

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MICROINJERTO DE EMBRIONES CIGOTICOS
Y SOMATICOS DE CAFE (Coffea spp.)

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico
Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias
Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico
Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado
de

MAGISTER SCIENTIAE

por

EMILIO MORA GUZMAN

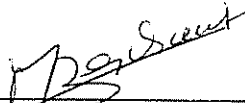
CATIE
Turrialba, Costa Rica

1990

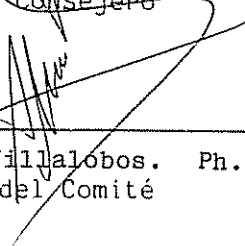
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE


COMITE ASESOR:




Marc Berthouly. Ph.D.
Profesor Consejero



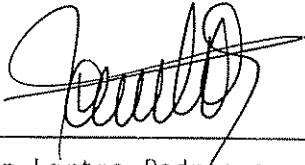
Víctor Villalobos. Ph.D.
Miembro del Comité



Nidia Morera. M.Sc.
Miembro del Comité



Vincent Escalant. Ph.D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado

Dr. José Luis Parisí
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Emilio Mora Guzmán
Candidato

DEDICATORIA

A mi madre, María por su hermoso sacrificio.

A mi tía, Ermida por todo su apoyo.

A mi amada esposa, Ledita
por su abnegación y confianza.

A nuestro querido hijo, Emilito
por todo lo que vino a enseñarnos.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas que colaboraron con la realización de mis estudios.

Al Dr. Marc Berthouly, por su participación y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Victor Villalobos, Jefe del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, por sus enseñanzas y preocupación en el enriquecimiento de este trabajo.

A la Msc. Nidia Morera y al Dr. Vincent Escalant, miembros del comité asesor, por todos los aportes y orientación en la realización del mismo.

A todo el personal del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales, por el apoyo y amistad demostrada durante mis estudios en CATIE. Especialmente al Sr. Juan Luis Ortiz, por su enorme colaboración en el desarrollo del trabajo de Tesis y su sincera amistad.

A la Lic. Nelly Vasquez, por su invaluable ayuda y orientación en el trabajo de histología.

A mis compañeros y amigos de promoción.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
1. LOS NEMATODOS Y EL CULTIVO DEL CAFE.....	4
1.1. Importancia de los nematodos en el cultivo del café.....	4
1.2. Resistencia a los nematodos en diferentes especies del género <u>Coffea</u>	5
2. EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CAFE.....	8
3. MICROINJERTACION.....	11
3.1. Uso del microinjerto <u>in vitro</u>	11
3.2. Uso del microinjerto en cítricos.....	13
3.3. Uso del microinjerto en otras especies.....	14
4. HISTOLOGIA DE LA UNION PATRON-INJERTO.....	16
III. MATERIALES Y METODOS.....	21
1. LOCALIZACION DEL ESTUDIO.....	21
2. MATERIAL VEGETAL.....	21
3. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	22
3.1. Medio de cultivo para embriones sexuales de <u>Coffea canephora</u> cv. Robusta usados como patrón.....	22
3.2. Medio para inducción de embriones somáticos de <u>Coffea canephora</u> cv. Robusta usados como patrón.....	22
3.3. Medio para el desarrollo de embriones somáticos de <u>Coffea canephora</u> cv. Robusta usados como patrón.....	23
4. OBTENCION DE PORTAINJERTOS E INJERTOS.....	24
4.1. Patrones provenientes de embriones sexuales....	24
4.2. Patrones provenientes de embriogénesis somática directa.....	25
4.3. Preparación de los portainjertos.....	26

5.	MICROINJERTACION.....	26
5.1.	Tratamientos de microinjertación.....	26
5.2.	Realización del microinjerto.....	30
6.	HISTOLOGIA.....	31
IV.	RESULTADOS.....	33
1.	MORFOLOGIA E HISTOLOGIA DE LAS DIFERENTES COMBINACIONES MICROINJERTADAS.....	33
1.1.	Patrones de embriones cigóticos de <u>Coffea</u> <u>canephora</u> en edades de ocho y diez semanas.....	33
1.2.	Patrones de embriones somáticos de <u>Coffea</u> <u>canephora</u> de 36 semanas de edad.....	34
1.3.	Morfología e histología de los injertos de <u>Coffea canephora</u> y <u>Coffea arabica</u> en edades de cero y una semana	35
2.	ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MICROINJERTO DE CAFE...36	
V.	DISCUSION.....	52
1.	MICROINJERTO.....	52
2.	ESTUDIO HISTOLOGICO DE LA UNION PATRON-INJERTO..	54
VI.	CONCLUSIONES.....	62
VII.	RECOMENDACIONES.....	64
VIII.	LITERATURA CITADA.....	65

MORA, E. 1990. Estudio histológico del microinjerto de embriones cigóticos y somáticos de café (Coffea spp). Tesis Mg. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 72p.

Palabras claves: Microinjerto, portainjerto, injerto, Coffea arabica, Coffea canephora, histología.

RESUMEN

Esta investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales del CATIE, con el objetivo de determinar los eventos histológicos que ocurren en el proceso de la microinjertación entre embriones cigóticos y somáticos de café y además si es factible o no la obtención de injertos exitosos y funcionales.

En el proceso de microinjertación se utilizaron plántulas provenientes de embriones cigóticos y somáticos de C. canephora, cv. Robusta y como injerto, embriones cigóticos y somáticos de C. arabica, cv. Caturra y C. canephora, cv. Robusta. Se ensayaron embriones de dos especies del género Coffea, en edades y origen diferentes. El estudio histológico se realizó con microscopía de luz y las combinaciones de microinjertación ensayadas permitieron observar los diferentes períodos para la ocurrencia de los eventos morfológicos, relacionados al desarrollo de los microinjertos. Todas las microinjertaciones culminaron con éxito, presentándose un prendimiento del 100% para todas las combinaciones ensayadas. Los eventos histológicos que caracterizan la unión patrón-injerto, se observaron en forma similar para todas las combinaciones de microinjertación

ensayadas, sin embargo éstas ocurren cronológicamente a diferentes velocidades de acuerdo con la especie, edad y origen de los embriones microinjertados. El estudio histológico permitió observar los siguientes eventos: a) formación de una capa de contacto constituida por células muertas de ambos componentes del sistema, debido a la lesión ocasionada por el corte en el patrón e injerto; b) reactivación de las células del patrón e injerto cercanas al corte, las que expresan un aumento en la actividad del núcleo y nucleolo, debido a la preparación de éstas para el proceso mitótico; c) acumulación de almidón en la región medular y cortical del patrón e injerto, donde posiblemente estos glúcidos serán transformados y movilizados como fuente de energía hacia las células que se encuentran en división activa en el cambium vascular; d) cohesión del patrón e injerto; e) proliferación de callo en la zona de unión como resultado de las divisiones celulares en todos los planos que sufren los tejidos parenquimáticos tanto del patrón como del injerto; f) formación de una zona cambial en el tejido neoformado o callo a partir del que se diferenciará progresivamente el tejido vascular que establecerá la conexión vascular efectiva. Esta se dió entre los 25 y 60 días de cultivo dependiendo de la combinación microinjertada.

Los resultados de este trabajo permiten establecer que la técnica de microinjertación in vitro, es una alternativa

viable para lograr injertos exitosos y funcionales entre patrones e injertos de C. canephora y C. arabica.

MORA, E. 1990. Histological study of micrografting of coffee (Coffea spp) cygotic and somatic embryos. Thesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 72 p.

Keywords: micrografting, rootstock, grafting, Coffea arabica, Coffea canephora, histology.

SUMMARY

The research was conducted, in the Biotechnology Unit of the Tropical Crops Improvement Program at CATIE, to determine histological events in the micrografting process of coffee cygotic and somatic embryos and the possibility to obtain viable grafts.

The material used for the micrografting process were cygotic and somatic embryos of C. canephora, cv. Robusta, as graft, cygotic and somatic embryos of C. arabica, cv. Caturra and C. canephora, cv. Robusta. Embryos of two Coffea species of different ages and origin were tested.

The histologic study was done using light microscopy and selected micrografting combination allowed observation at different periods for the appearance of morphologic events related to micrografts development. All micrograftings were successful with 100% performance for tested combinations. The histologic events characterizing the union pattern-graft were similar for all micrografting combinations; nevertheless, they occur chronologically at

different speeds according with the species, age and origin of micrografted embryos. The following events also were observed: a) formation of a contact coat of dead cells from both systems components due to injury caused by a cut made to the pattern or graft; b) reactivation of pattern and graft cells near the cut expressing an increasing activity of nucleus and nucleolus as preparation for the mitotic process; c) starch accumulation of pattern and graft medullar and cortical regions where these glucoside will be transformed and moved as energy source to cells in active division at the vascular cambium; d) pattern and graft cohesion; e) callus proliferation in the union areas as a result of cellular divisions in all parenchyma tissues of pattern and graft; f) formation of cambial zone in the neoformed tissue from where vascular tissue, for an effective connection, will progressively differentiate. This happened between 25 and 60 days of culture depending of micrografted combinations.

The final results of this research allow to conclude that in vitro micrografting technique is a viable alternative to obtain successful and functional graftings with patterns and grafts of C. canephora and C. arabica.

LISTA DE CUADROS

En el texto

Cuadro No.	Página
Cuadro 1. Microinjertos, según la edad del patrón e injerto, utilizando embriones cigóticos de <u>Coffea canephora</u> y <u>Coffea arabica</u>	28
Cuadro 2. Microinjertos utilizando como patrones, embriones cigóticos de <u>Coffea canephora</u> y como injertos embriones cigóticos y somáticos de <u>Coffea arabica</u> y <u>Coffea canephora</u>	29
Cuadro 3. Eventos en las microinjertaciones realizadas. Días al inicio de su ocurrencia.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Página
Figura 1. Corte longitudinal a los dos días de cultivo, mostrando las superficies de contacto de ambos tejidos lesionados (médula en el patrón y corteza en el injerto), del microinjerto de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u> de 10 semanas de edad usados como patrón, con embriones de <u>C. canephora</u> de una semana, usados como injerto (X 450).....	39
Figura 2. Corte longitudinal a los 30 días de cultivo, mostrando la acumulación de almidón en la médula, corteza y células perivasculares, en el microinjerto de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u> de ocho semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de <u>C. arabica</u> de cero semanas de edad, usados como injerto (X 900).....	40
Figura 3. Corte longitudinal a los diez días de cultivo, mostrando el inicio de la cohesión del sistema, en el microinjerto de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u> de 10 semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de <u>C. arabica</u> de cero semanas de edad, usados como injerto (X 180).....	42
Figura 4. A) Corte longitudinal a los 12 días de cultivo, mostrando el inicio de las divisiones celulares, en todos los planos que darán origen al callo, en el microinjerto de embriones cigóticos de <u>C. canephora</u> de ocho semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de <u>C. canephora</u> de cero semanas de edad, usados como injerto (X 900). B) Corte longitudinal del mismo microinjerto mostrando el callo formado en la interfase del injerto (X 450).....	43

- Figura 5. Corte longitudinal a los 22 días de cultivo, mostrando la completa regeneración de la médula del patrón, en el microinjerto de embriones cigóticos de C. canephora de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de C. canephora de cero semanas de edad, usados como injerto (X 180).....45
- Figura 6. Corte longitudinal a los 22 días de cultivo, mostrando el inicio de la diferenciación vascular a partir de la zona cambial neoformada en la interfase del microinjerto de embriones cigóticos de C. canephora de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de C. canephora de cero semanas de edad, usados como injerto (X 900).47
- Figura 7. Corte longitudinal a los 22 días de cultivo, mostrando la conexión entre los elementos vasculares formados del callo, El microinjerto corresponde a embriones cigóticos de C. canephora de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de C. arabica de una semana de edad (X 450).....48
- Figura 8. Corte longitudinal a los 60 días de cultivo. Se observa la conexión vascular continua entre el tejido vascular del patrón y el injerto, en el microinjerto de embriones cigóticos de C. canephora de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de C. arabica de una semana de edad (X 450).....50

I. INTRODUCCION

Para algunos países de América Latina como Brasil, Colombia, Centroamérica etc, la actividad cafetalera constituye una de las principales fuentes de divisas, que sustenta directamente su desarrollo social y económico. Ello justifica la conducción de investigaciones en este cultivo con miras a profundizar en aspectos relacionados con su propagación, fisiología, manejo, y mejoramiento hacia fuentes de resistencia, lo que permitiría incrementar la productividad del mismo.

En la región latinoamericana, los nematodos fitoparásitos constituyen uno de los factores limitantes para la caficultura, pues se ha demostrado que pueden ser responsables de un alto porcentaje de pérdidas, estimadas hasta en el 60%. Estos parásitos causan su daño al alimentarse de las raicillas de la planta, lo que afecta la absorción de agua y nutrientes con un resultado indirecto sobre la cantidad y calidad de los frutos. Además se señala la posibilidad de que los nematodos, sobre todo los del género Meloidogyne formen parte de un complejo etiológico en el que participan también hongos del género Fusarium spp, Cylindrocladium spp y Phialophora, causantes de severa marchitez en el café (Calderón, 1989).

El difícil combate de esta plaga una vez que ha infestado las raíces de la planta, así como la naturaleza perenne del cultivo, han hecho de este, un problema de difícil solución. Sin embargo se ha tratado de afrontar especialmente de las siguientes maneras: a) combate químico mediante el uso de nematicidas, el cual además de tener altos costos, es un contaminante peligroso del ambiente y con eficacia por corto tiempo; b) utilización de genotipos tolerantes o resistentes obtenidos a través de mejoramiento genético, posibilidad que se encuentra aún en experimentación y c) Injertación de materiales productivos sobre patrones tolerantes o resistentes. Este último método se considera adecuado y económico para hacer frente a este problema.

El cultivo de tejidos in vitro, tiene un sinnúmero de aplicaciones, siendo la microinjertación una de ellas. Esta constituiría una alternativa para producir plantas injertadas con resistencia a nematodos mediante el uso de portainjertos de variedades resistentes, que además cuenten con un sistema radical abundante, de regeneración rápida, con injertos de variedades comerciales de la especie Coffea arabica, altamente productivas.

Hasta el momento, se ha realizado muy poca investigación en los diferentes aspectos relacionados con la microinjertación y a la fecha para el caso particular de

café, no existen reportes en la microinjertación de esta especie. ni un estudio histológico que muestre los eventos que ocurren en el proceso.

En esta investigación se proponen las siguientes hipótesis: a) el método de microinjerto in vitro es una técnica que permite el desarrollo de injertos compatibles entre patrones de C. canephora e injertos de C. arabica; b) la técnica ofrece la posibilidad de microinjertar embriones cigóticos y somáticos de C. canephora y C. arabica in vitro; c) la compatibilidad de los microinjertos no se ve afectada por la edad del embrión al momento de injertar, por el origen del embrión, o por el genotipo y edad del injerto; d) la funcionalidad de microinjertos de C. arabica sobre C. canephora, se puede comprobar en etapas tempranas del microinjerto mediante el estudio histológico de la unión injerto-patrón.

II. REVISION DE LITERATURA

1. LOS NEMATODOS Y EL CULTIVO DEL CAFE

1.1. Importancia de los nematodos en el cultivo del café.

Lima y Almeida (1989) y López y Velez (1983), coinciden en señalar que después de las enfermedades fungosas que atacan el cafeto, los nematodos son la plaga más destructora, la cual si no es tratada a tiempo, hace declinar la producción, terminando por matar las plantas.

El nematodo Meloidogyne exigua fue identificado en América por Gueldi (Lordello y Fazuoli, 1980), y esta es la especie más comunmente asociada a este cultivo en la mayoría de los cafetales del continente (Di Pietro et al, 1981; García et al, 1988; Lima y Almeida, 1989). Ferraz (1980), en un estudio sobre caracterización de nematodos realizado en Brasil, concluye que los géneros más comunmente encontrados en plantaciones de cafeto fueron Helicotylenchus, Pratilenchus y Meloidogyne, dentro de 34 géneros identificados.

Técnicos del Instituto Mexicano del Café, (INMECAFE, 1987), realizaron un estudio en Veracruz, e identificaron a Meloidogyne incognita como el factor limitante de más peso en la producción cafetalera, ya que es el causante de los daños más importantes y severos al cafeto. Campos et al (1985), reporta para Brasil, a los géneros Meloidogyne y Pratylenchus, como los más encontrados

en asociación, perjudicando las raíces del cafeto. Schieber (1976), cita para Guatemala a Meloidogyne exigua, Pratylenchus coffeae y Xiphinema americana, como las principales plagas de la producción cafetalera en ese país y responsables de una reducción marcada en el rendimiento. Colbert (1979), se refiere a una disminución del rendimiento del orden de hasta el 60%, en plantaciones de café atacadas por nematodos del género Meloidogyne.

1.2. Resistencia a los nematodos en diferentes especies del género Coffea.

Cook y Evans, (1987), consideran a una planta completamente resistente como aquella que no permite la reproducción del nematodo. Parcialmente resistente si soporta niveles intermedios de reproducción y susceptible aquella que permite que el nematodo se reproduzca libremente.

Diversos autores concuerdan en que la identificación y utilización de fuentes de resistencia genética para manejar poblaciones de nematodos es una alternativa adecuada, efectiva y económica para enfrentar el problema de los nemátodos en el cultivo del cafeto. (Fazuoli y Lordello (1977; 1978a,b); Fazuoli et al (1978); Sasser et al (1987).

En general se indica a las variedades de C. arabica como susceptibles, mientras que en otras especies de ese

género como C. canephora y C. liberica, se informa de variedades tolerantes o resistentes a los nematodos. De hecho en la especie C. canephora es en la que existe más información sobre resistencia a Meloidogyne exigua y M. incognita. Por ello en algunos casos como El Salvador, Guatemala y Brasil ésta es utilizada como patrón en injertos con cultivares de C. arabica y además en programas de mejoramiento genético sobre resistencia (Curi y Silva (1977); Curi et al (1977); Medina et al (1981); Rodríguez (1980). Además de su resistencia a los nematodos antes anotados, C. canephora posee un sistema radical muy desarrollado lo que le confiere importantes ventajas para usarla como portainjerto. Otras especies que poseen características útiles como portainjertos de cultivares de C. arabica son el C. congensis, el C. dewevrei, el C. racemosa, y el C. eugenioides (Fazuoli et al (1978); Fazuoli y Lordello (1977) y Arevalo et al (1977).

Los nematodos del género Meloidogyne, se citan como muy importantes en la producción cafetalera de los países centroamericanos, debido a su distribución geográfica y a los daños que ocasionan y el mecanismo más eficaz y menos costoso para enfrentar el problema lo constituye el uso de plantas con resistencia genética, siendo la especie C. canephora una de las más sobresalientes. C. canephora puede utilizarse como portainjerto en la injertación con otras variedades de café más productivas. Sin embargo C. canephora es de naturaleza alógama, por lo que podría

presentar variabilidad en su resistencia a esta plaga si se trabaja con semilla obtenida por polinización no controlada (Avendaño y Morera, 1988).

Entre los injertos realizados en café, el conocido como Método Reyna (Reina 1968; 1980), se considera sencillo, práctico y además su ejecución ha ayudado a resolver exitosamente el problema de nematodos en Guatemala. Consiste en injertar C. arabica, sobre un portainjerto de C. canephora var. Robusta. Los semilleros de C. canephora var. Robusta se hacen alrededor de diez días antes que el de la variedad o cultivar de C. arabica que se desea multiplicar. Cuando estas plantulas tienen cinco días de germinadas (antes de que los cotiledones abran), se puede proceder a realizar el injerto de cuña. Para el vendaje se usa una tira de polietileno de medio centímetro de ancho y de largo conveniente para facilitar el amarre que se hace en la parte inferior de la herida del patrón. Las plantulas injertadas se deben sembrar en un propagador, a una humedad relativa entre 80 y 90% y una temperatura promedio de 20 a 25 °C. En el propagador las plantas permanecen de 50 a 60 días, posteriormente son trasladadas a bolsas de polietileno (Reyna, 1968; 1980). Sin embargo este método presenta el inconveniente, como ya se señaló, de que la semilla del patrón de C. canephora es de polinización abierta, lo cual no garantiza la misma respuesta genética de resistencia a los nematodos.

En la actualidad, el injerto con el Método Reyna ha sido aprovechado por varios países del mundo, (Reyna, 1980), sin embargo no se han realizado estudios histológicos, que muestren los eventos que ocurren en este proceso.

El microinjerto de patrones provenientes de embriones somáticos de *C. canephora*, vendría a minimizar el riesgo de utilizar semilla sexual, lo cual no garantiza la misma respuesta genética del material al ataque de nematodos.

2. EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CAFE

La embriogénesis somática in vitro es un proceso biológico en el cual a partir de células somáticas, se llega a la formación de embriones perfectamente organizados en los cuales las características morfológicas, son idénticas a las encontradas en los embriones sexuales (Michaux-Ferriere, et al., 1989). En algunas especies estas células tienen la capacidad de desarrollarse en plantas completas, proceso que ocurre asociado a diferentes tejidos de la planta tales como la epidermis, parénquima y tejido vascular (Amirato y Steward, 1971; Amirato, 1983 y 1989). Los embriones somáticos y cigóticos presentan gran similitud en sus estados morfogénicos, observándose en ambas rutas morfogénicas la ocurrencia del estado globular, caracterizado por su activa división celular, el estado de corazón, el cual se presenta seguido al embrión globular y

finalmente el estado de torpedo (Sung, 1985; Buchheim et al, 1989).

Debido a la alta tasa de multiplicación de individuos que provoca esta técnica, se ha considerado ideal para reproducir en gran escala genotipos de café de buen comportamiento. Desde los años setentas, hasta el presente se han realizado estudios del cultivo de tejidos de diversas variedades de café, básicamente las de valor comercial (Arévalo, 1985).

En este aspecto se han regenerado plantas por medio de neoformación de yemas (Dublin, 1980, 1981), a partir de secciones de entrenudos de tallos ortotrópicos y por embriogénesis somática a partir de tejidos de diferentes órganos: fragmentos de tallo ortotrópico (Nassuth et al., (1980); Dublin (1980); Staritsky (1970), secciones de tejido foliar (Dublin (1981); Pierson et al, (1983); Sondhal y Sharp (1977); Michaux-Ferriere, (1987 y 1989), tegumentos ovulares (Lanaud, 1981) y de tejido somático de anteras (Ascanio y Arcia, 1987).

Como método de multiplicación vegetativa la micropropagación por yemas presenta la ventaja de que permite la reproducción de individuos, en los cuales se espera mantener la identidad genética del material (Michaux-Ferriere, 1989).

En 1970, Staritsky, reportó la obtención de embriones somáticos derivados de callo obtenidos partir de fragmentos de tallo ortotrópico de C. canephora. Estos callos se

desarrollaron en un medio base de Linsmaier y Skoog, suplementado con 2,4-D ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y cinetina ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Para el caso de *C. arabica*, Sondhal y Sharp (1977), establecieron las condiciones adecuadas para la formación de embriones somáticos en callos producidos a partir de tejido foliar, lo cual se conoce como embriogénesis somática indirecta. (Amirato y Steward, 1971).

Yasuda et al., (1985), definieron la metodología para la obtención de embriones somáticos sin pasar por un estado de callo, (embriogénesis somática directa), empleando como medio basal el de Murashige y Skoog (1962), complementado con benciladenina (BA) ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

La embriogénesis somática de explantes de hoja en café, descrita por García y Méndez (1987), se inicia con el desarrollo del callo, el cual fue observado seis días después de establecido el cultivo. Este callo, color crema, comienza a proliferar sobre la superficie del corte y con el tiempo va tomando un color marrón oscuro, aparentemente a consecuencia de la oxidación de fenoles. Es en este callo donde se inicia la embriogénesis pasando por las formas típicas de embrión globular, acorazonado y torpedo (Dublin (1981); Peña (1983) y Sondhal y Sharp (1977)). El análisis microscópico de las secciones de hoja, revelaron que el callo se origina a partir del mesofilo, especialmente el esponjoso en la zona de la lámina, posteriormente la

proliferación de las células ocasiona la ruptura de la epidermis.

La presencia de auxinas y de citocininas en el medio de cultivo, es necesaria para la inducción del callo embriogénico y para la proliferación de embrioides (Ascanio y Arcia (1987); Peña (1983); Pierson et al (1983); Sondhal y Sharp (1977)). La técnica de embriogénesis somática se presenta como una alternativa para la producción de grandes cantidades de plantas en un tiempo relativamente corto, en relación a la propagación por métodos convencionales.

3. MICROINJERTACION

3.1. Uso del microinjerto in vitro

La injertación es la técnica que permite unir partes de tejido de individuos diferentes o no, de manera que continúen su desarrollo como un solo individuo. El injerto tendrá éxito si se establece una unión funcional de los componentes que culminará con el prendimiento (Moore, 1984a). A la parte superior de la nueva planta, se le llama púa, espiga o injerto, mientras que la parte que constituirá el sistema radical se conoce como patrón, pie o portainjerto.

El éxito del injerto depende de la compatibilidad entre la púa y el patrón. La propagación por injertos se realiza con variados fines, entre los que se consideran: a)

aprovechar el sistema radical de un patrón resistente a plagas y enfermedades y la sección aérea de un genotipo de buena producción; b) acelerar el crecimiento de plantas, ya que el injerto es más precoz que la planta producida por semilla; c) reparar partes dañadas de plantas atacadas por enfermedades o plagas; d) perpetuar clones o variedades, con el objetivo de conservar sus características de producción, calidad, época de cosecha, etc (Barahona, 1984; Garner, 1983).

Los injertos pueden ser establecidos entre: a) una planta de la misma especie, en cuyo caso se llaman autoinjertos o injerto autoplástico, b) entre plantas diferentes de la misma especie en cuyo caso se llaman injertos homoplásticos c) entre plantas de diferentes especies llamados injertos heteroplásticos (Kollmann y Glockkmann, 1985 , Kollmann et al, 1985).

La unión depende de dos causas principales: afinidad botánica entre los individuos a injertar (compatibilidad) y el estrecho contacto del cambium y otros tejidos de ambas partes.

Para lograr la unión patrón-injerto y el desarrollo de injertos compatibles es requisito la ocurrencia de los siguientes eventos, a) adhesión entre el injerto y el patrón, como causa directa del contacto del cambium de ambas

partes, b) transformación de tejido diferenciado adyacente a la zona de injertación, que es reactivado para favorecer la formación de callo y c) la conexión vascular a través de la zona, donde no existía procambium antes de realizar la injertación (Garner, 1983; Moore, 1984 a,b,c).

Con respecto a la microinjertación in vitro, esta fue una técnica originalmente desarrollada y aplicada para resolver el problema de virosis en los cítricos, en la cual se plantea la posibilidad de microinjertar in vitro ápices caulinares, sobre plántulas provenientes de semilla (Murashige et al, 1972; Navarro, 1975; Navarro et al, 1975; Paiva et al, 1988).

3.2. Uso del microinjerto en cítricos

Las enfermedades virales en los cítricos son responsables en conjunto de una disminución en la producción, provocando el decaimiento y pérdida de vigor en los árboles, además de reducir la cantidad de frutos. También impiden la utilización de portainjertos en la reproducción vegetativa (Murashige et al, 1972; Navarro et al, 1975). Para tratar de lograr plantas libres de virus en cítricos se han utilizado varios métodos: la temoterapia, la cual es útil para eliminar de ápices ciertos virus como la psoriasis y la tristeza, pero es totalmente ineficaz para eliminar la exocortis y la xiloporosis. El segundo método

estudiado, es el basado en el cultivo de plantas nucelares, el cual es conveniente para eliminar los virus mencionados anteriormente, sin embargo estas plantas presentan el problema de expresar sus caracteres juveniles, lo cual no las hace aptas para el mercado, al tener que esperar largos periodos hasta la producción. El tercer método que permite la obtención de plantas libres de virus, es la técnica de microinjerto de ápices sobre patrones provenientes de semilla. Mediante esta técnica se consigue eliminar los virus de la tristesa, psoriasis, xyloporosis, exocortis y stubborn, sin el problema de juvenilidad prolongada. Se ha aplicado en las especies Citrus sinensis, C. reticulata y C. limon (Navarro *et al*, 1975; Mosella y Ascui, 1984; Jeffree *et al*, 1983; Plastira, 1987; Shengeliya y Butenko, 1988).

3.3. Uso del microinjerto en otras especies

Esta técnica se ha aplicado en manzano donde permitió la limpieza del "stem groving virus" (SGV), lo cual no se lograba aplicando el tratamiento de termoterapia (Huang, y Millikan, 1980).

También se ha utilizado en damasco y vid, con los mismos propósitos (Mosella y Ascui, 1984a). En duraznero se logró obtener plantas libres de los virus "sharka" o "plum pox" y filtrados del "necrotic ring spot" (NRSV), Mosella *et al* (1980a), han tenido éxito en duraznero logrando eliminar

virus tales como el "prune dwarf" (PDV) y el "chlorotic leaf spot" (CLSV). También Gebhardt y Goldbach (1988) aplicaron esta técnica en especies del género Prunus. En esta investigación los estudios histológicos de la unión injerto-patrón, revelaron la formación de callo, citodiferenciación y la xilogénesis, responsable de la formación de las conexiones vasculares.

También se ha considerado al microinjerto como una herramienta adecuada para especies forestales tales como Pinus pinaster, Cedrella odorata, Eucaliptus sp y Sequoiadendron giganteum, Eucaliptus sp (Damiano et al, 1986; Tranvan y David, 1985 ; Djeda, 1986).

En el género Rosaceae el microinjerto fue utilizado para realizar la injertación entre dos de sus especies. En esta experiencia se aprovechó la cualidad de Cowania mexicana de fijar nitrógeno, debido a la simbiosis en sus raíces con una especie de actinomicete (Frankia sp) y se injertó con la especie Fallugia paradoxa que no posee esta cualidad. (Kyle et al, 1987).

En el cultivo del café, Guzmán (1989), realizó una experiencia, en la cual las plántulas microinjertadas presentaron crecimiento lo que hace suponer que las conexiones vasculares entre el injerto y el patrón se dieron.

Couturon y Berthaud, (1979), utilizaron el método de microinjertación en embriones de semillas no maduras o mal desarrolladas y su utilización también haría posible la recuperación de embriones provenientes de hibridaciones interespecífica.

Couturon, 1982; Velazco y Cueto, 1976, proponen un tipo de injerto in vivo, con el objetivo de rescatar haploides espontáneos de C. canephora provenientes de semillas poliembriónicas. Dada su reducida frecuencia de aparición y su dificultad de recuperación, la técnica permitiría injertar estos embriones provenientes de semillas inmaduras.

Más recientemente Aguilar (1990), en un trabajo que puede considerarse pionero, ha utilizado la técnica del microinjerto de embriones somáticos in vitro para solucionar problemas de micropropagación en cacao.

4. HISTOLOGIA DE LA UNION PATRON-INJERTO

La cohesión inicial del patrón y el injerto es mediada por alguna interacción entre las partes injertadas. Kollmann et al., (1985) sugieren que para el desarrollo del injerto debe darse un reconocimiento celular. Jeffrey y Yeoman, (1983), indican que la deposición y subsecuente polimerización de materiales en la pared celular

(posiblemente pectinas), que ocurre en respuesta de la lesión, es la base para la cohesión del injerto. Moore y Walker (1981a,b), indican que esta cohesión inicial es un evento pasivo que no está relacionado directamente con la compatibilidad.

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la compatibilidad-incompatibilidad de injertos, los cuales involucran el reconocimiento celular mutuo. El modelo propuesto por Jeffree y Yeoman,(1983), está basado en la disolución de las paredes celulares de células cercanas, con el subsecuente contacto de las plasmalemas de células de las diferentes partes del injerto. Parkinson et al (1987), sugiere que moléculas de proteína liberadas de las plasmalemas se combinan para formar un complejo con actividad catalítica llamado complejo de compatibilidad, que traerá como resultado la formación de un injerto exitoso. El modelo sugerido propone que: a) el complejo catalítico es formado después del contacto de las superficies injertadas, b) que la compatibilidad se consigue sólomente cuando el complejo es formado, c) que la incompatibilidad ocurre cuando el sistema catalítico no es generado, d) la difusión de las dos sustancias que forman el complejo catalítico pueden ser diferentes y cada una de las partes contribuye con un componente diferente al complejo y e) las moléculas de las dos sustancias pueden combinarse para formar estimulantes para la transcripción de ARN.

Es bien conocido que en los injertos de plantas superiores se realizan intercambios de varias sustancias entre el patrón y el injerto. La traslocación de sustancias entre células de ambas partes parece ser tanto simplástica como apoplástica. En el caso del simplasto, estas ocurren mediante plasmodesmos de ambas partes del sistema, los cuales se encuentran arreglados en pequeños grupos en áreas donde la pared celular es delgada interconectando continuamente los protoplastos de células adyacentes. Además participan conexiones citoplasmáticas entre células no relacionadas (Kollmann y Glockmann, 1985, Kollmann et al 1985). Se han observado dos tipos de plasmodesmos: a) plasmodesmos de interconexión continua entre células del patrón e injerto y b) plasmodesmos medios que atraviesan una parte de la pared celular sin conexión con otras células. Conexiones simples o ramificadas ocurren en ambos tipos de plasmodesmos y su distribución varía con las diferentes áreas de la interface del injerto. En la región del tejido vascular predominan las conexiones celulares continuas mientras que en el área de la corteza o médula predominan las discontinuas (Kollmann y Glockmann, 1985).

Recientemente se ha demostrado que un injerto compatible o incompatible es determinado por diferentes sistemas de reconocimiento celular como pudieran ser las superficies receptoras de glicoproteínas, lectinas, etc

(Martínez et al, 1981; Jeffree y Yeoman, 1983), los cuales son el disparador para hacer un injerto exitoso o no.

Jeffree y Yeoman, (1983), han sugerido que aunque el plasmodesmata no esté en contacto, un intercambio de moléculas portadoras de mensajes tiene lugar entre células cercanas lo que hace que los tejidos del patrón e injerto incrementen su actividad mitótica, dando como resultado la formación del callo, el cual es el paso siguiente en la constitución de un injerto exitoso. Esta proliferación de callo se da como resultado de activas divisiones celulares en todos los planos, principalmente en el periclinal, del parénquima medular, tanto del patrón como del injerto.

El suceso posterior al callo, es la diferenciación vascular, la cual es considerada como el evento crítico en la formación de injertos exitosos, ya que hace posible que el flujo de nutrientes y agua (continuidad simplástica y apoplástica) se restablezca, proporcionando además el sostén mecánico para el sistema establecido (Jeffree y Yeoman, 1983; Parkinson et al., 1987).

Las conexiones vasculares son el evento final que ocurre en injertos típicamente compatibles, en el cual la diferenciación de células del callo y la activación del cambium vascular favorece la formación de nuevos elementos vasculares (floema y xilema) (Gebhardt y Golbach, 1988). En el caso del xilema, su desarrollo es acrópeto y conforme se

va diferenciando, aparecen puntuaciones y placas perforadas, simples o compuestas, mientras el floema se interconecta mediante poros cribosos en áreas cribosas (Kollmann et al., 1985). La extensión y polaridad de la diferenciación vascular según Gebhardt y Goldbach (1988), se explica en respuesta a la liberación y transporte basípeto de auxinas provenientes del ápice vegetativo movilizado por el sistema vascular preexistente. Esta fitohormona proporciona el estímulo necesario para la formación del nuevo sistema vascular (Jeffree y Yeoman, 1983; Sachs, 1981) y estudios realizados por Sachs (1981), demostraron que auxinas aplicadas sobre una masa de callo, indujeron la diferenciación vascular, mientras que la ausencia de un flujo de auxinas en áreas adyacentes al tejido vascular, -por ejemplo, médula y corteza- correlaciona positivamente con la ausencia de rediferenciación vascular en estas áreas.

III. MATERIALES Y METODOS

1. LOCALIZACION DEL ESTUDIO

La presente investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, durante el período de octubre de 1989 a noviembre de 1990.

2. MATERIAL VEGETAL

Los materiales vegetales (frutos y hojas de café), se obtuvieron de la colección de café del Banco de Germoplasma del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Como portainjertos se utilizaron embriones sexuales provenientes de frutos maduros de polinización libre y embriones somáticos directos provenientes de explantes de hoja, de la especie canephora cv. Robusta. Como injertos se emplearon embriones sexuales de las especies arabica cv. Caturra y canephora cv. Robusta provenientes de frutos maduros de polinización libre, así como embriones somáticos de canephora cv. Robusta provenientes de explantes de hoja.

En cada caso, el origen de los materiales fue una sola planta de cada especie, seleccionada previamente.

3. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

3.1. Medio de cultivo para embriones sexuales de Coffea canephora cv. Robusta usados como patrón.

Se empleó el medio Murashige y Skoog (1962) con los siguientes suplementos: tiamina ($4,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), mio-inositol ($100,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), glicina ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), ácido nicotínico ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), piridoxina ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), caseína hidrolizada ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), bencil adenina ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), Fe EDTA ($5,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), cisteína ($40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) y Gelrite ($2,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). El pH del medio se ajustó a 5,6 con NaOH 0.1 N antes de autoclavar. Se vertió 10 ml de medio por frasco, los cuales fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos, a una temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y una presión de $1,2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$.

3.2. Medio para inducción de embriones somáticos de Coffea canephora cv. Robusta usados como patrón.

Se utilizó como medio básico, el de Yasuda (Yasuda, et al, 1985), el cual contiene los macro y microelementos de Murashige y Skoog al 25% y 50%, respectivamente (Murashige y Skoog, 1962). Además a este medio se le adicionaron los siguientes suplementos: KH_2PO_4 ($42,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), tiamina ($10,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), mio-inositol ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), ácido nicotínico ($1,0$

mg·l⁻¹), piridoxina (1,0 mg·l⁻¹), bencil adenina (1,0 mg·l⁻¹), Fe EDTA (2,5 mg·l⁻¹), sacarosa (30 g·l⁻¹) y Gelrite (1,75 g·l⁻¹), una vez incorporados todos los componentes se ajustó el pH a 5,6 con NaOH 0.1 N, y se utilizó igual temperatura de esterilización que en el caso anterior.

3.3. Medio para el desarrollo de embriones somáticos de Coffea canephora cv. Robusta usados como patrón.

Se utilizó como medio base el de Murashige y Skoog (1962), al 50% como fuente de macro y microelementos. Además se le adicionó como suplementos: tiamina (100,0 mg·l⁻¹), mio-inositol (100,0 mg·l⁻¹), ácido nicotínico (1,0 mg·l⁻¹), piridoxina (1,0 mg·l⁻¹), bencil adenina (1,0 mg·l⁻¹), Fe EDTA (2,5 mg·l⁻¹), extracto de malta (200 mg·l⁻¹), caseína hidrolizada (100 mg·l⁻¹) y sacarosa (30 g·l⁻¹). Una vez agregados todos los componentes, el pH del medio se ajustó a 5,6 con NaOH 0,1N y se vertió 50 ml de medio en erlenmeyers con capacidad para 250 ml, los cuales habían sido esterilizados de la misma forma que los otros medios.

4. OBTENCION DE PORTAINJERTOS E INJERTOS

4.1. Patrones provenientes de embriones sexuales

Los embriones se obtuvieron de frutos maduros de Coffea canephora, los cuales se desinfectaron de la siguiente manera:

Los frutos se lavaron con agua del grifo por 10 minutos, luego fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de calcio al 10% con tres gotas de Tween 80 por 20 minutos. Se lavaron tres veces con agua destilada esteril, y posteriormente se sumergieron en hipoclorito de calcio al 8% con tres gotas de Tween 80 por 15 minutos. Nuevamente se lavaron tres veces con agua destilada esteril. Los frutos se colocaron en un plato petri dentro de la cámara de flujo laminar.

Para aislar el embrión de la semilla se procedió de la siguiente manera: A cada semilla se le realizó un corte triangular superficial (4 a 5 mm) en su cara convexa, con un escalpelo. Una vez localizado el embrión, se le separó del endospermo y se colocó en una solución de cisteina-HCl a $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ durante cinco minutos para evitar su oxidación. Posteriormente fue pasado al tubo de ensayo, el cual se flameó y se cerró herméticamente. Los embriones ya envasados se transfirieron a una cámara de crecimiento con una temperatura de $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el día y de $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, en la noche, con un fotoperíodo regulado de 12 horas y una

intensidad lumínica de 2000 lux proporcionados por lámparas fluorescentes.

4.2 Patrones provenientes de embriogénesis somática directa

Para inducir estos embriones se utilizaron explantes de hoja de Coffea canephora y se procedió según la metodología descrita por Berthouly y Guzmán, (1987). Las hojas se desinfectaron de la siguiente manera: Se lavaron con agua del grifo por 10 minutos, Se sumergieron en una solución de Benlate ($1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), por 30 minutos. Se lavaron tres veces con agua del grifo. Posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio al 10% con tres gotas de Tween 80 por 30 minutos. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Después se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio al 8% con tres gotas de Tween 80 por 20 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada esteril.

En la cámara de flujo laminar se cortaron secciones de hoja de $1,0 \text{ cm}^2$. Posteriormente se colocaron esos trozos en el medio de cultivo, a razón de uno por tubo de ensayo. Los trozos de hoja se llevaron a una cámara de crecimiento con una temperatura durante el día de $26\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y de $24\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ en la noche con luz indirecta. En estas condiciones se mantuvieron por espacio de 16 semanas. Una vez que los embriones somáticos alcanzaron el estado globular fueron transferidos

a recipientes con medio líquido en agitación para favorecer su desarrollo. Este período tuvo una duración de cinco semanas. Posteriormente, los embriones somáticos desarrollados fueron transferidos a recipientes a razón de uno por tubo de ensayo, que contenían el mismo medio de cultivo empleado para el desarrollo de los embriones sexuales. El período de desarrollo para lograr su injertación fue de 15 semanas.

4.3. Preparación de los portainjertos

a) Los patrones provenientes de embriones sexuales de C. canephora cv. Robusta se injertaron en edad de ocho y diez semanas posteriores a la separación de estos del tejido materno. b) Los patrones provenientes de embriones somáticos de C. canephora cv. Robusta se injertaron a las 36 semanas posteriores a su inducción.

5. MICROINJERTACION

5.1. Tratamientos de microinjertación

Los tratamientos aplicados se resumen en los cuadros 1 y 2. Sobre los patrones provenientes de embriones cigóticos y somáticos de canephora cv. Robusta, se utilizaron injertos de embriones cigóticos maduros de canephora cv. Robusta, de arabica cv. Caturra y embriones somáticos de canephora cv. Robusta. Los embriones utilizados como injertos fueron

injertados en edades de cero y una semanas después de separados del tejido materno.

Para su utilización en edad de una semana los embriones fueron colocados en el mismo medio utilizado para favorecer el desarrollo de los embriones sexuales que se usaron como patrón.

Cuadro 1. Microinjertos, según la edad del patrón e injerto, utilizando embriones cigóticos de Coffea canephora y Coffea arabica.

Patrón Especie/Edad*	Injerto Especie/Edad**
<u>Coffea canephora</u> (8 semanas)	<u>Coffea canephora</u> (0 semanas)
<u>Coffea canephora</u> (8 semanas)	<u>Coffea canephora</u> (1 semana)
<u>Coffea canephora</u> (10 semanas)	<u>Coffea canephora</u> (0 semanas)
<u>Coffea canephora</u> (10 semanas)	<u>Coffea canephora</u> (1 semana)
<u>Coffea canephora</u> (8 semanas)	<u>Coffea arabica</u> (0 semanas)
<u>Coffea canephora</u> (8 semanas)	<u>Coffea arabica</u> (1 semana)
<u>Coffea canephora</u> (10 semanas)	<u>Coffea arabica</u> (0 semanas)
<u>Coffea canephora</u> (10 semanas)	<u>Coffea canephora</u> (1 semana)

* Las edades de los patrones de C. canephora. corresponden a embriones cigóticos que se encuentran en frutos maduros de alrededor de 290 días de edad, los cuales se extrajeron y se les dió un desarrollo de ocho y diez semanas en el medio de cultivo antes de injertarlos.

** Las edades de los injertos de C. canephora corresponden a embriones cigóticos de frutos maduros de alrededor de 290 días, los cuales se microinjertaron inmediatamente en el caso de 0 semanas, o se desarrollaron durante una semana antes de injertarlos. Para el caso de C. arabica, los injertos corresponden a embriones cigóticos de frutos de alrededor de 240 días, a los cuales se les dió el mismo manejo anterior antes de proceder a realizar la microinjertación.

Cuadro 2. Microinjertos utilizando como patrones, embriones cigóticos de Coffea canephora y como injertos embriones cigóticos y somáticos de Coffea arabica y Coffea canephora.

Patrón Especie/Origen/Edad*	Injerto Especie/Origen/Edad**
<u>Coffea canephora</u> Embrión somático (36 semanas)	<u>Coffea canephora</u> Embrión cigótico (0 semanas)
<u>Coffea canephora</u> Embrión somático (36 semanas)	<u>Coffea arabica</u> Embrión cigótico (0 semanas)
<u>Coffea canephora</u> Embrión somático (36 semanas)	<u>Coffea canephora</u> Embrión somático (36 semanas)

* Las edades de los patrones de C. canephora. corresponden a embriones somáticos de 36 semanas de desarrollo en el medio de cultivo, antes de proceder a la microinjertación.

** Las edades de los injertos de C. arabica corresponden a embriones cigóticos de frutos maduros de alrededor de 240 días, los cuales se microinjertaron inmediatamente de extraídos del fruto. Para el caso de C. canephora, los injertos corresponden a embriones somáticos de 36 semanas de desarrollo en el medio de cultivo, antes de proceder a la microinjertación.

5.2. Realización del microinjerto

Fue utilizada una variación del injerto hipocotiledonar usado en injertos de café in vivo descrita por Reyna, (1980).

Los patrones se extrajeron del tubo de ensayo y se procedió a realizar el injerto. Estos se decapitaron a nivel del hipocótilo, donde se practicó un corte longitudinal con un bisturí esteril, para facilitar la inserción de los embriones cigóticos que se utilizaron como injertos.

A los embriones usados como injertos se les practicó un corte a bisel en ambos lados, de tal forma que pudiese empatar con el portainjerto o patrón. Posteriormente, se insertó en la incisión longitudinal practicada al portainjerto y para facilitar la unión patrón-injerto se utilizaron cintas de papel aluminio esteril, con las que se envolvió la zona de injertación (Aguilar, 1990).

En caso necesario a las plántulas injertadas se les realizó una poda de raíces para permitir su colocación nuevamente en el tubo de ensayo.

Posteriormente a la microinjertación, las plántulas se colocaron nuevamente en las cámaras de crecimiento bajo las condiciones referidas anteriormente.

6. HISTOLOGIA

Con el objetivo de estudiar los eventos histológicos de la unión patrón-injerto, se fijaron cinco muestras de todos los microinjertos en las diferentes etapas de su desarrollo (2,4,6,8,10,12,14,22,30,45 y 60 días después de injertados), las cuales comprendían la zona de unión injerto-patrón.

Para los respectivos estudios, se procedió de la siguiente manera: las muestras fueron infiltradas en una solución de agar al 2%, esto con el fin de evitar el desprendimiento en etapas tempranas de la unión patrón-injerto por efecto de la manipulación. Seguidamente fueron colocadas en la solución fijadora F.A.A (Formalina, Alcohol, Acido acético) por 24 horas, aplicando vacío por 15 minutos y la adición de una gota de Tween 80. Posteriormente, las muestras se deshidrataron progresivamente, con una batería ascendente de alcohol etílico (70-100 °). El proceso de impregnación se realizó 24 horas más tarde haciendo uso de tolueno.

Seguidamente, las muestras fueron infiltradas en bloques de Paraplast plus y se efectuaron cortes con un micrótopo de rotación a 10 um de grosor. Los cortes montados en portaobjetos fueron teñidos mediante la técnica de coloración cuádruple, con safranina, cristal violeta, "fast green" FCF y "orange" G.(CIRAD, 1989). Finalmente se

pusieron los cubreobjetos y se procedió a su observación y toma de fotografías al microscopio de luz.

IV. RESULTADOS

1. MORFOLOGIA E HISTOLOGIA DE LAS DIFERENTES COMBINACIONES MICROINJERTADAS.

1.1. Patrones de embriones cigóticos de C. canephora en edades de ocho y diez semanas.

Los embriones de C. canephora de ocho y diez semanas usados como patrones presentaron a la altura del hipocotilo un diámetro aproximado de dos milímetros. En este momento las plántulas mostraron su primer par de hojas verdaderas y su raíz principal inició el desarrollo. Se escogieron portainjertos con eje erecto y con un grosor proporcional al del injerto. Mediante cortes histológicos en secciones transversal y longitudinal del hipocotilo, se encontraron los siguientes tejidos: cutícula hialina en la cual se observa una deposición de materiales lipídicos la que fue mayor en las plántulas de diez semanas de edad que en las de ocho. La epidermis se observó claramente diferenciada dentro de los demás tejidos del hipocotilo y consta de una sóla capa de células de paredes gruesas, caracterizadas por su forma cuadrada en sección transversal y un poco más rectangulares en sección longitudinal. La corteza constituida en su totalidad por tejido parenquimático, se caracteriza por presentar varias capas de células grandes en forma de polígono en su sección transversal. Sus paredes celulares son delgadas y los núcleos se presentan claramente visibles. Los espacios intercelulares de naturaleza

esquizógena fueron muy evidentes y en algunas células de la periferia de la médula comienza a notarse la deposición de pared celular de naturaleza secundaria. En los patrones de diez semanas de edad el anillo vascular presentó una diferenciación más evidente que en los patrones de ocho semanas, lo que fue constatado por la presencia de fibras libriformes y elementos conductores propios del xilema y floema secundarios. En el caso del xilema los elementos conductores observados están constituidos por elementos de los vasos anulares, helicoidales, reticulados, escalariformes y puntiados. Los dos últimos tipos presentaron placas perforadas simples en sus paredes terminales y puntuaciones alternas en sus paredes laterales. En lo que respecta al floema se observó elementos de los tubos cribosos, los que mediante las áreas cribosas interconectan sus protoplastos con elementos cribosos contiguos, en ubicación tanto lateral como vertical.

1.2. Patrones de embriones somáticos de C. canephora de 36 semanas de edad.

A esta edad las plántulas provenientes de embriones somáticos fueron similares morfológicamente a las plántulas provenientes de embriones cigóticos. El estudio histológico del hipocotilo mostró la misma disposición de tejidos observados, similar a la que se encontró en el estudio histológico de los embriones cigóticos. Solamente en el sistema vascular se observó diferencia con respecto a los

anteriores. Se presenta un sistema vascular más diferenciado y por lo tanto más eficiente en conducción.

1.3. Morfología e histología de los injertos de C. canephora y C. arabica en edades de cero y una semana.

Los embriones injertados de C. canephora presentaron una longitud entre 4,6 y 5,6 milímetros y un diámetro aproximado entre 1 y 2 milímetros, mientras que los de C. arabica son de menor tamaño (4,0 - 4,5 mm) y el mismo grosor (medidas obtenidas como rangos de medición de 20 embriones). Los embriones recién aislados en ambas especies, mostraron una coloración blanco traslúcida y consistencia suave, mientras que los embriones con una semana en el medio de cultivo presentaron una coloración verde y su consistencia es más fuerte. La composición histológica del hipocotilo de estos embriones fue similar al de las plántulas de ocho semanas de edad usadas como patrón. Sin embargo el sistema vascular fue ontogenéticamente menos desarrollado. En los embriones de cero semanas de edad se encontró un anillo meristemático en el que se observa bandas de cambium fascicular unidas entre sí por bandas de cambium interfascicular. En los embriones de una semana de edad comienzan a diferenciarse en mayor grado elementos vasculares en el anillo meristemático, observándose en el xilema secundario fibras libriformes, así como elementos

traqueales, constituidos básicamente por elementos de los vasos con engrosamientos en las paredes laterales de tipo escalariforme y reticulado. Estos elementos conductores se observan mezclados con tejido vascular de naturaleza primaria (elementos de los vasos anulares y helicoidales). El floema se observó formado por tubos cribosos y parénquima floemático.

Las combinaciones de microinjertación realizadas permitió observar diferentes periodos en el tiempo en relación al desarrollo de los microinjertos. Todas las microinjertaciones culminaron con éxito, presentándose un prendimiento del 100% en todas las combinaciones ensayadas.

2. ESTUDIO HISTOLOGICO DEL MICROINJERTO DE CAFE

Los eventos morfológicos se observaron en forma similar para todas las combinaciones de microinjertación utilizadas. Tanto entre embriones cigóticos como entre embriones somáticos y cigóticos (usados como patrón e injerto), estos ocurren cronológicamente a diferentes velocidades de acuerdo con la especie, edad y origen de los embriones microinjertados (Cuadro 3).

No 3 Eventos en las microinjertaciones realizadas Días al inicio de su ocurrencia

Evento	Inicio reactivac	Presencia: almidón	Inicio divisiones periclinales	Inicio formación de callo	Callo completo	Diferencia: Médula completa	Contacto: tejido vasc en interfase:neoformado	Unión vascular efectiva		
No de microinjertación	celular	Patrón	Injerto	callo	del injerto	preexistente				
canephora\C canephora Injerto cigótico: 0 semanas Patrón cigótico: 10 semanas	2	4-final	6	10	10	14	14	14	30	60
canephora\C canephora Injerto cigótico: 1 semanas Patrón cigótico: 10 semanas	4	4-final	8	8	12	14	14	22	30	60
arabica\C canephora Injerto cigótico: 0 semanas Patrón cigótico: 10 semanas	4	4-final	10	10	8	12	12	14	30	60
arabica\C canephora Injerto cigótico: 1 semanas Patrón cigótico: 10 semanas	2	2-final	6	8	8	12	12	14	30	60
canephora\C canephora Injerto cigótico: 0 semanas Patrón cigótico: 8 semanas	2	2-final	6	8	8	12	12	12	30	45
canephora\C canephora Injerto cigótico: 1 semanas Patrón cigótico: 8 semanas	2	6-final	4	6	6	12	10	10	22	45
arabica\C canephora Injerto cigótico: 0 semanas Patrón cigótico: 8 semanas	2	2-final	6	6	8	12	14	22	45	60
arabica\C canephora Injerto cigótico: 1 semanas Patrón cigótico: 8 semanas	4	4-final	6	8	6	10	14	10	45	60
arabica\C canephora Injerto cigótico: 0 semanas Patrón somático: 36 semanas	5	10-final	10	10	10	15	15	15	25	30
canephora\C canephora Injerto cigótico: 0 semanas Patrón somático: 36 semanas	5	20-final	10	10	15	20	20	25	30	35
canephora\C canephora Injerto somático: 36 semanas Patrón somático: 36 semanas	4-5	10-final	10	10	15	20	20	20	20	20

Además de los eventos referidos en el Cuadro 3, se observó la formación de una capa de contacto (Fig. 1), en la cual la capa de células de ambos tejidos lesionados por el corte del patrón e injerto, se oxidan, mueren y necrosan. Posteriormente y conforme avanza la edad del injerto esta capa necrótica es reabsorbida por el sistema. En este tiempo, (Cuadro 3), las células cercanas a la zona de corte del patrón e injerto, sufren una reactivación que es expresada por un aumento en la actividad del núcleo y nucleolo, los que al ser el centro de control celular se hacen más visibles, presentan una forma esférica y se preparan para el proceso mitótico. La ocurrencia de este evento fue común en todos los casos y se observó entre los dos y cinco días dependiendo de la microinjertación realizada.

En todas las combinaciones ensayadas, tanto en el patrón como en el injerto, se observó la acumulación de almidón (Fig. 2). La aparición de éste tuvo lugar entre el segundo y sexto día posterior a la microinjertación y se mantuvo hasta el final del proceso. Al utilizar embriones somáticos como patrón, el almidón aparece en forma más tardía, desde el día diez hasta el final de la unión vascular (Cuadro 3). En la mayoría de los casos, el almidón se presentó como granos, en los cuales fue posible distinguir una estratificación de capas concéntricas,

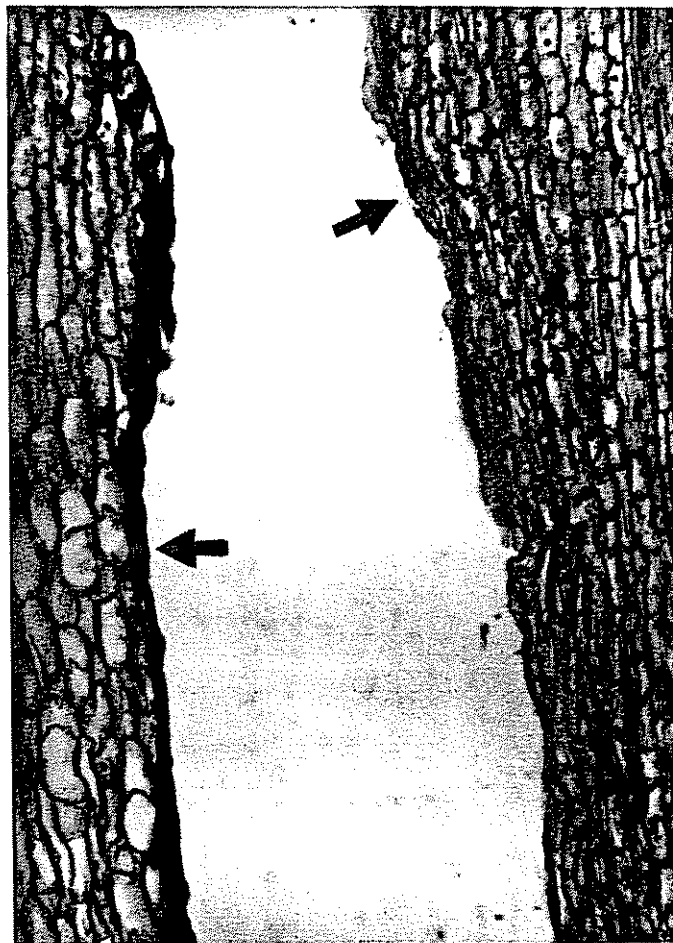


Figura 1. Corte longitudinal a los dos días de cultivo, mostrando las superficies de contacto de ambos tejidos lesionados (médula en el patrón y corteza en el injerto), del microinjerto de embriones cigóticos de *C. canephora* de 10 semanas de edad usados como patrón, con embriones de *C. canephora* de una semana, usados como injerto (X 450).



Figura 2. Corte longitudinal a los 30 días de cultivo, mostrando la acumulación de almidón en la médula, corteza y células perivasculares, en el microinjerto de embriones cigóticos de C. canephora de ocho semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de C. arabica de cero semanas de edad, usados como injerto (X 900).

observándose básicamente en la región medular y cortical cerca de las células perivasculares. La acumulación de este polisacárido de reserva se presentó durante todo el proceso, o sea hasta que se dió la unión vascular del sistema y el microinjerto concluyó con éxito.

Seguidamente se presentó la cohesión del sistema patrón-injerto (Fig. 3). Este evento, que se inició al entrar en contacto las superficies lesionadas del patrón y del injerto, se observó entre los seis y diez días siguientes a la microinjertación, dependiendo de la combinación de componentes usados en el proceso. Después de la cohesión, la lesión de los tejidos involucrados en el proceso estimuló la proliferación de células de callo sobre las heridas (Fig. 4). Este tejido está constituido de masas parenquimatosas, las que se formaron a partir de emisiones celulares en tejidos parenquimáticos de la corteza y la médula, según sea el tejido lesionado por el corte. Las observaciones demuestran que para este caso, el callo prolifera como resultado primero de divisiones en el plano periclinal y luego en los planos anticlinal y oblicuo, principalmente del parénquima medular del patrón y del parénquima cortical del injerto. El inicio de las divisiones periclinales en el patrón ocurrió entre el sexto y décimo día después de realizada la microinjertación, mientras que en el injerto ocurrió antes o a lo sumo igual que en el patrón (Cuadro 3). El tiempo de ocurrencia de estas

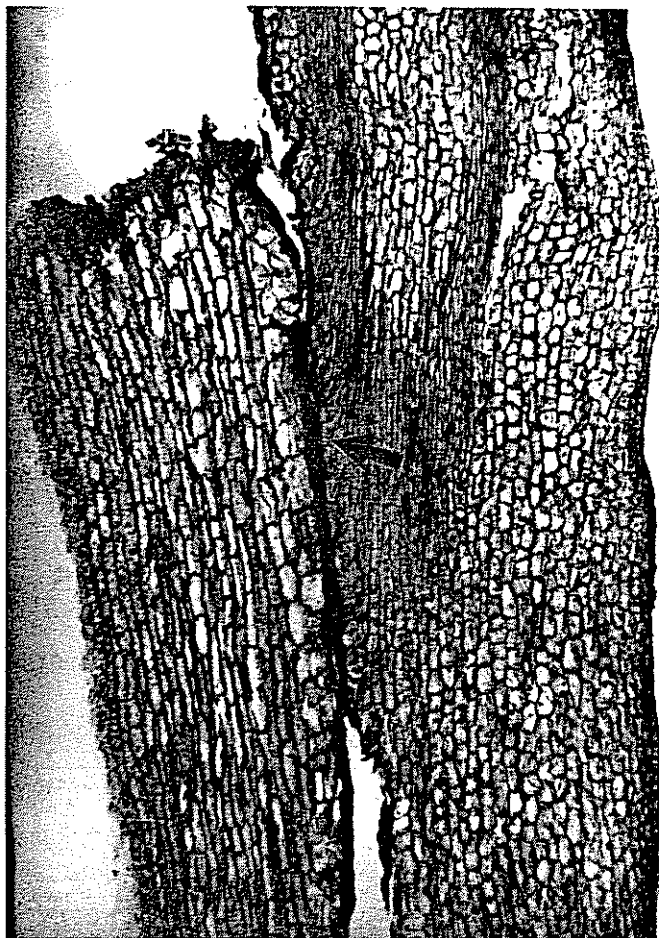


Figura 3. Corte longitudinal a los diez días de cultivo, mostrando el inicio de la cohesión del sistema, en el microinjerto de embriones cigóticos de C. canephora de 10 semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de C. arabica de cero semanas de edad, usados como injerto (X 180).

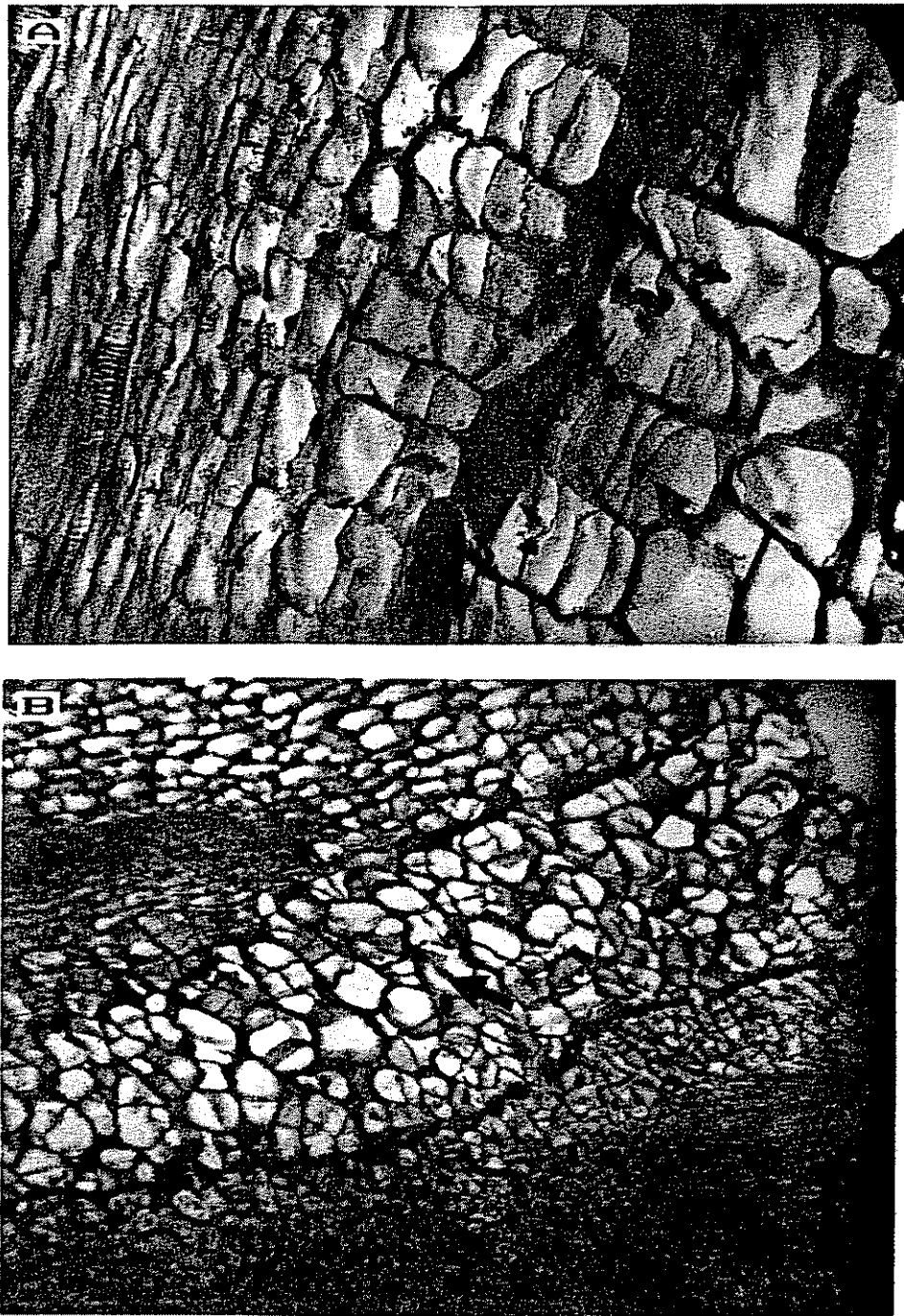


Figura 4. A) Corte longitudinal a los 12 días de cultivo, mostrando el inicio de las divisiones celulares, en todos los planos que darán origen al callo, en el microinjerto de embriones cigóticos de *C. canephora* de ocho semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de *C. canephora* de cero semanas de edad, usados como injerto (X 900). B) Corte longitudinal del mismo microinjerto mostrando el callo formado en la interfase del injerto (X 450).

divisiones celulares dependió de la edad, origen y especies microinjertadas. Cuando se utilizaron embriones somáticos como patrones, el inicio de este evento ocurrió en todos los casos a los diez días, al igual que en los embriones que se usaron como injertos (Cuadro 3).

Aparentemente, la formación del callo, se inicia primero al microinjertar embriones cigóticos de C. arabica sobre C. canephora que al microinjertar embriones cigóticos de C. canephora sobre C. canephora. Algo similar ocurrió al microinjertar embriones cigóticos de C. arabica sobre patrones somáticos de C. canephora. Sin embargo, estas diferencias en el tiempo de inicio de la formación del callo, no parecen ser importantes ya que en todos los casos el proceso concluye con la unión vascular exitosa entre el patrón e injerto (Cuadro 3). El callo también proporcionó las células que lograron el restablecimiento de la región medular lesionada del patrón (Fig. 5). La ocurrencia de dicho evento se observó entre los 10 y los 20 días dependiendo de la combinación de especies, origen y edad microinjertadas (Cuadro 3). Es importante anotar que el tiempo de restablecimiento de la médula dependió probablemente de la longitud de la incisión inicial practicada al patrón para insertar el injerto. Con respecto al uso de patrones somáticos, se observó que tanto el callo como la médula, se completan más rápidamente en el tiempo, cuando se microinjertaron embriones cigóticos de C. arabica

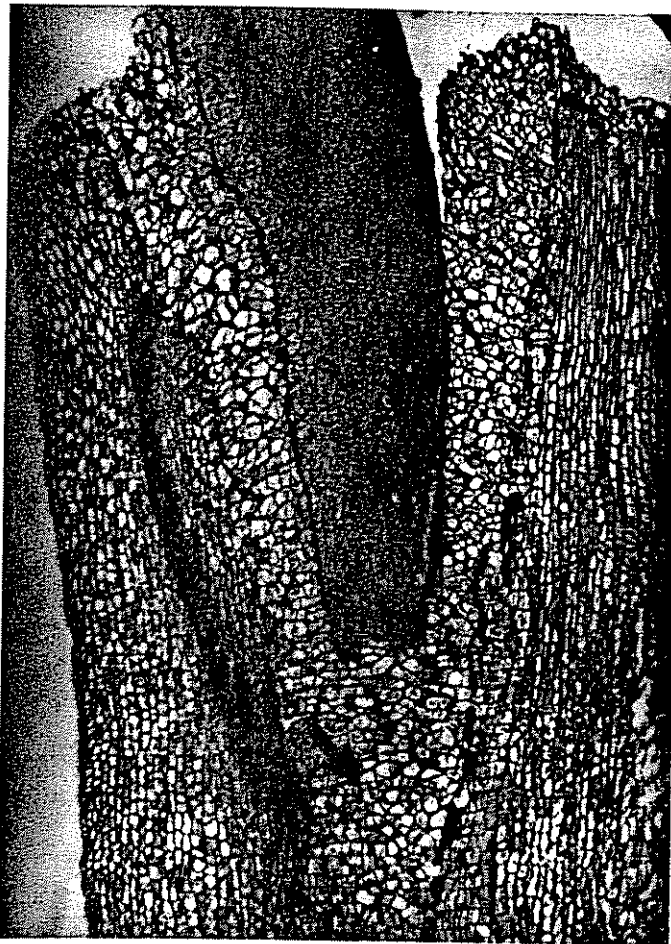


Figura 5. Corte longitudinal a los 22 días de cultivo, mostrando la completa regeneración de la médula del patrón, en el microinjerto de embriones cigóticos de *C. canephora* de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de *C. canephora* de cero semanas de edad, usados como injerto (X 180).

que cuando se injertaron embriones cigóticos o somáticos de *C. canephora* (Cuadro 3). En el callo se observó el inicio de la formación de una zona cambial a partir de la cual se diferenció progresivamente el tejido vascular. En la zona de interfase del injerto, se observaron células del xilema entre los 10 y 22 días, dependiendo de la combinación utilizada en el proceso de microinjertación (Cuadro 3, Fig 6). En todas las microinjertaciones se observó también en la zona cambial, la aparición de elementos conductores y no conductores del floema y xilema. Este tejido dió origen primeramente a elementos vasculares aislados y posteriormente a verdaderos centros de formación y diferenciación de tejido vascular. Se observó que las células que primero comienzan a diferenciarse son las que se encuentran cerca del tejido vascular existente. Estas células se fueron ensancharon gradualmente hasta adquirir la forma característica de elementos maduros del xilema y floema los que se conectaron poco a poco entre sí (Fig. 7), y más tarde al sistema vascular existente del patrón y del injerto, lo que tiene lugar entre los 22 y 45 días, de acuerdo con la combinación microinjertada (Cuadro 3). Se observó que el tejido cambial neoformado produce en forma centripeta el xilema secundario y en forma centrífuga el floema secundario. El xilema secundario observado en la unión vascular inicial se observó constituido básicamente por elementos de los vasos con engrosamientos secundarios en las paredes laterales de tipo escalariforme y punteada,



Figura 6. Corte longitudinal a los 22 días de cultivo, mostrando el inicio de la diferenciación vascular a partir de la zona cambial neoformada en la interfase del microinjerto de embriones cigóticos de *Q. canephora* de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de *Q. canephora* de cero semanas de edad (X 900).



Figura 7. Corte longitudinal a los 22 días de cultivo, mostrando la conexión entre los elementos vasculares formados del callo. El microinjerto corresponde a embriones cigóticos de *C. canephora* de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de *C. arabica* de una semana de edad (X 450).

tanto alternas como opuestas. En su sección terminal se observó que las placas perforadas simples, sirven de unión con otros elementos de los vasos en la formación de los vasos propiamente dichos que son las estructuras especializadas en la conducción de agua. Además se encontraron fibras libriformes intraxilares, que no son conductoras y su especialización obedece a funciones mecánicas de soporte. Estas células se caracterizan por ser largas, puntiagudas, de paredes secundarias gruesas, con puntuaciones simples. También fueron observadas fibrotraqueidas, que son un estadio o tipo intermedio entre los traqueidas y las fibras libriformes, con puntuaciones rebordeadas en sus paredes laterales. También fue observado parénquima acompañando al xilema. Con respecto al floema secundario, se observaron elementos de los tubos cribosos, que se conectan entre sí mediante placas cribosas para formar los tubos cribosos.

El proceso de reconexión vascular efectivo, que hace que el injerto culmine con éxito se observó entre los 25 y 60 días después de realizada la microinjertación, dependiendo de la combinación entre patrón e injerto usado (Cuadro 3, Fig. 8).

La unión vascular efectiva se realizó más pronto al utilizar como patrón, embriones somáticos de C. canephora (30 a 35 días). Además, el usar embriones somáticos de la misma edad



Figura 8. Corte longitudinal a los 60 días de cultivo. Se observa la conexión vascular continua entre el tejido vascular del patrón y el injerto, en el microinjerto de embriones cigóticos de *C. canephora* de diez semanas de edad usados como patrón, con embriones cigóticos de *C. arabica* de una semana de edad (X 450).

como injerto, se logra la unión efectiva a los 25 días luego de realizada la microinjertación, lo que representa aproximadamente la mitad del tiempo en que se realizaron en las demás combinaciones ensayadas (Cuadro 3).

V. DISCUSION

1. MICROINJERTO

El microinjerto utilizado consistió en decapitar los patrones al nivel del hipocotilo, mientras que a los embriones usados como injertos se les practicó un corte a bisel en ambos lados de tal forma que pudiese "empatar" de manera adecuada con el portainjerto o patrón. La zona de injertación se envolvió con una cinta de papel aluminio estéril lo cual es recomendado por Aguilar, (1990), como una forma de facilitar el proceso de unión patrón-injerto.

En el caso de café los portainjertos alcanzaron un desarrollo adecuado para la microinjertación a las ocho semanas. Navarro et al, (1975), en microinjertos de cítricos encontró que la edad óptima de injertación de los patrones era de dos semanas. Posiblemente en café, los portainjertos presentan un desarrollo más lento, por lo que se debió esperar más tiempo para proceder a su injertación.

Se encontró la misma respuesta para el desarrollo de los microinjertos al utilizar patrones cigóticos de ocho y diez semanas y somáticos de 36 semanas, los cuales se caracterizaron por un buen eje vertical y un sistema de raíces en crecimiento activo. Esta respuesta similar a la microinjertación pudo deberse a la presencia en todos los patrones de tejidos apropiados ontogenéticamente que

favorecieron la cicatrización y la unión vascular. Además, la afinidad botánica entre las especies ensayadas, hace que el origen cigótico o somático de los embriones no resulte importante, por lo que este no fue un factor que afectara la unión vascular efectiva y por ende el éxito del injerto. Los tejidos encontrados en los embriones de ambos orígenes fueron los mismos, lo que supondría no encontrar problemas de compatibilidad. Los microinjertos realizados en este ensayo permanecieron en crecimiento activo, no importando la combinación ensayada, lo cual se debió a que las conexiones vasculares fueron completas. Guzmán (1989), encontró un comportamiento similar al microinjertar embriones de café, sin embargo el crecimiento de los microinjertos fue más lento, lo que fue atribuido a que las conexiones vasculares no se completaron posiblemente debido a que las plántulas usadas como patrón presentaron diferencia de grosor con respecto a la yema.

La técnica ofrece la posibilidad de microinjertar in vitro embriones cigóticos y somáticos de ambas especies de café, donde la compatibilidad de estos microinjertos no se ve afectada por la edad del patrón al momento de injertar, por su origen, o por el genotipo y edad del injerto.

2. ESTUDIO HISTOLOGICO DE LA UNION PATRON-INJERTO

La afinidad de las especies microinjertadas permitió el éxito logrado en todos los tratamientos evaluados, demostrando la posibilidad que ofrece esta técnica para el desarrollo de microinjertos de café. Como menciona Kollmann y Glockmann (1985), el éxito de una unión permanente, al realizar un injerto, depende de la afinidad botánica entre los individuos a injertar y del estrecho contacto que se establezca entre los cambia u otros tejidos de naturaleza meristemática de ambas partes. Los eventos anatómicos observados en el desarrollo de la microinjertación ocurren en un tiempo máximo de 60 días. Moore (1984a), y Garner (1983), mencionan como condición básica para lograr una verdadera unión patrón-injerto, la ocurrencia de tres eventos secuenciales: a) la adhesión entre el injerto y el patrón, como causa directa del contacto de los cambia de ambas partes; b) la transformación del tejido diferenciado adyacente a la zona de injertación, que es reactivado para favorecer la formación del callo, probablemente como respuesta a estímulos hormonales o físicos y c) la diferenciación vascular a partir de las células del callo, con la formación de tejido vascular de unión entre los tejidos existentes, donde no existía procambium o cambium antes de realizar la injertación. Los eventos referidos anteriormente se observaron en todos los tratamientos de microinjertación utilizados, variando únicamente el tiempo

al inicio de su ocurrencia, lo cual demuestra la posibilidad de esta técnica para ser usada en el desarrollo de microinjertos exitosos en el cultivo del café, no importando la combinación de especies, origen y edades que se utilice.

La formación de la capa de contacto es el primer suceso que se observa en el desarrollo de los injertos, donde las capas de células de ambos tejidos lesionados por el corte se oxidan, necrosan y mueren. Posteriormente esta capa de contacto es reabsorbida por el sistema. Las células cercanas a la zona de corte de ambos componentes del sistema, sufren una reactivación expresada por un aumento en la actividad del núcleo y nucleolo, los que se tornan esféricos y visibles. Lo anterior no ha sido reportado en otros trabajos, sin embargo, esta actividad es razonable ya que son el centro de control celular, la que se incrementa debido a que estas células entrarán rápidamente en proceso de mitosis para la formación del callo.

La aparición y acumulación de almidón en la región medular y cortical de todos los microinjertos ensayados, constituye el polisacárido de reserva que se forma en los leucoplastos de células de naturaleza parenquimática (Esau, 1977). Posiblemente estos glúcidos, producto de la fotosíntesis, serán transformados y movilizados como fuente de energía hacia las células que se encuentran en división activa en el cambium vascular (Flores, 1989; Fanh, 1974).

Thorpe y Meier (1975), trabajando en tabaco indican la importancia de la acumulación de almidón en los tejidos del explante, el cual se degrada posteriormente por acción enzimática, para ser usado como fuente de energía en los procesos de formación de nuevos tejidos.

En orden cronológico seguidamente se observó la cohesión del sistema patrón-injerto el cual según las investigaciones de Kollmann et al (1985), es mediado por interacciones entre las partes del sistema para lo cual debe darse un sistema de reconocimiento celular. Jeffree y Yeoman (1983), explican este evento como el resultado de la deposición y subsecuente polimerización de materiales en las paredes celulares de ambos componentes. Posiblemente el material más representativo durante esta etapa lo constituyen las pectinas. Moore (1984a) y Moore y Walker (1981a,b) encontraron que este reconocimiento inicial es un evento de naturaleza pasiva en donde no es necesario el reconocimiento celular mutuo para que ocurra. Además este evento no está relacionado directamente con la compatibilidad de los componentes del injerto. El reconocimiento celular mutuo, según Jeffree y Yeoman, (1983), es importante para explicar la compatibilidad de injertos y está basado en la disolución de las paredes de células cercanas, lo que permitiría el contacto del plasmalema de las células involucradas y Parkinson et al (1987)., sugieren que moléculas liberadas del plasmalema,

son las encargadas de formar un complejo con actividad catalítica llamado complejo de compatibilidad. Posteriormente a la cohesión descrita anteriormente, en los tejidos involucrados, se estimula la proliferación de células de callo, tanto en las paredes externas como internas del patrón e injerto. Este tejido neoformado se desarrolla tanto en injertos compatibles como en injertos incompatibles. En investigaciones sobre el desarrollo de conexiones entre células opuestas en la unión de injertos Jeffrey y Yeoman, (1983), han sugerido que aunque el plasmalema de células próximas no estén en contacto, un intercambio de moléculas portadoras de mensajes químicos tiene lugar entre ellas. Estos mensajes son los responsables de que los tejidos parenquimáticos, tanto del patrón como del injerto, incrementen su actividad meristemática en la zona de unión, conllevando las divisiones celulares en todos los planos a la formación del callo. En otras especies se observó este mismo comportamiento y Moore y Walker (1981a), reportan al respecto la formación del callo en Sedum telephoides como el producto de divisiones celulares del patrón e injerto en la primera semana de realizado el microinjerto. En el caso de las microinjertaciones llevadas a cabo en café, este evento sucede en las primeras dos semanas y estas observaciones también concuerdan con lo encontrado por Moore (1984c) y Moore y Walker (1981 a, b), al trabajar con microinjertos de pera, membrillo, Sedum telephoides y Solanum penelli.

También Huang y Millikan (1980) y Gebhardt y Goldbach (1988), reportan aspectos similares en trabajos desarrollados en microinjertaciones in vitro de manzanas y durazneros.

Jeffree y Yeoman (1983), consideran que intervienen procesos de reconocimiento entre las células de ambos componentes y como ejemplo Martínez et al (1981), indican en sus investigaciones la aparición de superficies receptoras de glicoproteínas y lectinas, las cuales parecen ser el disparador para que un injerto sea o no exitoso. Esta continuidad inicial que se da entre los tejidos de ambos componentes mediante el callo, se establece debido a la aparición de plasmodesmos entre ambas partes del sistema, los cuales tienen lugar a través de poros en las paredes celulares interconectando continuamente los protoplastos de células adyacentes (Kollman y Glockmann, 1985; Kollmann et al (1985). Los plasmodesmos se forman al final de la mitosis, en los sitios donde la placa celular es atravesada por segmentos de retículo endoplasmático (Flores, 1989). Los plasmodesmos actúan como canales de transporte simplástico de solutos a corta distancia (Fanh, 1974).

En el callo se inicia la formación de una zona cambial a partir de la cual se diferencia progresivamente el tejido vascular. Esta formación y diferenciación del tejido vascular según Jeffree y Yeoman (1983) ; Parkinson et al (1987) y Moore y Walker (1981a, b) es considerado como el

evento crítico en la formación de injertos exitosos, ya que hace posible que el flujo de agua y nutrientes se restablezca, proporcionando además el sostén mecánico para el sistema. La diferenciación de las células del callo, así como la activación del cambium vascular, favorece la formación de nuevos elementos vasculares. La diferenciación de tejido vascular se inició en algunas combinaciones microinjertadas a partir de las dos semanas de cultivo y el establecimiento de una unión vascular efectiva se observó entre las cuatro y ocho semanas, lo que coincide con Moore (1984b), el cual en trabajos con microinjertos de Sedum telephoides encontró el inicio y el final de la diferenciación vascular a los 12 y 21 días de cultivo, respectivamente. La polaridad y extensión de la diferenciación vascular, se puede explicar en respuesta a la liberación y transporte basípeta de auxinas provenientes del ápice vegetativo y movilizadas por el sistema vascular preexistente en el sistema (Gebhardt y Goldbach, 1988; Kollmann et al, 1985). La liberación de auxinas, giberelinas y citocininas que se encuentran básicamente en los ápices de crecimiento del injerto son movilizadas por el tejido vascular existente en forma basípeta hacia las células del tejido cambial neoformado. Aquí estos compuestos son los responsables de proporcionar el estímulo hormonal necesario para la formación del nuevo tejido vascular (Sachs, 1981).

Otras experiencias que refuerzan lo anterior han demostrado la existencia de dos grupos importantes que afectan la actividad cambial. Los giberelinas parecen inducir en el cambium vascular divisiones celulares aceleradas, pero no seguidas de diferenciación, mientras que las auxinas parecen ser las encargadas de promover esta diferenciación vascular (Flores, 1989). Wareing, citado por Fanh (1974) encontró que el efecto de ciertas hormonas en la planta favorecen una normal actividad cambial. Esau (1977), afirma que la división celular en este tejido cambial, es estimulada por la acción conjunta de las citocininas, auxinas y giberlinas y que el alargamiento celular y la lignificación de las paredes celulares está influenciado por el complejo auxina-citocinina, ya que estos son importantes en la regulación de la síntesis de celulosa y hemicelulosa, constituyentes de las paredes celulares. Además refiere que las giberlinas influyen en el patrón de deposición de la pared celular en los elementos vasculares.

Se observó que las células que primero empiezan a diferenciarse son las que se encuentran cerca del tejido vascular existente ya que esta es la vía de transporte de auxinas en forma basipeta del meristemo apical del injerto al resto del sistema.

Sachs, (1981) al realizar estudios de rediferenciación vascular sobre masas de callo, llegó a la conclusión de que

la aplicación exógena de auxina sobre estas células las indujo a diferenciarse en tejidos vasculares, mientras que la ausencia de un flujo de auxinas correlaciona positivamente con la ausencia de diferenciación vascular.

El método de microinjertación desarrollado en este estudio, permitirá ayudar a solucionar el problema de nematodos en café de la siguiente manera: Aprovechar la técnica de embriogénesis somática, la cual debido a la alta tasa de multiplicación de individuos, permitiría reproducir en gran escala genotipos de café de buen comportamiento, los cuales al ser utilizados como portainjertos se espera mantengan la identidad genética del material. El uso in vivo de patrones de C. canephora provenientes de semilla de polinización abierta no garantiza la misma respuesta genética de resistencia a los nematodos, situación que se espera sea corregida al utilizar patrones provenientes de embriones somáticos.

El estudio histológico de la unión patrón-injerto permitió comprobar la funcionalidad de los microinjertos entre C. canephora y C. arabica, lo que demuestran que el método de microinjerto in vitro es una técnica que permite el desarrollo de microinjertos compatibles entre patrones de C. canephora e injertos de C. arabica, en los cuales el prendimiento fue del 100%.

VI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

1. La técnica del microinjerto in vitro permite desarrollar injertos entre Coffea canephora y Coffea arabica en forma eficiente para todas las combinaciones estudiadas.
2. El estudio histológico realizado, mostró la compatibilidad de todas las combinaciones microinjertadas para formar plantas completas.
3. La compatibilidad del microinjerto no se ve afectada por los genotipos microinjertados.
4. La compatibilidad del microinjerto no se ve afectada por la edad de los embriones al momento de microinjertar.
5. La compatibilidad del microinjerto no se ve afectada por el origen cigótico o somático de los embriones microinjertados.

6. Los eventos que se desarrollan a través del período de microinjertación, se observan de forma similar para todas las combinaciones de microinjertos.
7. Los eventos observados durante la microinjertación se suceden a velocidades diferentes de acuerdo a la combinación de microinjerto realizado.
8. Al usar embriones somáticos de Coffea canephora como patrón, se observó la unión vascular efectiva entre los 25 y 35 días posteriores a la microinjertación.
9. La unión vascular efectiva al usar como patrones embriones cigóticos de Coffea canephora, se observó entre los 45 y 60 días posteriores a la microinjertación.

VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar investigaciones que incluyan trabajos bajo condiciones de invernadero, que permita realizar pruebas de selección tendientes a observar el comportamiento de los materiales microinjertados al ataque de poblaciones de nematodos, para una posterior evaluación en condiciones de campo.
- 2 Realizar estudios histológicos al microscopio electrónico de transmisión, con el objetivo de observar los eventos ultraestructurales que caracterizan a la unión patrón-injerto.
3. Conducir estudios bioquímicos que permitan determinar los compuestos químicos involucrados en los diferentes eventos morfológicos que ocurren durante el proceso de microinjertación.

VIII. LITERATURA CITADA.

- AGUILAR, M. 1990. Obtención de plantas de cacao (Theobroma cacao L.) a partir del microinjerto de embriones somáticos. Tesis Mag. Sc. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 131 p.
- AMIRATO, P.; STEWARD, F. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. *Botanical Gazette (EE.UU)* 132(2):149-158.
- _____. 1983. Embryogenesis. In. *Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding.* Ed. by D.A. Evans; W.R. Sharp; P.V. Amirato; Yamada. New York, Macmillan. p. 82-123.
- _____. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. *Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture* 57:1-27.
- AREVALO, R.; LICERAS, Z.; URRELLO, G. 1977. Comportamiento de nueve variedades de café al ataque del nematodo del nudo de la raíz. *Nematropica (EUA)*. v. 7(2). p.3.
- _____. 1985. Inducción de embriones somáticos en callos obtenidos a partir de hojas de cafeto (Catimor). *Memorias del VIII Congreso Venezolano de Botánica*. p. 70.
- ASCANIO, E.; ARCIA, M. 1987. Haploids from anther culture in Coffea arabica L. *International Congress of Plant Tissue Culture, Tropical Species, Bogotá (Colombia)*, p. 68.
- AVENDAÑO, L.; MORERA, N. 1988. Evaluación de la respuesta de cinco clones de Coffea canephora al ataque de Meloidogyne exigua Goeldi. 10. Simposio sobre Caficultura Latinoamericana. Tapachula, (México). p. 162-165.
- BARAHONA, M. 1984. *Fruticultura general.* Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. 1984. p. 71-105.
- BERTHOULY, M.; GUZMAN, N. 1987. Reproducción asexual en el género Coffea, mediante embriogénesis somática. Segundo Curso de Cultivo de Tejidos. Turrialba, Costa Rica. PROMECAFE. p. 87-106.
- BUCHHEIM, J.; COLBURN, S.; RANCH, J. 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiology (EE.UU)*. 89:768-775.

- CALDERON, M. 1989. Reacción de diferentes genotipos de café a Meloidogyne arabicida López y Salazar (1989, gama de hospedantes y hongos fitopatógenos asociados. Tesis Mg. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 71 p.
- CAMPOS, V.; LIMA, R.; ALMEIDA. 1985. Nematóides parasitas do cafeeiro. Informe Agropecuario (Brasil). 11(126) p.50-58.
- CIRAD. LABORATOIRE DE CYTOGENETIQUE ET D'HISTOLOGIE VEGETALE (FRANCIA). 1989. Manual pratique d'histologie vegetale. Montpellier. 61 p.
- COLBERT, B. 1979. Los nematodos reducen el rendimiento del cafeto. Cámara del Agro (Guatemala). v.1 (3) p. 28-29.
- COOK, R.; EVANS, K. 1987. Resistance and tolerance. In Principles and practice of nematode control in crops. Ed. by R.H. Brown, B.R. Kerry. Sidney, Australia, Academic Press. p. 179-231.
- COUTURON. 1982. Obtention d'haploides spontanés de Coffea canephora Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. Café Cacao Thé (Francia) 26(3):155-160.
- _____.; BERTHAUD, J. 1979. Le greffage d'embryons de caféiers. Mise au point technique. Café Cacao Thé (Francia) 24(4):267-270.
- CURI, S.; SILVA, S. 1977. Distribuicao geografica, sintomatologia e significao dos nematóides Meloidogyne incognita e Meloidogyne exigua parasitos do cafeeiro no estado do Sao Paulo. In. Congresso Brasileiro de pesquisas cafeeiras. Instituto Brasileiro do café. p.19.
- DAMIANO, C.; CURIR, P.; COSMI, T. 1986. In vitro micrografting of Eucalyptus spp. Hortsciense (EEUU) 21(3 sect. 2) p. 684.
- DI PRIETO, C.; GUERRA NETO, E.; FREITAS, V.; PASSOS, A. 1981. Levantamento preliminar da ocorrencia de nematóides do género Meloidogyne, no estado de Sao Paulo. Instituto Brasileiro do Café, Rio de Janeiro (Brasil). 9. Congresso Brasileiro de Pesquisas Caffeiras. p. 316-320.
- DUBLIN, P. 1980. Induction de bourgeons néoformés et embryogenese somatique. Deux voies de multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés. Café Cacao Thé (Paris). 24(2):79-89.

- _____. 1981. Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféiers Arabusta. *Café Cacao Thé*. (Paris) 25(4):237-242.
- ESAU, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2nd. edition. New York, Wiley. 550p.
- FAHN, A. 1974. *Anatomia vegetal*. Segunda edición. Madrid. (España). 643p.
- FAZUOLI, L.; LORDELLO, R. 1977. Resistencia de Coffea liberica e Coffea dewevrei a Meloidogyne exigua. 2. Reuniao Sociedade Brasileira de Nematologia. Paracicaba, SP (Brasil). p. 197-199.
- _____. 1978 a. Resistencia de cafeeiros Híbrido de Timor a Meloidogyne exigua. *Ciencia e Cultura* (Brasil). v. 31 (7, supl.) p. 3.
- _____. 1978 b. Fontes de resistencia em especies de cafeeiro ao nematóide Meloidogyne exigua. Reuniao Sociedade Brasileira de Nematologia. no. 3. p. 49-52.
- _____,; CARVALHO, A.; COSTA, W. 1987. Melhoramento do café Icatu em Campinas. Instituto Brasileiro do Café, Rio de Janeiro (Brasil). p. 91.
- _____.; LORDELLO, R. 1977. Estudo de metodos de infestacao para avalicao precoce da resistencia do cafeeiro a Meloidogyne exigua. *Bragantia* (Brasil). v.36(23) p. 231-238.
- _____.; LORDELLO, R.; GUILHAUMON, F.; CORSI, T.; COSTA, A. 1978. Tolerancia de cafeeiros ao nematóide Meloidogyne incognita em condicoes de campo. In. 6. Congresso Brasileiro de Pesquisas Caffeiras. Instituto Brasileiro do Café, Rio de Janeiro (Brasil). p. 246-248.
- FERRAZ, S. 1980. Reconhecimento das especies de fitonematoides presentes nos solos do estado de Minas Gerais. *Experientia* (Brasil). 26(11):255-328.
- FLORES, E. 1989. *La planta:estructura y función*. 1. ed. Cartago. Editorial Tecnológica de Costa Rica. (Costa Rica). 501p.
- GARCIA, E.; MENDEZ, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares de cafeto "Catimor". *Café Cacao Thé* (Paris). 31(1):15-22.
- GARCIA, C.; TIHOHOD, D.; CAETANO, F.; RABELLO, L. 1988. Nota sobre a ocorrencia de fitonematoides em cafezais da regioao de Marília. *Nematologia Brasileira* (Brasil). v. 12. p. 151-152.

- GARNER, R. 1983. Manual del injertador. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 335 p.
- GEBHARDT, K.; GOLDBACH, H. 1988. Establishment graft union characteristics and growth of Prunus micrografts. *Physiologia Plantarum* (Dinamarca) 72(1):153-159.
- GUZMAN, N. 1989. Estudio de alternativas para la conservación in vitro de café (Coffea spp). Tesis Mg. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 135 p.
- HUANG, S.; MILLIKAN, D. 1980. In vitro micrografting of apple Malus domestica shoot tips. *HortScience*.(EE.UU) 15(6):741-743.
- INSTITUTO MEXICANO DEL CAFE. 1987. Los nematodos en cafetales del centro de Veracruz. Boletín Técnico de Café - Instituto Mexicano del Café (México). no. 4. 4 p.
- JEFFREE, C.; YEOMAN, M. 1983. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytologist* (G.B) 93:491-509.
- _____.; HUGARD, J.; MACHEIX, J.; MARTINEZ, J.; MOSELLA, L.; POESSEL, J.; VILLEMUR, P. 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae* (Holanda) 20(2):147-160.
- KOLLMANN, R.; GLOCKMANN, C. 1985. Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* (Austria) 124:224-235.
- _____.; YANG, S.; GLOCKMANN, CH. 1985. Studies on graft unions. II. Continuous and half plasmodesmata in different regions of the graft interfase. *Protoplasma* (Austria) 126:19-29.
- KYLE, N.; JAKOBK, J.; BACKHAUS, R.; STUTZ, J.; RIGHETTI, T. 1987. Micrografting between nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing genera of the Rosaceae. *Botanical Gazette* (EE.UU) 147(3):243-246.
- LANAUD, C. 1981. Production de plantules de Coffea canephora par embryogenese somatique réailsé a partir de culture in vitro d'ovules. *Café Cacao Thé* (Paris). 25(4):231-236.
- LIMA, R. D'A.; ALMEIDA, V. F. DE. 1989. Ocorrencia e distribuicao de fitonematóides em cafeeiros do triangulo mineiro e Alto Paranaíba. *Nematologia Brasileira* (Brasil). 13 p. 6.

- LOPEZ, I.; VELEZ T, J. 1983. estudio nematológico en Otramina, localidad cafetalera del Municipio de Titiribi (Antioquia). Medellín. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia). Facultad de Agronomía. Tesis. 39 p.
- LORDELLO, R.; FAZUOLI, L. 1980. Meloidogyne decalineata parasita cafeeiros na Ilha de Sao Tome. Revista de Agricultura (Brasil) 55(4) p. 238.
- MARTINEZ, J.; POESSEL, J.; HUGARD, J.; JONARD, R. 1981. In vitro micrografting utilization for grafting incompatibility study. C.R. Sciences Acad.Sci Ser. III. Sci. Vie 292(16):961-964.
- MEDINA, H.; FAZUOLI, L.; COSTA, W. 1981. Identificao das racas 2, 3, 4 de Meloidogyne incognita parasitando o cafeeiro. In. Congreso Brasileiro de Pesquisas Caffeiras. Instituto Brasileiro do Café. pp.166-168.
- MICHAUX-FERRIERE, N.; DUBLIN, P.; SCHWENDIMAN, J. 1987. Etude histologique de l'embryogenese somatique a partir d'explants foliaires de Coffea arabica L. Café Cacao Thé (Paris) 31(2). p.103-114.
- _____.; BIEYSSE, D.; VARD,D.; DUBLIN, P. 1985. Histological study of somatic embryogenesis in Coffea arabica, induced by culture on single media of leaf fragments of different genotypes. Café Cacao Thé (Paris) 33(4). p. 207-217.
- MOORE, R. 1984a. A model for graft compatibility-incompatibility in higher plants. American Journal of Botany. (EE.UU) 71(5):752-758.
- _____. 1984b. The rol of direct cellular contact in the formation of compatible autografts in Sedum telephoides. Annals of Botany (EE.UU) 54:127-133.
- _____. 1984c. Ultrastructural aspects of grafts incompatibility between pear and quince in vitro. Annals of Botany (EE.UU) 53:447-451.
- MOORE, R.; WALKER, D. 1981a. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. 1. A structural study of a compatible autograft in Sedum telephoides (Crassulaceae). American Journal of Botany (EE.UU) 68(6):820-830.

- _____. 1981b. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in Sedum telephoides (Crassulaceae) and Solanum penelii (Solanaceae). American Journal of Botany (EE.UU) 68:831-842.
- MOSELLA, L.; ASCUI, L. 1984. Obtención de plantas frutales libres de virus a partir de ápices meristemáticos cultivados in vitro. Chile. Universidad Católica de Valparaíso. 22 p.
- _____.; SIGNORET, P.; JONARD, R. 1980a. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le Pêcher (Prunus persica Batsch). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris (Serie D) (Francia) 290:287-290.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 15(3):473-479.
- _____.; BITTERS, W.; RANGAN, T.; NAUER, E.; ROISTACHER, C.; HOLLIDAY, P. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. HortScience (EE.UU) 7(2):118-119.
- NASSUTH, A.; WORMER, T.; BOUMAN, F.; STARITSKY, G. 1980. The histogenesis of callus in Coffea canephora stem explants and the discovery of early embryod initiation. Acta Botanica Neerlandica (Leyde). 29(1):49-54.
- NAVARRO, L. 1975. Nueva técnica para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Levante Agrícola (España) 159:5-10.
- OJEDA, L. 1986. Microinjerto in vitro de Cedrela odorata L. empleando ápices juveniles y adultos. Tesis Mag. Sc. Chapingo, México, Colegio de Posgraduados. 65 p.
- _____.; ROISTACHER, C.; MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science (EE.UU) 100(5):471-479.
- PAIVA, M.; ASSIS, M.; LIN, M.; CRESTANI, O. 1988. Elimination of plants viruses by tissue culture. Fitopatologia Brasileira. (Brasil) 13(2):91-92.
- PARKINSON, M.; JEFFREE, C.; YEOMAN, M. 1987. Incompatibility in cultured explant grafts between members of the Solanaceae. New Phytologist (G.B) 107:489-498.

- PEÑA, M. 1983. Somatic embryo induction and plant regeneration from Coffea canephora and Coffea arabica. Simposio sobre Ferrugens do Caffeiro, Oeiras, Portugal. p. 493-512.
- PIERSON, E.; VAN LAMMEREN, A.; SCHEL, J.; STARITSKY, G. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of Coffea canephora. Protoplasma (Viena). 115(2-3):208-216.
- PLASTIRA, V. 1987. Application of the micrografting method to the clementine poros variety of tangerine tree in order to obtain virus-free plants. Annual Institute Phytopathology. Benaky 15(2):95-108.
- REYNA, E.. 1968. Nuevo método para injertar cafetos; técnica guatemalteca muy útil como defensa contra los nematodos. Agricultura de las Américas 17(2) p.12-13, 37-39.
- _____. 1980. Impacto del injerto método Reyna en la caficultura guatemalteca. Revista cafetalera (Guatemala) 5(194) p.28-30, 32.
- RODRIGUEZ A.. 1980. Nematodos y su control con injertos. Revista Cafetalera (Guatemala) No. 190:30.
- SACHS, I. 1981. The control of the patterned differentiation of vascular tissue. In: Woolhouse. H.D., Ed. Advances in Botanical Research, Vol. 9. London: Academic Press.
- SASSER, J.; HARTMAN, K.; CARTER, C. 1987. Summary of preliminary crop germplasm evaluations for resistance to root-knot nematodes. Raleigh, N.C., Crop Nematode Research & Control Project. 88 p.
- SCHIEBER, E. 1976. Nematodos que atacan al café en Guatemala, su distribución, sintomatología y control. Revista AGA (3a. época) (Guatemala). (no. 105) p. 12-16.
- SHENGELIYA, L.; BUTENKO, R. 1988. Micrografting as method for obtaining virus-free citrus plants. Fiziol. Rast.(Moscú) 35(1):190-195.
- SONDAHL, M; SHARP, W. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica L. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie (Stuttgart) 81(5):395-408.
- STARITSKY, G. 1970. Embryoid formation in callus culture tissue of coffea. Acta Botanica Neerlandica (Leyde). 19(4):509-514.

- SUNG, Z. 1985. Developmental biology of plant embryogenesis. In Plant Genetics p. 115-128.
- THORPE, T; MEIER, D. 1975. Effect of gibberellic acid on starch metabolism in tobacco cultured under shoot-forming conditions. Phytomorphology 25(2):238-245.
- TRANVAN, H.; DAVID, A. 1985. In vitro grafting of the maritime pine Pinus pinaster. Canada Journal Botany (Canadá) 63(6):1017-1020.
- VELAZCO, J.; CUETO, M. 1976. Injertos en café. Ciencias: Serie Botánica (Cuba) 8:3-18.
- YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. 1985. Embryogenic callus induction from Coffea arabica leaf explants by benzyladenine. Plant and Cell Physiology. 26(3):595-597.