M.P. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19 : 243-256.
- MICHALCZUK, L. ; COOKE, T.J. AND COHEN, J.D. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry. 31 : 1097-1103.
- MICHLER, C.H. AND LINEBERGER, R.D. 1987. Effects of light on somatic embryo development and abscisic acid levels in carrot suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture 11 :189-207.
- MILBORROW, B.V. 1974. The chemistry and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology, 25. 259-307.
- MING-DE DENG AND CORNU, D. 1992. Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture : 28 : 195-202.
- MONNIER, M. 1980. Contribution de la culture de l'embryon zygotique à la connaissance du développement et de la physiologie de l'embryon *in situ*. Bulletin de la société Botanique de France, Actualités Botaniques (Francia) 127(3-4) : 71-77.
- MONTEALEGRE, M. 1933. El Café. Editorial CVLTVRA, México. Pp. 7. Secretaría de la Economía Nacional , Departamento de Estudios Económicos.
- MONTES, S. ; MARTINEZ, M. ; ROJAS, R. ; SANTANA, N. ; CUBA, M. 1995. Obtención de Embriones Somáticos a partir de Suspensiones Celulares de *Coffea canephora* variedad Robusta. Cultivos Tropicales 16(3) : 77-81.
- MORRIS, P.C. ; WEILER, E. W. ; MADDOCK, S.E. ; JONES, M.G.K ; LENTON, J.R. AND BOWLES, D. J. 1988. Determination of endogenous abscisic acid levels in immature cereal embryo during *in vitro* culture. Plant, 73 : 110-116.
- MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15 : 53-58.
- OBENDORF, R.L. AND SLAWINSKA, J. 1988. Maturation of soybean somatic embryos to a desiccation tolerant state. *In vitro* cell Dev. Biol. 24 : 71A.
- PREVOST ; PAGE-DEGIVRY TH. LE. 1985. Inverse Correlation between ABA Content and Germinability throughout the Maturation and the *In Vitro* Culture of the Embryo of *Phaseolus vulgaris*. Journal of Experimental Botany, 36(170) : 1457-1464.

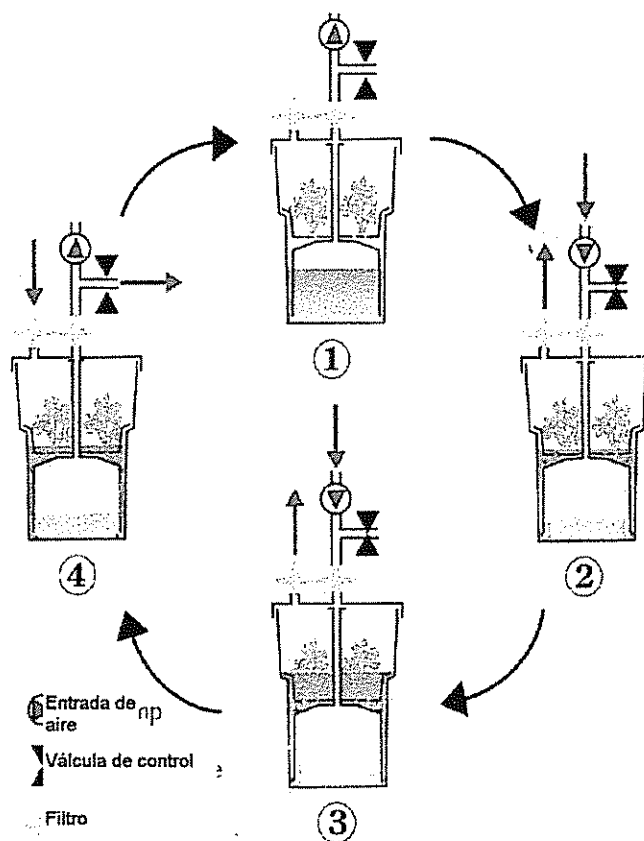
- QUATRANO, R.S. ; 1987. The role of hormones during seed development. In : Davies PJ, de. Plant hormones and their role in plant growth and development. Dordrecht : Martinus Nijhoff, 494-514.
- RAGHAVAN, V. 1980. Embryo Culture. In Perspectives in plant cell and tissue culture. De. By I.K. Vasil. New York, Academic Press. p.209-240. (International Review of Cytology, Supplement 11B).
- RAGASWAMY, N.S. 1986. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.), 96 : 247-271.
- RAJASSEKARAN, K. ; VINE ,J. ; MULLINS ,MG. 1982. Dormancy in somatic embryos and seed of Vitis : changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. Planta 154 : 139-44.
- REDENBAUGH, K. AND WALKER, K. 1986. Role of artificial seeds in alfalfa breeding, in : S.S. Bhojwani (Ed). Plant Tissue Culture. Applications and limitations, Elsevier publishing. 102-135.
- REDENBAUGH, K. ; PAASCH, B.D. NICHOL, J :W. ; KOSSLER, M.E. ; VISS, P.R. AND WALKER, K.A. 1986. Somatic seeds : encapsulation of asexual plant embryos. Bio/ Technology 4 : 797-801.
- REINERT, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus karotten. Naturwissenschaften. 45 : 344-345.
- RIVERA, A. ; GARCIA, L. ; HERNANDEZ, S. ; 1989. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agricultura Cafetalera. Xalapa, ver., México del 12 al 15 de Abril de 1989. Compiladores : Roussos, R. ; Licon, R. ; Gutierrez, M. Memorias, pag 29-30.
- ROBERTS, D.R. ; FLINN, B.S. ; WEBB, D.T. ; WEBSTER, F.B. ; SUTTON, B.C. 1990. Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. Physiologia Plantarum 78 : 355-360.
- ROCA, W.M. Y MROGINSKI, L.A. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia. pp 143-173.
- SANTANA, N. 1989a. Efecto de algunos componentes del medio de cultivo sobre embriones de café (*Coffea arabica*, Lin.) cultivados "In vitro". Cultivos tropicales 11(4) : 53-62.
- SANTANA, N. 1989b. Estudio sobre el efecto del medio de cultivo y la edad en el comportamiento de embriones de café (*Coffea* sp.) cultivados "In vitro". Cultivos Tropicales 11(3) : 17-29.
- SANTANA, N. ; IGLESIAS, L. ; GONZALEZ, M.C. 1989. Micropropagación del cafeto (*Coffea arabica*, Lin) mediante el cultivo de embriones "In vitro". Cultivos tropicales 11(3) : 31-43.

- SAS Institute Inc., SAS/STAT ® User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 1, Cary, N :C : : SAS Institute INC, volumen I y II, 1989.
- SENARATNA, T. ; MCKERSIE, B.D. AND BOWLEY, S.R. 1990. Artificial Seed of alfalfa (*Medicago sativa* L). Induction of desecation tolerance in somatic embryos. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 26 : 85-90.
- SHENK, R.U. ; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany (Can.)* 50(1) : 199-204.
- SKRIVER, K. AND MUNDY, J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and stress. *Plant Cell*, 2 : 503-512.
- SLAWINSKA J, OBENDORF RL. 1991. Soybean somatic embryo maturation : composition, respiration and water relations. *Seed Science Research* 1, 251-62.
- SONDAHL, M.R. ; SHARP, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* Z. *Pflanzenphysiol. (Stuttgart)* vol 81, pp 395-408.
- SONDAHL, J. 1979. A historical study of high frequency on low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.Z. *Pflanzenphysiol.* pp94.
- STARITSKY, G. 1970. Embryoid formation in callus culture tissue of coffea. *Acta Botánica Neeri.* Vol 19(4) : 509-514.
- STEWARD, F.C. ; MAPES, M.O. AND HEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cell II. Organization in culture grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45 : 705-708.
- TEISSON, C. ; ALVARD, D. 1995. A new concept on plant *in vitro* cultivation liquid medium : Temporary immersion. In : Terzi, M. ; Cella, R. ; Falavigna, A. *Current issues in plant molecular and cellular biology.* Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 105-110.
- TEISSON, C. ; ALVARD, D. ; BERTHOULY, M. ; COTE, F. ; ESCALANT, J.V. ; ETIENNE, H. A cheap and easy way to improve plant tissue culture in liquid medium by temporary immersion. CIRAD/BIOTROP P.O. Box 5035, 34032 Montpellier, France.
- TEISSON, C. ; ALVARD, D. ; BERTHOULY, M. ; COTE, F. ; ESCALANT, J.V. ; ETIENNE, H. Cultivo *in vitro* por inmersión temporal : un nuevo recipiente. *Plantations, recherche, developpement.* September-October 1995.
- TENG, W. ; LIU, Y. ; SOONG, T. 1994. Somatic embryogenesis of carrots in bioreactor culture systems. *HortScience.* 29 (11) : 1349-1352.

- TAUTORUS, T.E. ; FOWKE, L.C. AND DUNSTAN D.I. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69 : 1873-1899.
- THORPE, T.A. ; 1985. Carbohydrate utilization and metabolism. *In* Tissue Culture in Forestry. De. By J.M. Bonga ; D.J. Durzan. 2nd. De. Dordrecht. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk. P. 325-368.
- TREMBLAY, L. & TREMBLAY F.M. 1991. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Science* 77 : 233-242.
- VASIL, V. ; LU, C. Y. ; VASIL, I.K. 1983. Proliferation and plant regeneration from the nodal region of *Zea mays* L. (maize, Gramineae) embryos. *American Journal of Botany* (EE .UU.) 70(6) :951-954.
- VAN DER VOSSSEN H.A.M., 1985. Coffee selection and breeding. In: Coffee : botany, biochemistry and production of beans and beverage. M.N. Clifford & Willson eds. Londres, Reino Unido, Croom Helm, p. 48-96.
- VAN DER VOSSSEN H.A.M., WALYARO D.J., 1981. The coffee breeding programme in Kenya : a review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. *Kenya Coffee* 46 (541): 113-130.
- VON ARNOLD, S. AND HAKMAN, I. 1986. Effect of sucrose on initiation of embryogenic callus cultures from mature zygotic embryos of *Picea abies* Karts (Norway spruce). *J. Plant Physiol.* 122 : 2261-265.
- WANG, T.L. ; SMITH, C.M. ; COOK, S.K. ; AMBROSE, M.J. ; HEDLEY, C.L. 1987. An analysis of seed development in *Pisum sativum*. 3. The relationship between the r locus, the water content and the osmotic potential of seen tissues *in vivo* and *in vitro*. *Annals of Botany* (G.B.) 59 (1) : 73-80.
- YONG-HWAN KIM. 1989. ABA and Polyox-encapsulation or High Humidity Increases Survival of Desiccated Somatic Embryos of Celery. *HortScience*, Vol. 24(4), August.
- ZAMARRIPA, A. 1995. La embriogénesis somática del cafeto y su aplicación en un programa de mejoramiento genético. Memoria de Resúmenes, XVII Simposio sobre caficultura Latinoamericana dl 23-27 de Octubre de 1995. pp23.
- ZOK, S. 1986. La multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés par culture de méristèmes et d apex. In Colloque Scientifique International sur le Café. (11., 1985, Lomé). Paris, Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). P.461-476.
- ZULUAGA, V. 1989. Utilización integral de los Subproductos del café. I seminario internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera. Xalapa, ver, México, del 12 al 15 de Abril de 1989. pp63.

9. APENDICE

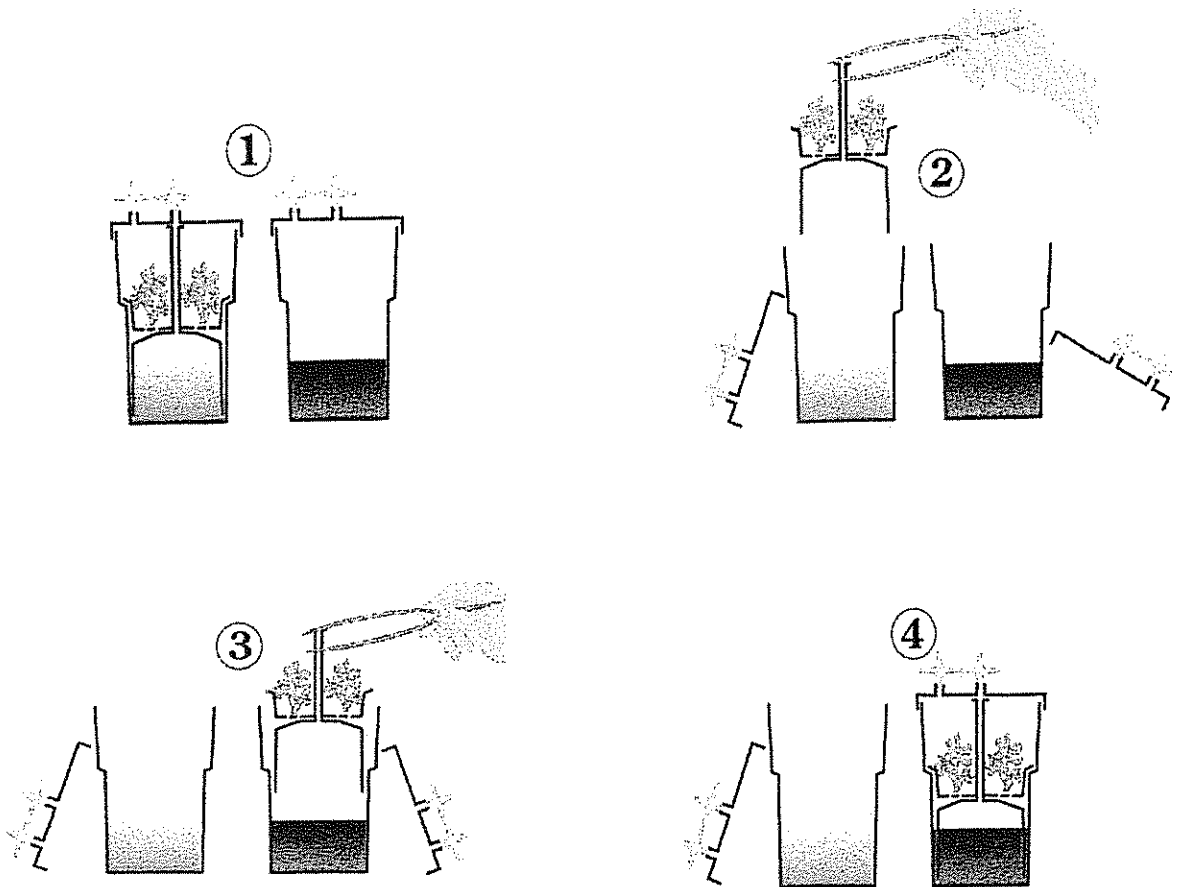
Apéndice 1. Pasos en el sistema con inmersión temporal con recipientes RITA® utilizados en la propagación *in vitro* de café.



- 1-Explantos y medio líquido en el recipiente RITA.
- 2-Entrada de aire al recipiente
- 3-Inmersión de los explantes con el medio de cultivo líquido.
- 4-Retorno del medio líquido a la sección inferior del recipiente.

¹ FUENTE : C. TEISSON & D. ALVARD. A. A new concept of plant *in vitro* culture in liquid medium : temporary immersion. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. NAPTC, Firenze, June 12-17, 1994.

Apéndice 2. Pasos a seguir para el cambio de medio en el sistema de inmersión temporal con recipiente RITA® utilizado en la propagación *in vitro* de café.



- 1- Utilización de un recipiente conteniendo el nuevo medio de cultivo.
- 2- Se sacan los explantes del medio anterior, utilizando una pinza y bajo condiciones asépticas, sin que se produzca ninguna remoción y sin hacer contacto.
- 3- Se introducen cuidadosamente los explantes al nuevo medio.
- 4- El material queda contenido en el recipiente con el medio deseado.

² FUENTE : C. TEISSON & D. ALVARD. A. A new concept of plant *in vitro* culture in liquid medium : temporary immersion. VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. ÑAPTC, Firenze, June 12-17, 1994.

Apéndice 3.1. Composición química de los medios de inducción, regeneración y maduración I.

Composición	Inducción	Regeneración	Maduración I
Macronutrientes/2*	25	25	25
Micronutrientes/2*	2.5	2.5	2.5
Fe EDTA/2*	2.5	2.5	2.5
L. cysteine	10	10	10
Thiamina.HCl	5	10	5
Pyridoxina	0.5	1	1
Ac. Nicotínico	0.5	1	1
Myo Inositol	100	200	200
Extracto de Malta	200	400	400
Hidrocasaína	100	200	200
2,4-D	1*	-	-
Kinetina	1*	-	-
Sacarosa**	15	40	diferentes concentraciones de sacarosa y ABA, ver materiales y métodos.
Glicina	-	2	2
BAP	-	3	3
Adenina	-	40	40

**g/l

las demás medidas están dadas en mg/l

Apéndice 3.2. Composición del medio de germinación.

Composición	Medio	
	Germinación I	Germinación II
Macronutrientes	50	50
Micronutrientes	5	5
Fe EDTA	5	5
Vit morel	5	5
Sacarosa**	40	80
BAP	0.3	0.3
Gelrite	2.2	2.2

Apéndice 3.3. Composición del fijador FAA (Formalina, alcohol, ácido acético).

Composición	Cantidad (ml)
Alcohol 95%	500
Agua destilada	350
Formalina	100
Acido acético glacial	50

Apéndice 3.4. Aclimatación en tierra.

Sustrato	Proporción
Tierra	3
Arena	1
Pulpa de café descompuesta	1

Apéndice 3.5. Composición del fijador para suspensiones celulares

Componente	Cantidad
Buffer fosfato, solución A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 31.21 g en un litro.	280 ml
Buffer fosfato solución B (NaH_2PO_4 anhidro) 24.49 g en un litro	720 ml
Buffer fosfato o cacodilato	50 ml
Paraformaldehído al 10%	20 ml
Glutaraldehído (solución al 25%)	4 ml
Cafeína	1 g
Agua destilada	26 ml