

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

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES QUIMICOS Y FISICOS SOBRE
LA REGENERACION DE EMBRIONES SOMATICOS DE *Coffea arabica*
EN BIORREACTOR SIMPLIFICADO**

POR

JOSÉ GERARDO ALBARRAN RINCON

CATIE

Turrialba, Costa Rica
1999

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

(CATIE)

**PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACION**

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES QUIMICOS Y FISICOS SOBRE
LA REGENERACION DE EMBRIONES SOMATICOS DE *COFFEA*
ARABICA EN BIORREACTOR SIMPLIFICADO**

**Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación
para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de
Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar por el grado de:**

Magister Scientiae

**Por
José Gerardo Albarrán Rincón**

Turrialba, Costa Rica

1999

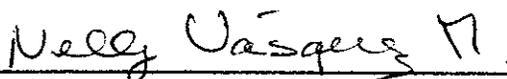
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



Hervé Etienne, PhD.
Consejero Principal



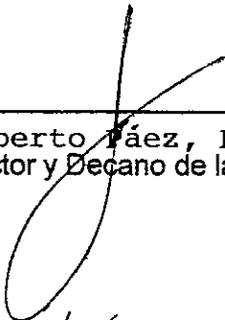
Nelly Vásquez Morera, MSc.
Miembro Comité Consejero



Ma. Elena Aguilar Vega, PhD.
Miembro Comité Consejero



Francois Anthony, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Pérez, PhD.
Director y Decano de la Escuela de Posgrado



José Gerardo Albarrán Rincón
Candidato

A la memoria de mi tía Claudia, a quien recordaré por siempre

A mis padres y demás familiares por su apoyo y comprensión

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) de Venezuela por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de maestría

A Hervé Etienne, por su gran dedicación, enseñanza, amistad y capacidad para dirigir mi trabajo de investigación

A los miembros de mi comité: Nelly Vásquez, María Elena Aguilar y Francois Anthony, por toda la colaboración profesional y personal brindada durante el desarrollo de mi tesis

A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología por su colaboración y principalmente por su calidad humana, hacen un equipo excepcional.

Quiero agradecer especialmente a mis amigos William Solano y Alexander Pereira, por su enriquecedora experiencia laboral, colaboración incondicional y amistad, fue muy grato trabajar con ustedes.

A mis compañeros de maestría: Maria José, Yanira, Omar, Jasmina, Luz Violeta, Maira, Rosina, Eufemia, Natasha, Mario, Carla y María Eugenia con quienes compartí muchos momentos especiales y me ofrecieron su amistad incondicional

A todos mis compañeros en general por haber permitido una integración comunitaria hasta formar un solo equipo solidario, respetuoso, divertido y capaz de mover el mundo.

Al personal de la escuela de posgrado y biblioteca Orton por su buen desempeño y disponibilidad para ayudar al estudiante en todo momento. Muchísimas gracias.

CONTENIDO

Resumen.....	vii
Summary.....	ix
Lista de figuras.....	xi
Lista de cuadros.....	xiv
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
2. REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1. ORIGEN E HISTORIA DEL C. ARABICA.....	6
2.2. HABITAT NATURAL Y RECURSOS GENÉTICOS.....	7
2.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO Y SELECCIÓN.....	8
2.6. ETAPAS DEL PROCESO EMBRIOGÉNICO.....	12
2.7. HISTOLOGÍA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	13
2.8. EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	14
3. MATERIALES Y METODOS.....	16
3.1. MATERIALES.....	16
3.1.1. Ubicación del ensayo.....	16
3.1.2. Material experimental.....	16
3.1.2.1. Material vegetal.....	16
3.1.2.2. Sistema de cultivo.....	16
3.1.3. Medios de cultivo.....	17
3.1.4. Condiciones de crecimiento.....	17
3.2. MÉTODO.....	18
3.2.1. Proliferación de agregados embriogénicos en suspensión.....	18
3.2.1.1. Condiciones de cultivo estándar para la proliferación y la regeneración... 18	
3.2.2. Regeneración de embriones somáticos en medio líquido.....	18
3.2.2.1. Efecto de los factores químicos sobre la regeneración de embriones somáticos.....	20
3.2.2.2. Efecto de los factores físicos sobre la regeneración de embriones somáticos y nutrición mineral.....	21
3.2.3. Análisis histológicos y de microscopía electrónica.....	23
3.2.4. Análisis estadístico.....	24
3.2.4.1. Variables de respuesta evaluadas.....	25

4. RESULTADOS Y DISCUSION	27
4.1. RESULTADOS.....	27
4.1.1. Efecto de los factores químicos sobre el proceso de regeneración de embriones somáticos en biorreactor	27
4.1.1.1. Comparación de la eficiencia de varios medios de cultivo para regeneración	27
4.1.1.2. Comparación de la eficiencia de las sales minerales y vitaminas de los diferentes medios de regeneración, T4 (café), Yasuda (café), M3 y M4 (banano). 29	
4.1.1.3. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de embriones somáticos.....	32
4.1.2. Efecto de diferentes parámetros físicos en biorreactor sobre el proceso de regeneración de embriones somáticos	41
4.1.2.1. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre la producción de embriones	41
4.1.2.2. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre la producción de embriones.....	57
4.2. DISCUSION.....	70
4.1.1. Importancia de la composición química del medio de cultivo	70
4.1.1.1. La composición en elementos minerales y vitaminas determinaron la eficiencia de la regeneración.....	70
4.1.1.2. La regeneración de embriones es posible sin reguladores de crecimiento, las cuales juegan un papel secundario	73
4.1.2. Importancia de algunos factores físicos en el biorreactor: la inmersión y el ritmo de cambio de medio.....	75
4.1.2.1. Inmersiones cortas y frecuentes estimulan la regeneración de embriones	76
4.1.2.2. Un tiempo de inmersión largo (15 minutos) provoca daños morfológicos y vitrificación en los embriones regenerados.....	77
4.1.2.3. Una renovación frecuente del cambio de medio de cultivo inhibe la formación de embriones.....	79
4.1.2.4. Evolución del contenido mineral del material vegetal durante el proceso de regeneración de embriones	81
4.1.2.5. El P y N (NH_4^+ y NO_3^-) son altamente consumidos durante la expresión embriogénica	83
4.1.2.6. Relación entre pH y $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$	85
5. CONCLUSIONES.....	87
6. RECOMENDACIONES	90
7. BIBLIOGRAFIA.....	91
8. APENDICE.....	98

ALBARRAN, J.G. 1999. Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en biorreactor simplificado. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Palabras claves: *Coffea arabica*, micropropagación, híbridos F1, embriogénesis somática, *in vitro*, biorreactor, medios de cultivo, inmersión temporal, nutrición mineral, histología, ultraestructura, vitrificación.

RESUMEN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes del mercado internacional. Su producción genera ingresos que para algunos países principalmente de América Latina, es su principal fuente de divisas. Sin embargo, el control fitosanitario y los costos de fertilización constituyen una parte significativa de los costos de producción, por lo que se han desarrollado programas de selección y mejoramiento genético de variedades que permitan mantener o aumentar la productividad. *C. arabica*, es la especie más cultivada a nivel mundial por la alta calidad de su bebida y baja vulnerabilidad a enfermedades. *C. arabica* representa el 70% de la producción del mercado mundial y *C. canephora* el 30% restante.

En Centroamérica en el marco de la red de PROMECAFE, diversas instituciones desarrollan un programa de mejoramiento genético cruzando variedades tradicionales de café con variedades silvestres, con el objetivo de propagar luego a escala comercial los híbridos F1 seleccionados por criterios de resistencia a enfermedades, vigor y productividad.

Debido a la condición heterocigota de los híbridos, la propagación masiva por embriogénesis somática haciendo uso de biorreactores simplificados, ha constituido la alternativa más viable para propagar los híbridos de café a gran escala. Hasta ahora se conoce el proceso de propagación, pero es necesario optimizar ciertas etapas del proceso para lograr una alta productividad y a bajo costo. Algunas etapas del proceso ya han sido estudiadas y conocidas ampliamente.

El objetivo de este trabajo fue optimizar la etapa correspondiente a la regeneración de embriones somáticos, estudiando el efecto de los factores químicos (sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento de diferentes medios de cultivo) y factores físicos (frecuencia y duración de las inmersiones en el biorreactor y ritmo de cambio de medio), sobre la producción y calidad de los embriones somáticos. Igualmente se estudio el efecto que tienen estos factores físicos sobre la nutrición mineral.

De los resultados obtenidos encontramos que las sales minerales del medio de cultivo Yasuda usando concentraciones de BAP entre 4 y 6 mg/l, son las mejores en términos de mayor producción y calidad de los embriones somáticos en estado de torpedo (más de 80%), así como una alta tasa de conversión en planta (56%). En cuanto a la calidad de las inmersiones se demostró que frecuencias altas y de corta duración diaria, son las más favorables en el proceso de regeneración (6 veces por 1 minuto diario), mientras que altas o bajas frecuencias pero con excesiva duración de las inmersiones (15 minutos) por día, provocan problemas de vitrificación de los embriones disminuyendo su calidad (20%). Un ritmo de cambio del medio de cultivo con mucha frecuencia (semanalmente) provoca un estrés en el tejido vegetal y cambios poco frecuentes (cada 8 semanas), un déficit nutricional que afectan la biomasa total y cantidad de embriones,

pero no su calidad. Una frecuencia de cambio de medio de 6 semanas, es el recomendado para permitir un buen crecimiento de los agregados embriogénicos durante la expresión embriogénica y posterior desarrollo óptimo de los embriones (3000 embrione/biorreactor). De los elementos minerales estudiados, el P y N son los más consumidos por el tejido vegetal durante las primeras semanas de la regeneración, convirtiéndose en factor limitante para la producción de embriones después de 6 semanas de cultivo.

El presente estudio contribuyó a mejorar la producción y a obtener una calidad óptima de los embriones somáticos en estado de torpedo, lo cual evidencia la eficiencia del uso de biorreactores con inmersión temporal en la propagación masiva de café.

ALBARRAN, J.G. 1999. Influence of chemical and physical factor on regeneration of somatic embryos of *Coffea arabica* in a simplified bioreactor.. Thesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Keywords: *Coffea arabica*, micropropagation, hybrids F1, somatic embryogenesis, *in vitro*, bioreactor, culture media, temporal immersion, mineral nutrition, histology, ultra-structure, vitrification

SUMMARY

Coffee is one of the main agriculture products in the international market. Its production generates incomes that for some countries, especially from Latin America are their main foreign exchange source. However, phytosanitary and fertilizing costs constitute a significative part of this crop's overall production costs. Because of this, selection and genetic improvement programs of varieties which allow to maintain or increase the productivity of *C. arabica*, which is the most widely cultivated species at worldwide level due to its high quality and diseases vulnerability have been developed. *C. arabica* represents 70% of worldwide production market followed by a 30% of *C. canephora*.

In Central America within the umbrella of PROMECAFE, several institutions have developed a genetic improvement program by crossing coffee traditional varieties with wild varieties to thus propagate at commercial scale the F1 hybrids selected through disease resistance, vigor and productivity criteria.

Due to these hybrids heterozygotic condition, massive somatic embryogenesis propagation using simplified bioreactors has become the most viable alternative to propagate these hybrids at big scale. Up to now, the propagation process is known but it is necessary to optimize certain stages to attain a high productivity at low cost. Some stages of this process have been already studied and are widely known.

The main objective of this work was to optimize the stage corresponding to somatic embryos regeneration, studying the effect of chemical (mineral salts, vitamins and growth regulators of different culture media) and physical (frequency and duration of immersions in the bioreactor and rhythm of medium changes) factors on production and quality of somatic embryos. Likewise, the effect of these physical factors on mineral nutrition was studied.

From the results obtained, it was found that mineral salts from the Yasuda culture medium using BAP concentrations from 4 to 6 mg/l, were the best, in terms of higher somatic embryos production and quality at the torpedo stage (more than 80%), showing also a high conversion rate into plants (56%). Regarding immersion quality, it was demonstrated that daily high and small duration frequencies are the most favorable for the regeneration process (6 times by 1 minute daily), while low and long duration daily immersions (15 minutes) provoke vitrification problems to the embryos, reducing their quality (20%). Very frequent (weekly) culture medium changes produce stress to plant tissues and little frequency changes (every 8 weeks) nutritional shortages, which affect the total biomass and embryos quantity, but not their quality. A medium changing frequency of 6 weeks is recommended to allow a good growth of the embryogenic aggregates during the embryogenic expression and subsequent embryos optimum development (3000 embryos/bioreactor). From the mineral elements under study, P and

N were the most consumed by the plant tissue during the first regeneration stages, becoming after 6 weeks of culture a limiting factor for embryos production. This research contributed to improve production and to obtain an optimum somatic embryos quality at the torpedo stage evidencing the efficiency of its utilization.

- Fig. 1 Esquema del proceso embriogénico de alta frecuencia.....19
- Fig. 2 Esquema de la metodología seguida del efecto de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de café.....22
- Fig. 3 Aspecto histológico de los agregados embriogénicos y embriones en desarrollo de 8 semanas, cultivados en diferentes medios de cultivo básicos. **(a)** M3, nótese abundantes agregados embriogénicos y formación de embriones (4x), **(b)** Yasuda (4X) abundantes agregados embriogénicos y formación de embriones, **(c, d)** T4 con agregados en mal estado (4X), **(d)** nótese el daño en el citoplasma de las células del callo (10X).....31
- Fig. 4. Aspecto histológico de los agregados embriogénicos y formación de embriones a las 4 semanas de regeneración en medio Yasuda con diferentes concentraciones de BAP. **(a)** alta proliferación sin BAP (4X), **(b)** formación de embriones con BAP 6 mg/l (4X), **(c)** daño a nivel del núcleo a las 8 semanas con BAP 0 y 8 mg/l (4X), **(d)** activa división celular, citoplasma denso con BAP 0, 2 y 6 mg/l a las 4 semanas (20X).....34
- Fig. 5. Aspecto morfológico de plantas regeneradas en diferentes medios de cultivo y en presencia de diferentes aportes hormonales. **(a)** medio Yasuda con 6 mg/l de BAP, nótese el aspecto vigoroso de las plantas provenientes de regeneración con alta concentración de BAP, **(b)** M4 sin AIA con BAP 0.5 mg/l, **(c)** M3 básico con plantas de mayor vigor que las regeneradas con M3 con 2ip, Kin, y Z.....37
- Fig. 6. Aspecto histológico de los agregados embriogénicos y embriones en el medio M4 sin AIA con diferentes concentraciones de BAP a 4 semanas de regeneración. **(a)** medio sin BAP, nótese los agregados en división celular, citoplasma denso (4X), **(b)** alta proliferación de agregados celulares con BAP 6 mg/l (20X) y **(c)** depósitos de almidón y proteínas en un embrión en formación (40X).....38
- Fig.7. Aspecto morfológico de embriones somáticos regenerados en el biorreactor simplificado RITA cultivados a diferentes frecuencias y duración de las inmersiones. **(a)** Regeneración óptima a 6v x 1' diaria. **(b)** 6v x 15', nótese los embriones vitrificados y con formación de raíces. **(c)** 6v x 1', embriones en estado de torpedo con poca formación de callo. **(d)** germinación en RITA.....44
- Fig. 8. Aspecto histológico de agregados embriogénicos y embriones en regeneración con diferentes frecuencias y duración de las inmersiones. **(a, b)** 1v x 1' características del estrés. **(a)** presencia de muchas células muertas o en degeneración y agregados normales poco frecuentes (4X), **(b)** células del agregado presentando plasmólisis del citoplasma (10X). **(c, d)** Frecuencias de 2v x 1' y 6v x 1', agregados y embriones normales. **(c)** agregados formando núcleos de activa división celular rodeados de una matriz mucilaginosa (10X), **(d)**

formación de cotiledones y meristema caulinar en embriones, nótese los depósitos de almidón (20X).....45

Fig.9. Ultraestructura en microscopía electrónica de los embriones somáticos desarrollados a las 14 semanas cultivados en 2 tipos de frecuencias y duración de las inmersiones. (a) 6v x 1', crecimiento de los cotiledones (60X) y (b) 6v x 1', notándose una superficie regular (500X), (c) 6v x 15', deformación del eje embrionario y cotiledones, diferenciación precoz de raíces (60X), (d) 6v x 15', nótese la superficie muy irregular del embrión y daños (500X).....55

Fig. 10. Aspecto histológico y de microscopía electrónica de proembriones y embriones cultivados en frecuencias y duración de las inmersiones de 6v x 15' y 2v x 5'. (a) 6v x 15', formación precoz de un meristemo radical, nótese la ausencia de reservas en el proembrión, (10X), (b) 2v x 5', formación normal de embriones globulares a partir de agregados embriogénicos a las 8 semanas (10X), (c) 2v x 5', presencia de abundantes reservas de almidón hacia la periferia de los cotiledones (rojo) y lípidos (azul) en embriones de 14 semanas (10X), (d) 2v x 5', alargamiento excesivo del eje embrionario y poco crecimiento de los cotiledones (60X).....56

Fig. 11. Evolución de los contenidos minerales en el tejido vegetal a lo largo de la fase de regeneración de embriones somáticos..... 54

Fig.12. Evolución del Peso Seco (PS) y Contenido de Agua (CA) del callo embriogénico (A), así como el pH y la Conductividad Eléctrica (CE) del medio de cultivo (B), durante 8 semanas de regeneración sin cambio de medio. Las barras representan las desviaciones estándar.....58

Fig. 13. Evolución comparada de la transferencia de NH_4^+ , NO_3^- , y P (A), y Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ y Cl^- (B) del medio Yasuda hacia el callo embriogénico en regeneración. Las barras representan las desviaciones estándar.....60

Fig. 14. Dinámica de la concentración de los elementos minerales Ca^{++} , Mg^{++} , K^{++} , P y Cl^- (A), NH_4^+ y NO_3^- (B), del medio de cultivo Yasuda durante 8 semanas. Las barras representan desviaciones estandar.....61

Fig.15. Velocidad de absorción de los elementos minerales del medio Yasuda durante 8 semanas. (A) Cl^- (B) NH_4^+ y NO_3^- (C) Mg^{++} (D) Ca^{++} (E) K^+ y (F) P. Las barras representan desviaciones estándar.....63

Fig. 16. Aspectos histológicos y morfología externa del material vegetal cultivado con ritmo de cambio de medio de 1 semana. (a) histología de agregados embriogénicos, nótese las células vacías y deformes (4X), (b) histología de embriones normales con abundante reserva de almidón (rojo) y lípidos (verde) (20X), (c) morfología externa de los embriones a las 14 semanas de regeneración, nótese el necrosamiento del tejido y pocos embriones (blanco).....68

Fig. 17. Agregados embriogénicos y embriones desarrollados en diferentes ritmos de cambio de medio. **(a)** ritmo de cambio de medio de 2 semanas, nótese los núcleos regenerativos dentro de los agregados en activa división (8 semanas) (10X). **(b)** ritmo de 4 semanas, nótese la morfología característica de las células embriogénicas y células en división (20X) y **(c)** ritmo de 6 semanas, con gran cantidad de agregados bien estructurados, separados y presencia de algunas células vacías (4X). **(d)** ritmo de cambio 6 u 8 semanas, embrión somático a las 14 semanas de cultivo con buen crecimiento de los cotiledones, área meristemática caulinar presente, diferenciación de tejido vascular y abundantes reservas de almidón (4X).....69

En el apéndice

Apéndice 2. Pasos del sistema con inmersión temporal en recipientes RITAS utilizados en la propagación in vitro de café.....	99
Apéndice 3. Pasos a seguir para el cambio de medio en el sistema de inmersión temporal con recipiente RITA® utilizado en la propagación in vitro de café.....	100

Cuadro 1. Composición química de los diferentes medios de cultivo ensayados (T4 Berthouly, 1995, café), Yasuda (Yasuda, 1985, café), M3 y M4 (Côte et al., 1996, banano). Estos medios fueron ensayados tanto en su composición básica como modificado en su contenido de reguladores de crecimiento.....	28
Cuadro 2a. Incidencia de diferentes medios de cultivo en su composición básica sobre la regeneración de embriones somáticos en biorreactor. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	29
Cuadro 2b. Efecto de las sales minerales y vitaminas sobre la regeneración de embriones somáticos en biorreactor. Letras iguales indican que no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	30
Cuadro 3. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de embriones somáticos de café en biorreactor utilizando el medio de cultivo Yasuda. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	33
Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de embriones somáticos de café en biorreactor utilizando el medio de cultivo M4 sin AIA. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	36
Cuadro 5. Efecto del aporte hormonal (auxina y citoquinina) sobre la regeneración de embriones somáticos de café en biorreactor utilizando el medio M3. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	40
Cuadro 6. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre la regeneración de embriones somáticos. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	43
Cuadro 7. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre el peso seco (PS) y el contenido de agua (CA) del callo embriogénico, pH y conductividad eléctrica (CE) del medio de cultivo, a las seis semanas de iniciada la regeneración.....	46
Cuadro 8. Concentración mineral del medio de cultivo a las seis semanas en biorreactor utilizando diferentes frecuencias y duración de las inmersiones. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).....	49

Cuadro 9. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre la proporción de nutrientes minerales del medio de cultivo con respecto a la concentración inicial.....	50
Cuadro 10. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre el contenido mineral de los agregados celulares a las seis semanas de iniciada la regeneración.....	51
Cuadro 11. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre las características morfológicas y contenido mineral de los embriones somáticos.....	52
Cuadro 12. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre la producción de biomasa y de embriones somáticos a las 14 semanas de iniciada la regeneración.....	67
Cuadro 13. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre el contenido mineral de los agregados embriogénicos a las 6 semanas de iniciada la regeneración.....	66

1. INTRODUCCION

1.1 Justificación

El café es el producto agrícola más importante en el mercado internacional. Su producción genera ingresos que para algunos países principalmente de América Latina, es su principal fuente de divisas. Según el Instituto del Café de Costa Rica (1998) la producción promedio mundial durante el periodo 1997-1998 fue igual a 92 millones de sacos en más de 50 países productores en las regiones tropicales de Latinoamérica, Africa y Asia.

Costa Rica ha sido un país líder en productividad, alcanzando 1500 kg. Ha^{-1} , que representa el doble de productividad de Brasil (Söndahl y Lauritis, 1992). Sin embargo, el control fitosanitario y los costos de fertilización constituyen una parte significativa de los costos de producción, por lo que se han desarrollado programas de selección y mejoramiento de variedades que permitan mantenerla o aumentarla. Algunos criterios importantes son el contenido de cafeína en el grano, resistencia a enfermedades, entre las que destacan: *Hemileia vastatrix* (roya) y *Colletotrichum coffeanum* (antracnosis) en Africa; la resistencia a estrés hídrico y el fácil acceso mecánico para la cosecha (Van der Vossen, 1985). Las especies de mayor importancia económica y de cultivo mundial son *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, encontrándose varios cultivares dentro de cada una de estas especies (Willson, 1985). *C. arabica* cuenta con casi el 70% de la producción mundial, debido a su alta calidad, mientras *C. canephora*, suministra el restante 30%; a las variedades cultivadas de esta última se les llama generalmente Robusta. *C. arabica*, es preferida sobre las otras especies además, por no ser tan vulnerable a enfermedades, particularmente a la roya, cuando se cultiva a bajas altitudes en zonas tropicales (Van der Vossen, 1985). El café Arabica es el más cultivado en Latinoamérica, mientras que el café Robusta representa el 95% de la producción de Indonesia y el 100% de la producción de Costa de Marfil.

La nueva demanda de resistencia a enfermedades, aumento de producción y calidad, ha conducido a la creación de programas de mejoramiento que involucran recombinación de caracteres por cruces y retrocruces, así como eficientes métodos de propagación. La propagación por semillas ha sido usada en las especies autógamas como *C. arabica* con buenos resultados, pero en el caso de especies alógamas como *C. canephora* e híbridos es indispensable la propagación vegetativa.

La forma de propagación vegetativa hortícola de plantas ha sido una práctica común en todo el mundo, y ha tenido como principal objetivo la reproducción en corto tiempo de especies de gran interés agrícola o forestal. Sin embargo, la cantidad de plantas que se pueden obtener por las vías tradicionales de propagación hortícola: esquejes, injertos, estacas, acodos, etc. no son altas y demanda una mano de obra considerable, aumentando los costos de producción de plantas.

Los cultivos *in vitro* ofrecen una alternativa para propagar plantas en grandes cantidades, en corto tiempo y a menor costo, así como, obtener variedades de mayor rendimiento mejoradas genéticamente. Una de las técnicas más empleadas para la regeneración de plantas por esta vía, es la embriogénesis somática, que consiste en la obtención de plantas a partir del cultivo de células somáticas (no sexuales), que sin fusión de gametos repite los pasos de la embriogénesis cigótica hasta formar un embrión con las mismas características del embrión cigótico.

Es importante destacar que el proceso de propagación por embriogénesis somática en medio líquido y más específicamente mediante el uso de bioreactores se ha efectuado en varias especies como begonia (Takayama y Akita, 1994), *Hevea brasiliensis* (Etienne *et al.*, 1997), café (Zamarripa, 1994), como una forma de obtener embriones en gran cantidad y potencialmente convertibles en plantas. Sin embargo, una aplicación a escala comercial no ha sido lograda hasta el momento.

En América Central se desarrolla actualmente un programa de mejoramiento genético en café, donde participan varias instituciones como PROMECAFE, las Instituciones de café

en Centro América, instituciones nacionales de investigación sobre el café, la Cooperación Francesa (CIRAD, ORSTOM, MAE) y el CATIE (Costa Rica), el cual tiene como finalidad, cruzar variedades tradicionales de América Latina con individuos silvestres de Etiopía y Sudán para recuperar una fuente de variabilidad y posteriormente propagar a escala comercial los híbridos F1 de *Coffea arabica* obtenidos. La importancia de propagar dichos híbridos, se basa en las características de resistencia a la roya, tolerancia a nemátodos, gran vigor, y alta productividad. La propagación masiva de embriones somáticos de café haciendo uso de bioreactores, ofrece ventajas como: poder obtener plantas en corto tiempo y evitar la separación y transferencia manual de embriones en las diferentes etapas del proceso, resultando en un bajo costo. Además, el sistema hace uso de recipientes de inmersión temporal automatizado (RITA®), que corrige ciertos problemas del uso de un medio líquido con inmersión continua, tales como: hiperhidricidad de los explantes, riesgos de asfixia y anomalías del desarrollo, asociados con una agitación continua que provocan una disminución del potencial de regeneración de los embriones.

Se sabe que en el caso del café, el futuro de los híbridos F1 dependerá de 3 parámetros: i) su plus-value en comparación a variedades cultivadas, ii) su aceptación por los productores y iii) su costo de producción, directamente condicionado por la eficacia del proceso de propagación por embriogénesis somática.

Actualmente se tiene bien estandarizado el proceso, desde la inducción del callo embriogénico de alta frecuencia, hasta la obtención de plantas completas, optimizándose las diferentes etapas involucradas en el sistema de regeneración. Estas etapas comprenden:

- a. Inducción del tejido a la embriogénesis, mediante la formación de un callo a partir del cultivo de explantes foliares (6 a 7 meses).
- b. Multiplicación a largo plazo (1 a 2 años), del callo embriogénico en suspensión celular.
- c. Regeneración y desarrollo de embriones somáticos en medio sólido o líquido (bioreactor RITA®) (4 a 5 meses).
- d. Germinación de embriones somáticos en bioreactor (3 meses).

- e. Semillero de los embriones germinados en sustrato hortícola en vivero y conversión en planta (3 meses).
- f. Crecimiento en vivero hasta obtención de plantas en condiciones de ser probadas en el campo (6 meses).

En el proceso que han desarrollado conjuntamente los laboratorios del CIRAD y el CATIE, la obtención de un callo embriogénico es posible cualquiera sea el genotipo; y la proliferación de callos en suspensiones celulares es también rutinaria (Etienne *et al.*, 1997 a, b). Además hasta el momento se conoce con gran detalle el sistema de propagación en las etapas tardías de la embriogénesis somática (maduración y conversión a planta), lográndose optimizar el proceso para obtener el máximo rendimiento (la totalidad de los embriones logran germinar). Así, Girón (1998), trabajó en la etapa de desarrollo y maduración de los embriones para obtener una mejor sincronización del crecimiento y tasa de conversión en plantas. Etienne-Barry *et al.*, (1999), optimizando las condiciones de germinación en bioreactor RITA®, lograron sembrar los embriones somáticos directamente en el suelo para obtener su conversión en planta en vivero. En esta etapa, la eficacia es ahora muy elevada, 80% de los embriones regeneran plantas directamente bajo estas condiciones.

1.2 Caracterización del problema.

Actualmente la etapa del proceso de embriogénesis somática que parece la menos eficiente, en términos de reproducibilidad, rendimiento y duración, es la etapa de regeneración o producción de embriones somáticos desarrollados. Los problemas encontrados pueden tener su origen, ya sea en la etapa previa de proliferación de la suspensión embriogénica, o directamente a nivel de la etapa de regeneración en bioreactor. En estas dos etapas es poco lo que se conoce acerca de la influencia que tienen los factores químicos y físicos sobre la producción de embriones somáticos.

Partiendo de una suspensión celular homogénea, es indispensable conocer aspectos relacionados con factores químicos (medio de cultivo, balance de los reguladores de

crecimiento), físicos (frecuencia de inmersión, densidad de muestra, ritmo de cambio del medio) y genéticos que nos permita obtener mayor variabilidad en la expresión embriogénica y poder seleccionar entre ellos condiciones de cultivo que nos permita acortar más los tiempos de regeneración, aumento de la cantidad y calidad de los embriones, y se espera en consecuencia un mayor rendimiento del proceso en general, acompañado lógicamente de una reducción en los costos de producción.

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general

Optimizar la regeneración de embriones somáticos en el biorreactor simplificado (RITA[®]) y lograr una propagación masiva a escala comercial de los híbridos F1 de *C. arabica* seleccionados.

1.3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar un medio de cultivo líquido para la etapa de regeneración en biorreactor.
- Estudiar la influencia de los reguladores de crecimiento exógenos (auxina y citocinina) sobre la producción de embriones en bioreactor.
- Determinar los efectos de la frecuencia y la duración de las inmersiones temporales utilizadas en bioreactor sobre la producción de embriones somáticos
- Determinar la influencia del ritmo de cambio de medio sobre la producción de embriones somáticos.
- Conocer la influencia de los factores físicos estudiados sobre la nutrición mineral

- Determinar los cambios morfológicos, histológicos y ultraestructurales, que ocurren en las etapas de regeneración del proceso embriogénico.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Origen e historia del *C. arabica*

El género *Coffea* fue propuesto en 1735 por Linné, quien más tarde en 1753 describió la especie *C. arabica*. *Coffea* pertenece a la familia Rubiaceae, que incluye más de 500 géneros y cerca de 8000 especies (Cherrier y Barthaud, 1985). Los árboles de café silvestres son componentes naturales de los bosques tropicales de Africa. Todos los botánicos que han explorado los bosques de las tierras altas del sur oeste de Etiopía, Sur de Dsudán y Norte de Kenia, están de acuerdo con la observación de que éste es el centro de diversidad de *C. arabica*, y se considera a Yemen como centro secundario de origen.

La historia del café Arabica puede trazarse desde sus orígenes en Etiopía a Yemen en la Península Arábiga. Durante el siglo XIII invasores Arabes y Persas probablemente introdujeron el café en otras regiones. Yemen fue el primer país en establecer plantaciones comerciales de café, las cuales eran altamente beneficiosas (Söndahl y Lauritis, 1992). En el siglo XVII, fue introducido a Europa posiblemente mediante un traslado desde Java hasta el jardín Botánico de Amsterdam y fue a partir de una sola planta. Este individuo jugó un papel excepcional en la historia de la creación varietal puesto que fue el origen de la mayoría de las variedades cultivadas en el mundo (Anthony *et al.*, 1999).

El café Arabica en el continente Americano.

Las primeras introducciones hacia el continente Americano datan de comienzos del siglo XVIII. Semillas de estos árboles Arábigos fueron enviadas desde Amsterdam a las colonias Suramericanas de Surinam (Guyana Holandesa) y de Cayena (Guyana Francesa) y luego a Brasil en 1727. Los ingleses introdujeron cafetos en Jamaica en 1730 y a finales del siglo XVIII, el cultivo se extendió al Caribe (Cuba, Puerto Rico, Santo Domingo), México y Colombia (Anthony *et al.*, 1999). Lo más notable es que la mayoría de las

introducciones de café evolucionaron de muy pocas semillas o plantas, restringiendo así la base genética de las plantaciones establecidas en países fuera del centro de origen (Söndahl y Lauritis 1992). En definitiva, los cafés de Yemen dieron origen a dos tipos de *Arabica*: *C. arabica* var. *arabica* conocido como Arábigo, Typica o Típica, que constituyó la base genética de las primeras variedades cultivadas en América y Asia, y *C. arabica* var. *bourbon*, que se difundió a partir de la isla Borbón ahora Reunión (Krug *et al.*, 1939).

2.2. Habitat natural y recursos genéticos.

Todos los colectores han notado una adaptación realmente específica de los árboles de café a las elevaciones, altitud, lluvia y tipos de suelo específicos. Así se pueden conseguir especies que crecen en lugares húmedos y de alta montaña como el Este de Africa, en contraste a otras que crecen en condiciones de altitud menos pronunciadas y de mayor sequía, como ocurre al Oeste de Africa.

En vista de los problemas que enfrenta la caficultura, como búsqueda de variedades resistentes a plagas y enfermedades, así como aumento de la producción y calidad de la bebida, se propone una solución que se basa en la explotación de la diversidad genética disponible en la naturaleza para transferir nuevas potencialidades a las variedades cultivadas. En tal sentido, la FAO y organizaciones francesas (ORSTOM, CIRAD) han intensificado sus esfuerzos para coleccionar germoplasma nuevo de café en los últimos 20 años, así un número de colecciones obtenidas entre 1964-65 en el Sur Oeste de Etiopía, han probado ser una nueva fuente de germoplasma de gran valor para el mejoramiento del café (Lashermes *et al.*, 1996).

El material recolectado en Etiopía ha sido ampliamente propagado por todo el mundo. Existen diez colecciones vivas importantes para la especie *C. arabica*: cinco en Africa, una en Madagascar, y tres en el continente americano (Costa Rica, Colombia y Brasil). América Central dispone de la colección del CATIE, con más de 1.700 introducciones, encontrándose casi la totalidad de la diversidad genética de la especie *C. arabica*. Sin

embargo, la colección en el campo no permite garantizar la preservación de estos recursos a largo plazo, debido a la erosión genética causada por la presión de selección que ejerce el medio ambiente. Otros métodos de conservación basados en métodos biotecnológicos son necesarios como complemento a la preservación en colecciones de campo (Anthony *et al.*, 1999).

2.3. Mejoramiento genético y selección.

El genoma básico del género es 11 cromosomas y típico para la mayoría de los géneros de la familia Rubiaceae. En la sección *Coffea* todas las especies son diploides con $2n= 22$ cromosomas y de polinización cruzada excepto para *C. arabica* que es la única especie tetraploide ($2n = 4x = 44$) y autopolinizada del género (Charrier y Berthaud 1985). Este aislamiento genético ha inhibido la utilización de toda la variación morfológica y metabólica existente en el género para el mejoramiento de *C. arabica*.

Los programas de mejoramiento exitosos han utilizado la hibridación interespecífica con tetraploides artificiales o naturales de *C. canephora*. Alrededor de 1927, se seleccionó un híbrido interespecífico natural (*C. arabica* x *C. canephora*) en la isla de Timor, luego se inició la selección de las variedades conocidas como Catimor, a partir de la progenie del híbrido de Timor sembrados en Oeiras, Portugal.

El uso de cultivares triploides provenientes del cruce de *C. arabica* con especies diploides, ha sido otra estrategia alternativa para capturar la variabilidad existente entre individuos diploides para el mejoramiento de café. Uno de los beneficios de los triploides es incrementar la probabilidad de recombinación durante la meiosis, sin embargo, estos híbridos en general son estériles. Una solución para recuperar la fertilidad en los triploides, se basa en inducir una duplicación cromosómica obteniéndose así híbridos hexaploides (Anthony *et al.*, 1999). Cualquiera que sea la vía escogida, los híbridos interespecíficos F1 (tetraploides, triploides o hexaploides) son luego retrocruzados por la variedad cultivada con el fin de mejorar el comportamiento agronómico y la fertilidad. Además de la hibridación interespecífica, otros métodos de cultivos se han utilizado para

el mejoramiento del café: introducción de plantas y selección, cruces artificiales con parentales seleccionados y el método de retrocruces. Sin embargo, los cultivos convencionales tienen limitaciones para el mejoramiento del café debido a las barreras genéticas del número de cromosomas (diploides vs. triploides), autoincompatibilidad (especies diploides) y ciclos largos de cultivo (Söndahl y Lauritis, 1992).

La práctica más común de propagación de los cultivares comerciales de café Arabica ha sido la multiplicación por semillas, en vista de la uniformidad genética derivada de su carácter de autopolinización. En contraste, la gran variación encontrada en poblaciones de plantas estrictamente alógamas como *C. canephora*, *C. liberica* y *C. excelsa* ha hecho que los agricultores practiquen métodos de multiplicación clonal para establecer plantaciones uniformes. Los híbridos deben ser propagados vegetativamente por la pérdida de fertilidad (Willson, 1985). El injerto fue una de las técnicas preferidas en Indonesia, mientras que el enraizamiento de estacas fue el preferido en Africa. Más recientemente, una propagación clonal a gran escala fue considerada para *C. arabica*, específicamente para un híbrido natural con resistencia a enfermedades obtenido en Brasil y Africa del Este mediante un programa de mejoramiento (Van der Vossen, 1985). Esta propagación no fue exitosa en estos casos debido a los límites de la propagación hortícola (Berthouly y Etienne, 1999).

Los métodos convencionales de propagación vegetativa *in vivo* permite poco incremento en el número de plantas clonales debido a la poca cantidad de brotes ortotrópicos disponibles para injertos o estacas, en tal sentido las técnicas *in vitro* de propagación clonal ofrecen mejores prospectos. Pueden ayudar a solucionar los problemas que afectan la producción de café, mediante la propagación masiva de plantas en corto tiempo. Permite propagar variedades previamente seleccionadas por ofrecer resistencia natural a alguna enfermedad o puede ser un carácter de selección en la etapa del proceso de aplicación de las técnicas de cultivos *in vitro*. De esta forma se podría obtener plantas en gran cantidad, genéticamente mejoradas, con alto rendimiento y a bajo costo.

2.4. Cultivo de tejidos en café.

Aunque el café es un producto agrícola importante, no ha sido tan beneficiado por el desarrollo tecnológico a nivel celular y molecular como ha ocurrido con otros cultivos. Sus programas de mejoramiento podrían incluir métodos como micropropagación, rescate de embriones, cultivo de anteras, suspensiones celulares, variación somaclonal, fusión de protoplastos y transformación genética (Söndahl y Lauritis, 1992). La micropropagación se ha logrado exitosamente, aunque solamente a nivel de laboratorio, a través de meristemos preexistentes, ya sea apicales o axilares. Con más frecuencia se han usado los brotes adventicios (organogénesis) y los embriones somáticos de alta frecuencia (embriogénesis somática) como medio de propagación (Söndahl *et al.*, 1993).

El cultivo de tejido en café fue primero reportado por Staritski (1970), quien describió la presencia de embriones somáticos a partir de vástagos ortotrópicos de *C. canephora*. Herman y Hass (1975) reportaron el desarrollo de organoides a partir del cultivo de callos. La embriogénesis somática de alta y baja frecuencia a partir de explantes de hojas de café fueron reportadas por primera vez por Söndahl y Sharp (1977) en *C. arabica* var. Bourbon donde dos medios sucesivos fueron necesarios: el medio condicionante y el inductor. Se ha encontrado que la inducción exitosa de callos embriogénicos de alta frecuencia es dependiente del ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y de la kinetina. Rangaswamy (1986) considera que la formación de embriones somáticos parece ser el resultado de una interacción muy estrecha entre diversos factores, de los cuales se puede citar el genotipo, la composición del medio y las condiciones de cultivo.

Hasta la fecha no existe un ejemplo de utilización del cultivo de tejidos a nivel industrial en café.

2.5. Embriogénesis somática a partir de cultivos en suspensión.

La obtención de embriones somáticos de café a partir de suspensiones celulares, es un fenómeno novedoso a nivel mundial dentro del campo de la biotecnología, solo logrado en países desarrollados (Montes *et al.*, 1995). Esta técnica de cultivo *in vitro* tiene como

objetivo fundamental, multiplicar a gran escala plantas élites provenientes generalmente de programas de hibridación, así como las logradas por otras vías biotecnológicas como la fusión de protoplastos y las transformaciones genéticas. Además la suspensión celular ofrece la ventaja de explotar el potencial de la embriogénesis somática y disminuir los costos de producción. Como ejemplo se puede citar el caso de la zanahoria, donde es posible obtener 800,000 embriones somáticos por litro de medio cultivado en bioreactores de 10 litros de capacidad (Nouaille y Petiard, 1988).

El empleo de un medio líquido en cultivo *in vitro* ofrece ventajas económicas como: reducción del trabajo manual, cambio de medio más fácil, ahorro de gelatinizante (Teisson *et al.*, 1995). Esta forma de cultivo condujo a la aplicación de los bioreactores normalmente usados para la producción industrial de bacterias y metabolitos animales o vegetales para la propagación de plantas a través de vástagos y cultivos de embriones. El uso de medio líquido en un bioreactor tiene algunas ventajas como: un gran número de plantas son fácilmente producidas y a gran escala, el cultivo está siempre en contacto con el medio estimulando la absorción de nutrientes y la tasa de crecimiento (Shinsaku *et al.*, 1994). Sin embargo, una forma más eficaz de utilizar el medio líquido consiste en evitar la asfixia e hiperhidricidad de los tejidos, así como los problemas de polarización asociadas a la agitación continua. Por tal motivo, el laboratorio de cultivos *in vitro* de CIRAD (Francia), desarrolló un sistema de inmersión temporal de fácil manipulación y bajo costo denominado Recipiente para la Inmersión Temporal Automática (RITA®), que permite sumergir los explantes en el medio de manera transitoria y no continua (Teisson *et al.*, 1995).

El método ha permitido la propagación eficiente en *Hevea brasiliensis*, donde la producción de embriones somáticos fue 3 o 4 veces superior a los obtenidos en medio gelificado (Etienne *et al.*, 1997a). En café la posibilidad de obtener una embriogénesis somática de alta frecuencia con gran cantidad de agregados embriogénicos dentro de un callo friable, permitió el establecimiento de la técnica como un método de propagación masal de diferentes genotipos. Con los ritmos y tiempos de inmersión adecuados, se permite una obtención de embriones de alta calidad, a partir de las suspensiones

celulares, prosiguiendo su desarrollo hasta la germinación *in vitro*; el tamaño de los cotiledones permite una buena actividad fotosintética y traslado directo de las plantas al invernadero (Etienne-Barry *et al.*, 1999). Desde 1995, se está desarrollando un proyecto de mejoramiento de *C. arabica* en Centroamérica dentro del marco de la red de investigación sobre el café, PROMECAFE con la selección de híbridos F1 que presenten una mejor producción, resistencia a enfermedades y calidad de bebida (Bertrand *et al.*, 1997). Etienne *et al.*, en 1997, dividen el proceso embriogénico en las siguientes etapas:

- a) Callogénesis: a partir del cultivo de segmentos de hojas jóvenes como explante, se obtienen los callos embriogénicos.
- b) Suspensión celular embriogénica: cultivando los callos embriogénicos en medio de proliferación líquido y mantenidos en agitación a 100 rpm.
- c) Regeneración en inmersión temporal: colocando los agregados embriogénicos procedentes de la suspensión embriogénica en RITA® con medio de expresión embriogénica para permitir el desarrollo de los embriones somáticos.

Para lograr un sistema de propagación eficiente y a gran escala de los genotipos seleccionados es necesario optimizar las diferentes etapas del proceso de embriogénesis somática en medio líquido. Zamarripa (1994), trabajando en la optimización de las condiciones de cultivo en café Arabusta, encontró que el proceso embriogénico depende de la densidad de inoculación utilizada y que densidades de 0.5 y 1.0 g. de materia fresca/litro (MF/l) favorece la producción de embriones. Además encontró que la renovación del medio aumentó el número de embriones (518,000 embriones por litro en cinco semanas).

2.6. Etapas del proceso embriogénico.

Emons (1994) define las siguientes etapas de desarrollo generalmente requeridas en el proceso:

- a) Desdiferenciación de las células en el explante, alcanzado normalmente por la aplicación de auxinas, aunque no en todos los casos sea inductor para obtener células

embriogénicas, como en el caso de *Citrus*, donde un cambio en la fuente de carbono en el medio es suficiente (Gavish *et al.*, 1991). En esta etapa el estado de desarrollo del explante es importante para la transición de las células somáticas en células embriogénicas.

- b) Iniciación del desarrollo embrionario comenzando por el estado globular, alcanzado generalmente por una reducción drástica en la concentración de auxinas.
- c) Maduración del embrión. En especies con órganos de reserva bien desarrollados, puede lograrse la maduración, con la aplicación de un medio con altas concentraciones de sacarosa.
- d) Prevención de la germinación antes de la maduración del embrión, la cual puede lograrse usando un medio con alta osmolalidad y hormonas como el ácido abscísico (ABA). Attree *et al.*, (1991), demostraron en *Picea glauca*, que el ABA promueve la acumulación de sustancias de reserva en los embriones y los prepara para la desecación y posterior germinación sin que sufran daño por la deshidratación.

2.7. Histología de la embriogénesis somática.

Berthouly y Michaux-Ferriere (1996), a partir del cultivo de explantes foliares de *C. canephora* en medio condicionante, observaron callos embriogénicos con células parenquimáticas y agregados celulares con una alta relación núcleo citoplasma, un nucleolo de gran tamaño y un citoplasma denso con depósitos de almidón. Al final del período de inducción las células embriogénicas perdieron estas características y se presentaban vacuoladas con almidón y reservas de proteínas. En el segundo medio (inductor de callos embriogénicos de alta frecuencia), las células se separaron unas de otras por modificación de su lamina media, alargamiento y división para formar líneas intrincadas de células vacuoladas. Las paredes de estas células son gruesas y fuertemente coloreadas y las reservas de almidón se observaron como granos grandes dentro del citoplasma, mientras que las reservas de proteínas, se apreciaron reticulares esféricas en

forma más difusa. Después de 4 semanas en el segundo medio, comenzó un proceso de desdiferenciación que comenzó en algunas células con una serie de divisiones nucleares, observándose también una mayor densidad del almidón contenido en el citoplasma y desaparición de las proteínas de reserva dando origen a las células embriogénicas o embriones globulares. Un estudio histológico de la diferenciación de embriones somáticos en discos foliares de Robusta fue presentado también por Pierson *et al* (1983).

2.8. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática.

El factor más ampliamente asociado con la proliferación continua de células embriogénicas es la auxina. En general, la exposición a la auxina es esencial para la inducción del estado embriogénico, pero la exposición continua de ésta puede ser inhibitoria del proceso, o dependiendo de la especie puede también generar ciclos repetidos de embriones (Merkle *et al.*, 1995). La presencia de concentraciones muy altas de auxina o una exposición demasiado larga provoca anomalías en el desarrollo de los embriones somáticos de soya (Parrott *et al.*, 1988).

Efecto de los reguladores de crecimiento en café.

Tradicionalmente los métodos estudiados para obtener embriogénesis somática en café, involucraron las combinaciones de auxinas y citoquininas como reguladores de crecimiento y el requerimiento de largos periodos de tiempo para la regeneración (Hatanaka *et al.*, 1991). Así se ha descrito la producción de callos embriogénicos en un medio definido con Benzil adenina (BA) en cultivos de hoja de *Coffea arabica* (Yasuda *et al.*, 1985). Hatanaka, *et al.* 1991, determinó en *C. canephora*, bajo condiciones experimentales usando auxinas y citoquininas, que las últimas son necesarias para que ocurra la embriogénesis somática, mientras que auxinas como el ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) eran inhibitorias del proceso. La obtención de callos embriogénicos de alta frecuencia a partir de explantes foliares de *C.*

arabica cv. Bourbon fue posible mediante el uso de dos medios: el condicionante y el inductivo. El éxito de la inducción dependió de las concentraciones del ácido 2,4 dicloro-

fenoxiacético y de la kinetina en el medio condicionante (Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996).

2.9. Estudio de la nutrición mineral

La composición precisa de minerales en las plantas es de gran interés, pues la ausencia o exceso de ciertos elementos puede afectar su crecimiento y productividad, más si se trata de una especie de interés alimenticio. Existe un número de elementos esenciales, algunos son necesarios en mayor cantidad que otros (macronutrientes y micronutrientes), con funciones muy específicas en las plantas.

Bajo condiciones de cultivos *in vitro*, la disponibilidad de estos elementos minerales y a las concentraciones adecuadas es muy importante para lograr la propagación de una especie dada. El uso del sistema de biorreactor es muy útil para conocer la dinámica nutricional, seleccionar condiciones óptimas de un medio de cultivo líquido y los efectos de los componentes del medio en la diferenciación celular y el crecimiento (Takayama y Akita, 1994).

Para el caso de la embriogénesis somática, muchos autores hacen énfasis en la influencia de la absorción de elementos minerales, principalmente fuentes de nitrógeno sobre el proceso embriogénico (Whetherell y Dougall, 1976). Así, Find *et al.* (1997) midieron parámetros de crecimiento, absorción de nutrientes minerales y capacidad de maduración de los embriones a partir de suspensiones embriogénicas de *Picea abies*. Etienne *et al.* (1997) en *H. brasiliensis*, estudiaron el efecto positivo sobre la embriogénesis somática aumentando las concentraciones de calcio en el medio de cultivo. Grimes *et al.* (1990) en arroz encontró que la relación $\text{NH}_4/\text{NO}_3^-$ afectaba la regeneración de las plantas. Concentración muy altas o una aplicación prolongada de fuentes nitrogenadas puede conducir a una serie de desórdenes fisiológicos y morfológicos que afectan la regeneración (Hecht y Mohr, 1990). En tal sentido, el estudio de la composición y concentración adecuadas de los elementos minerales en el medio de cultivo ayudan a optimizar el proceso de regeneración a través de la embriogénesis somática.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Ubicación del ensayo

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

3.1.2. Material experimental

3.1.2.1. Material vegetal

a) El material de estudio consistió de suspensiones celulares de un híbrido F1 de *C. arabica*, Caturra x ET531. La Caturra corresponde a una variedad comercial ampliamente cultivada en América Latina, y el genotipo ET531 a una especie silvestre originaria de Etiopía presente en la colección del CATIE. Este híbrido se caracteriza por ser resistente a enfermedades, su producción y su vigor.

3.1.2.2. Sistema de cultivo

a. Proliferación celular

Consistió en permitir la multiplicación de los agregados embriogénicos en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo líquido T3 (Apéndice 1), inoculando a una densidad de 5 g/l, con agitación constante a 100 rpm

b. Regeneración en Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®)

El RITA® Consiste en un bioreactor simplificado desarrollado por el CIRAD (Montpellier, Francia), especialmente diseñado para el cultivo *in vitro*. Este aparato es ajustado a las necesidades del material vegetal, permitiéndole a las células en condiciones de cultivo, una inmersión temporal de algunos minutos por día en el medio nutritivo. El uso de este tipo de biorreactor evita los problemas asociados a una inmersión permanente

y a la agitación que se observan en los biorreactores tradicionales y frascos Erlenmeyer. El RITA tiene dos compartimientos, separados por un tamiz que consiste en una espuma de poliuretano. El medio se coloca en el compartimiento inferior y una sobrepresión creada en éste por una bomba de aire, propulsa el medio al compartimiento superior, que sumerge el material vegetal. El funcionamiento de este bioreactor simplificado se presenta en el Apéndice 2.

3.1.3. Medios de cultivo

La mayoría de los medios probados, tienen como componente mineral básico el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Este medio fue modificado y usado en forma líquida durante las etapas de proliferación y regeneración. En la etapa de proliferación solo se utilizó el medio líquido conocido como "T3" (Van-Boxtel y Berthouly, 1996) (Apéndice 1). En la etapa de regeneración se usó el medio "T4" (Van-Boxtel y Berthouly, 1996), M₃, M₄ (Côte *et al.*, 1996) y Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) (cuadro 1).

Los medios de cultivo se ajustaron a pH 5.6 y se autoclavaron a una presión de 1.2 bares, durante 20 minutos. Los reguladores de crecimiento que se adicionaron a los medios de cultivo son: las auxinas, Acido Indol Acético (AIA) y Acido Naftalen-Acético (ANA); las citoquininas, Benzil Amino Purina (BAP), Kinetina (Kin), Zeatina (Z), 2 isopentenil adenina (2ip) en diferentes combinaciones y concentraciones.

3.1.4. Condiciones de crecimiento

El material vegetal se cultivó en un cuarto de crecimiento, con una temperatura de 27 ± 1 °C, una humedad relativa de $85-90 \pm 3\%$, y un fotoperiodo de 12 horas diarias de luz ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Además para el cultivo en biorreactor se utilizó rampas acondicionadas con las diferentes frecuencias de inmersión empleadas. Las suspensiones celulares se mantuvieron en oscuridad y agitación constante a 100 rpm.

La Figura 1 muestra el esquema del proceso de propagación por embriogénesis somática de *C. arabica*, resaltando en un recuadro de color rojo la fase de regeneración embrionaria, la cual es el objeto de este estudio. Esta fase se divide en una etapa de expresión embriogénica (0 - 6 semanas) y otra de desarrollo embrionario (6 - 14 semanas).

3.2. Método

3.2.1. Proliferación de agregados embriogénicos en suspensión

3.2.1.1. Condiciones de cultivo estándar para la proliferación y la regeneración

Las suspensiones celulares se mantuvieron en el medio de multiplicación "T3", con cambios de medio de cultivo cada 15 días. Las suspensiones se filtraron con una pipeta de 500 μm de diámetro, la cual permitió tomar la fracción celular necesaria para establecer una densidad de 5 g/l en cada Erlenmeyer iniciado. En cada biorreactor se cultivaron 250 mg de agregados celulares en los diferentes medios ensayados. La capacidad de regeneración de las suspensiones embriogénicas se evaluó después de 14 semanas.

La renovación del medio se realizó transfiriendo el compartimiento interno del recipiente, el cual contiene la muestra vegetal a otro previamente autoclavado, a éste se le agregó el medio nuevo (Apéndice 3).

La conversión en planta se realizó en presencia del medio T5 (Apéndice 1) gelificado en tubos de ensayo.

3.2.2. Regeneración de embriones somáticos en medio líquido

Las condiciones químicas y físicas del cultivo en biorreactores, se optimizaron para obtener la regeneración masiva de embriones somáticos.

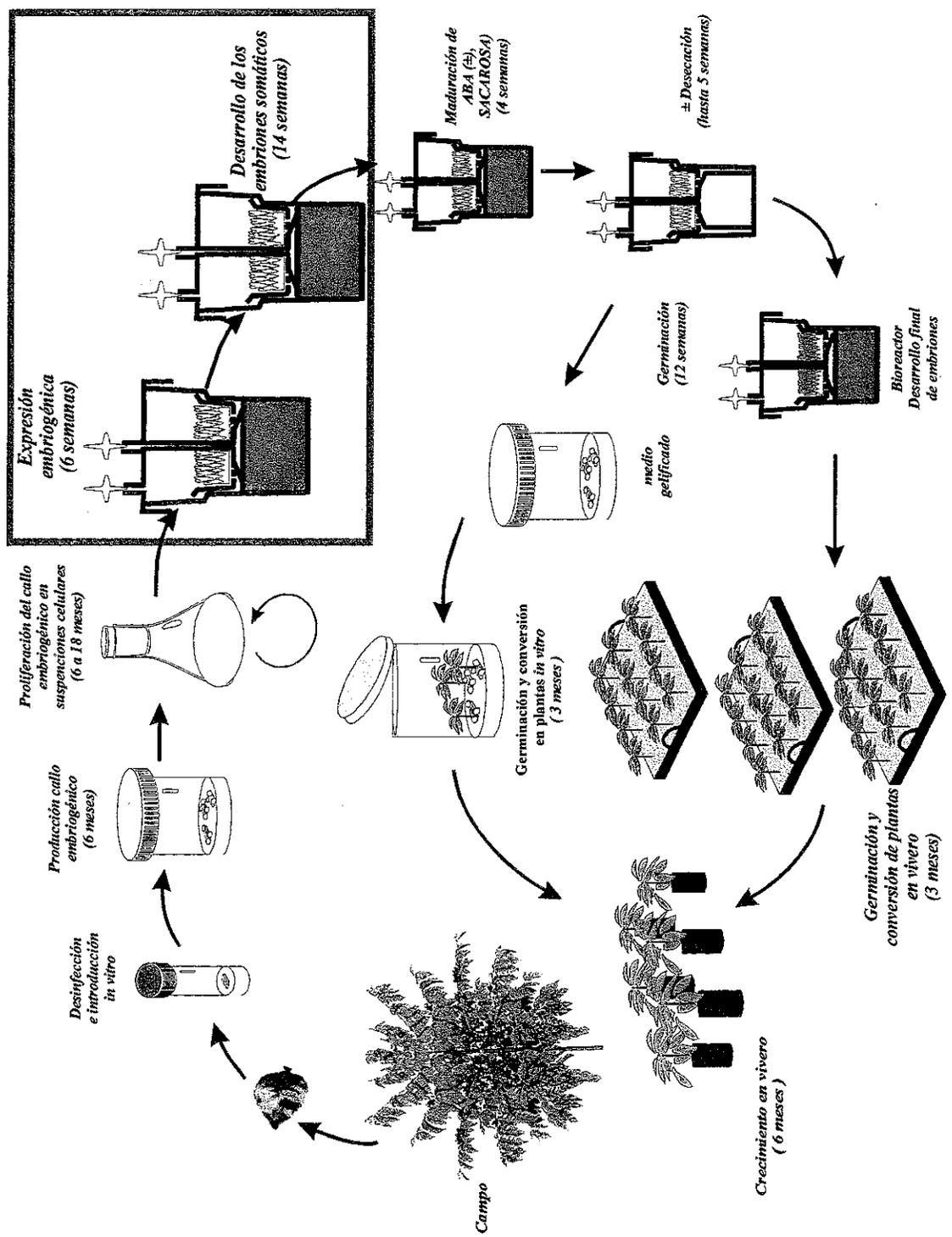


Fig. 1. Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia

3.2.2.1. Efecto de los factores químicos sobre la regeneración de embriones somáticos.

El tratamiento testigo consistió en el medio de cultivo T4 (Berthouly, 1995), una densidad de inoculación en el bioreactor de 250 mg de agregados celulares, una frecuencia de inmersión de 2 veces al día por 1 minuto (2v x 1') y una frecuencia de renovación de medio cada 6 semanas. En la Figura 2 se presenta un esquema del estudio de los factores químicos sobre la regeneración.

a. Comparación de diferentes medios de regeneración y de su composición en sales minerales y vitaminas

Los medios de cultivo para regeneración, T4 (café, Berthouly, 1995), M3 y M4 (banano, Cote *et al.*, 1996) y Yasuda (café, Yasuda *et al.*, 1996) fueron comparados tanto en su composición básica (reportada por los autores), como modificado sin auxinas. En el último caso se mantuvieron iguales las concentraciones de sacarosa, valores de pH y BAP (5 mg/l), para todos los medios comparados, así las diferencias encontradas entre estos medios provendrían solo de su composición en sales minerales y vitaminas. En cada biorreactor se colocaron 200 ml del medio de cultivo correspondiente y se mantuvo constante el resto de las condiciones especificadas anteriormente en 3.2.2.1. (densidad de inóculo, frecuencia de inmersión y renovación del medio de cultivo).

b. Influencia de los reguladores de crecimiento exógenos sobre la regeneración de los embriones somáticos

Se estudió el efecto que tiene el aporte exógeno de reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones, sobre la capacidad regenerativa de la suspensión embriogénica y la calidad de los embriones obtenidos. Se usaron los medios M4 y Yasuda libres de auxinas y se les agregó BAP a las concentraciones de 0.0, 0.5, 1.1, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 mg/l. El medio M3 se usó de la siguiente forma: a) básico (ANA 0.2 mg/l, Z 0.05 mg/l, Kin 0.1 mg/l y 2ip 0.2 mg/l), b) los mismos reguladores de crecimiento anteriores, pero sin ANA, c) Z 1.6 mg/l, 2ip 1.5 mg/l, Kin 1.6 mg/l; y d) BAP 5 mg/l.

El mejor medio de cultivo fue seleccionado y luego se utilizó en la segunda etapa, relacionada con el estudio de los factores físicos. Los experimentos se mantuvieron en condiciones de cultivo por un período de 14 semanas, y luego se midieron las variables especificadas en 3.2.4.1.

3.2.2.2. Efecto de los factores físicos sobre la regeneración de embriones somáticos y nutrición mineral

En esta segunda parte se estudió el efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones, el ritmo de cambio de medio nutritivo sobre la producción y calidad de los embriones producidos, y la influencia de la nutrición mineral durante todo el proceso de regeneración en biorreactor (Fig. 2). Para tal fin, se usó el mejor medio de cultivo seleccionado en la sección anterior. Durante la fase de expresión embriogénica (semana 0 a 6) se usó el medio Yasuda con BAP 5 mg/l y para la fase de desarrollo embrionario se usó el medio T4 con BAP 0.3 mg/l (semana 6 a 14). Los tratamientos se evaluaron al final de la semana 14.

a. Efecto de la frecuencia y duración de la inmersión en el bioreactor sobre la regeneración de embriones somáticos

Se usaron diferentes combinaciones de frecuencias y tiempos de inmersión para determinar su eficiencia en el proceso de regeneración: duración de la inmersión (1, 5 y 15 minutos) y frecuencia de inmersión diaria (1, 2 y 6 veces). La frecuencia y duración de las inmersiones se controlaron con un reloj programable.

b. Efecto del ritmo de cambio del medio de cultivo

La frecuencia de renovación del medio de cultivo en el biorreactor fue modificada durante la etapa de regeneración, con el fin de determinar su efecto sobre la producción de embriones somáticos. Se hicieron cambios de medio cada 1, 2, 4, 6 y 8 semanas después de iniciada la regeneración y durante las 14 semanas que duró el proceso. La evaluación de la producción y calidad de los embriones se hizo a las 14 semanas de iniciada la regeneración.

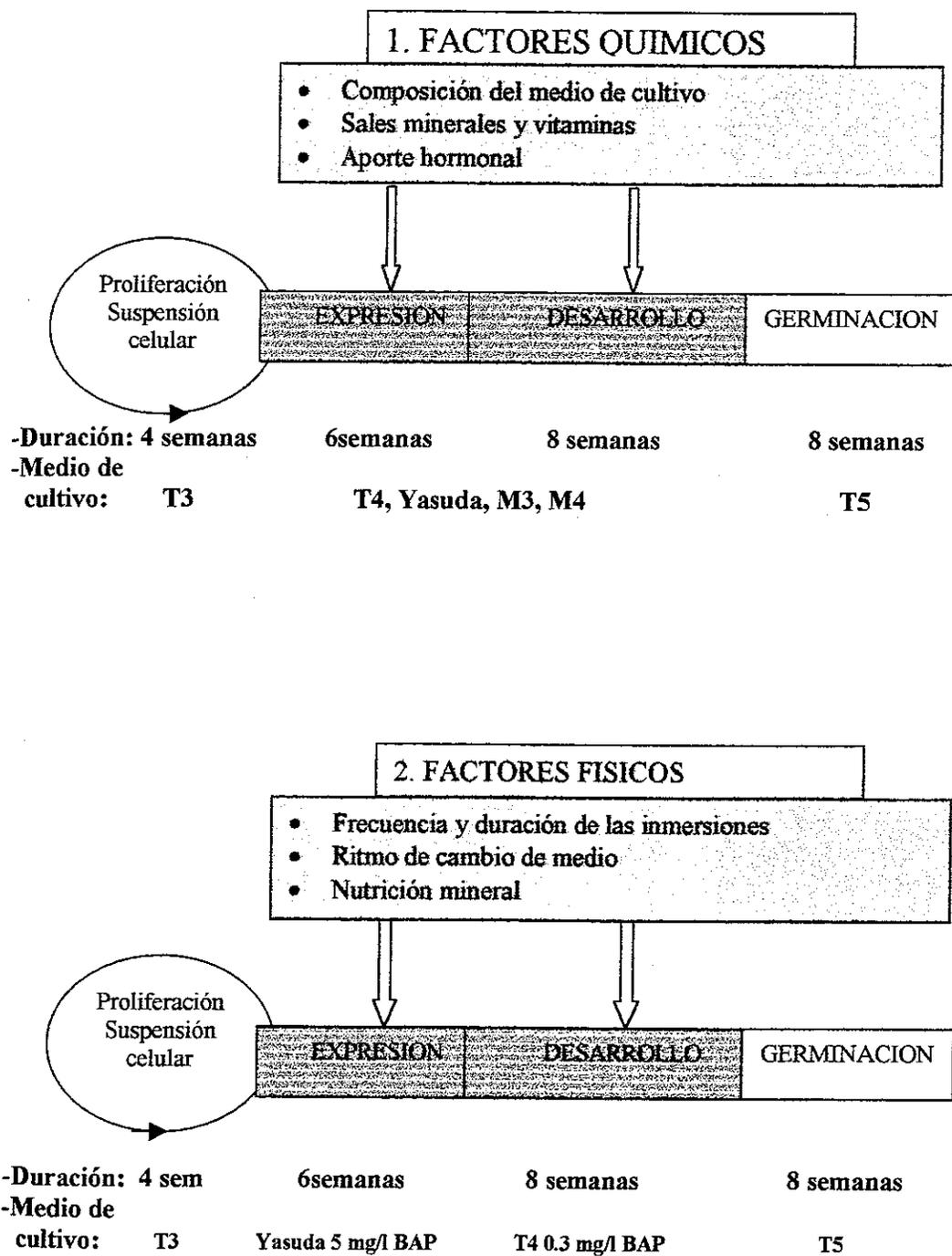


Fig. 2. Esquema de la metodología seguida para estudiar el efecto de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de café.

c. Análisis de la concentración mineral en el tejido vegetal y medio de cultivo

El análisis mineral se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Tejidos vegetales y Aguas del CATIE.

Para el análisis del contenido mineral de los tejidos vegetales (realizado sobre los agregados embriogénicos a las 6 semanas y embriones somáticos a las 14 semanas) se hicieron mediciones en los contenidos de Calcio (Ca^{++}), Magnesio (Mg^{++}), Potasio (K^+), Fósforo (P), Cloro (Cl), y Nitrógeno (N) total). La determinación de N total se hizo siguiendo el método semi-micro Kjeldahl. Los análisis de Ca, Mg, K, se hicieron mediante lectura por absorción atómica y el P por método colorimétrico desarrollando color azul de Molibdeno.

Para el análisis del medio líquido se determinaron las concentraciones de Ca^{++} , Mg^{++} y K^+ por absorción atómica a partir de una dilución del extracto. El P fue determinado por el método del Cloruro Estañoso, desarrollando color Azul de Molibdeno leído a 660 nm, los Cloruros (Cl), por método volumétrico titulando con Nitrato de Plata, y los análisis de NH_4^+ y NO_3^- por destilación, utilizando Oxido de Magnesio como base y Aleación Devarda como agente reductor para el NO_3^- .

3.2.3. Análisis histológicos y de microscopía electrónica

Los estudios histológicos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología del CATIE y los de microscopía electrónica en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica en San José.

Para los estudios histológicos, se eligieron tres muestras representativas de cada tratamiento. Estas muestras fueron colocadas en agar al 1% y posteriormente colocadas en FAA, se deshidrataron luego en una serie ascendente de alcohol (50-70-80-90-95-100-100%), una hora en cada uno de ellos. Luego se infiltraron en resina Kulzer y se hicieron cortes longitudinales a 3 μm de grosor. Los cortes fueron teñidos con PAS (Periodic acid-Schiff) – NBB (Naphthol blue black). PAS tiñe específicamente los polisacáridos en

color rojo (paredes celulares y almidón) y NBB revela en azul las proteínas solubles e insolubles (Fisher, 1968).

El estudio de su morfología externa se hizo con ayuda de un Scanning Electronic Microscopy (SEM). Para ello, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, llevados en buffer fosfato, postfijadas en tetraóxido de osmio al 1% y de nuevo lavados en buffer fosfato. Seguidamente se deshidrataron de la misma forma hecha en el estudio histológico y se secaron por punto crítico con la metodología del test butanol. Una vez secados, se colocaron en bases de aluminio cubiertas con oro paladio para su examinación al SEM (S 2360 Hitachi). Finalmente se tomaron fotografías con una película VP-120.

3.2.4. Análisis estadístico

Se usó un Diseño Irrestricto al Azar (DIA). El modelo estadístico que describe la información obtenida para cada variable fue:

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

donde:

Y_{ij} = variable de respuesta que representa la observación j-esima bajo el tratamiento i-esimo

μ = media general

T_i = efecto del tratamiento i

E_{ij} = error experimental asociado a la unidad j y el tratamiento i

Se realizó un análisis de varianza con un criterio de clasificación, seguido de una prueba SNK para comparación de medias ($P= 0.05$). Se utilizó el procedimiento GLM de SAS (Statistical Analysis System) para analizar los datos y el procedimiento Corr para determinar correlaciones entre las variables.

Los tratamientos evaluados fueron:

Factores químicos:

Medios de cultivo: T4, M4, M3 y Yasuda

Factores físicos:

- a. Frecuencia y duración de las inmersiones
- b. Ritmo de cambio de medio

3.2.4.1. Variables de respuesta evaluadas

a. Determinación de la cantidad de biomasa

- *Biomasa total en el biorreactor:* determinada en el contenido total de callo y embriones contenidos en el biorreactor.
- *Biomasa de callo:* se calculó el peso fresco total del callo presente en cada biorreactor a partir del contenido de callo presente en muestras de 800 a 900 mg.
- *Biomasa de embriones:* se calculó el peso total de embriones de la siguiente manera:
Biomasa de embriones = Biomasa total – Biomasa de callo

b. Determinación de la cantidad y calidad de los embriones obtenidos

- *Número total de embriones totales y torpedos:* de cada muestra de 800 a 900 mg se contó el número de embriones con morfología torpedo y total (incluye todas las morfologías) para estimar luego la cantidad de embriones por biorreactor.
- *Frecuencia de embriones torpedo:* Se calculó la proporción de embriones somáticos con morfología de torpedo con respecto al número total de embriones producidos. El cálculo se realizó de la siguiente forma: % de embriones torpedo = $(N^{\circ} \text{ embriones torpedo} / N^{\circ} \text{ embriones total}) \times 100$
- *Peso fresco (PF) y Contenido de agua (CA):* Estas variables se midieron sobre 4 repeticiones de 10 embriones cada una. Las muestras se secaron por 48 horas a 70°C y se registró el PS, luego se calculó el CA: % CA = $((PF - PS) / PS) \times 100$

c. Estudio del crecimiento de la biomasa total durante la etapa de la expresión embriónica, en los ensayos de la influencia de los factores físicos

- *Peso fresco (PF) y Peso seco (PS) de los agregados embriónicos*: se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento provenientes de 4 biorreactores diferentes, en los experimentos de influencia de los factores físicos: a) frecuencias y duración de las inmersiones, b) ritmo de cambio de medio.
- *pH y Conductividad eléctrica (CE)*: Se midieron en 3 repeticiones para cada tratamiento sobre 3 biorreactores diferentes a partir del medio de cultivo líquido.

d. Estudio de la nutrición mineral

- *Concentración de elementos minerales en el medio de cultivo y material vegetal*: cada tratamiento consistió de 3 repeticiones. En el ensayo sobre el efecto del ritmo de cambio de medio, se realizó una cinética de las tasas y velocidad de absorción mineral:

Tasa de absorción (%) = $(C_{ti} - C_{to})/C_{to}$, donde C_{ti} = concentración del elemento en el medio al tiempo i , C_{to} = concentración inicial del elemento en el medio autoclavado, C_{ti} y C_{to} son expresados en mg/l.

Velocidad de absorción: $V = (M_{t_{i+1}} - M_{t_i}) / (PSt_{i+1} - Pst_i)$, donde $M_{t_{i+1}}$ = concentración del elemento al tiempo t_{i+1} semana, M_{t_i} = concentración del elemento al tiempo i , Pst_i = peso seco al tiempo i , PSt_{i+1} = peso seco a tiempo $i + 1$ semana, M_{t_i} y $M_{t_{i+1}}$ son expresados en mM y Pst_i y PSt_{i+1} son expresados en g.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Efecto de los factores químicos sobre el proceso de regeneración de embriones somáticos en biorreactor

4.1.1.1. Comparación de la eficiencia de varios medios de cultivo para regeneración T4 (Berthouly, 1995, café), Yasuda (Yasuda, 1985, café), M3 y M4 (Côte *et al.*, 1996, banano) en su composición básica

La composición química de los diferentes medios probados (cuadro 1) afectó tanto la cantidad de biomasa producida así como la proporción de embriones en esta biomasa (cuadro 2a). El medio Yasuda fue el más eficiente, permitiendo una producción de biomasa más orientada hacia la producción de embriones (mejor frecuencia de biomasa en forma de embriones) y una producción de callo limitada. Hay que destacar que ningún medio nutritivo permitió evitar la producción de callo durante la regeneración de embriones en biorreactor. Se obtuvo siempre una mezcla de callo y embriones después de 3 meses de regeneración. El medio T4 fue el que más estimuló la formación de callo y una regeneración muy baja del número de embriones torpedo y totales. Con el medio M4 se obtuvo gran cantidad de callo, comparado con los medios Yasuda y M3. Contrario a Yasuda, el uso de los otros medios de cultivo condujo a la obtención de una biomasa más orientada hacia la producción de callo embriogénico que de embriones (proporción de embriones en la biomasa inferior o igual a 20%).

La utilización de 4 medios diferentes condujo a 2 situaciones distintas a nivel de la producción de embriones (cuadro 2a). Cuando se usaron los medios Yasuda y M4 se produjo una mayor cantidad de embriones totales. Con los medios M3 y T4 la cantidad de embriones totales regenerados fue muy baja. Los medios Yasuda y M4 fueron los mejores para obtener embriones en estado torpedo (cuadro 2a).

Cuadro 1. Composición química de los diferentes medios de cultivo ensayados (T4 Berthouly, 1995, café), Yasuda (Yasuda, 1985, café), M3 y M4 (Côte et al., 1996, banano). Estos medios fueron ensayados tanto en su composición básica como modificado en su contenido de reguladores de crecimiento.

Compuestos	T4 (mg/l)	M3 (mg/l)	M4 (mg/l)	Yasuda (mg/l)
Macronutrientes				
NH ₄ NO ₃	825		1650	412
KNO ₃	950	2500	1900	475
KH ₂ PO ₄	85		170	85
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220	200	440	110
MgSO ₄ . 7H ₂ O	185	400	370	92
NH ₄ H ₂ PO ₄		300		
Micronutrientes				
H ₃ BO ₃	3.1	5	6.2	3.1
MnSO ₄ . H ₂ O	8.45	10	16.9	6.8
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	5.3	1	10.6	4.3
KI	0.415	1	0.83	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0125	0.2	0.025	0.05
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.125	0.1	0.25	0.125
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.0125	0.1	0.025	
Fe-EDTA				
FeSO ₄ . 7H ₂ O	13.9	15	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	18.65	20	37.3	37.3
Vitaminas				
Mio-inositol	200	100	100	100
Acido nicotínico	1	0.5	0.5	1
Piridoxina. HCl	1	0.1	0.1	1
Tiamina. HCl	10	0.5	0.5	10
Glicina	2	2	2	
Fuentes de N orgánico				
Extracto de malta	400	400		
Hidrolizado de caseína	400			
Adenina	40			
Biotina		1		
Glutamina		100		
Prolina		230.2		
Reguladores de crecimiento				
AIA			2	
BAP	4		0.5	1.1
ANA		0.2		
Zeatina		0.05		
2ip		0.2		
Kinetina		0.1		
Fuentes de Carbono				
Sacarosa	40,000	45,000	30,000	30,000
Lactosa		10,000		
PH	5.6	5.3	5.6	5.6

Los medios T4 y M3, no fueron buenos inductores del proceso de regeneración de embriones, presentando valores menores al resto de los tratamientos. No se notó diferencias en el efecto del medio nutritivo utilizado sobre la calidad de los embriones formados, ya que las frecuencias de embriones torpedo obtenidas no fueron significativamente diferentes. En un corte histológico hecho a los callos embriogénicos crecidos en el medio T4, se pudo observar agregados deformes y muchas de las células con el citoplasma plasmolisado (Fig. 3c y d), contrario a lo que ocurrió con M3, donde a pesar de que hubo poca producción de embriones, se podían observar agregados celulares en buen estado y formación de embriones normales (Fig 3a). Igualmente, en el medio Yasuda se observaron agregados embriogénicos y embriones en formación completamente normales (Fig. 3b).

Cuadro 2a. Incidencia de diferentes medios de cultivo en su composición básica sobre la regeneración de embriones somáticos en biorreactor. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Tipo de medio	Producción de biomasa				Producción de embriones		
	Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop. biom. emb (%)	N° emb. tot.	N° emb. torp.	Frec. emb. torp. (%)
T4 (café)	43.8±1.1 ^a	42.8±1.5 ^a	0.9±0.5 ^b	2±1 ^c	203±148 ^b	154±169 ^b	46±50 ^a
Yasuda (café)	13.0±1.9 ^c	5.2±1.4 ^c	7.8±1.7 ^a	60±8 ^a	1414±148 ^a	850±187 ^a	64±7 ^a
M4 (banano)	23.5±5.4 ^b	19.6±2.8 ^b	3.9±3.0 ^b	15±10 ^b	1166±183 ^a	455±213 ^a	63±22 ^a
M3 (banano)	5.8±1.0 ^d	4.4±0.4 ^c	1.4±0.7 ^b	23±8 ^b	299±104 ^b	206±64 ^b	70±5 ^a

4.1.1.2. Comparación de la eficiencia de las sales minerales y vitaminas de los diferentes medios de regeneración, T4 (café), Yasuda (café), M3 y M4 (banano).

Al analizar solamente el efecto de las sales minerales y vitaminas, se observaron las mismas tendencias sobre la producción de biomasa y de embriones que fueron observadas con los medios en su composición básica (Cuadro 2b). Las sales minerales y

vitaminas del medio Yasuda fueron las más eficientes en estimular la formación de embriones somáticos, expresado en una mayor biomasa de embriones que de callo. Con las sales de M3 y T4 se observó lo contrario, siendo más significativos los resultados con el medio T4, donde se obtuvo casi 10 veces mayor cantidad de callo que con las demás combinaciones de sales y vitaminas. La utilización de sales y vitaminas de M4 resultó en la obtención de cantidades equilibradas de callo y embriones.

En la producción de embriones, las sales minerales y vitaminas de Yasuda estimularon la producción de embriones totales y torpedo, con una alta frecuencia de embriones torpedo. Las sales y vitaminas de M4, M3 y T4 fueron menos eficientes en la producción de embriones totales y torpedo. En cuanto a la calidad embrionaria el medio M4 presentó una frecuencia de embriones torpedo menor que la obtenida en Yasuda y M3. Este efecto negativo no se observó con el medio nutritivo M4 completo, así que la eliminación de la auxina (ácido indolacético) de su fórmula original, no mejoró la respuesta, por lo que ésta se atribuye a la composición química en sales minerales y vitaminas. Contrario al medio Yasuda, las sales minerales y vitaminas de los medios M3, T4 y M4, fueron poco eficientes para promover la regeneración de embriones somáticos.

Cuadro 2b. Efecto de las sales minerales y vitaminas sobre la regeneración de embriones somáticos en biorreactor. Letras iguales indican que no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Medio de cultivo	Producción de biomasa				Producción de embriones		
	Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop.biom. emb. (%)	N° emb. tot.	N° emb. torp.	Frec. emb. torp. (%)
T4 (café)	43.8±1.1 ^a	42.8±1.5 ^a	0.9±0.5 ^c	2±1 ^d	203±148 ^b	154±169 ^b	46±50 ^{ab}
Yasuda (café)	14.7±6.6 ^b	4.0±1.9 ^b	10.7±4.9 ^a	72±4 ^a	2094±1090 ^a	1670±911 ^a	79±4 ^a
M4 (banano)	11.5±2.4 ^b	5.5±2.3 ^b	6.0±0.9 ^b	53±12 ^b	1052±150 ^b	124±76 ^b	12±8 ^b
M3 (banano)	4.6±1.2 ^c	3.1±0.9 ^b	1.4±0.4 ^c	32±7 ^c	356±115 ^b	328±111 ^b	92±3 ^a

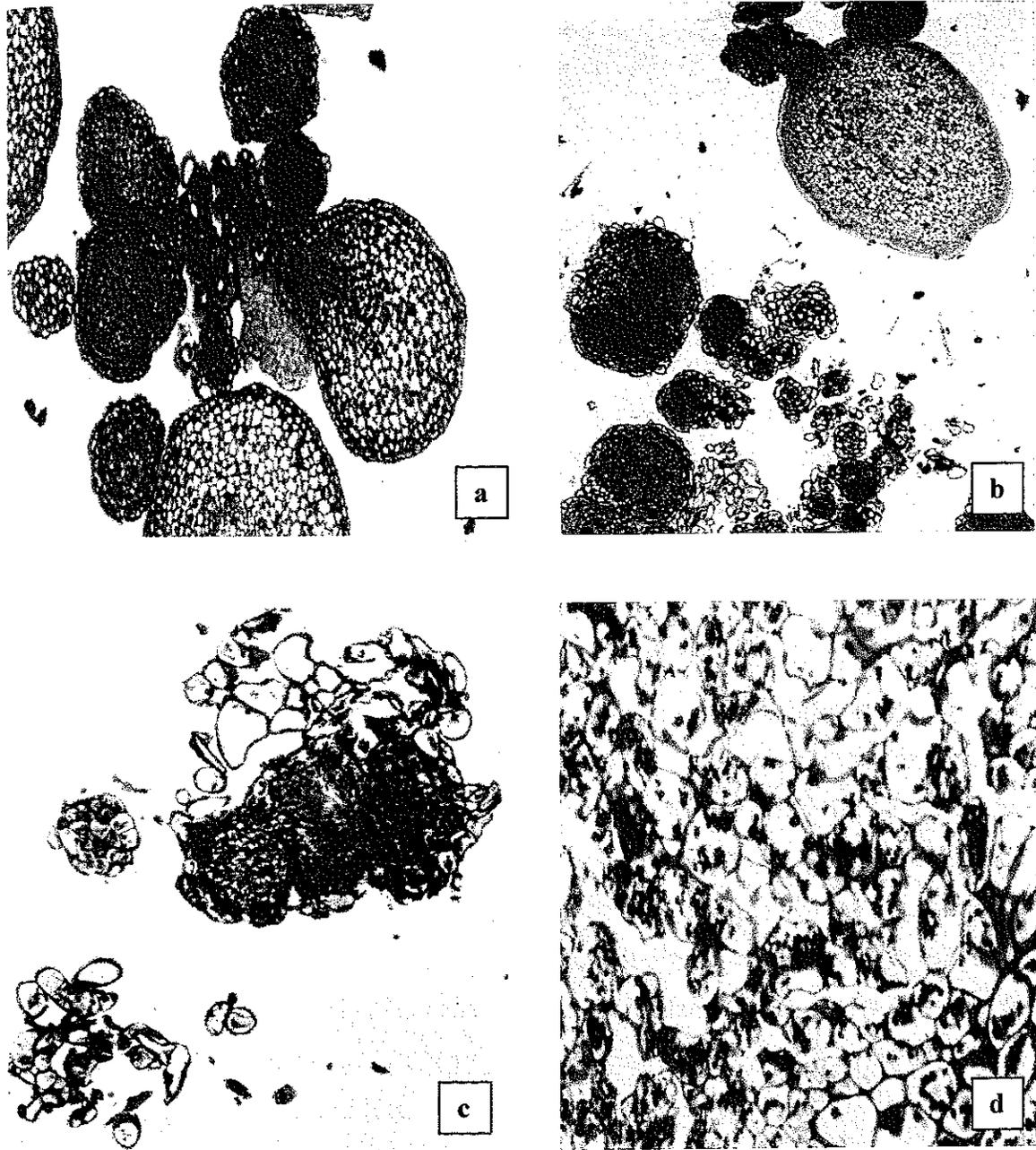


Fig. 3. Aspecto histológico de los agregados embriogénicos y embriones en desarrollo de 8 semanas, cultivados en diferentes medios de cultivo básicos. (a) M3, nótese abundantes agregados embriogénicos y formación de embriones (4x), (b) Yasuda (4X) abundantes agregados embriogénicos y formación de embriones, (c, d) T4 con agregados en mal estado (4X), (d) nótese el daño en el citoplasma de las células del callo (10X)

4.1.1.3. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de embriones somáticos

- *En el medio de cultivo Yasuda*

Las cantidades de biomasa de callo y embriones fueron poco influenciadas por la concentración de BAP excepto cuando se usó una alta concentración de BAP (8 mg/l), donde pudo observarse una tendencia a la disminución de la biomasa de callo y de embriones. El mayor número de embriones totales y torpedo fue obtenido a una concentración de 6 mg/l de BAP (Cuadro 3). Se pudo observar que la regeneración de embriones somáticos de *C. arabica* fue posible sin BAP, sin embargo, ésta regeneración fue estimulada en presencia de una concentración óptima.

En los cortes histológicos pudo observarse que en todos los tratamientos con y sin BAP los agregados celulares presentaron activa división celular y la formación de embriones al primer mes de iniciada la regeneración. En presencia de 4 y 6 mg/l de BAP, se observó además, una mejor organización y formación de la epidermis (Figs. 4a y b), comparado con otras concentraciones de BAP. Las células de los agregados celulares presentaron un citoplasma denso, un núcleo y nucleolo grandes y bien diferenciados, reservas en forma de granos de almidón y en algunos casos lípidos y proteínas (Fig. 4d). En ausencia de BAP y en los tratamientos con 2 y 8 mg/l de BAP, se observó la presencia de daño en el núcleo a los 2 meses de cultivo (Fig. 4c).

La proporción de embriones en estado torpedo no se vio significativamente influenciada por la concentración exógena de BAP, y permaneció entre 60 y 72 % (Cuadro 3). A pesar de que no se observaron efectos de la BAP sobre la producción y calidad de los embriones, el porcentaje de conversión en plantas tendió a aumentar en forma lineal a medida que aumentó la concentración en BAP ($r= 0.92$, $P=0.0034$). Las plantas obtenidas fueron vigorosas sobre todo a altas concentraciones de BAP (Fig. 5a).

Cuadro 3. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de embriones somáticos de café en biorreactor utilizando el medio de cultivo Yasuda. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Concentración de BAP (mg/l)	Producción de biomasa				Producción de embriones			Conversión en plantas (%)
	Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop. biom. emb. (%)	N° emb. tot.	N° emb. torp.	Frec. emb. torp.	
0	14.1±1.9 ^{ab}	4.4±1.2 ^{ab}	9.7±2.2 ^{ab}	68±11 ^a	1640±495 ^b	1112±350 ^b	67±4 ^a	35±17 ^c
0.5	11.9±3.7 ^{abc}	4.6±0.6 ^a	7.3±3.4 ^{abc}	59±12 ^a	1360±484 ^b	872±237 ^b	68±18 ^a	42±17 ^{bc}
1.1	13.0±1.9 ^{ab}	5.2±1.4 ^a	7.8±1.7 ^{abc}	60±8 ^a	1414±148 ^b	900±114 ^b	64±7 ^a	50±19 ^{abc}
2	8.5±0.2 ^{bc}	2.7±0.4 ^{ab}	5.8±0.4 ^{bc}	69±5 ^a	1060±227 ^b	658±115 ^b	63±8 ^a	46±16 ^{abc}
4	12.7±3.6 ^{ab}	5.1±1.9 ^a	7.6±1.8 ^{abc}	61±5 ^a	1681±334 ^b	1217±373 ^b	72±15 ^a	53±21 ^{abc}
6	15.3±5.3 ^a	4.3±1.9 ^{ab}	11.0±3.6 ^a	72±5 ^a	2443±731 ^a	1790±642 ^a	74±16 ^a	56±12 ^{ab}
8	6.8±0.7 ^c	1.9±0.7 ^b	4.9±1.1 ^c	72±13 ^a	972±208 ^b	551±80 ^b	58±14 ^a	62±11 ^a

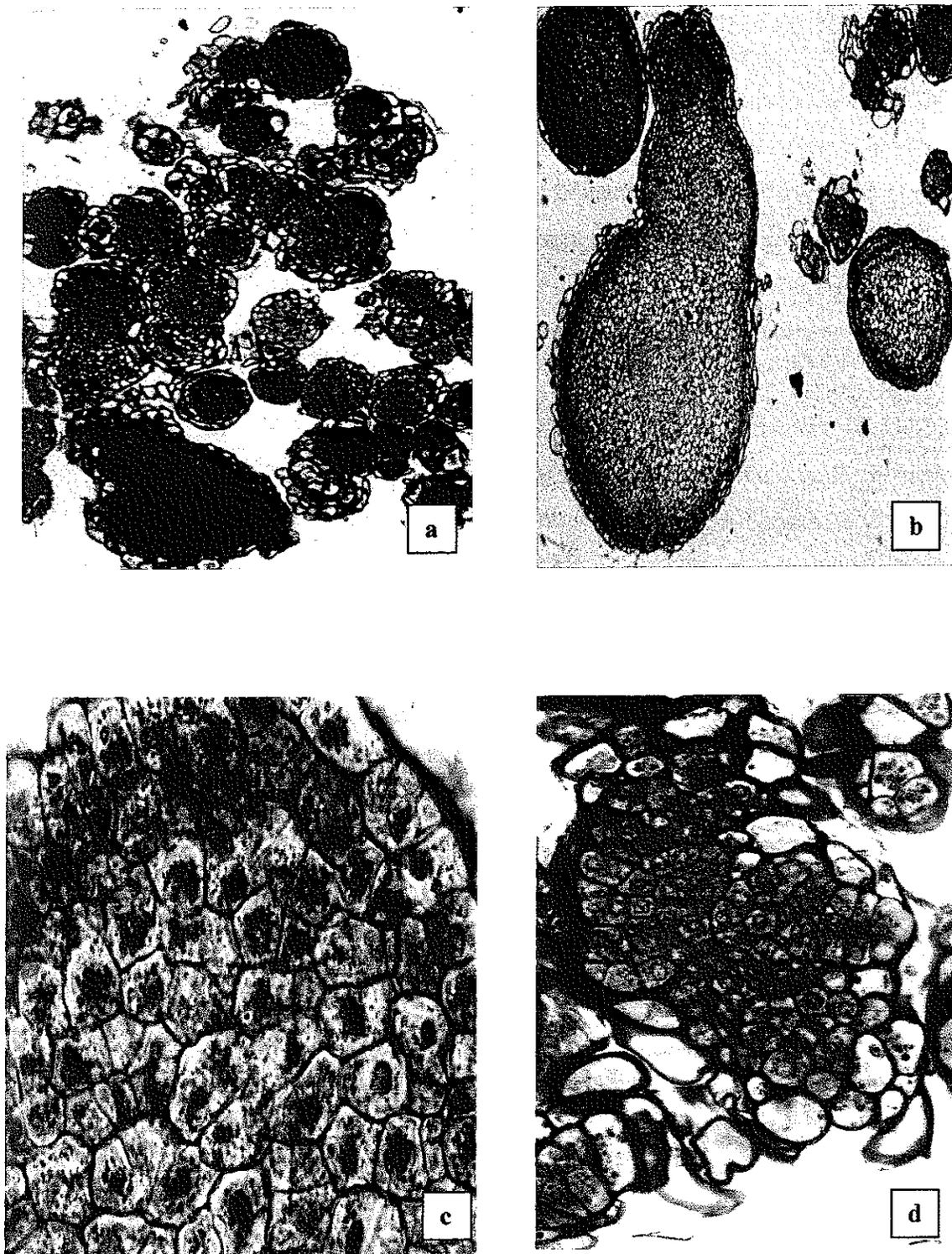


Fig. 4. Aspecto histológico de los agregados embriogénicos y formación de embriones a las 4 semanas de regeneración en medio Yasuda con diferentes concentraciones de BAP. (a) alta proliferación sin BAP (4X), (b) formación de embriones con BAP 6 mg/l (4X), (c) daño a nivel del núcleo a las 8 semanas con BAP 0 y 8 mg/l (4X), (d) activa división celular, citoplasma denso con BAP 0, 2 y 6 mg/l a las 4 semanas (20X)

- *En el medio de cultivo M4 sin AIA*

La biomasa producida en presencia del medio de regeneración M4 no dependió de la concentración de BAP (Cuadro 4). Sin embargo, la biomasa de embriones tendió a ser mayor cuando se usó concentraciones inferiores o iguales a 1 mg/l de BAP, y por el contrario, una frecuencia mediana o baja de biomasa de embriones para concentraciones de BAP más altas (2, 4, 6, 8 y 10 mg/l). No hubo diferencias significativas en el número de embriones totales y torpedo en ninguna de las concentraciones de BAP ensayadas.

La frecuencia de embriones torpedo fue baja (< 36%) a cualquier concentración de BAP utilizada (Cuadro 4). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en la frecuencia de embriones torpedo cuando se usaron concentraciones de BAP entre 0 y 2 mg/l, encontrándose un valor máximo con 0.5 mg/l de BAP.

En un corte histológico efectuado a los agregados celulares crecidos en ausencia de BAP a las 4 semanas de regeneración, se observaron las células de los agregados en activa división celular, restos de células de callo y embriones en diferentes estado de desarrollo (Fig. 6a). Las células embrionarias poseían un núcleo muy visible, alto grado de diferenciación, así como reservas de almidón y proteína en las capas de células más externas (Fig. 6c). Cuando se usó una concentración de 6 mg/l de BAP, pudo notarse igualmente la activa división celular de los agregados embriogénicos (Fig 6b), pero a diferencia del tratamiento anterior no se observó la formación de embriones a la cuarta semana.

El efecto de la BAP sobre la frecuencia de embriones torpedo parece haber influido también en la frecuencia de conversión en planta, pues la máxima tasa de conversión se obtuvo con una concentración de 0.5 mg/l de BAP (27%) (Cuadro 4). Las plantas obtenidas a esta concentración de BAP fueron muy vigorosas (Fig. 5b). Los datos obtenidos en este experimento confirman la baja calidad de los embriones obtenidos sobre el medio M4 comparándolos con los obtenidos en el medio Yasuda (Cuadro 3).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de BAP sobre la regeneración de embriones somáticos de café en biorreactor utilizando el medio de cultivo M4 sin AIA. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Concentración de BAP (mg/l)	Producción de biomasa			Producción de embriones			Conversión en plantas en plantas (%)	
	Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop. biom. emb. (%)	N° emb. tot.	N° emb. torp.		Frec. emb. torp. (%)
0.0	10.7±2.3 ^a	3.1±1.2 ^{ab}	7.6±2.1 ^a	70±10 ^a	1265±500 ^a	293±265 ^a	21±11 ^{abc}	20±15 ^{ab}
0.5	9.0±3.1 ^a	3.1±1.5 ^{ab}	5.8±2.4 ^{ab}	65±11 ^a	1113±621 ^a	387±285 ^a	36±14 ^a	27±17 ^a
1.0	8.2±2.7 ^a	2.7±1.1 ^b	5.5±1.9 ^{ab}	67±8 ^a	826±526 ^a	253±265 ^a	28±10 ^{abc}	18±15 ^{ab}
2.0	10.4±3.9 ^a	5.5±3.6 ^{ab}	5.0±2.6 ^{ab}	49±22 ^{ab}	651±212 ^a	216±184 ^a	30±15 ^{ab}	13±13 ^{ab}
4.0	11.5±2.4 ^a	5.5±2.3 ^{ab}	6.0±0.9 ^{ab}	53±12 ^{ab}	1052±150 ^a	124±76 ^a	12±8 ^{bc}	4±7 ^b
6.0	7.7±1.0 ^a	5.2±1.4 ^{ab}	2.5±1.0 ^b	32±13 ^b	514±173 ^a	34±15 ^a	6±1 ^c	16±13 ^{ab}
8.0	10.5±4.0 ^a	7.0±2.7 ^a	3.6±1.4 ^b	34±3 ^b	742±314 ^a	61±21 ^a	9±4 ^{bc}	17±8 ^{ab}
10.0	7.3±1.1 ^a	4.7±1.0 ^{ab}	2.7±0.9 ^b	36±10 ^b	455±208 ^a	82±55 ^a	17±9 ^{abc}	10±9 ^b



Fig. 5. Aspecto morfológico de plantas regeneradas en diferentes medios de cultivo y en presencia de diferentes aportes hormonales. (a) medio Yasuda con 6 mg/l de BAP, nótese el aspecto vigoroso de las plantas provenientes de regeneración con alta concentración de BAP, (b) M4 sin AIA con BAP 0.5 mg/l, (c) M3 básico con plantas de mayor vigor que las regeneradas con M3 con 2ip, Kin, y Z.

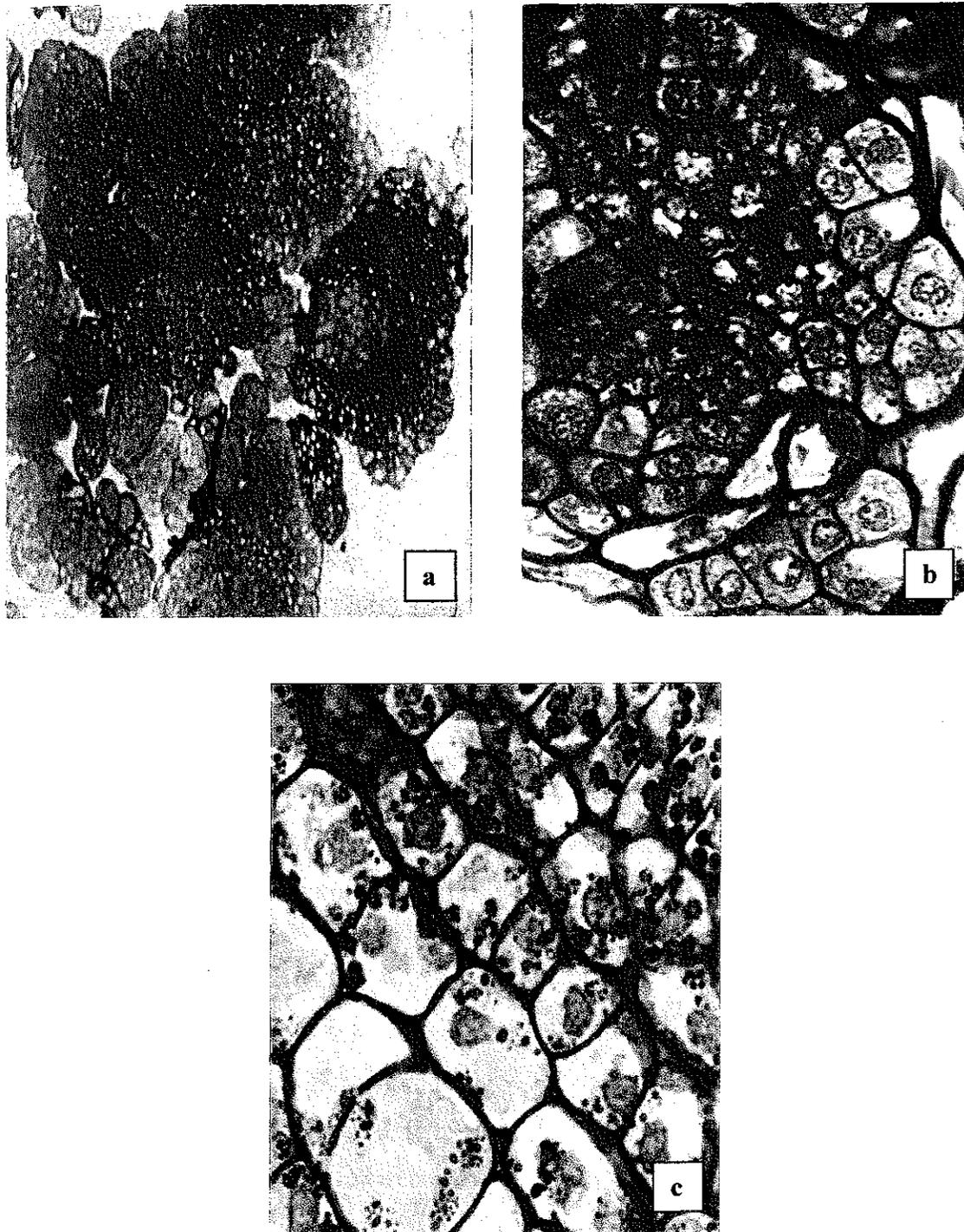


Fig. 6. Aspecto histológico de los agregados embriogénicos y embriones en el medio M4 sin AIA con diferentes concentraciones de BAP a 4 semanas de regeneración. (a) medio sin BAP, nótese los agregados en división celular, citoplasma denso (4X), (b) alta proliferación de agregados celulares con BAP 6 mg/l (20X) y (c) depósitos de almidón y proteínas en un embrión en formación (40X).

Es notable que la BAP no tiene una influencia determinante sobre la regeneración embriónica como es el caso de las sales minerales. Sin embargo, existe una interacción entre el medio nutritivo y la concentración de BAP pues los efectos son diferentes en función del medio de cultivo utilizado (Yasuda o M4). Es importante destacar que para ambos medios fue posible la producción de embriones en ausencia total de reguladores de crecimiento.

c. En el medio de cultivo M3 con diferentes combinaciones y concentraciones hormonales

Las modificaciones en el aporte de reguladores de crecimiento no tuvieron un impacto sobre la producción de biomasa, la cual fue muy baja. En todos los tratamientos se obtuvo una mayor cantidad de callo y poca frecuencia en la biomasa de embriones (30%), este comportamiento se observó independientemente del tipo y concentración de hormonas utilizadas en cada tratamiento (Cuadro 5).

Este experimento confirma los datos registrados en el cuadro 2a, ya que la cantidad de embriones obtenidos con el medio M3 fue bastante baja (alrededor de 400 embriones/biorreactor) y no estuvo significativamente influenciada por los reguladores de crecimiento exógenos.

El medio de regeneración M3 permitió la obtención de frecuencias muy altas de embriones presentando la morfología de torpedo (80% en promedio). La frecuencia de estos embriones fue significativamente menor en el tratamiento A que en los tratamientos B, C y D. El tratamiento A a diferencia del B, contenía 0.2 mg/l de ANA, quizás esta diferencia en la composición hormonal podría estar influyendo en los resultados obtenidos. Entre los tratamientos B, C y D no se observaron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de embriones somáticos, por lo tanto, la regeneración no se vio afectada ni por la naturaleza ni por la concentración de las citoquininas usadas.

Cuadro 5. Efecto del aporte hormonal (auxina y citoquinina) sobre la regeneración de embriones somáticos de café en biorreactor utilizando el medio M3. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Combinación hormonal (mg/l)	Producción de biomasa			Producción de embriones			Conversión en plantas (%)
	Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop. biom. emb. (%)	No. emb. tot.	No. emb. torp.	
A: ANA 0.2							
Z 0.05							
2ip 0.2	5.8±1.0 ^a	4.4±0.4 ^a	1.4±0.7 ^a	23±8 ^a	299±104 ^a	206±64 ^b	70±5 ^b
Kin 0.1							
B: Z 0.05							
2ip 0.2	5.4±0.6 ^a	3.8±0.3 ^{ab}	1.6±0.5 ^a	29±6 ^a	436±111 ^a	366±67 ^{ab}	85±9 ^a
Kin 0.1							
C: Z 1.6							
2ip 1.5	5.7±0.6 ^a	3.9±0.3 ^{ab}	1.8±0.6 ^a	31±8 ^a	475±139 ^a	449±138 ^a	94±4 ^a
Kin 1.6							
D: BAP 5	4.6±1.2 ^a	3.1±0.9 ^b	1.4±0.4 ^a	32±7 ^a	356±115 ^a	328±111 ^{ab}	92±3 ^a

En el tratamiento A hubo diferenciación de embriones globulares a partir de los agregados embriogénicos al segundo mes de la regeneración. En estos embriones pudo apreciarse una epidermis bien diferenciada y depósitos de almidón (Fig. 3a). La frecuencia de conversión en plantas en todos los tratamientos fue baja si la comparamos con las obtenidas con el medio Yasuda, a pesar de que la calidad de los embriones fue muy buena, obteniéndose el mayor porcentaje de plantas vigorosas en el tratamiento A (35%) (Fig. 5c).

4.1.2. Efecto de diferentes parámetros físicos en biorreactor sobre el proceso de regeneración de embriones somáticos

4.1.2.1. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre la producción de embriones

a. Producción de biomasa y embriones somáticos

La frecuencia y duración de las inmersiones fue un factor muy importante que influyó significativamente sobre la producción de biomasa total, cantidad de callo producida y calidad de los embriones formados (Cuadro 6).

Incrementando la frecuencia de inmersión se estimuló significativamente el aumento de la producción de biomasa, así como la producción y calidad de los embriones, ver combinaciones (1v x 1', 2v x 1' y 6v x 1'). Por el contrario, un aumento en la duración de la inmersión de uno a cinco minutos afectó significativamente los mismos parámetros, reduciendo considerablemente la biomasa desde un valor de 14.7 a 4.2 g y el número de embriones totales de 2094 a 428.

La gama de frecuencias y duraciones de inmersión utilizadas, incluyó tratamientos con condiciones extremas lo cual permitió obtener respuestas muy contrastadas. Así, un tratamiento incluyendo frecuencias y duración de las inmersiones muy altas como la de 6v x 15', no afectó significativamente el número total de embriones, pero si afectó

fuertemente su calidad, al observarse una alta frecuencia de embriones hiperhídricos causada principalmente por la excesiva duración de la inmersión y no por la alta frecuencia como se demostró en los resultados obtenidos con la mejor frecuencia de $6v \times 1'$. En el otro extremo de la gama, el tratamiento donde se combinó una frecuencia y duración de inmersión muy baja ($1v \times 1'$), se observó la más baja producción de biomasa (3.3 g) y la menor producción de embriones totales, aunque la eficiencia en la obtención de embriones torpedo fue mediana (60%). Esta combinación limitó claramente la producción de embriones.

El mejor tratamiento fue el de $6v \times 1'$, en el cual se observó la mayor producción de biomasa orientada a una alta producción de embriones totales (3081) de muy buena calidad y morfología (Fig. 7 a y b), esto se reflejó además en la frecuencia obtenida de embriones torpedo 85% (Cuadro 6). Al comparar este tratamiento con el de $6v \times 15'$, se observó una reducción del 50% de la biomasa y del 65% del número total de embriones, así como una disminución en la frecuencia de embriones torpedo, de 85 a 20%. Así mismo, la frecuencia de embriones vitrificados aumentó de 2 a 90%, lo cual se traduce en la pérdida de embriones bien formados (Cuadro 11) y morfología característica de estructuras vitrificadas (Fig. 7c).

Los cortes histológicos efectuados sobre los diferentes tratamientos apoyan los resultados obtenidos en cuanto a producción de biomasa y calidad de los embriones. Con el tratamiento de $1v \times 1'$ se observó a la cuarta semana de regeneración, algunos agregados celulares en buen estado, callo abundante; sin embargo, también se observaron agregados celulares colapsados con el citoplasma plasmolisado (Fig. 8a y b), lo cual influyó probablemente sobre la cantidad de biomasa y la producción de embriones.

En los tratamientos de $2v \times 1'$ y $6v \times 1'$ se observó gran cantidad de agregados celulares activos, algunos constituidos de células con citoplasma denso y un núcleo grande. A $6v \times 1'$ también se observaron agregados en activa división celular y con segmentaciones internas (Fig. 8c), así como el comienzo de la formación de embriones globulares caracterizado por una epidermis bien formada y una pared celular gruesa.

Cuadro 6. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre la regeneración de embriones somáticos. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Frecuencia y duración de las inmersiones diarias	Tiempo inmersión diaria acumulada (min)	Producción de biomasa (14 semanas)			Producción de embriones (14 semanas)			
		Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop. biom. emb. (%)	N° emb. tot.	N° emb. Torp.	Frec. emb. torp. (%)
1V x 1'	1	3.3±1.0 ^c	0.7±0.4 ^b	2.7±0.7 ^c	81±7 ^a	480±169 ^d	291±117 ^c	60±8 ^b
2V x 1'	2	14.7±6.6 ^b	4.0±1.9 ^a	10.7±4.9 ^b	72±4 ^{ab}	2094±1090 ^b	1670±911 ^b	79±4 ^a
6V x 1'	6	23.1±2.7 ^a	5.7±2.4 ^a	17.4±0.4 ^a	76±8 ^{ab}	3081±670 ^a	2641±686 ^a	85±4 ^a
2V x 5'	10	11.4±3.0 ^b	4.7±1.2 ^a	6.7±2.2 ^{bc}	58±8 ^c	1392±455 ^c	1131±515 ^b	78±18 ^a
2V x 15'	30	4.2±1.2 ^c	1.4±0.1 ^b	2.8±1.1 ^c	66±8 ^{bc}	428±128 ^d	212±84 ^c	49±7 ^b
6V x 15'	90	11.1±2.9 ^b	2.2±0.9 ^b	8.9±2.4 ^b	80±6 ^a	1183±344 ^{bc}	214±90 ^c	20±10 ^c

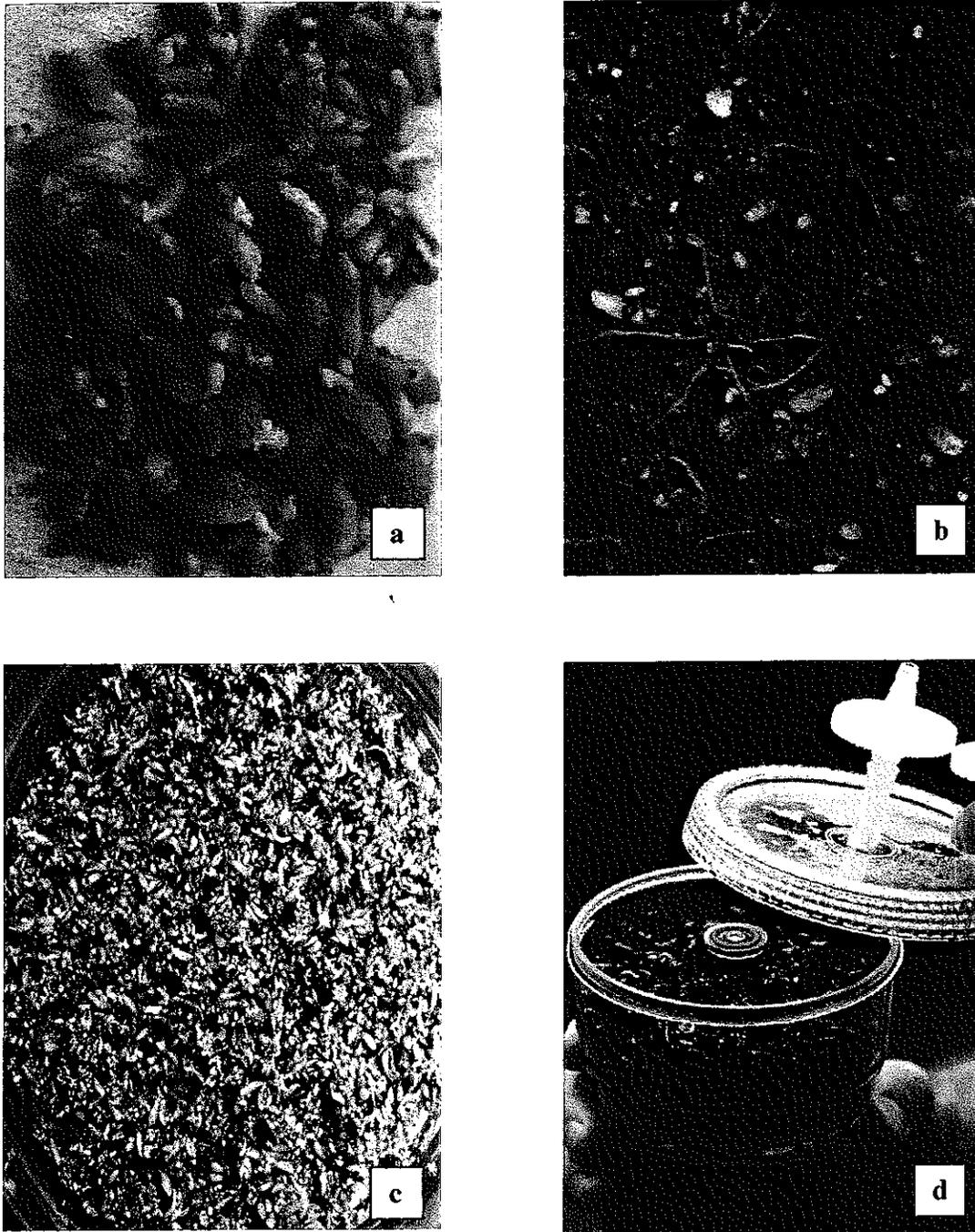


Fig.7. Aspecto morfológico de embriones somáticos regenerados en el biorreactor simplificado RITA cultivados a diferentes frecuencias y duración de las inmersiones. **(a)** Regeneración óptima a 6v x 1' diaria. **(b)** 6v x 15', nótese los embriones vitrificados y con formación de raíces. **(c)** 6v x 1', embriones en estado de torpedo con poca formación de callo. **(d)** germinación en RITA

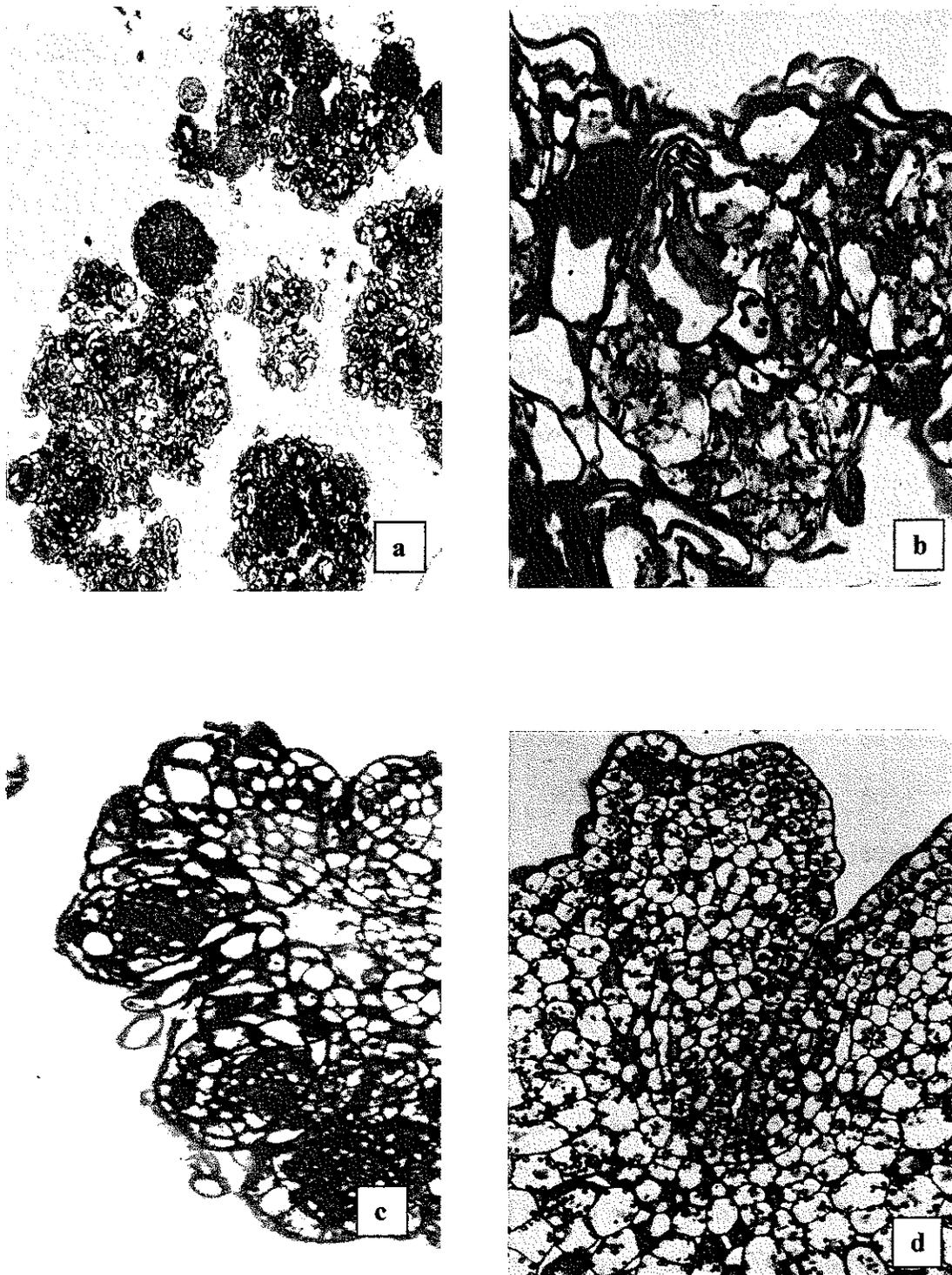


Fig. 8. Aspecto histológico de agregados embriogénicos y embriones en regeneración con diferentes frecuencias y duración de las inmersiones. **(a, b)** 1v x 1' características del estrés. **(a)** presencia de muchas células muertas o en degeneración y agregados normales poco frecuentes (4X), **(b)** células del agregado presentando plasmólisis del citoplasma (10X). **(c, d)** Frecuencias de 2v x 1' y 6v x 1', agregados y embriones normales. **(c)** agregados formando núcleos de activa división celular rodeados de una matriz mucilaginosa (10X), **(d)** formación de cotiledones y meristema caulinar en embriones, nótese los depósitos de almidón (20X)

b. Peso seco (PS) y contenido de agua (CA) del callo embriogénico, pH y conductividad eléctrica (CE) del medio de cultivo

A las 6 semanas de regeneración, la biomasa aumentó muy poco (Cuadro 7) si la comparamos con la biomasa a las 14 semanas (Cuadro 6), sin embargo, se observó un efecto significativamente positivo cuando se utilizaron inmersiones de un minuto durante seis veces al día (6v x 1').

Cuadro 7. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre el peso seco (PS) y el contenido de agua (CA) del callo embriogénico, pH y conductividad eléctrica (CE) del medio de cultivo, a las seis semanas de iniciada la regeneración. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Frecuencia y duración De las inmersiones diarias	Tiempo inmersión diaria acumulada (min)	Callo embriogénico (6 sem)		Medio de cultivo (6 sem)	
		PS (g)	CA (%)	pH	CE (mV)
1v x 1'	1	0.37±0.05 ^b	88±0 ^a	4.8±0.1 ^d	127±4 ^a
2v x 1'	2	0.22±0.04 ^c	90±2 ^a	5.4±0.1 ^b	94±11 ^c
6v x 1'	6	0.69±0.07 ^a	87±1 ^a	5.8±0.1 ^a	68±0 ^d
2v x 5'	10	0.20±0.04 ^c	90±1 ^a	5.5±0.1 ^b	85±4 ^c
2v x 15'	30	0.38±0.03 ^b	87±2 ^a	5.5±0.1 ^b	86±5 ^c
6v x 15'	90	0.44±0.02 ^b	87±2 ^a	5.2±0.1 ^c	107±5 ^b

En el rango de tratamientos de inmersiones utilizados, el de 6v x 15', provocó mayores problemas de vitrificación en los embriones a la semana 14, aunque el CA a nivel de los agregados embriogénicos no fue diferente a los demás tratamientos (Cuadro 7). Al aumentar la frecuencia de inmersión y mantener el tiempo de inmersión constante (1v x 1', 2v x 1' y 6v x 1') se produjo un aumento del pH del medio y se notó una disminución significativa de la CE. Estas variables no mostraron cambios significativos cuando se utilizaron diferentes tiempos de inmersión con frecuencia constante (2v x 1', 2v x 5' y 2v x 15'), sin embargo, al usar una frecuencia de 6 veces diarias con diferentes tiempos de inmersión (6v x 1' y 6v x 15') se observó una disminución del pH y un aumento de la CE.

c. Calidad de las inmersiones y nutrición mineral del callo embriogénico al final de la expresión embriogénica

El análisis de absorción de nutrientes después de 6 semanas de regeneración (Cuadro 9), indicaron claramente la presencia de fuertes absorciones de P, NH_4^+ y NO_3^- a cualquier frecuencia y tiempo de las inmersiones.

La frecuencia y duración de las inmersiones afecta fuertemente la absorción neta de todos los elementos minerales a excepción del Ca^{++} (Cuadros 8 y 9). Una frecuencia alta (6 veces diarias) y una duración larga de 15 minutos, estimularon significativamente la absorción de la mayoría de los elementos, encontrándose el siguiente orden decreciente de absorción: P (99%), NH_4^+ (97%), NO_3^- (86-97%), Mg^{++} (86-91%), K^+ (65-73 %). La absorción neta del Cl^- , disminuye en función de tiempos prolongados de inmersión diaria. La estimulación de la absorción en estos tratamientos fue acompañada sistemáticamente por un fuerte crecimiento de la biomasa (Cuadro 7).

Se considera que los elementos P, NH_4^+ y NO_3^- , desaparecieron del medio de cultivo a la sexta semana, evidenciando su carencia en el medio Yasuda cuando se utilizan frecuencias y duraciones altas. Efectivamente las tasas de transferencia de estos elementos fueron cercanas al 100% (Cuadro 9), lo que produjo concentraciones extremadamente bajas (0.01 mM P, 0.011 mM NH_4^+ y 0.08 mM NO_3^-) en el medio de cultivo (Cuadro 8).

Un minuto de inmersión diaria, dio resultados inesperados a nivel de la nutrición mineral, pues los resultados obtenidos a nivel de la absorción (Cuadros 8 y 9) y del contenido mineral del callo embriogénico (Cuadro 10), fueron similares a las del tratamiento de frecuencias altas de inmersión. Esta efectividad en la absorción, se tradujo igualmente en un buen crecimiento (Cuadro 7). Es decir, que a pesar de imponerle al callo un tiempo de contacto muy reducido, la absorción de todos los elementos fue fuerte y el contenido mineral comparable al resto de los tratamientos.

Los tratamientos de 2v x 1' y 2v x 5' dieron resultados similares. Se obtuvo la menor absorción de iones P, K⁺, Mg⁺⁺, NH₄⁺ y NO₃⁻, sin observarse diferencias significativas entre ellos, excepto para el P, NH₄⁺ y NO₃⁻ donde hubo mayor absorción a 2v x 1'. Como resultado de la disminución de la absorción, el crecimiento (PS) del callo embriogénico para los 2 tratamientos fue significativamente más bajo (Cuadro 7).

A pesar de haber obtenido diferencias altamente significativas en la absorción, no se observó la misma tendencia para el contenido mineral del callo embriogénico a la sexta semana de cultivo (Cuadro 10). Solamente se pudo notar en el mejor tratamiento (6v x 1'), una tendencia hacia la disminución de los niveles de P y N, indicando que la desaparición temprana de estos elementos del medio de cultivo se refleja en los contenidos del callo embriogénico.

d. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en el biorreactor sobre la calidad de embriones somáticos

La calidad de los embriones fue afectada por la frecuencia y duración diaria de las inmersiones, observándose una correlación alta entre estas 2 variables ($r = -0.90$, $P = 0.0134$). Una duración de inmersión larga (tratamientos 2 y 6 veces x 15') afectaron negativamente la calidad de los embriones (Cuadro 11). Para estas duraciones de inmersión se observaron embriones vitrificados con una superficie irregular, formas redondas y gruesas, además de la formación de raíces, y como consecuencia una fuerte disminución en la frecuencia de embriones torpedos. En estos tratamientos la vitrificación se caracterizó por un aumento significativo en el contenido de agua (CA) y el peso fresco (PF) (Cuadro 11). A las 14 semanas el CA de los embriones fue correlacionado con la duración de la inmersión ($r = 0.89$ $P = 0.0162$).

En el tratamiento de 6v x 1', los embriones en estado de torpedo poseen un área meristemática en el ápice caulinar con células en crecimiento activo con un núcleo bien visible, alto contenido citoplasmático y depósitos de almidón (Fig. 8d), lo cual evidenció la buena calidad de los embriones producidos.

Cuadro 8. Concentración mineral del medio de cultivo a las seis semanas en biorreactor utilizando diferentes frecuencias y duración de las inmersiones. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Frecuencia y duración de las Inmersiones diarias	Tiempo Inmersión diaria acumulada (min)	Concentración del elemento mineral en el medio de cultivo a las 6 semanas de regeneración						
		Ca ⁺⁺ (mM)	Mg ⁺⁺ (mM)	K ⁺ (mM)	P (mM)	Cl ⁻ (mM)	NH ₄ ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)
1V x 1'	1	0.47±0.05 ^b	0.07±0.01 ^b	1.72±0.14 ^c	0.05±0.01 ^c	0.45±0.02 ^{bc}	0.23±0.16 ^c	0.28±0.06 ^b
2V x 1'	2	0.52±0.05 ^{ab}	0.16±0.01 ^a	2.81±0.05 ^a	0.12±0.01 ^b	0.43±0.04 ^c	0.67±0.12 ^b	0.75±0.07 ^a
6V x 1'	6	0.45±0.01 ^a	0.06±0.01 ^b	2.25±0.05 ^b	0.01±0.00 ^d	0.92±0.00 ^a	0.11±0.01 ^c	0.08±0.01 ^b
2V x 5'	10	0.52±0.03 ^b	0.17±0.01 ^a	2.92±0.12 ^a	0.15±0.02 ^a	0.36±0.02 ^c	0.92±0.17 ^a	0.81±0.07 ^a
2V x 15'	30	0.49±0.07 ^{ab}	0.03±0.01 ^b	1.67±0.14 ^c	0.01±0.00 ^d	0.51±0.00 ^{bc}	0.11±0.02 ^c	0.21±0.08 ^b
6V x 15'	90	0.60±0.11 ^a	0.06±0.04 ^b	2.13±0.45 ^{bc}	0.01±0.00 ^d	0.67±0.10 ^b	0.13±0.07 ^c	0.33±0.24 ^b
Medio de regeneración nuevo (sem 0)		0.89±0.02	0.40±0.01	6.31±0.23	0.64±0.03	1.59±0.23	4.35±0.06	2.35±0.04

Cuadro 9. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre la proporción de nutrientes minerales del medio de cultivo con respecto a la concentración inicial. Cada cifra es el promedio de 3 repeticiones hechas a partir de biorreactores diferentes.

Frecuencia y duración de las inmersiones diarias	Tiempo inmersión diaria acumulada (min)	Proporción del elemento mineral absorbido a las 6 semanas con respecto a la concentración inicial							
		Ca ⁺⁺ (%)	Mg ⁺⁺ (%)	K ⁺ (%)	P (%)	Cl ⁻ (%)	NH ₄ ⁺ (%)	NO ₃ ⁻ (%)	
1V x 1'	1	47.4±5.8	83.4±2.6	72.8±2.2	92.5±1.6	71.3±1.6	94.7±3.6	87.9±2.5	
2V x 1'	2	40.9±5.2	60.3±1.9	55.4±0.8	81.5±1.5	73.1±2.7	84.6±2.8	68.1±2.9	
6V x 1'	6	48.9±1.5	86.4±1.8	64.4±0.8	98.7±0.2	41.7±0.0	97.5±0.1	96.5±0.5	
2V x 5'	10	41.0±3.3	58.7±2.7	53.7±1.9	76.5±3.3	77.6±1.6	78.8±3.9	65.6±3.0	
2V x 15'	30	44.2±7.4	91.8±2.6	73.5±2.2	98.7±0.3	67.8±0.0	97.4±0.6	91.0±3.3	
6V x 15'	90	31.9±12.5	86.1±11.0	66.3±7.1	99.1±0.2	57.9±6.2	97.0±1.7	85.9±10.2	

Cuadro 10. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre el contenido mineral de los agregados celulares a las seis semanas de iniciada la regeneración. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Frecuencia y duración de las inmersiones diarias	Tiempo de inmersión diaria acumulada (min)	Ca ⁺⁺ (%)	Mg ⁺⁺ (%)	K ⁺ (%)	P (%)	N (%)
1v x 1'	1	0.38±0.05 ^a	0.13±0.00 ^a	1.70±0.17 ^a	0.34±0.06 ^a	3.36±0.11 ^{ab}
2v x 1'	2	0.47±0.06 ^a	0.13±0.02 ^a	1.73±0.16 ^a	0.36±0.07 ^a	3.51±0.31 ^{ab}
6v x 1'	6	0.33±0.02 ^a	0.20±0.06 ^a	1.98±0.03 ^a	0.30±0.02 ^b	2.95±0.14 ^b
2v x 5'	10	0.35±0.11 ^a	0.13±0.02 ^a	1.82±0.16 ^a	0.44±0.11 ^a	3.74±0.14 ^a
2v x 15'	30	0.34±0.04 ^a	0.15±0.01 ^a	1.99±0.15 ^a	0.38±0.01 ^a	3.47±0.19 ^{ab}
6v x 15'	90	0.35±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a	1.88±0.16 ^a	0.34±0.04 ^a	3.08±0.21 ^{ab}
Agregados celulares al inicio de la regeneración (sem 0)		0.46±0.08	0.14±0.04	2.17±0.34	0.48±0.05	6.19±0.46



Cuadro 11. Efecto de la frecuencia y duración de las inmersiones en biorreactor sobre las características morfológicas y contenido mineral de los embriones somáticos. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Frecuencia y duración de las inmersiones diarias	Tiempo de Inmersión diaria acumulada (min)	Características de los embriones a las 14 semanas						Contenido mineral de embriones a las 14 semanas				
		PF/emb (g)	CA (%)	Frec emb torp (%)	Frec. vitrificación (%)	Ca** (%)	Mg** (%)	K* (%)	P (%)	N (%)		
1V x 1'	1	8.45±2.76 ^b	73±9 ^b	60±8 ^b	2±3 ^c	0.16±0.01 ^b	0.11±0.01 ^a	2.15±0.14 ^c	0.36±0.03 ^{bc}	3.10±0.12 ^a		
2V x 1'	2	5.20±0.56 ^b	74±2 ^b	79±4 ^a	3±4 ^c	0.23±0.02 ^a	0.09±0.01 ^a	2.50±0.13 ^b	0.22±0.01 ^d	2.80±0.17 ^a		
6V x 1'	6	5.76±2.43 ^b	76±5 ^{ab}	85±4 ^a	2±3 ^c	0.22±0.06 ^{ab}	0.11±0.03 ^a	2.60±0.13 ^b	0.21±0.00 ^d	2.82±0.23 ^a		
2V x 5'	10	6.32±0.69 ^b	76±3 ^b	78±18 ^a	11±5 ^c	0.17±0.02 ^{ab}	0.10±0.02 ^a	2.45±0.14 ^b	0.26±0.02 ^{dc}	2.70±0.04 ^a		
2V x 15'	30	11.51±3.30 ^{ab}	81±5 ^b	49±7 ^b	64±19 ^b	0.17±0.01 ^{ab}	0.13±0.02 ^a	2.78±0.15 ^b	0.52±0.13 ^a	2.84±0.13 ^a		
6V x 15'	90	15.83±6.64 ^a	83±5 ^a	20±10 ^c	90±6 ^a	0.18±0.01 ^{ab}	0.12±0.02 ^a	3.13±0.14 ^a	0.44±0.08 ^{ab}	2.86±0.21 ^a		

En observaciones hechas al microscopio electrónico de barrido de este tratamiento, se observó el crecimiento normal de los cotiledones y de sus 2 zonas apicales, así como una superficie regular (Fig. 9a y b). Contrariamente en el tratamiento 6v x 15', los embriones mostraron una superficie muy irregular y un crecimiento anormal de los cotiledones y del eje embrionario (Fig. 9c y d). En cortes histológicos, se observó muy pocos agregados celulares en buen estado, y deformaciones en las células de callo y estructuras diferenciadas. Con más detalle de estos agregados se pudo determinar que las deformaciones correspondían a una diferenciación temprana (4 semanas) de los agregados celulares donde se notaba la ausencia de una epidermis y sustancias de reserva (Fig. 10a), por tal motivo no se logró un alto rendimiento de embriones somáticos normales (200 embriones/torpedo).

En el tratamiento de 2v x 5' se observó el desarrollo de embriones a partir de los agregados embriogénicos (Fig. 10b). Estos embriones poseían características similares a las observadas en 2v x 1' y 6v x 1', además de abundantes depósitos de almidón y lípidos hacia la zona de los cotiledones (Fig. 10c). Sin embargo, las observaciones realizadas al microscopio electrónico diferenciaron la morfología de estos embriones con los de 6v x 1' y 2v x 1', notándose un alargamiento del eje embrionario hacia la zona apical del vástago en forma de "botella", y poco crecimiento de los cotiledones. Esto evidencia el efecto negativo que tiene una duración de la inmersión de 5 minutos sobre el crecimiento de los embriones (Fig. 10d).

En cuanto al contenido mineral, la evolución de los proembriones a embriones se tradujo generalmente por una nueva disminución del contenido mineral entre la semana 6 y la 14, excepto para el K^+ y el Mg^{++} . La fase de desarrollo (6 a 14 semanas) se realizó sobre un medio T4 dos veces más rico en composición mineral, así que la carencia en nitrógeno desapareció y en este caso no se observaron diferencias provocadas por el tipo de inmersión y los contenidos del N del embrión. Se notó que los embriones producidos a 2v x 1' y 6v x 1', con frecuencia de embriones torpedo de 80% en promedio, poseían los contenidos de P más bajos. Se encontró una correlación entre el contenido de P y el Mg^{++} ($r = 0.87$, $P=0.0242$). El Ca^{++} y el Mg^{++} no se vieron afectados pues su contenido no varió

a ninguna frecuencia de inmersión en los embriones en función del tipo de inmersión utilizada. El contenido en K^+ aumentó significativamente con el aumento del tiempo de inmersión diaria acumulada y se encontró una correlación entre ambos parámetros ($r=0.89$, $Pr | r| = 0.0174$). El K^+ podría estar involucrado en el proceso de vitrificación de los embriones.

Comparando los contenidos minerales del tejido vegetal durante la fase completa de regeneración de embriones somáticos a una frecuencia de $2v \times 1'$ se encontró que el P y N disminuyeron progresivamente a medida que el tejido vegetal evolucionó desde un estado *indiferenciado embriogénico* hacia un estado *diferenciado embrionario* (Fig. 11). Los contenidos de Ca^{++} y Mg^{++} no variaron durante la expresión embriogénica (0- 6 semanas), mientras que durante el desarrollo embrionario si se observó un consumo de éstos. El K^+ fue consumido muy poco durante la expresión embriogénica.

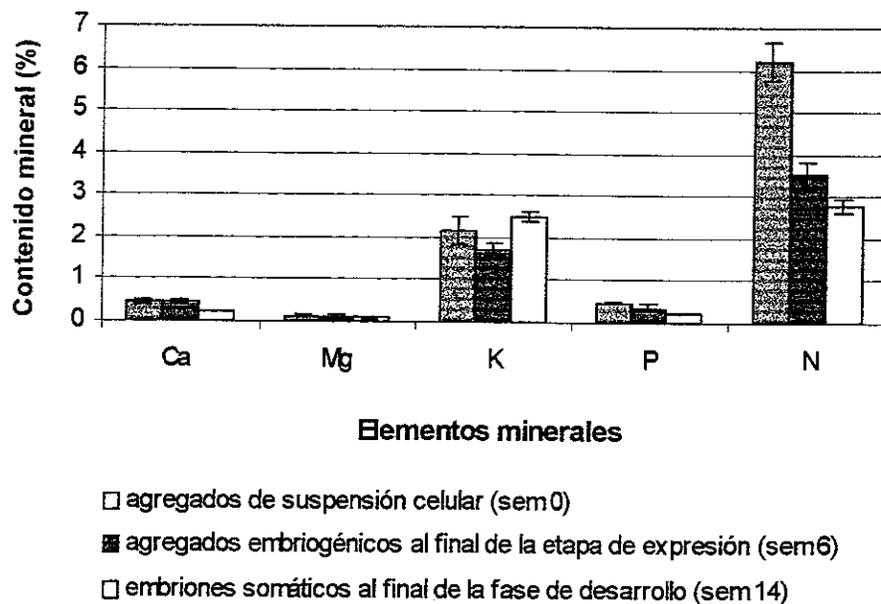


Fig. 11. Evolución de los contenidos minerales en el tejido vegetal a lo largo de la fase de regeneración de embriones somáticos.

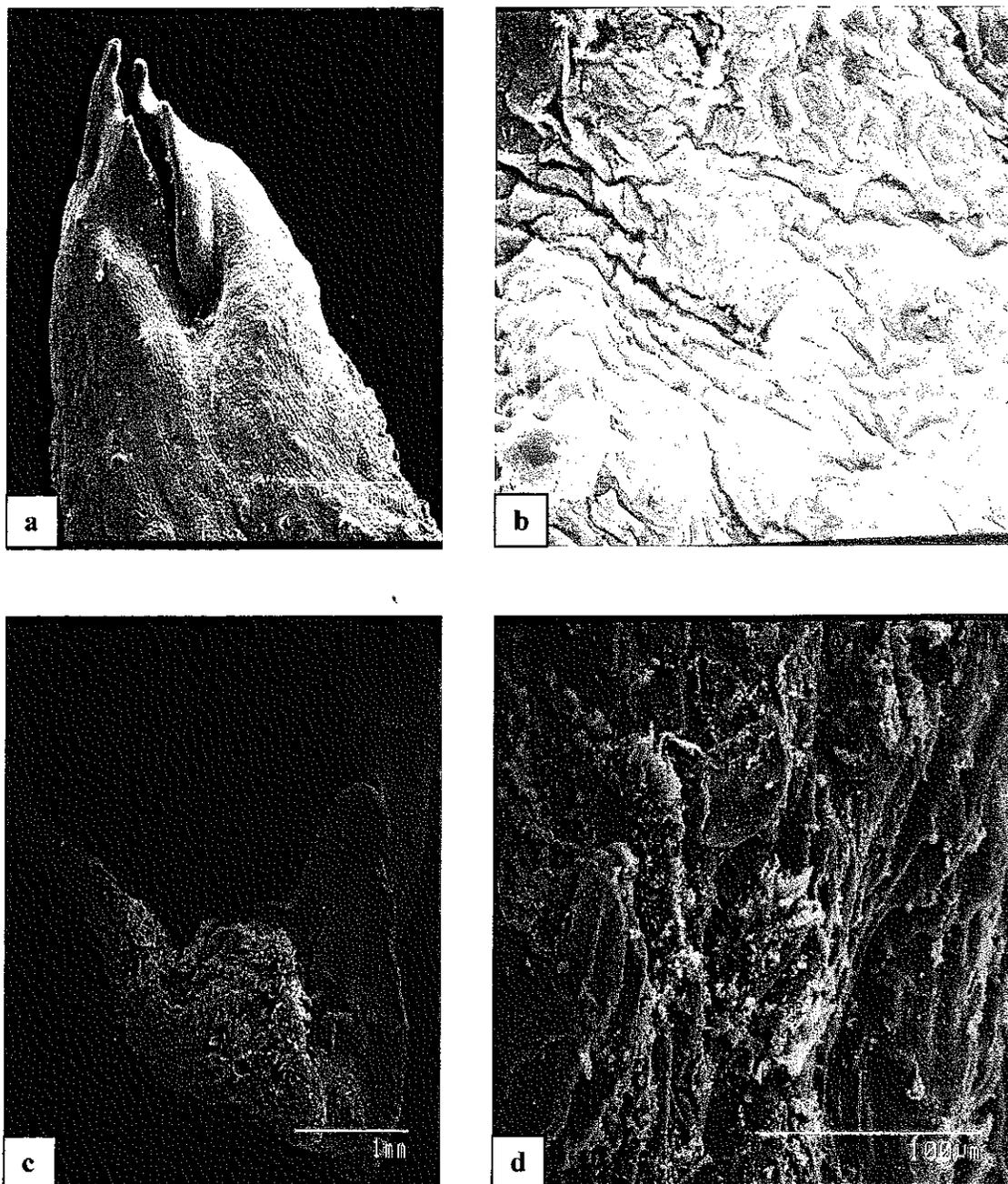


Fig. 9. Ultraestructura en microscopía electrónica de los embriones somáticos desarrollados a las 14 semanas cultivados en 2 tipos de frecuencias y duración de las inmersiones. **(a)** 6v x 1', crecimiento de los cotiledones (60X) y **(b)** 6v x 1', notándose una superficie regular (500X), **(c)** 6v x 15', deformación del eje embrionario y cotiledones, diferenciación precoz de raíces (60X), **(d)** 6v x 15', nótese la superficie muy irregular del embrión y daños (500X).

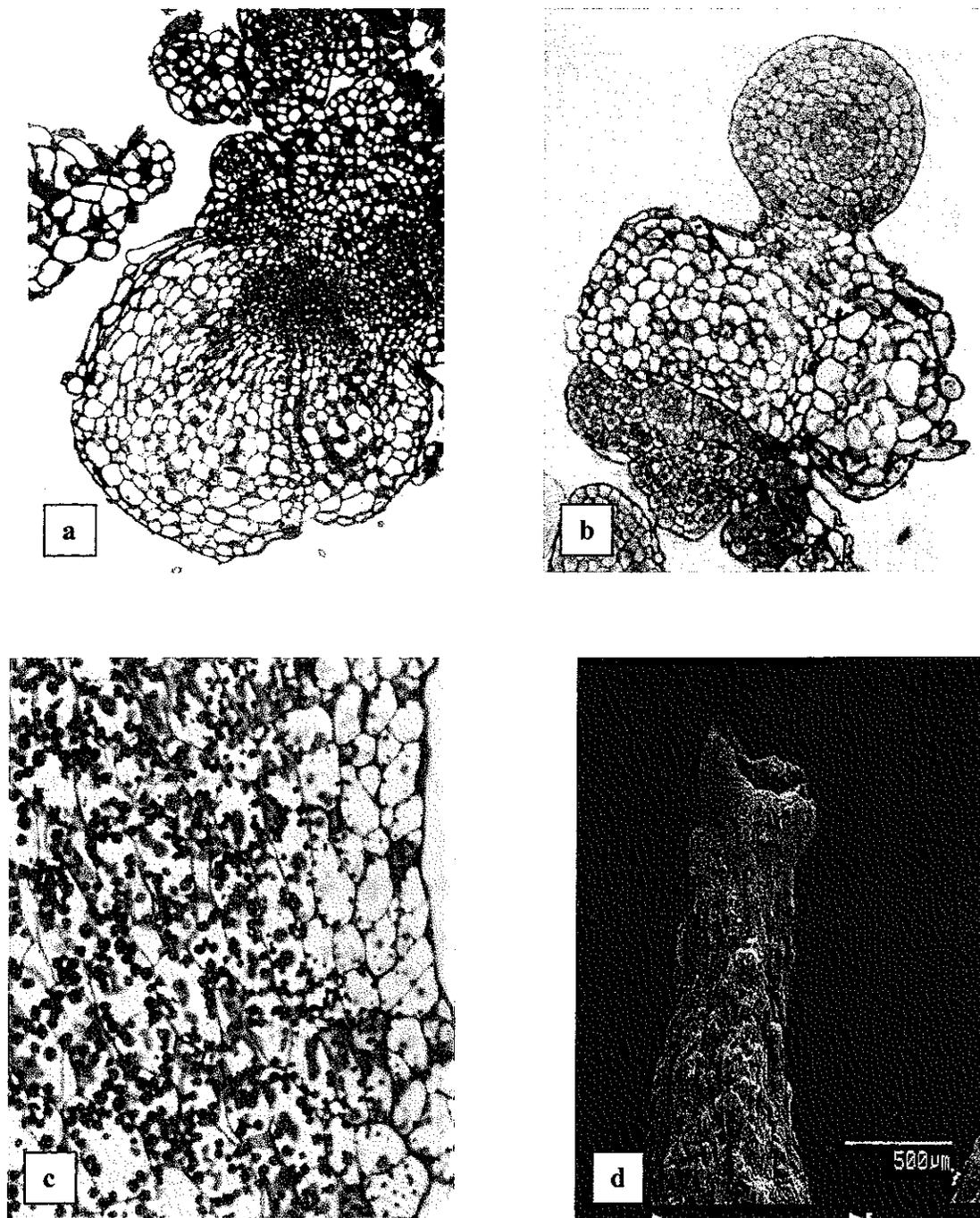


Fig. 10. Aspecto histológico y de microscopía electrónica de proembriones y embriones cultivados en frecuencias y duración de las inmersiones de 6v x 15' y 2v x 5'. (a) 6v x 15', formación precoz de un meristemo radical, nótese la ausencia de reservas en el proembrión, (10X), (b) 2v x 5', formación normal de embriones globulares a partir de agregados embriogénicos a las 8 semanas (10X), (c) 2v x 5', presencia de abundantes reservas de almidón hacia la periferia de los cotiledones (rojo) y lípidos (azul) en embriones de 14 semanas (10X), (d) 2v x 5', alargamiento excesivo del eje embrionario y poco crecimiento de los cotiledones (60X).

4.1.2.2. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre la producción de embriones

a. *Cinética de crecimiento durante la fase de la expresión embriogénica (semana 0 a 8)*

La curva de crecimiento del callo embriogénico presentó 2 etapas durante las 8 semanas de regeneración (Fig. 12A). Una primera etapa de 3 semanas durante la cual se notó un bajo crecimiento correspondiendo a una fase de estrés y de selección de los agregados embriogénicos. Una segunda etapa de crecimiento rápido a partir del final de la tercera semana, correspondiendo a la proliferación de los agregados embriogénicos. No se observaron variaciones en el CA durante toda la fase de expresión embriogénica (Fig. 12A).

Durante las primeras cuatro semanas no se presentó ningún cambio significativo de pH y CE, el pH se mantuvo entre 4.76 y 4.62 y la CE entre 127.7 y 137 mV, pero a partir de la quinta semana empezó un aumento significativo de pH y de la CE (Fig.12B). Esto significa que durante las primeras cuatro semanas existió una amplia disponibilidad de iones en el medio de cultivo evidenciado por la alta CE, pero después de la cuarta semana la concentración de iones comenzó a disminuir drásticamente como consecuencia de una mayor absorción por parte de los agregados embriogénicos en crecimiento (Fig. 14A), haciendo disminuir la CE del medio.

b. *Cinética de la absorción mineral durante la expresión embriogénica (semana 0 a 8)*

A excepción del cloro, la absorción del conjunto de elementos minerales siguió una evolución comparable (Fig. 13 A y B). Esquemáticamente se puede dividir el cultivo en 2 fases. Una primera fase de latencia (1 a 2 semanas) en la cual la absorción fue baja (inferior a 20%). Luego una segunda fase de absorción lineal (4 a 8 semanas) para todos los elementos, sin que se estableciera un equilibrio entre el callo y el medio de cultivo, ni

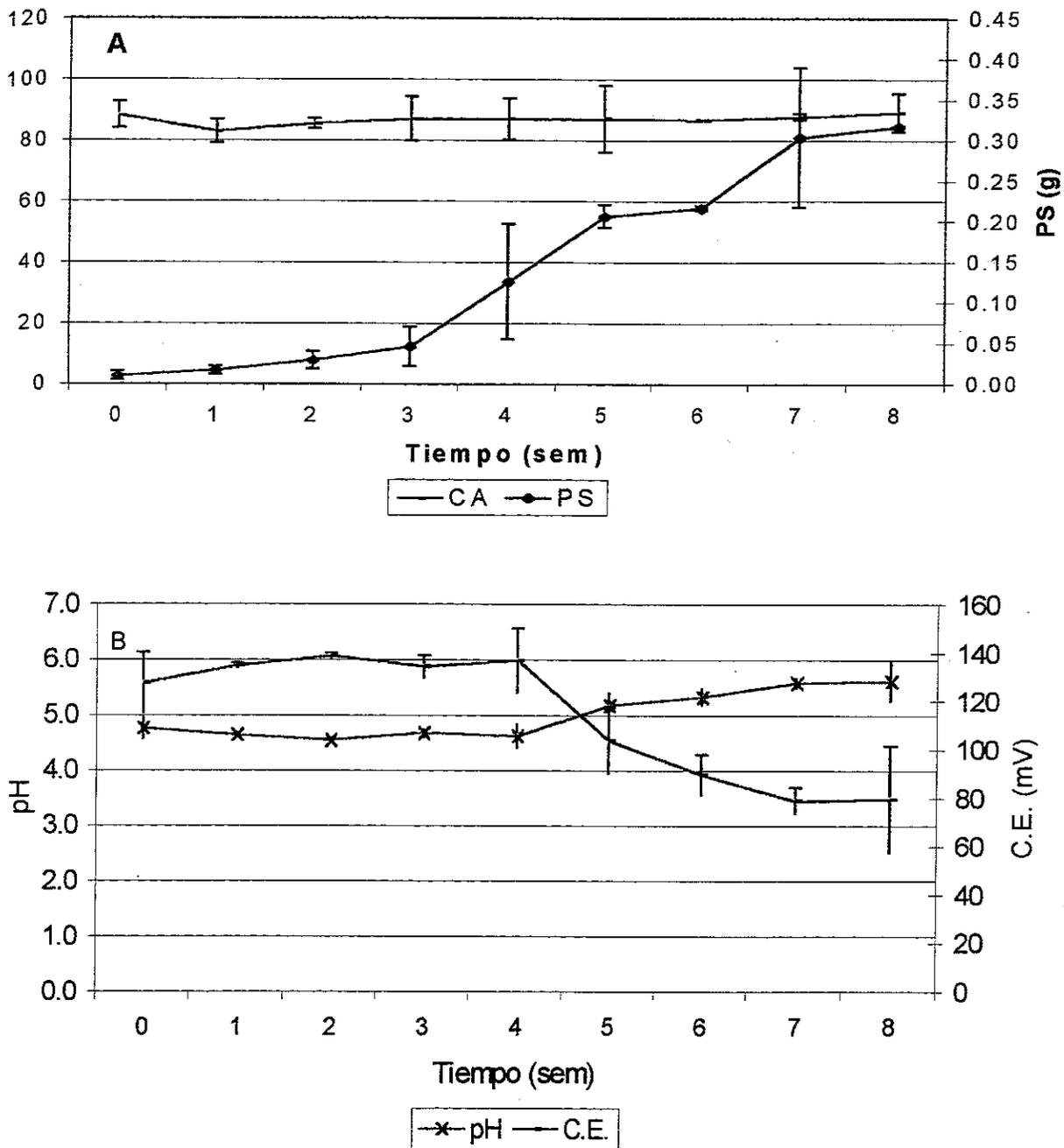


Fig. 12. Evolución del Peso Seco (PS) y Contenido de Agua (CA) del callo embriogénico (A), así como el pH y la Conductividad Eléctrica (CE) del medio de cultivo (B), durante 8 semanas de regeneración sin cambio de medio. Las barras representan las desviaciones estándar

tampoco una liberación de elementos al medio (disminución de la cantidad transferida). Hubo una transferencia fuerte del cloro en sentido contrario durante la primera semana, es decir, del callo hacia el medio de cultivo, siendo absorbido luego de forma lineal hasta la quinta semana (55%) (Fig. 13B). Posteriormente se estableció un equilibrio entre el callo y el medio. Se notó, igualmente una liberación de NH_4^+ y Ca^{++} , en la primera semana. El P fue de los menos afectados durante la primera fase de latencia, pues fue absorbido desde el inicio.

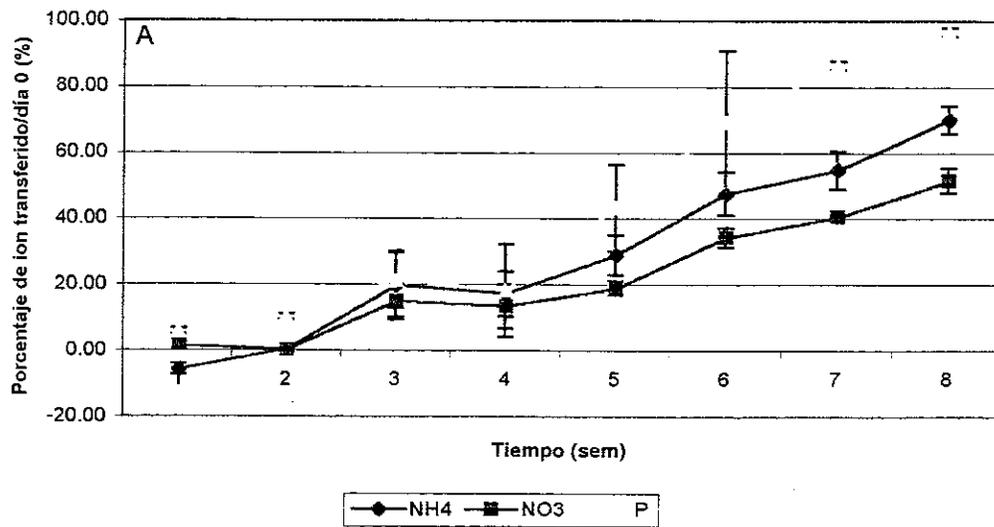
La intensidad de la transferencia depende de los macroelementos. Efectivamente, para el P, casi toda la cantidad presente en el medio fue absorbida a la octava semana. Un 70% del NH_4^+ , 60% del Cl^- , 50% del NO_3^- , 45% del Mg^{++} , 30% de K^+ y 20 % de Ca^{++} fueron absorbidos después de 8 semanas de regeneración (Figs. 13 A y B).

Los tejidos de café absorben preferencialmente el NH_4^+ sobre el NO_3^- durante la regeneración, pues la relación inicial $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ fue de 2:1 y al final casi 1:1 (Fig. 14B). Además se observó que la absorción del nitrógeno presentó 2 fases relacionadas con el nivel de pH en el medio de cultivo. Durante la primera fase de 4 semanas con un pH estable (Fig. 12B), existió un equilibrio de absorción entre NH_4^+ y NO_3^- . Posteriormente el pH aumentó linealmente favoreciendo la absorción de NH_4^+ (Fig. 12B).

La velocidad de absorción (diferencia de concentración del ion/ incremento de peso/semana) evaluada semanalmente, permitió determinar fluctuaciones en su intensidad para cada elemento mineral (Fig. 15). Se observaron cuatro máximos de velocidad de absorción, que correspondieron a la primera semana (liberación o absorción rápida de todos los elementos excepto el NO_3^-), tercera (absorción de NO_3^- , NH_4^+ , Cl^-), sexta (absorción muy rápida de NO_3^- , NH_4^+ , Mg^{++} y P) y octava semana (absorción de todos los elementos). El resto del tiempo (semanas 4 y 5) se notó una estabilidad en las tasas de absorción para todos los elementos.

Las velocidades de absorción o liberación más importantes registradas en la primera semana, son probablemente la consecuencia de la transferencia del tejido a un medio de

Amonio (NH₄⁺), Nitrato (NO₃⁻), Fósforo (P)



Calcio (Ca⁺⁺), Magnesio (Mg⁺⁺), Potasio (K⁺), Cloro (Cl⁻)

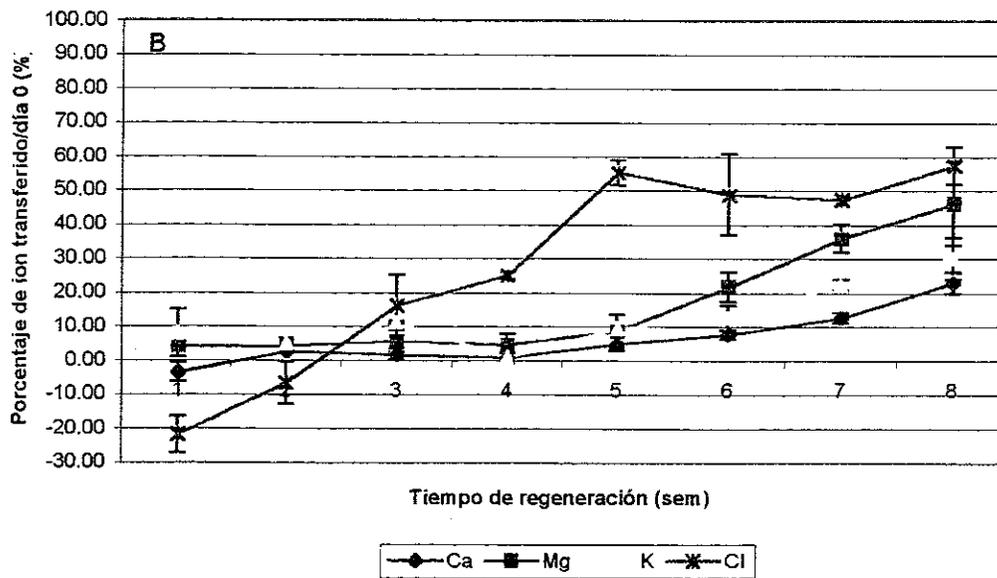
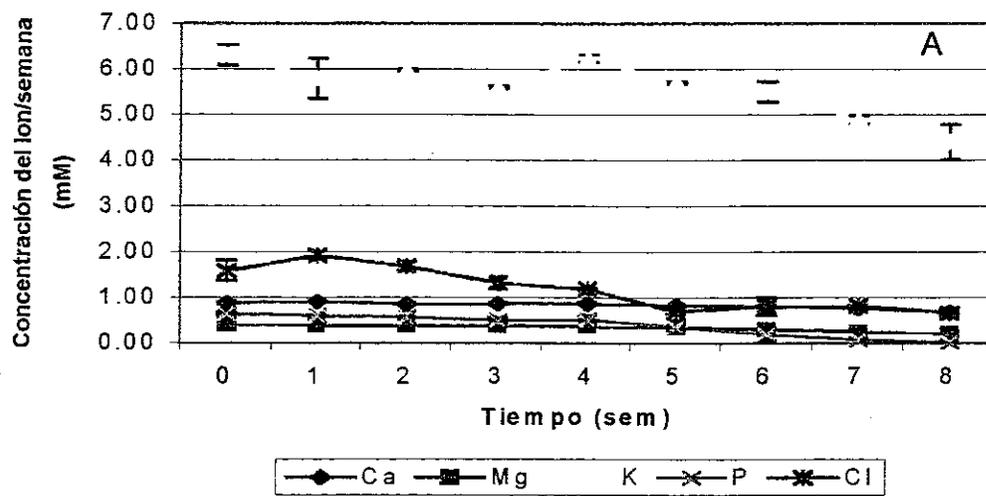


Fig. 13. Evolución comparada de la transferencia de NH₄⁺, NO₃⁻, y P (A), y Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, K⁺ y Cl⁻ (B) del medio Yasuda hacia el callo embriogénico en regeneración. Las barras representan las desviaciones estándar

Calcio (Ca^{++}), Magnesio (Mg^{++}), Potasio (K^{++}), Fósforo (P), Cloro (Cl^-)



Amonio (NH_4^+) y Nitrato (NO_3^-)

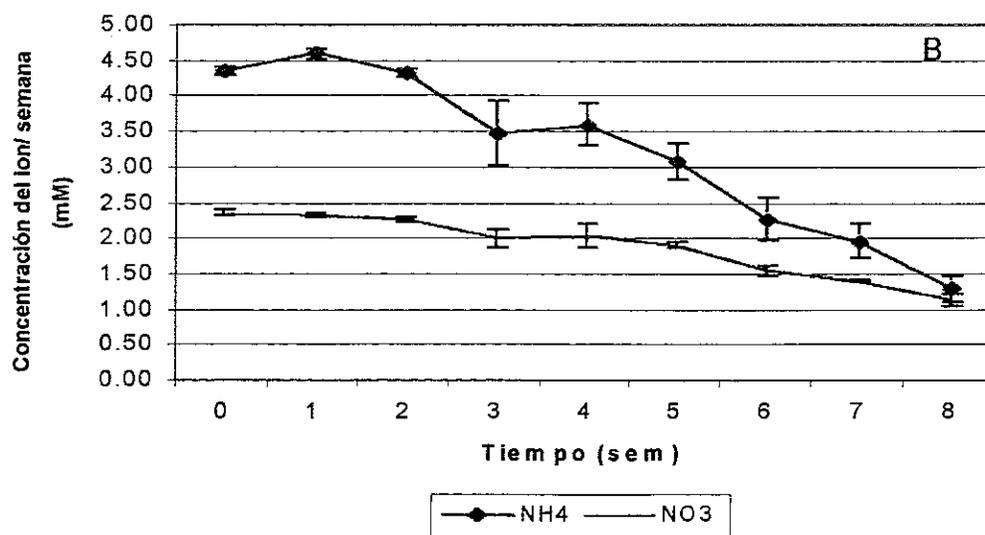
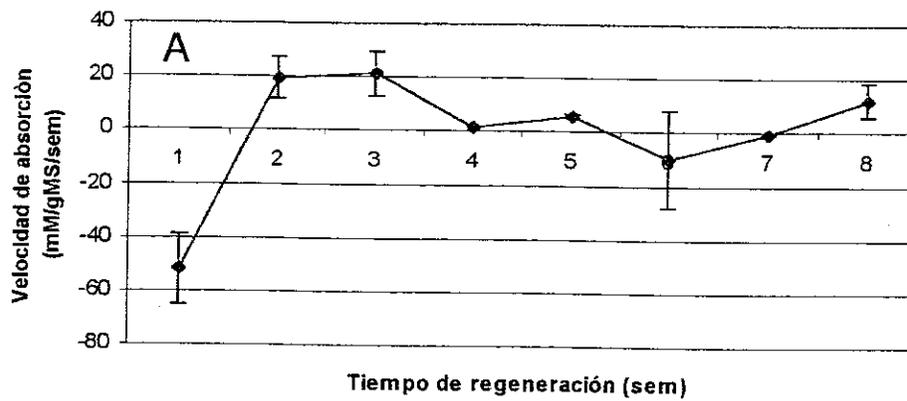
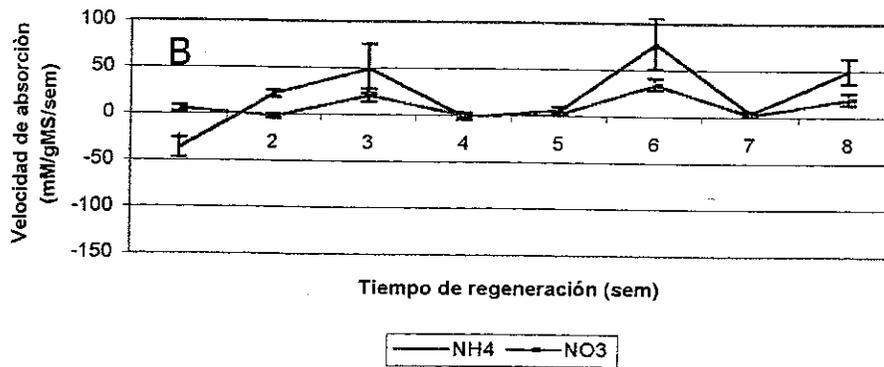
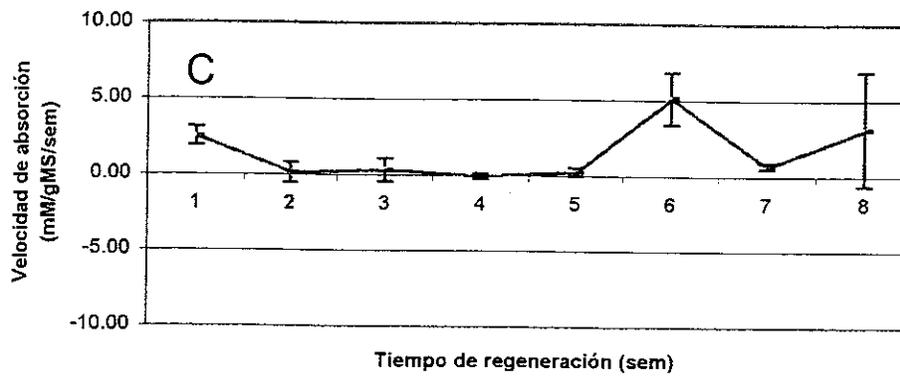


Fig. 14. Dinámica de la concentración de los elementos minerales Ca^{++} , Mg^{++} , K^{++} , P y Cl^- (A), NH_4^+ y NO_3^- (B), del medio de cultivo Yasuda durante 8 semanas. Las barras representan desviaciones estándar.

Cloro Cl⁻Amonio NH₄⁺ y Nitrato NO₃⁻Magnesio Mg⁺⁺

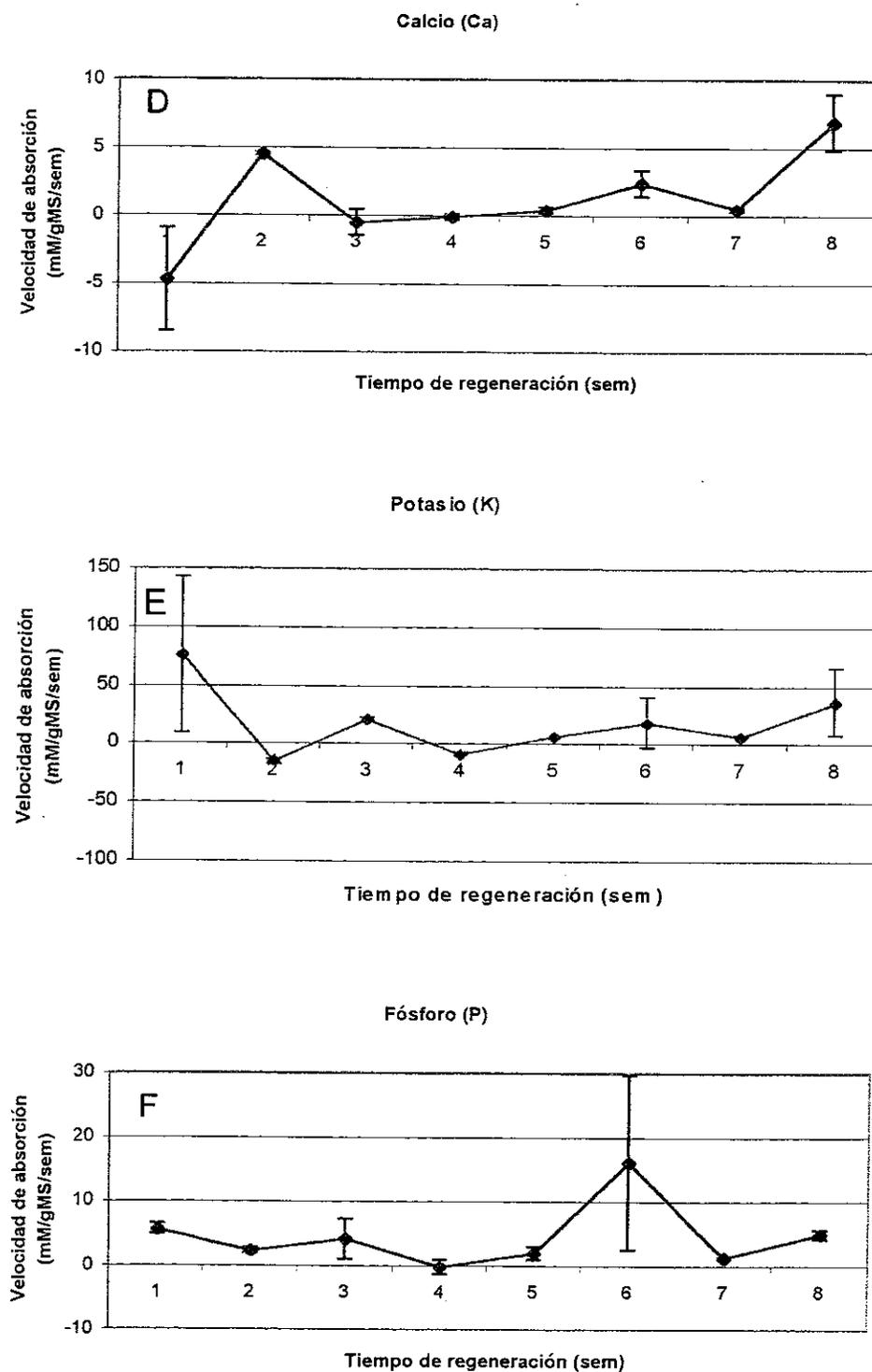


Fig.15. Velocidad de absorción de los elementos minerales del medio Yasuda durante 8 semanas. (A) Cl^- (B) NH_4^+ y NO_3^- (C) Mg^{++} (D) Ca^{++} (E) K^+ y (F) P. Las barras representan desviaciones estándar

regeneración. La intensa velocidad de absorción de NO_3^- y sobre todo de NH_4^+ , en la segunda y tercera semana, evidenció la necesidad del suministro de nitrógeno en el inicio de la fase de crecimiento de los agregados embriogénicos, el cual es necesario para las diferentes actividades metabólicas. En la sexta semana, la fuerte absorción de NO_3^- y NH_4^+ (Fig. 15B), así como de P y Mg (Fig. 15 C y F), corresponde al inicio de la formación de los embriones somáticos. Se notó que la velocidad de absorción del NH_4^+ fue más alta que la del NO_3^- y que las curvas de velocidades de absorción de estos 2 iones y la del P son muy similares, confirmando una fuerte actividad metabólica durante las semanas 3, 6 y 8 de la regeneración.

c. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre la producción de biomasa y de embriones

El ritmo de cambio del medio de cultivo afectó de manera significativa la producción de biomasa y de embriones (Cuadro 12). Se observó que una frecuencia de cambio del medio cada 6 semanas permitió obtener la mayor biomasa total y producción de embriones. Con una frecuencia elevada (cada 1 y 2 semanas) de cambio del medio se redujo significativamente la biomasa total y la de embriones con respecto al mejor tratamiento (6 semanas).

El número de embriones totales y torpedo aumentó con la frecuencia de cambio de medio, siendo la frecuencia de 1 semana la que produjo la cantidad más baja de embriones (434 totales y 376 torpedo) y 6 semanas la óptima (2733 totales y 2147 torpedo). Un aumento en el ritmo de cambio de medio de cada 8 semanas disminuyó nuevamente la producción embrionaria. La frecuencia de embriones torpedo fue poco influenciada por el ritmo de cambio de medio y los valores registrados fueron relativamente altos.

A nivel histológico se observó a las 8 semanas de cultivo, que cuando el medio se cambió con una frecuencia semanal, se obtuvieron pocos agregados embriogénicos normales,

abundando más los deformes y con células vacías (Fig. 16a), lo cual afectó la cantidad de biomasa y embriones producidos. Esto se debió quizás a un estrés químico o físico provocado sobre el tejido vegetal, bien sea por exceso de nutrientes o por el cambio de medio en si, conduciendo al necrosamiento del tejido a lo largo del proceso de regeneración. Solo aquellos agregados embriogénicos capaces de sobrevivir a esta frecuencia de cambio de medio desarrollaron embriones de buena morfología (Fig. 16c). Los embriones formados en este tratamiento, poseían una epidermis bien diferenciada, células con alto contenido citoplasmático, presencia de sustancias de reserva en forma de proteínas y a diferencia del resto de los tratamientos, grandes cantidades de almidón mayormente concentrado en las células del parénquima del eje embrionario (Fig. 16b).

A una frecuencia de cambio de medio de 2 semanas, se confirmó histológicamente la presencia de gran cantidad de callo, muchas de estas células rodeaban los agregados embriogénicos más activos, bien estructurados y segmentados. Se observó además una matriz mucilaginosa rodeando dichos agregados, células con un citoplasma denso, activa división celular, núcleo grande y reservas de almidón (Fig. 17a). Entre los embriones torpedos regenerados, algunos presentaron un crecimiento normal, y otros con células de poco contenido citoplasmático, escasa polarización del eje embrionario y deformación de los cotiledones.

Un cambio de medio cada 4 y 6 semanas permitió la formación de mayor cantidad de agregados embriogénicos con las mismas características del tratamiento anterior (Figs. 17 b y c), lo que ulteriormente dio origen a un mayor número de embriones somáticos. Los embriones comenzaron a formarse a los 2 meses, normalmente como estructuras globulares a partir de los agregados hasta alcanzar la morfología de un embrión en estado de torpedo, con un área meristemática del vástago en formación, así como sus dos cotiledones (Fig. 17 d). Se observó la presencia de sustancias de reserva en forma de almidón concentrado principalmente hacia los cotiledones. La presencia de mayor cantidad de agregados embriogénicos y la morfología de los embriones desarrollados explica el aumento en el número de embriones torpedos obtenidos en este tratamiento comparado con los dos anteriores (Cuadro 12).

d. Efecto del ritmo de cambio de medio sobre el contenido mineral de los agregados celulares al final de la expresión embriogénica

En los callos embriogénicos sin cambio de medio durante seis semanas no hubo cambios significativos en el contenido de Ca^{++} , Mg^{++} , y K^+ , pero si niveles más bajos de P y N (Cuadro 13). Esta disminución proviene probablemente de la más baja disponibilidad de NO_3^- , NH_4^+ y P en el medio de cultivo a partir de la cuarta semana, ya que, estos elementos son los más absorbidos (Fig. 13 A). También estos bajos contenidos en P y N, pueden provenir del mayor crecimiento en biomasa obtenido cuando no se cambia el medio durante 6 semanas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre el contenido mineral de los agregados embriogénicos a las 6 semanas de iniciada la regeneración. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Ritmo de cambio de medio (sem)	Contenido mineral de los agregados celulares a las 6 semanas de regeneración				
	Ca^{++} (%)	Mg^{++} (%)	K^+ (%)	P (%)	N (%)
1	0.23±0.02 ^a	0.17±0.02 ^a	1.74±0.02 ^a	0.64±0.01 ^a	4.79±0.09 ^a
2	0.24±0.03 ^a	0.16±0.03 ^a	1.54±0.14 ^a	0.63±0.04 ^a	4.84±0.11 ^a
4	0.29±0.02 ^a	0.13±0.01 ^a	1.49±0.12 ^a	0.58±0.02 ^a	4.74±0.17 ^a
6	0.33±0.07 ^a	0.17±0.04 ^a	1.75±0.06 ^a	0.35±0.04 ^b	3.60±0.17 ^b

Suspensión celular (sem 0)	Contenido mineral de los agregados celulares a la semana 0				
	0.46±0.08	0.14±0.04	2.17±0.34	0.48±0.05	6.19±0.46

Cuadro 12. Efecto del ritmo de cambio de medio en biorreactor sobre la producción de biomasa y de embriones somáticos a las 14 semanas de iniciada la regeneración. Datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ (test de Newman y Keuls).

Frecuencia de cambio de medio (sem)	Producción de biomasa			Producción de embriones			
	Peso total (g)	Peso callo (g)	Peso emb. (g)	Prop. biom. emb. (%)	N° emb. tot.	N° emb. torp.	Frec. emb. torp. (%)
1.0	6.0±0.3 ^c	3.9±0.3 ^b	2.1±0.4 ^c	35±5 ^{ab}	434±187 ^c	376±153 ^c	87±2 ^a
2.0	16.3±3.2 ^b	12.5±2.1 ^a	3.8±1.3 ^{bc}	23±4 ^b	704±149 ^{bc}	590±147 ^{bc}	84±6 ^{ab}
4.0	16.7±3.3 ^b	7.3±3.3 ^b	9.5±4.4 ^{ab}	56±20 ^a	1585±548 ^b	1238±447 ^b	78±5 ^b
6.0	23.9±5.2 ^a	9.6±4.1 ^{ab}	14.3±3.8 ^a	60±13 ^a	2733±728 ^a	2147±568 ^a	79±2 ^b
8.0	13.9±3.7 ^b	5.7±1.4 ^b	8.2±3.0 ^b	58±8 ^a	1325±602 ^{bc}	1015±476 ^{bc}	76±2 ^b

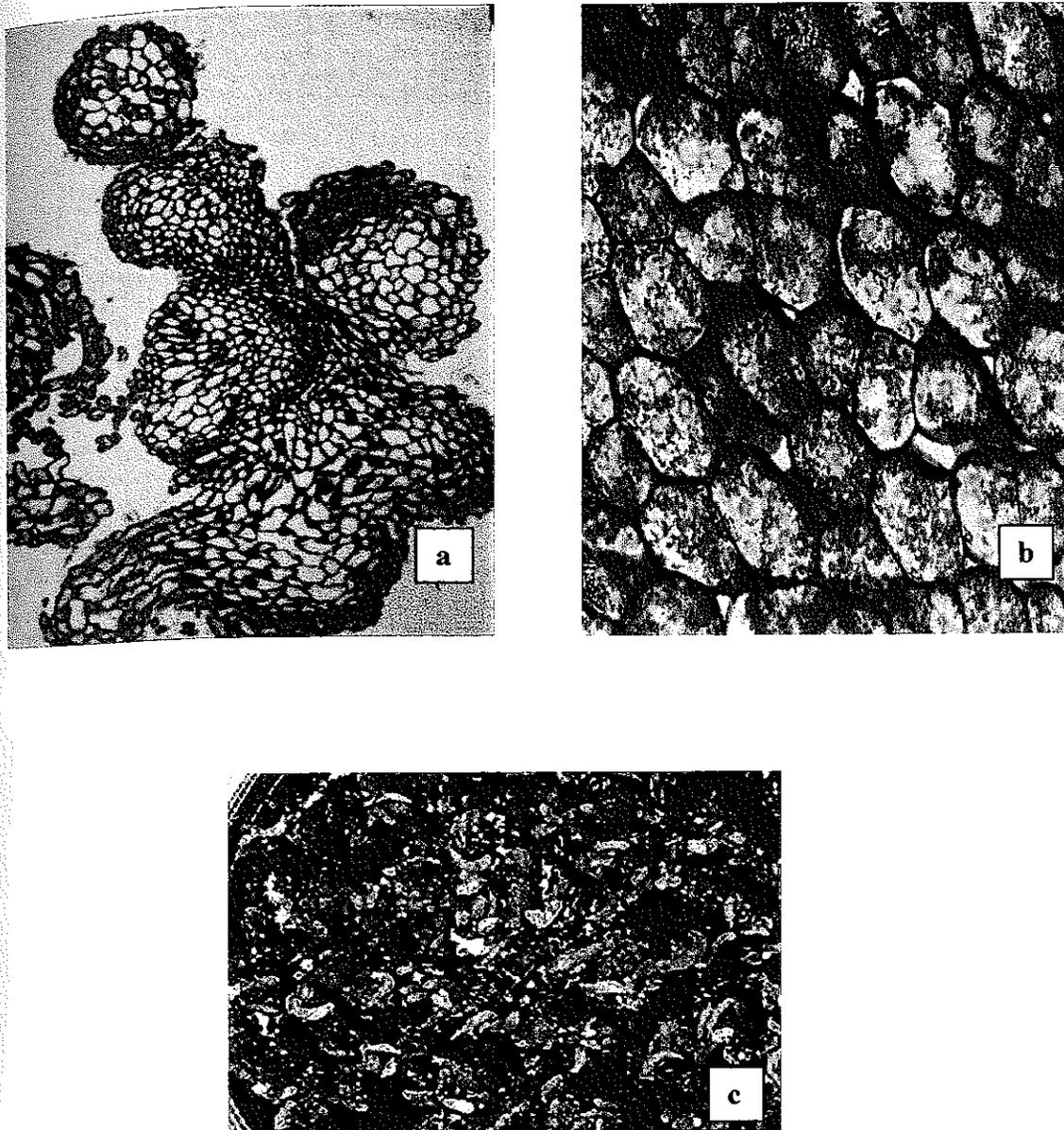


Fig. 16. Aspectos histológicos y morfología externa del material vegetal cultivado con ritmo de cambio de medio de 1 semana. **(a)** histología de agregados embriogénicos, nótese las células vacías y deformes (4X), **(b)** histología de embriones normales con abundante reserva de almidón (rojo) y lípidos (verde) (20X), **(c)** morfología externa de los embriones a las 14 semanas de regeneración, nótese el necrosamiento del tejido y pocos embriones (blanco).

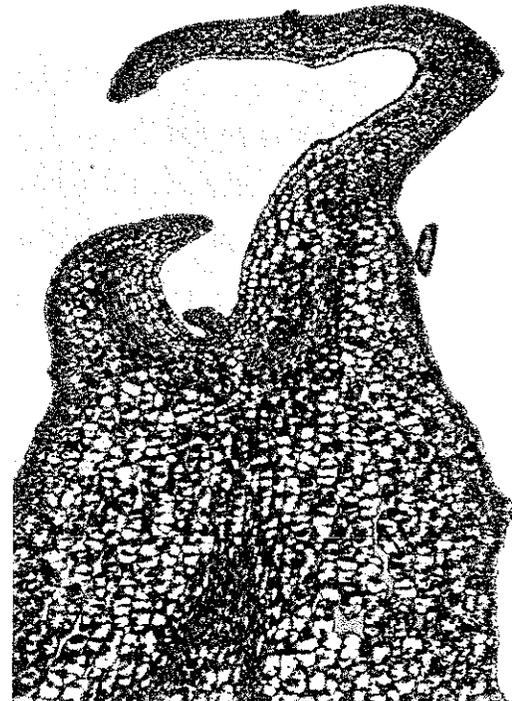
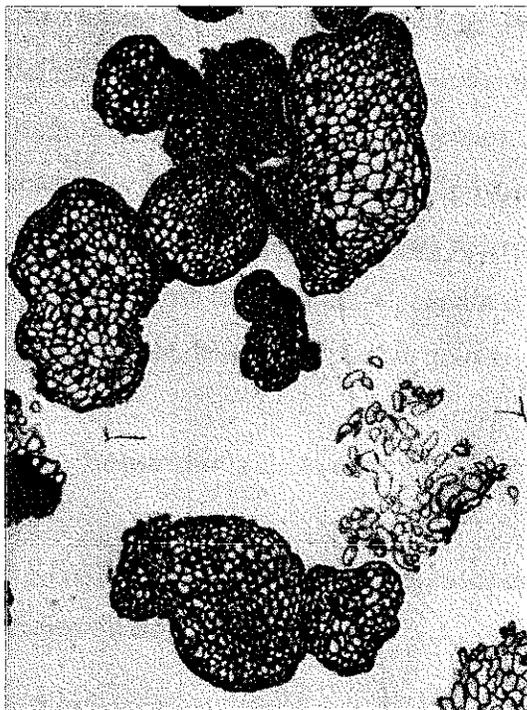
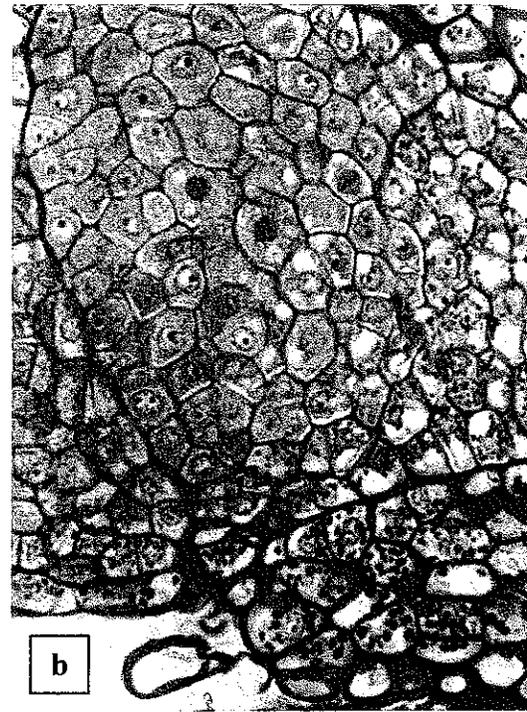
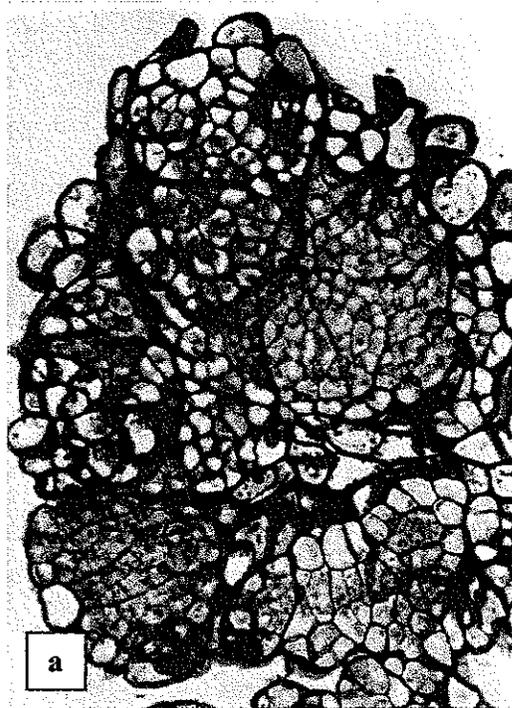


Fig. 17. Agregados embriogénicos y embriones desarrollados en diferentes ritmos de cambio de medio. **(a)** ritmo de cambio de medio de 2 semanas, nótese los núcleos regenerativos dentro de los agregados en activa división (8 semanas) (10X). **(b)** ritmo de 4 semanas, nótese la morfología característica de las células embriogénicas y células en división (20X) y **(c)** ritmo de 6 semanas, con gran cantidad de agregados bien estructurados, separados y presencia de algunas algunas células vacías (4X). **(d)** ritmo de cambio 6 u 8 semanas, embrión somático a las 14 semanas de cultivo con buen crecimiento de los cotiledones, área meristemática caulinar presente, diferenciación de tejido vascular y abundantes reservas de almidón (4X).

4.2. DISCUSION

El recipiente con inmersión temporal automatizado (RITA) puede considerarse como un biorreactor simplificado en el cual se eliminan muchas limitaciones encontradas con los biorreactores tradicionales. Un tiempo de inmersión muy reducido (algunos minutos por día), entre el medio nutritivo y el material vegetal, es la clave del éxito de este nuevo sistema. La mayoría del tiempo el material vegetal permanece sobre un soporte inerte (espuma de poliuretano o tela de nylon) sin contacto con el medio el cual queda en el compartimiento inferior del aparato. Este tipo particular de funcionamiento afecta probablemente el modo de absorción de nutrientes del medio. Hasta la fecha no se han realizado estudios del impacto de dicha técnica en la fisiología del tejido al realizar contactos temporales con el medio de cultivo, en lugar de un contacto continuo como ocurre en el caso tradicional (medios gelificados o líquidos).

Diferentes preguntas pueden surgir en tal sentido. Son los medios de regeneración determinados anteriormente y creados en la base de cultivos gelificados o biorreactores, inapropiados al cultivo con inmersión temporal?. Cuándo ocurre preferencialmente la absorción de nutrientes, entre las inmersiones o durante las inmersiones?. Si la absorción se realiza durante las inmersiones deberíamos favorecer inmersiones largas, o si es entre las inmersiones (a partir de la película o capa de medio nutritivo depositado al final de la inmersión) se debería utilizar un gran número de inmersiones cortas diariamente.

4.1.1. Importancia de la composición química del medio de cultivo

4.1.1.1. La composición en elementos minerales y vitaminas determinaron la eficiencia de la regeneración

La composición en minerales y vitaminas tuvo un mayor efecto sobre la regeneración de embriones somáticos comparado al aporte de la combinación y el balance hormonal. Las diferentes respuestas en la producción de biomasa (callo y embriones) pueden explicarse sobre la base de las diferencias en la composición de sales minerales y

vitaminas de los diferentes medios utilizados. Efectivamente eliminando las diferencias relacionadas con las hormonas, fuentes de carbono y pH en todos los medios utilizados, pudo determinarse que la diferencia en la composición de los macro, micronutrientes del medio Yasuda con respecto a los demás medios y vitaminas influyeron directamente sobre la producción y morfología de los embriones somáticos de *C. arabica*.

El medio de cultivo Yasuda posee una composición equivalente a la cuarta parte de los macro y micronutrientes que posee el medio M4 y la mitad de los que posee el medio T4. El medio M4 a diferencia del Yasuda y similar al M3 y T4 posee glicina, considerada como una vitamina en el medio de cultivo. El medio T4, el menos eficiente de todos en la producción de embriones y con la mayor producción de callo, es el más rico de todos los medios en fuente de nitrógeno orgánico. Probablemente una alta fuente de nitrógeno (orgánico e inorgánico) pudo afectar la regeneración de embriones y favorecer el mantenimiento de callo. El medio M3 caracterizado por la poca biomasa total producida está compuesto a diferencia del M4 por una menor cantidad de nitrógeno orgánico y la presencia de lactosa como fuente adicional de carbono, sin embargo, la producción de embriones en este caso aunque muy baja, fue de buena calidad.

La producción de embriones en biorreactor en esta parte del estudio siempre estuvo acompañada por la producción de callo. Variaciones en la composición mineral, vitaminas y hormonas no lograron eliminar ese problema. La presencia de callo tiene como desventajas: a) oponerse al desarrollo de los embriones somáticos, b) excesivo aumento de las densidades de biomasa, c) alta humedad con problemas de vitrificación, d) aumentos en el tiempo de regeneración, obligando en muchos casos a transferir manualmente los embriones de un biorreactor a otro, aumentando los costos de producción.

El nitrógeno es el mineral cuantitativamente más absorbido durante el crecimiento de los tejidos vegetales y el suministro de nitrógeno en su forma reducida es una de las formas más eficientes para el crecimiento, sin embargo las células necesitan también del consumo de nitrógeno inorgánico ya que un desbalance de iones NH_4^+ y NO_3^- puede

afectar la absorción de nutrientes, acumular iones en el medio de cultivo y además puede afectar los valores de pH en el citosol y en consecuencia afectar la embriogénesis (Marschner, 1986).

En *C. Arabica*, Neuenschwander y Baumann (1992), González *et al.* (1993), van Boxtel y Berthouly (1996), lograron optimizar la embriogénesis somática de alta frecuencia utilizando un medio de Murashige y Skoog reducido a la mitad de la concentración original en macro y micronutrientes durante la etapa de regeneración. Esto apoya los resultados obtenidos con el medio Yasuda, en cuanto al uso de un medio de cultivo con concentraciones bajas de sales minerales. Sin embargo, Staritski y Van Hasselt, (1980), han comentado la obtención de embriones somáticos en medio sólido con medio MS a la mitad de su concentración en sales, pero aumentando el KNO_3 a 1000 mg/l.

En otras especies, como en callos provenientes de embriones inmaduros de arroz la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ puede afectar la respuesta de estos callos a diferentes concentraciones de 2,4-D, mediante una regulación de la absorción o del metabolismo hormonal (Grimes *et al.*, 1990). En hule, el porcentaje de callo embriogénico incrementa durante la etapa de expresión en forma lineal con la absorción de NO_3^- , mientras que la absorción de NH_4^+ disminuye durante el mismo periodo en las siguientes etapas como si esta relación $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ tendiera a balancearse (Montoro *et al.*, 1995). La relación $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ presente en los medios M3 y T4 donde existen las mayores fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico pudo haber afectado la potencialidad del callo embriogénico para diferenciar embriones somáticos, contrario a lo ocurrido con el medio Yasuda. En trigo, la concentración de los macroelementos afecta la morfología y la capacidad embriogénica del callo obtenido de embriones cigóticos inmaduros, así el NH_4NO_3 fue esencial para la proliferación del callo embriogénico, el CaCl_2 , MgSO_4 y KH_2PO_4 no fue esencial para la iniciación de callo, pero afectó el desarrollo del callo y su diferenciación potencial. Por lo tanto, la composición del medio puede diferir dependiendo de la etapa del proceso de regeneración, de esta forma el medio Yasuda bajo las condiciones utilizadas fue eficiente para el proceso de expresión y desarrollo de los embriones somáticos en café.

En *Picea abies*, se ha demostrado que los micronutrientes pueden tener un efecto estimulador o inhibidor de la embriogénesis somática. Así niveles altos de algunos micronutrientes comparados con la composición normal del medio Murashige y Skoog como el boro (B), zinc (Zn), cobalto (Co) y Iodo (I) estimularon la diferenciación de callo embriogénico en algunos genotipos de callos y el crecimiento de callo solamente en otras de *P. abies* (Simola y Santanen, 1990). A diferencia de estos resultados el medio Yasuda no posee I ni Co, lo cual podría estar influyendo en los resultados positivos obtenidos.

4.1.1.2. La regeneración de embriones es posible sin reguladores de crecimiento, las cuales juegan un papel secundario

La producción de embriones fue posible con los medios Yasuda y M4 sin agregar reguladores de crecimiento. Se observó una incidencia hormonal sobre el proceso de regeneración sobre todo cuando se usó 6 mg/l de BAP en el medio Yasuda, sin embargo las diferentes concentraciones de BAP usadas no influyeron sobre la calidad de los embriones torpedo obtenidos, confirmándose el papel secundario de las hormonas sobre este proceso.

a. La auxina inhibe la regeneración de embriones de café

La auxina en el medio de regeneración sola o en combinación con otros reguladores de crecimiento tuvo un efecto negativo sobre la regeneración de embriones somáticos. En M4, la presencia de ácido indolacético (AIA) no favoreció la producción de embriones ni la biomasa pues su eliminación no condujo a resultados diferentes. Igualmente el ácido naftalenacético (ANA) en el medio M3 no condujo a una mayor producción de biomasa y redujo el número de embriones obtenidos y la frecuencia de embriones torpedo (normales). Sin embargo, es importante destacar que en otra fase del proceso de propagación masal, como la de conversión en planta, el ANA presente en el medio M3 tuvo un efecto inductor cuando se colocaron los embriones en el medio de germinación T5. En *Paspalum scrobiculatum*, embriones somáticos obtenidos a partir de suspensiones celulares fueron estimulados a germinar eficientemente en MS con ANA y BAP presentes en el medio de cultivo (Nayak y Sen, 1989).

Para la embriogénesis somática se conoce que en general las auxinas son necesarias para la inducción del proceso, pero son inhibitorias para el desarrollo del embrión. Durante muchos años la embriogénesis somática estuvo asociada al “choque auxínico” y se demostró además que la presencia de la auxina en el medio de regeneración puede provocar anomalías morfológicas. En batata, el callo embriogénico prolifera cuando se subcultiva en medio con reguladores de crecimiento, tales como: ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y BAP, y los embriones se forman cuando se subcultiva el callo en un medio sin reguladores de crecimiento.

En café *C. arabica*, sin embargo, haciendo uso del cultivo de embriones cigóticos sobre medio gelificado, se ha obtenido la máxima formación directa de embriones somáticos cuando se combinó ANA 0,5 mg/l con kinetina 0.1 mg/l (Santana *et al.*, 1989). Hatanaka *et al.* (1991) señalaron que las auxinas (ANA, Acido Indol Butírico (AIB), AIA y 2,4-D) en cultivo de hojas de *C. canephora*, inhibían la formación de embriones somáticos. Estos resultados concuerdan con el efecto negativo que produjo el uso de auxinas en el sistema de regeneración con biorreactor utilizado por nosotros.

b. Las citoquininas exógenas estimulan la regeneración

El aporte de BAP en el medio de cultivo tuvo un efecto positivo sobre la producción de embriones somáticos en los tres tipos de medio de cultivo estudiados (Yasuda, M4 y M3). El medio de Yasuda a una concentración entre 4 y 6 mg/l de BAP produjo la mayor producción de embriones torpedo con la menor formación de callo.

En *C. arabica*, González *et al.* (1993) y Zamarripa (1994) obtuvieron la mayor producción de embriones somáticos en suspensión utilizando 5 mg/l de BAP y observaron la aparición de embriones somáticos a la sexta semana, lo cual concuerda con nuestros resultados en cuanto a la composición y concentración hormonal, así como con el tiempo necesario para la expresión de la embriogénesis. Sin embargo, los mismos autores obtuvieron bajas frecuencias de embriones torpedo (16% y 8.5% respectivamente), entre 4.5 y 8 veces más bajo al obtenido por nosotros. Al parecer el uso de un sistema de biorreactor basado en la inmersión temporal permitió la producción de

embriones de mejor calidad. Staritski y Van Hasselt (1980) similarmente obtuvieron los mejores resultados para la expresión y desarrollo de embriones somáticos de café cuando usaron altas concentraciones de BAP (5 mg/l).

Contrario a nuestros resultados, Van Boxtel y Berthouly (1996) en *C. canephora* y *C. arabica*, obtuvieron embriogénesis somática de alta frecuencia cultivando los callos embriogénicos en medio MS con 1 mg/l de BAP en suspensión, lo cual permitió la expresión embriogénica en un período de 8 y 10 semanas. Hatanaka *et al.* (1991) y Yasuda *et al.* (1985), en cultivos de hojas de *C. canephora* y *C. arabica* respectivamente, regeneraron embriones somáticos con una concentración de 1.1 mg/l de BAP.

La formación de embriones torpedo también fue posible en el medio de cultivo sin el suministro exógeno de BAP, lo cual indica que en los agregados embriogénicos en suspensión existe un nivel hormonal endógeno que favorece la formación de embriones. El mismo resultado fue obtenido por Yasuda *et al.* (1985), sin embargo, no reportaron cifras del número o frecuencia de embriones torpedo obtenido. En nuestro caso la calidad de los embriones fue alta, aunque significativamente inferior al mejor tratamiento con BAP (6 mg/l). Posiblemente las diferentes respuestas encontradas por estos autores están relacionadas al genotipo trabajado, pues se conoce que existe una fuerte interacción entre el genotipo propagado y el medio de cultivo, que se traduce en diferentes grados de respuesta durante la inducción de callos embriogénicos (Zamarripa, 1993; Bieysse *et al.*, 1993).

4.1.2. Importancia de algunos factores físicos en el biorreactor: la inmersión y el ritmo de cambio de medio

Los biorreactores utilizados representan sistemas ideales que pueden usarse eficientemente en la producción a gran escala de embriones somáticos. Esto ya fue reportado en especies como zanahoria (Ammirato y Styer, 1985), alfalfa (Stuart, *et al.*, 1987; McDonald *et al.*, 1989), algunas coníferas (Taulorus, *et al.*, 1992), *Capsicum*

(Mavituna y Buyukalaca, 1996) y en café (Petiard *et al.*, 1993; Etienne-Barry *et al.*, 1999). Zamarripa *et al.* (1991), compararon la producción de embriones somáticos de café en medio líquido, reportando cifras de 153,000 embriones de café/litro en erlenmeyer y de 200,000 embriones/litro en biorreactor.

La medición y control de varios factores dentro del recipiente de inmersión que no pueden realizarse en cultivos en medio sólido, permite el análisis preciso de la interacción de parámetros responsables del crecimiento celular y desarrollo de los embriones con el fin de optimizar su rendimiento. Se puede realizar además un monitoreo y control de los procesos biológicos (Ammirato y Styer, 1985); medir y controlar concentraciones de oxígeno y de dióxido de carbono (Ducos, *et al.*, 1993), realizar y optimizar cinéticas de crecimiento y dinámica de nutrientes, entre otros.

4.1.2.1. Inmersiones cortas y frecuentes estimulan la regeneración de embriones

El sistema de biorreactor con inmersión temporal es reciente, así que no existe literatura que describa el papel de la frecuencia o duración de las inmersiones sobre la propagación *in vitro*. En este estudio se demostró que la frecuencia y duración de las inmersiones diarias de los agregados celulares en el medio de cultivo, tuvieron un efecto determinante sobre la producción de biomasa y de embriones somáticos de café. El mejor tratamiento, en términos de mayor cantidad de biomasa total, poca cantidad de callo y mayor cantidad de embriones fue de $6v \times 1'$; mientras que frecuencias y duración de las inmersiones muy altas ($6v \times 15'$), o muy bajas ($1v \times 1'$) provocaron una reducción drástica en el número de embriones. De manera similar algunos autores reportaron frecuencias y tiempos cortos de inmersiones en hule (Etienne *et al.*, 1997) y en café (Etienne-Barry *et al.*, 1999), señalando frecuencias y tiempos de inmersión de 2 veces diarias por 1 minuto para la obtención de embriones somáticos.

En banano, Alvard *et al.*, (1993), señalaron que el uso de una combinación de inmersiones de 20 minutos cada 2 horas estimuló la propagación por cultivo de meristemos. Estos autores señalaron que la escasa inmersión del explante en el medio de

cultivo provocó un suministro limitado de agua, carbohidratos y nutrientes minerales que marcaron un débil desarrollo de los explantes. Algo similar debió ocurrir en nuestra experiencia ya que el número total de embriones somáticos, fue muy bajo. En este caso la limitación nutritiva ocurrió seguramente durante la fase de desarrollo, donde la biomasa tendió a aumentar mucho (hasta 23 g), pues no hemos evidenciado problemas de absorción mineral durante la fase de expresión, donde la biomasa aún se mantiene baja.

4.1.2.2. Un tiempo de inmersión largo (15 minutos) provoca daños morfológicos y vitrificación en los embriones regenerados

Una frecuencia alta (6 veces) y duración larga (15 minutos) de la inmersión, permitió la producción de un número elevado de embriones, aunque inferior a los mejores tratamientos (6v x 1'), pero afectó muy significativamente la calidad de los mismos, registrándose la menor frecuencia de embriones torpedo. Este tratamiento se benefició del efecto positivo ya comentado en el párrafo anterior sobre las frecuentes inmersiones, pero su eficacia fue reducida por el largo tiempo de inmersión.

La vitrificación estuvo asociada a la excesiva duración de la inmersión, (tratamientos 2v x 15' y sobre todo 6v x 15'), es decir a un largo tiempo de contacto entre los embriones y el medio líquido. Este resultado contrasta con el tratamiento 1v x 1', que representó la más reducida frecuencia y duración de las inmersiones con formación de pocos embriones (480), pero de mejor calidad (60%).

A 6v x 15' fueron evidentes los síntomas de vitrificación, provocados por un aumento en el CA (6%). Además del color, se observaron otros cambios en la morfología de los embriones caracterizados principalmente por una superficie irregular, pérdida de la forma torpedo en un 30% y 60% para 2v x 15' y 6v x 15', respectivamente y un aumento significativo en el tamaño (100% del PF) del embrión. Estos cambios se apreciaron tanto visualmente como por microscopía electrónica e histología y pueden considerarse como marcadores morfológicos de la vitrificación. A nivel endógeno los embriones vitrificados presentaron los contenidos más altos de K^+ , mientras que los que se encontraban en

tiempos bajos de inmersión presentaron los niveles más bajos. Se demostró la existencia de una correlación alta entre el contenido de K de los embriones y el tiempo de inmersión diaria acumulada, la cual no es sorprendente, pues el K es el elemento más involucrado en el mantenimiento del potencial osmótico de la célula (Chée *et al.*, 1992).

El cambio de color y un aumento en el contenido de agua representan características morfológicas y bioquímicas de la vitrificación conocidas en microestacas (Debergh *et al.*, 1992). Aunque no se han reportado oficialmente problemas de vitrificación sobre embriones somáticos, es probable que las bajas tasas de embriones torpedo (bien formados) obtenidas en biorreactores o erlenmeyers (García *et al.*, 1997), particularmente en café (Ducos *et al.*, 1993 y Zamarripa, 1994) y las bajas tasas de conversión en plantas (Loh *et al.*, 1997 y Zamarripa, 1994), son debidas parcialmente a problemas de vitrificación. Varios autores han reportado tasas de embriones torpedo más altas en medio sólido que en medio líquido, lo cual podría confirmar esta hipótesis (García *et al.*, 1997).

En nuestro caso donde se puede controlar la aplicación del medio líquido, los problemas de vitrificación se pueden resolver disminuyendo los tiempos de inmersión, como lo vimos anteriormente. En los sistemas tradicionales basados en contacto permanente con medio gelificado o líquido, la vitrificación en algunos casos puede reducirse con disminución en el contenido de citoquininas del medio de cultivo (Debergh *et al.*, 1992). Los mismos autores demuestran que incrementando el contenido de Ca^{++} y disminuyendo el de NH_4^+ o Cl^- , se puede reducir la hiperhidricidad. Esto es poco probable en nuestro caso, pues no se encontraron niveles endógenos variables de estos elementos. La vitrificación responde a una serie de cambios bioquímicos que influyen en la reducción de actividades peroxidasas y catalasas involucradas en la eliminación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), así como a otros desórdenes metabólicos y cambios a nivel de la integridad de la membrana celular que permiten finalmente expresar la estructura vitrificada (Le Dily, *et al.*, 1993).

En la propagación de meristemas de Banano en biorreactor con inmersión temporal, se observó que cuando los explantes fueron colocados en contacto continuo con el medio de cultivo ocurrió hiperhidricidad en los tejidos, con disminución en el crecimiento (Alvard *et al.*, 1993). Según estos autores, la falta de oxígeno fue una de las causas principales del fenómeno presentado, provocando asfixia del explante, efecto que fue mayor aún por la falta de agitación del medio de cultivo. Una inmersión permanente aplicando un sencillo burbujeo, o inmersiones frecuentes y largas (20 minutos cada 2 horas), permitieron no solo eliminar el problema de vitrificación, sino estimular las mejores tasas de crecimiento. En el caso del café, podemos afirmar que esta especie es muy sensible al problema de vitrificación, pues 6v x 15' no representan frecuencias y tiempos de inmersión tan largos. El callo embriogénico de café es muy sensible a la falta de oxígeno, pues hemos observado en varias ocasiones necrosamiento y muerte de suspensiones celulares, después de aproximadamente 10 horas de ausencia de agitación por cortes accidentales de electricidad. También se observaron problemas de vitrificación sobre microestacas de *C. arabica* cultivadas en biorreactores utilizando inmersiones temporales más prolongadas que 4v x 15' (Berthouly *et al.*, 1995). En el caso del café, la vitrificación puede ser una consecuencia de la falta de oxigenación, pero también por el contacto directo prolongado con el líquido, pues un burbujeo acompaña a la inmersión.

4.1.2.3. Una renovación frecuente del cambio de medio de cultivo inhibe la formación de embriones

Cambios de medio cada 1 o 2 semanas, redujeron fuertemente la producción de embriones somáticos de *C. arabica* en biorreactor, favoreciendo la producción de callo. Un cambio de medio poco frecuente (cada 6 semanas), estimuló la más eficiente regeneración de embriones (2700 embriones/biorreactor). Estos resultados son diferentes de los obtenidos por Zamarripa (1994) en *C. canephora*. Este autor puso en evidencia la existencia de una interacción entre la densidad de inoculación en biorreactor y la renovación del medio de cultivo. La renovación del medio cada 2 semanas, estimuló la producción de embriones, y se vio favorecida cuando la densidad de inoculación aumentó de 0.5, 1 y 3 g PF/l. Zamarripa (1994), obtuvo un aumento del número de embriones

regenerados (89%) para una densidad de inoculación similar a la nuestra (1 g PF/l). Por el contrario, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Etienne *et al.* (1997) sobre hule, donde observaron que un cambio de medio al inicio de la regeneración embriogénica reduce la producción de embriones 10 veces.

A nivel del efecto de la renovación del medio sobre la calidad de los embriones, los resultados de Zamarripa (1994), son idénticos a los nuestros, pues observó que el porcentaje de embriones en estado de torpedo fue superior cuando se renovó el medio. Igualmente Osuga *et al.* (1997), demostraron en zanahoria, que cambios parciales del medio favorecen la eficiencia del desarrollo de los embriones del estado globular al estado torpedo en un 20%. Esta tendencia fue confirmada por Etienne *et al.* (1997) en hule, midiendo el impacto sobre la tasa de conversión en planta.

Cuatro hipótesis pueden plantearse sobre el efecto de la renovación del medio sobre la producción de embriones: 1) El cambio de medio elimina sustancias inhibitoras excretadas por los agregados embriogénicos (Inhibitory Conditioning Factor(s), ICF(s)) que pueden acumularse en el medio e inhibir la producción de embriones; este antagonismo fue reportado en arroz (Ozawa y Komamine 1989), y en zanahoria (Sung y Okimoto, 1983; Nouaille y Petiard, 1988; Kobayashi, *et al.*, 1994). 2) El cambio de medio elimina sustancias inductoras de la formación de embriones, tales como glicoproteínas, evidenciado por De Vries *et al.* (1988). 3) El cambio de medio permite evitar la carencia de elementos del medio (azúcar, fósforo, nitrógeno...). 4) Un cambio muy seguido puede representar un estrés mecánico y químico para el material vegetal y una variación continua de la presión osmótica.

En el caso estudiado, podemos hacer 2 hipótesis que pueden explicar la inhibición por cambios de medio muy frecuentes y la estimulación que ocurrió dejando el mismo medio de cultivo durante 6 semanas. En primer lugar, pudo ocurrir la eliminación de una o varias sustancias promotoras, tales como los PCFs (Promotive Conditioning Factor(s)), descritos por Osuga *et al.*, (1997). Efectivamente hemos realizado en el estudio cambios totales del medio. Si esta hipótesis es cierta, un cambio parcial del medio de cultivo, debería eliminar esta inhibición, dejando suficiente cantidad del medio con la sustancia

promotora. Tal proceso fue reportado en zanahoria por Osuga *et al.* (1997) haciendo cambios parciales 2 o 3 veces por semana. Segundo, no podemos descartar un efecto de estrés provocado por el proceso de cambio de medio. En nuestro caso se trata más probablemente de un estrés químico, por las siguientes razones: hemos evidenciado por estudios histológicos una gran riqueza de las células embriogénicas en almidón, proteínas y lípidos influenciando más la producción de callo que de embriones. Además los cambios de medio realizados con el biorreactor no representan un verdadero estrés para el material vegetal, ya que el cambio de medio no implica una manipulación directa del tejido, pues solo una parte del biorreactor se transfiere al medio nuevo.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de frecuencias y duración de las inmersiones y del ritmo de renovación del medio, se logró evidenciar que existen 2 etapas en la producción de embriones bien diferenciadas. Una etapa de expresión embriogénica (0 a 6 semanas), es decir la iniciación del proceso de regeneración y que culmina con la formación de embriones globulares, la cual es afectada muy negativamente por la renovación del medio. Otra etapa de desarrollo del embrión del estado globular hacia el estado torpedo (6 a 14 semanas), que es estimulada por un cambio de medio frecuente. La etapa de desarrollo embrionario, es la más afectada por la calidad de las inmersiones.

4.1.2.4. Evolución del contenido mineral del material vegetal durante el proceso de regeneración de embriones

Existe una bibliografía muy escasa acerca de los contenidos minerales durante el proceso de regeneración de embriones por embriogénesis somática. En el caso del café, encontramos que globalmente, la evolución del material vegetal durante la regeneración se traduce por una disminución en el contenido de los minerales P y N. Estos cambios traducen una evolución progresiva de los tejidos desde un *estado indiferenciado embriogénico* hacia un *estado diferenciado embrionario* acompañado por una reducción en las actividades metabólicas relacionadas con la energía celular (P), o la biosíntesis de macromoléculas (N). Durante la iniciación del proceso de regeneración (expresión embriogénica), los contenidos de Ca^{++} , Mg^{++} no cambian. La disminución del contenido

de Ca^{++} y Mg^{++} durante el desarrollo, puede responder a los cambios parietales durante la evolución de células pequeñas y esféricas de tipo meristemáticas, embriogénicas o embrionarias presentes en los agregados o proembriones globulares a células grandes de tipo parenquimático presentes en los embriones desarrollados. Contrario a nuestros resultados, la inducción de la regeneración en *Camelia japonica*, tiene como efecto un aumento en los contenidos de Na^+ , K^+ , P en hierro (Fe) y azufre (S) (Pedroso et Pais, 1992). En otras especies los elementos K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} tienen un efecto estimulador o inhibidor de la embriogénesis somática. En *H. brasiliensis*, incrementos en el contenido de calcio de callos friables en el medio de mantenimiento, estimularon el potencial de regeneración a través de la embriogénesis somática (Etienne *et al.*, 1997). En alfalfa dependiendo de la concentración presente de K en el medio, se observa una inhibición o estimulación de la embriogénesis somática, así una concentración en el medio de 100 mM de K, estimuló el mayor número de embriones somáticos (Shetty y Mckersie, 1993).

Cual fue el efecto de la variación de los factores físicos del cultivo sobre los contenidos minerales? Estos cambios afectaron únicamente los contenidos en P y N, confirmando la importancia de estos elementos durante el proceso de regeneración de embriones. La optimización de la frecuencia de inmersión favoreció la asimilación precoz de P y N, pero condujo a un déficit en el medio afectando los contenidos endógenos de estos elementos en los agregados embriogénicos e igualmente en los embriones somáticos (P). Además para un cambio de medio poco frecuente (6 semanas), se produjo una disminución de estos elementos en los agregados embriogénicos, mostrando también la existencia de un déficit en el medio. En ambas experimentaciones este déficit de P y N endógenos, se observó en los mejores tratamientos (material con mayor biomasa y capacidad de producción de embriones).

Los análisis de contenidos minerales en el tejido vegetal siempre indicaron deficiencias y no excesos o acumulación de algunos elementos, sin embargo, esto último es lo que se debería esperar haciendo renovaciones de medio muy frecuentes. Con cambios de medio cada semana se confirmó histológicamente la acumulación de almidón, lo cual demuestra que existe un sistema de regulación del nivel mineral (controlando la utilización de los

elementos para la producción de biomasa) en caso de cultivos en medios muy ricos. Por supuesto, esta capacidad de regulación no puede actuar en casos donde se use un medio de cultivo con balances de nutrientes minerales bajos. A diferencia de los agregados embriogénicos durante la expresión, los embriones somáticos en la fase de desarrollo, tienen un contenido mineral y de agua afectado por la frecuencia y duración de la inmersión. Por lo tanto, el sistema de control de los equilibrios minerales durante el desarrollo embrionario no parece ser tan eficiente como en la expresión.

En café el proceso de regeneración embriogénico tiene requerimientos cuantitativa y cualitativamente específicos en elementos minerales. Esta situación fue demostrada también para *Citrus deliciosa* (Cabasson, 1993),

4.1.2.5. El P y N (NH_4^+ y NO_3^-) son altamente consumidos durante la expresión embriogénica

A diferencia de los contenidos minerales en el tejido vegetal, los procesos de absorción de los elementos minerales por las plantas están mejor documentado, principalmente para NH_4^+ y NO_3^- . En café hemos evidenciado al inicio de la regeneración una fase de latencia en la absorción durante las 2 o 3 primeras semanas, a diferencia de los resultados de Blanc (1999) en hule, donde ocurrió una absorción inmediata de P y NH_4^+ . Similarmente durante la regeneración de embriones somáticos de *P. abies*, el NH_4^+ y NO_3^- son absorbidos en los primeros días de iniciada la regeneración (Find *et al.*, 1998). Probablemente esta diferencia proviene del uso de sistemas de cultivo diferentes: absorción temporal por inmersión para café, absorción permanente del tejido en medio gelificado para hule y en suspensión celular para *P. abies*.

La mejor frecuencia y duración de la inmersión (6v x 1') estuvo acompañada por una fuerte absorción de Nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-) y P del medio de cultivo durante las primeras seis semanas. La cinética de absorción mineral también reveló que a partir de la cuarta semana, el P y N empezaron a ser muy absorbidos del medio de cultivo y a la sexta semana ya se encontraba deficiente tanto en el medio como en los agregados

embriogénicos. Ciertamente existe una absorción casi total de las 2 fuentes de nitrógeno después de 6 semanas de regeneración, sin embargo, ambas experimentaciones mostraron una absorción preferencial de NH_4^+ . A partir de una relación inicial $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ de 2:1, a la sexta semana la relación fue 1:1. La cinética de consumo durante la expresión embriogénica indica que es a partir de la tercera semana que la absorción de NH_4^+ se ve favorecida. El análisis mineral realizado sobre el medio de cultivo y material vegetal, así como la comparación con otros medios de cultivo, revelan que el medio de cultivo Yasuda posee una composición muy baja en N y P. Un medio más rico en estos elementos debería probablemente estimular aún más el proceso de regeneración.

Para la proliferación de suspensiones embriogénicas de *C. canephora*, Van Boxtel y Berthouly (1996) han demostrado que entre un 50-70% de las fuentes de N y un 70% del Mg^{++} fueron absorbidos después de 3 semanas. Estos autores no analizaron el fósforo. De acuerdo a nuestros resultados de regeneración de embriones en biorreactor, obtuvimos que el N fue muy absorbido, pero contrario a los resultados de Van Boxtel y Berthouly (1996), el Mg^{++} no fue tan importante en la fase de expresión embriogénica (menos del 10% del Mg^{++} fue absorbido después de 5 semanas de regeneración). Aunque la etapa del proceso de propagación (proliferación de suspensiones celulares) y el sistema estudiado por ellos es diferente al nuestro, podemos decir que estos elementos son absorbidos en grandes cantidades por los agregados embriogénicos de café en diferentes etapas de la propagación dada su importancia para el metabolismo y crecimiento.

La absorción de mayor cantidad de NH_4^+ que de NO_3^- , está relacionado con una disminución de la potencialidad o capacidad embriogénica del callo en *H brasiliensis*, (Montoro, *et al.*, 1995). En nuestros resultados no ocurrió lo mismo, ya que en todos los tratamientos el NH_4^+ fue altamente absorbido y casi siempre en mayor cantidad que el NO_3^- , sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos. Para la proliferación de suspensiones Van Boxtel y Berthouly (1996), no evidenciaron una preferencia de absorción entre las 2 fuentes de nitrógeno. En *Cocos nucifera* la iniciación de la embriogénesis somática requiere también una alta demanda en NH_4^+ y Mg (Dussert *et al.*, 1995). Según este autor las exigencias en NH_4^+ se podrían atribuir al aumento de la

síntesis proteica en los callos durante este proceso y las del Mg, por su función como cofactores de importantes sistemas enzimáticos. El consumo en P en los callos de *Citrus deliciosa* es más elevado cuando el medio de cultivo contiene galactosa en lugar de sacarosa (Cabasson, 1993). En esta especie vegetal la naturaleza del glúcido determina la orientación morfogénica: la galactosa favorece la regeneración por embriogénesis somática y la sacarosa el crecimiento del callo.

Para algunas especies el papel de las fuentes de nitrógeno sobre la embriogénesis somática no es tan evidente, pues en *Picea abies*, utilizando un amplio rango de relaciones $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ en el medio de cultivo, Simola y Santanen (1990) no lograron demostrar una influencia de estas fuentes de N sobre la producción de embriones.

En Gimnospermas como *P. abies*, se ha encontrado que en la etapa inicial del proceso de formación de embriones somáticos, cambios semanales del medio de cultivo, aumenta el potencial de las células embriogénicas, con aumentos en la biomasa, altos consumos de fuentes nitrogenadas y de sacarosa, mientras que en la siguiente fase del desarrollo y maduración de los embriones, las tasas de crecimiento y consumo de nutrientes disminuyen (Taber *et al.*, 1998). Los autores encontraron además que el NH_4^+ fue consumido preferencialmente al NO_3^- durante este proceso. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en café, donde se evidenciaron contenidos minerales muy distintos entre las etapas de expresión y desarrollo del embrión, así como un favorecimiento por el consumo de NH_4^+ que de NO_3^- por parte del material vegetal.

4.1.2.6. Relación entre pH y $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$

En medios de cultivo que contienen tanto NH_4^+ como NO_3^- , los cambios en el PH durante el periodo de cultivo son tradicionalmente explicados sobre la base de diferencias de absorción entre NH_4^+ y NO_3^- (George, 1993). En café no se evidenciaron variaciones rápidas y pronunciadas ni del pH ni de la absorción del NH_4^+ y NO_3^- . Tal vez esto proviene de la especificidad del sistema de cultivo donde no hay un contacto permanente entre el material vegetal y el medio, lo cual conduce a amortiguar las variaciones fuertes

de muchos factores. Sin embargo, hemos observado que una absorción preferencial de NH_4^+ después de la cuarta semana, condujo a un aumento del pH, lo cual no concuerda con los resultados anteriores (George, 1993). Find *et al.* (1998), trabajando sobre 2 genotipos de *P. abies*, demostraron que la evolución del pH obtenido para uno de los 2 genotipos no podía tampoco explicarse sobre la base del consumo en NH_4^+ y NO_3^- . Algo similar ocurrió en hule, donde Montoro *et al.* (1996) mostraron una utilización preferencial del NO_3^- . En *Cucumis sativus*, el pH del medio de cultivo se estabiliza dependiendo de la composición de NO_3^- y NH_4^+ presente en el medio, lo cual influye directamente sobre el crecimiento del tejido embriogénico. Una relación 2:20 de NH_4^+ : NO_3^- respectivamente, permite una separación de los agregados celulares, iniciándose el proceso embriogénico (Wróblewski, *et al.*, 1995).

El N es un macronutriente con función estructural muy importante en las plantas para la formación de proteínas y ácidos nucleicos y el P es esencial como componente principal de la membrana celular, ADN, ATP, ADP y muchos otros fosfatos de azúcar involucrados en los procesos metabólicos (Reid, *et al.*, 1999). Además este elemento junto con el N forma parte estructural de muchos compuestos, principalmente ácidos nucleicos y fosfolípidos, por tal motivo, ambos elementos deben ser absorbidos en gran cantidad por las células del callo embriogénico para poder obtener máximos rendimientos en producción de embriones somáticos, tal como ocurrió en el tratamiento de $6v \times 1'$. Por otro lado, encontramos una alta correlación entre el P y el Mg. El Mg desempeña muchas funciones en numerosas reacciones químicas que implican transferencia de fosfato desde el ATP, y en general tiene un papel decisivo en las reacciones del metabolismo energético, en tal sentido es de esperarse una correlación positiva y bastante alta entre este elemento y el P.

5. CONCLUSIONES

- El estudio de los factores químicos mediante la comparación de los medios de cultivo T4, M4, M3 y Yasuda, demostraron que las sales y vitaminas del medio Yasuda fueron las más efectivas en permitir la mayor producción y calidad de embriones somáticos limitando el problema de la producción de callo. Sin embargo, el balance de los elementos minerales debe ser mejor adaptado al cultivo de café.
- Se demostró que los reguladores de crecimiento tienen un papel secundario en la optimización del proceso de regeneración cualquiera que sea el medio de cultivo ensayado, obteniéndose solamente un aumento en la cantidad de embriones somáticos producidos. La mayor producción de embriones se produjo en el medio Yasuda en un rango de concentración de BAP entre 4 y 6 mg/l. Además, la gran mayoría de los embriones obtenidos fueron potencialmente convertibles en plantas.
- Este trabajo permitió seleccionar un nuevo medio nutritivo adaptado a la producción masiva de embriones de café en biorreactor. Este medio permitió seguir mejorando exitosamente el proceso de regeneración mediante la optimización de los parámetros físicos de cultivo en el biorreactor
- La gama de frecuencia y duración de las inmersiones ensayadas influyó significativamente sobre las diferentes respuestas biológicas obtenidas en cuanto a la producción de biomasa, así como en la cantidad y calidad de los embriones somáticos. Se demostró que en café la regeneración masiva de embriones en un sistema de inmersión temporal es estimulada por la utilización de tiempos cortos y frecuencia alta de inmersión. Los mejores resultados fueron obtenidos para la combinación de 6v x 1' diaria. En función de los resultados obtenidos, es muy probable que la absorción de nutrientes se realice entre 2 inmersiones y no durante las mismas (excepto para el Potasio).

- Se encontró una correlación significativa entre la duración de las inmersiones diarias y la calidad de los embriones, caracterizada por las frecuencias de la morfología torpedo y de embriones vitrificados, por los contenidos de agua y de potasio. Este conjunto de parámetros, además de los estudios ultraestructurales e histológicos permitieron caracterizar el estado vitrificado.
- Se demostró un alto grado de sensibilidad de los embriones somáticos de *C. arabica* a la inmersión. Estudios de microscopía electrónica indicaron daños superficiales y anomalías morfológicas para tiempos de inmersión diaria de apenas 5 minutos, siendo más fuertes a 15 minutos.
- El ritmo de cambio de medio fue otro factor físico que influyó sobre la producción y calidad de los embriones somáticos. Cambios de medio muy frecuentes o poco frecuentes no incidieron en la calidad de los embriones, pero si en la disminución de la cantidad de embriones y en la cantidad de sustancias de reserva, encontrándose que a un rango de frecuencias de cambio de medio entre 4 y 6 semanas se favoreció el aumento de biomasa y de embriones somáticos con morfología óptima (torpedo).
- Los estudios histológicos de los agregados embriogénicos y embriones somáticos, permitieron comprender los diferentes cambios morfológicos que presentó el material vegetal ante la variación de los factores químicos y físicos. La presencia de gran cantidad de agregados celulares organizados en núcleos de regeneración, con células de contenido citoplasmático denso, activa división celular y presencia de sustancias de reserva en forma de almidón, proteínas y lípidos, están siempre asociados con la morfología óptima para la regeneración de embriones somáticos.
- El estudio de la nutrición mineral a lo largo del proceso de regeneración de embriones somáticos indicó que los elementos minerales P y N, son esenciales para la formación de los embriones somáticos, mientras que el Ca^{++} , K^+ y Mg^{++} están menos implicados en el proceso de regeneración.

- En los mejores tratamientos de frecuencias y duración de las inmersiones, así como en ritmo de cambio de medio, se observó que el P, NH_4^+ , y NO_3^- habían sido absorbidos casi totalmente del medio de cultivo. Esto demuestra que el medio Yasuda posee concentraciones bajas de estos elementos que puedan ser limitantes para la producción masiva de embriones somáticos.
- Para cualquier especie vegetal, se sabe muy poco acerca de los factores que afectan la capacidad embriogénica de cultivos celulares y como se controla la transición de la proliferación de callo embriogénico hacia el desarrollo de embriones somáticos, sin embargo, los datos biológicos y fisiológicos obtenidos en el presente trabajo con café contribuyen a enriquecer el conocimiento en este sentido y hacen surgir diferentes hipótesis para seguir optimizando el sistema de regeneración masiva por embriogénesis somática.
- Este trabajo contribuyó a mejorar la producción y obtener una calidad óptima de los embriones somáticos (80%), no reportado hasta ahora. Esto evidencia la eficiencia del uso de biorreactores de inmersión temporal en la propagación masiva de café.

6. RECOMENDACIONES

- Se debe enriquecer el medio Yasuda en fuentes de P y N, aumentando las concentraciones de H_2PO_4 , KNO_3 y NH_4NO_3 para evitar la carencia precoz observada en los mejores tratamientos.
- Es necesario ensayar frecuencias de inmersión más altas (superiores a 6 veces diarias) combinadas con tiempos de inmersiones inferiores o iguales a 1 minuto. El objetivo sería cubrir con más frecuencia el material vegetal con el medio de cultivo para que ocurra una buena absorción entre las inmersiones y evitar tiempos de inmersión largos que favorezcan la aparición de problemas de vitrificación.
- No es necesario seguir estudiando el aporte hormonal durante la fase de regeneración de embriones.
- Es necesario estudiar la dinámica de los carbohidratos durante el proceso de regeneración de embriones somáticos para tener un conocimiento más completo del proceso y poder así hacer las modificaciones pertinentes en el medio de cultivo que contribuyan a mejorar u optimizar la producción de embriones somáticos de café.
- Los embriones somáticos ofrecen un gran potencial para aprender acerca de la fisiología del embrión, que por varias razones técnicas (como presencia de tejidos de reserva) ha sido muy difícil estudiar en los embriones cigóticos naturales, por lo tanto este sistema de regeneración haciendo uso de biorreactores seguirá ofreciendo una buena alternativa para conocer y explicar estos procesos biológicos desconocidos o incompletos hasta ahora en café.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alvard, D.; Côte, F.; Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture of banana micropopagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32: 55-60
- Anthony, F.; Astorga, C.; Berthaud, J. 1999. Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In: *Desafíos de la caficultura centroamericana*. Bertrand, B.; Rapidel, B. eds. IICA, San José. 495p
- Arora, D.K.; Suri, S.; Ramawat, K.G.; Merillon, J.M. 1999. Factors affecting somatic embryogenesis in long term callus cultures of "safed musli" (*Chlorophytum borivilianum*), an endangered wonder herb. *Indian Journal of Experimental Biology.* 37: 75-82
- Ashburner, G.R.; Thompson, W.K.; Maheswaran, G.; Burch, J.M. 1991. The effect of solid and liquid phase in the basal medium of coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo cultures. *Oléagineux.* 46: 149-152
- Ashihara, H.; Li, X.; Ukaji, T. 1988. Effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of purine and pyrimidine nucleotides in suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Annals of Botany.* 61: 225-232
- Baker, S.R.; Yon, R.J. 1983. Characterization of ornithine carbamoyltransferase from cultured carrot cells of low embryogenic potential. *Phytochemistry.* 22: 2171-2174
- Berthouly, M.; Dufour, M.; Alvard, D.; Carasco, C.; Alemano, L.; Teisson, C. 1995. Coffee micropopagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: *16^e Coloquio científico internacional sobre el café*, Kyoto, Japon, 9-14 abril 1995. Vevey, Suiza, ASIC. pp.514-519
- Berthouly, M.; Michaux-Ferrière, N. 1995. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 44: 169-176
- Bertrand, B.; Aguilar, G.; Anthony, F.; Etienne, H. 1997. Comparación de híbridos F1 con variedades de *Coffea arabica*. In *IICA/PROMECAFE. Memorias XVIII simposio latinoamericano de caficultura*. ICAFE, San José Costa Rica. p. 245-252
- Blanc, G. 1999. Rôles de l'apport glucidique sur les étapes précoces de l'embryogénèse somatique des cals d'*Hévea Brassiliensis* Müll. Arg. Thèse Université Montpellier II. 186p

- Brisibe, E.; Miyake, H.; Taniguchi, T.; Maeda, E. 1994. Abscisic acid and high osmoticum regulation of development and storage reserve accumulation in sugarcane somatic embryos. *Japanese Journal of Crop Science*. 63: 689-698
- Büyükalaca, S.; Mavituna, F. 1995. Large scale production of pepper somatic embryos using bioreactors. *Acta Horticulturae*. 412: 58-63
- Cabasson, C. 1993. Régénération de *Citrus deliciosas* Ten. par embryogenèse en milieu liquide. Fusions somatiques et essais de transformation génétique. Thèse Université Montpellier II.
- Charrier, A.; Berthaud, J. 1985. Botanical classification of coffee. In Clifford, M.N.; Willson, K. Eds. *Coffee: Botany, biochemistry and beverage*. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn, England. pp. 13-47
- Chée, R.P.; Leskovar, D.; Cantliffe, D. 1992. Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed for sweetpotato by varying media nutrient concentrations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117: 663-667
- Choi, Y.; Kim J.; Yoon, E. 1999. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Annals of Botany*. 83: 309-314
- Côte, F. X.; Domergue, R.; Monmarson, S.; Schwendiman, J.; Teisson, C.; Escalant, J.V. 1996. Embryogenic cell suspension from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum*. 97: 285-290
- Capuana, M.; Debergh, P.C. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 48: 23-29
- Debergh, P.; Aitken-Christie, J.; Cohen, D.; Grout B.; von Arnold, S.; Zimmerman, R.; Ziv, M. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropopagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30: 135-140
- De Jong, A.J.; Schmidt, E.D.L.; De Vries, S.C. 1993. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*. 22: 367-377
- Dufour, M.; Berthouly, M.; Alvard, D.; Carasco, C.; Teisson, C. 1995. El sistema de inmersión temporal : un nuevo método de propagación *in vitro* del café en medio líquido. In: 17e simposio sobre caficultura latino americana, San Salvador, El Salvador, 23-27 octubre, 1995.
- Emons, A.M.C. 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.* 43: 1-14

- Etienne, H.; Lartaud, M.; Michaux-Ferrière, N.; Carron, M.P.; Berthouly, M.; Teisson, C. 1997a. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea Brassiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33: 81-87
- Etienne, H.; Solano, W.; Pereira, A.; Etienne-Barry, D.; Bertrand, B.; Anthony, F.; Côte, F.; Berthouly, M. 1997b. Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación masal de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. In IICA/PROMECAFE. Memorias XVIII simposio latinoamericano de caficultura. ICAFE, San José Costa Rica. pp. 253-261.
- Etienne, H.; Lartaud, M.; Carron, M.P.; Michaux-Ferrière, N. 1997c. Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea Brassiliensis* (Müll. Arg.). *Journal of Experimental Botany.* 48: 129-137
- Etienne, H.; Barry-Etienne, D.; Vasquez, N.; Berthouly, M. 1999. Aportes de las biotecnologías al mejoramiento genético del café: El ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. En: Desafíos de la caficultura centroamericana. Bertrand, B.; Rapidel, B. eds. IICA, San José. 495p
- Etienne-Barry, D.; Bertrand, B.; Vasquez, N.; Etienne, H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports.* In Press
- Fisher, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie.* 16: 92-96
- Find, J.I.; Norgaard, J.V.; Krogstrup, P. 1998. Growth parameters, Nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway Spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *Journal of plant physiology.* 152: 510-517
- García, D.; Rojas, R.; Martínez, M.; Cuba, M. 1996. Métodos para la evaluación del crecimiento de suspensiones celulares de *Coffea canephora* variedad Robusta. *Cultivos Tropicales.* 17: 85-87
- Gavish, H.; Vard, A.; Fluhr, R. 1991. Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. *Physiol Plant.* 82: 606-616
- George, E.F. 1993. Propagation by tissue culture, Part1, The components of culture media. Exegetics Ltd., England. Pp. 273-343

- Girón, I.E. 1998. Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica. Centro Tropical de Investigación y Enseñanza. 92 p
- Grimes, H.; Hodges, T. 1990. The inorganic $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oriza sativa* L.). *J. Plant. Physiol.* 136: 362-367
- Hakan, L.; Egertsdotter, U.; Arnold, S.V. 1996. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Annals of Botany.* 77:143-152
- Hatanaka, T.; Arakawa, O.; Yasuda, T.; Uchida, N.; Yamaguchi, T. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Reports.* 10: 179-182
- He, D.G.; Yang, Y.M.; Scott, K.J. 1989. The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science.* 64: 251-258
- Hecht, U.; Mohr, H. 1990. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. *Physiologia Plantarum.* 78: 379-387
- Instituto del Café de Costa Rica. 1998. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. Instituto del Café de Costa Rica, San José. 58 p.
- Jiménez, E.; Rivero, A.; de Faria Silva, M. 1993. Embriogenesis somática en suspensiones celulares de café (*Coffea arabica* cv catimor). *Centro Agrícola., Biotecnología.* 3: 64-68
- Kessell, R.H.J.; Carr, A.H. 1972. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *Journal of Experimental Botany.* 23: 996-1007
- Le Dily, F.; Huault, C.; Gaspar, T.; Billard, J.P. 1993. Does altered nitrogen metabolism and H_2O_2 accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L.)?. *Plant Cell Culture and Organ Culture.* 35: 69-74
- Lee, K.; Soh, W. 1998. Structural aspects of somatic embryos developed from *Aralia cordata* cells cultured in medium with ABA. *Phytomorphology.* 48: 225-236
- Lefebvre, D.; Duff, S.; Fife, C.; Julien-Inalsingh, C.; Plaxton, W. 1990. Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant. Physiol.* 93: 504-511

- Litz, R.E.; Jarret, R.L. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In Roca, W.M.; Mroginski, L.A. eds. Cultivos de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia. pp. 144-172
- Loh, C.; Shu, W.; Khor, E. 1997. High frequency production of embryos from liquid flask cultures of oilseed rape. *Biotechnology and Bioengineering*. 54: 231-238
- McDonald, K.; Jackman, A.P. 1989. Bioreactors studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspensions cultures. *Plant Cell Reports*. 8: 455-458
- Menéndez, A.; Garcia, E.G. de; Segura, M. 1994. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Reports*. 13: 197-202
- Merino, C. 1998. Informe sobre el aprendizaje de biotecnologías aplicadas al café. Reporte de capacitación, Centro de Investigación de Nestlé, Tours, Francia. 28p
- Minocha, S.C.; Papa, N.S.; Khan, A.J. 1991. Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. III. Effects of methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Plant Cell Physiol*. 32: 395-402
- Montague, M.J.; Koppenbrink, J.W.; Jaworski, E.G. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol*. 62: 430-433
- Montes, S.; Martínez, M.; Rojas, R.; Santana, N.; Cuba, M. 1995. Obtención de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Coffea canephora* variedad Robusta. *Cultivos Tropicales*. 16(3): 77-81
- Montoro, P.; Etienne, H.; Carron, M.P. 1995. Relation between nitrogen uptake, amino acids contents and embryogenic intensity of rubber tree calli. *Journal of plant nutrition*. 18: 1693-1704
- Munsell Color Charts for Plant Tissues. 1963. 2ª. Ed. Munsell Color Company, INC. Maryland, U.S.A. 17 p
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497
- Neuenschwander, B.; Bauman, T. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*. 10: 608-612
- Nomura, K.; Komamine, A. 1995. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In Thorpe, T.A. ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. pp. 249-266

- Noriega, C.; Söndhal, M.R. 1993. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. In: 15^o Coloquio científico internacional sobre el café, Montpellier, Francia, 6-11 juin 1993. Vevey; Suiza, ASIC. pp.514-519
- Osuga, K.; Kamada, H.; Komamine, A. 1997. Frequency improvement of somatic embryogenesis at high embryo density by partial replacement of medium in carrot suspension culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84: 275-278
- Parrott, W.A.; Dryden, G.; Vogt, S.; Hildebrand, D.F.; Collins, G.B.; Williams, E.G. 1988. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 817-820
- Pierson, E.S.; Lammeren, A.A.M.; Schel, J.H.N.; Staritski, G. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma*. 115: 208-216
- Santana, N.; Iglesias, L.; Gonzales, M. 1989. Micropropagacion del cafeto (*Coffea arabica* Lin.) mediante un cultivo de embriones *in vitro*. *Cultivos Tropicales*. 11: 31-45
- Sengupta, C.; Raghavan, V. 1980. Somatic embryogenesis in carrot cell suspension. I. Pattern of protein and nucleic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*. 31: 247-258
- Shetty, K.; McKersie, D. 1993. Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfafa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sciences*. 88: 185-193
- Simola, L.K.; Santanen, A. 1990. Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*. 80: 27-35
- Söndahl, M.R.; Sharp, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 81: 395-408
- Söndahl, M.R.; Lauritis, J.A. 1992. Coffee. In Hammerschlag, F.A.; Litz, R.E. eds. *Biotechnology of perennial fruit crops*. C.A.B International No. 8. Wallengland. GBR. pp. 401-420
- Starinsky, G.; van Hasselt, A.M. 1980. The synchronised mass propagation of *Coffea canephora in vitro*. In: 9^o Coloquio científico internacional sobre el café, Londres, Inglaterra, 16-20 junio, 1980. Vevey; Suiza, ASIC. pp.597-602
- Sterk, P.; Booij, H.; Schellekens, G.A.; Kammen, A.V.; De Vries, S.C. 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*. 3: 907-921

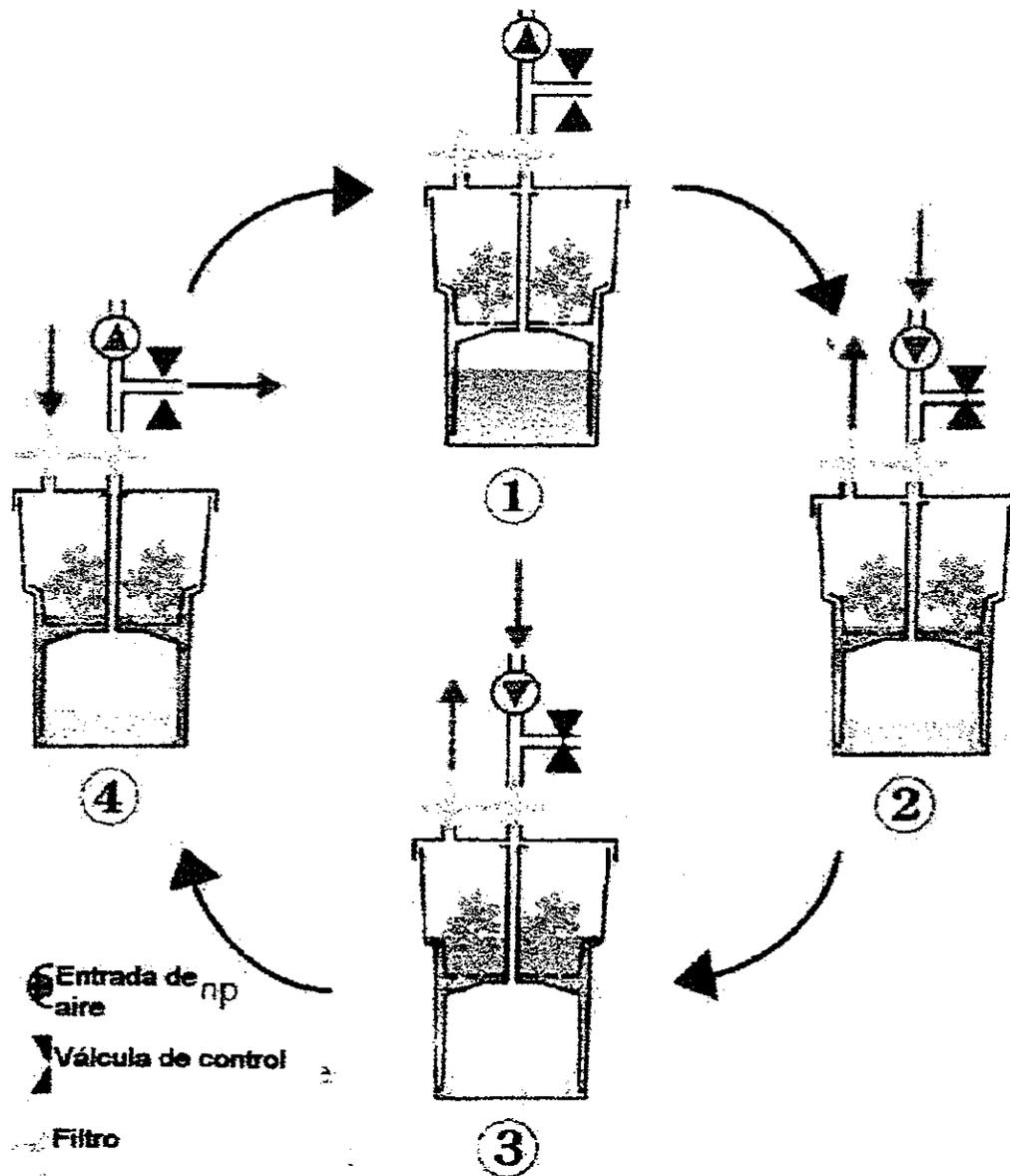
- Taber, R. P.; Zhang, C.; Hu, W. 1998. Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany*. 76: 863-871
- Takayama, S.; Akita, M. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 39: 147-156
- Teisson, C.; Alvard, D.; Berthouly, M.; Côte, F.X.; Escalant, J.V.; Etienne, H. 1995. Cultivo *in vitro* por inmersión temporaria: un nuevo recipiente. *Plantation Recherche Développement*. 2: 29-34
- Thomas, A.S. 1942. The wild Arabica coffee on the Boma Plateau of Anglo-Egyptian Sudan. *Empire Journal of Experimental Agriculture*. 10: 207-212
- Van Boxel, J.; Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 44: 7-17
- Van der Vossen, H.A.M. 1985. Coffee selection and breeding. In Clifford, M.N.; Willson, K. Eds. *Coffee: Botany, biochemistry and beverage*. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn, England. pp. 48-96
- Willson, K.C. 1985. Cultural methods. In Clifford, M.N.; Willson, K. Eds. *Coffee: Botany, biochemistry and beverage*. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn, England. pp. 157-207
- Wetherell, D.; Dougall, D. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant*. 37, 97-103
- Wróblewski, T.; Filipecki, M.; Malepszy, S. 1995. Factors influencing cucumbers (*Cucumis sativus* L.) somatic embryogenesis. I. The crucial role of pH and nitrogen in suspension culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 64: 223-231
- Yasuda, T.; Fujii, Y.; Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol*. 26:595-597
- Zamarripa, A. 1994. Optimización de la embriogenesis somática de café arabusta (*Coffea canephora* P. x *Coffea arabica* L.) a partir de una suspensión celular. *Agric. Téc. Méx.* 20: 27-41
- Zamarripa, A.; Ducos, J.P.; Bollon, H.; Dufour, M.; Petiard, V. 1991. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide : Effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao Thé*. 35: 233-243
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant Cell*. 5: 1411-1423

8. APENDICE

Apéndice 1. Composición química de los medios de cultivo T3 y T5 (Berthouly, 1995, café)

Compuestos	T3 (mg/l)	T5 (mg/l)
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	825	825
KNO ₃	950	950
KH ₂ PO ₄	85	85
CaCl ₂ . 2H ₂ O	220	220
MgSO ₄ . 7H ₂ O	185	185
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	3.1	3.1
MnSO ₄ . H ₂ O	8.45	8.45
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	5.3	5.3
KI	0.415	0.415
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0125	0.0125
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.125	0.125
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.0125	0.0125
Fe-EDTA		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	13.9	13.9
Na ₂ EDTA	18.65	18.65
Vitaminas		
Mio-inositol	200	100
Acido nicotínico	1	1
Piridoxina. HCl	1	1
Tiamina. HCl	10	1
Glicina	2	2
Fuentes de N orgánico		
Extracto de malta	400	
Hidrolizado de caseína	400	
Adenina	40	
Biotina		0.01
Pantotenato de calcio		1
Glutamina		
Prolina		
Reguladores de crecimiento		
AIA		
BAP		0.3
ANA		
Zeatina		
2,4-D	1	
Kinetina	1	
Fuentes de Carbono		
Sacarosa	15,000	40,000
Phytigel/Gelrite		2,000
PH	5.6	5.3

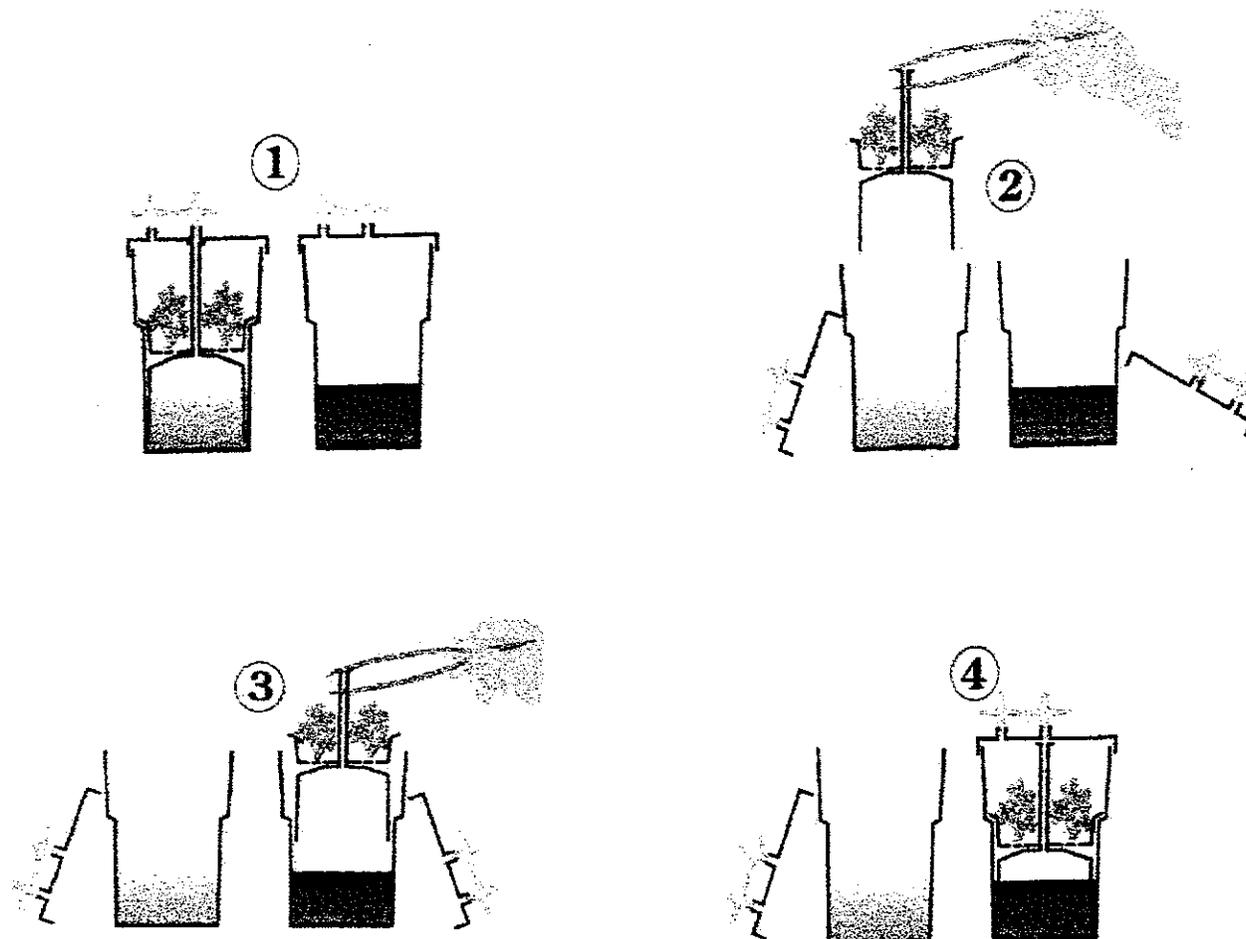
Apéndice 2. Pasos en el sistema con inmersión temporal con recipientes RITAS utilizados en la propagación *in vitro* de café.



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

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

Apéndice 3. Pasos a seguir para el cambio de medio en el sistema de inmersión temporal con recipiente RITA® utilizado en la propagación in vitro de café.



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

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