

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA E INDIRECTA EN *Coffea arabica* var. Colombia

DIRECT AND INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Coffea arabica* var. Colombia

Avila-Victor, C.M.¹; Martínez-Infante, Á.¹; Ordaz-Chaparro, V.M.¹; Arjona-Suárez, E.J.; Iracheta-Donjuan, L.²; Gómez-Merino, F.C.³; Robledo-Paz, A.^{1*}

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. ²Campo Experimental Rosario Izapa. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Tapachula-Cacahoatán km 18, Tuxtla Chico, Chiapas. C. P. 30870. ³Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km 348. Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz. C. P. 94946.

*Autor de correspondencia. arobledo@colpos.mx

RESUMEN

México es uno de los diez principales productores de café en el mundo; sin embargo, el estado actual de sus plantaciones enfrenta problemas de índole genético y fitosanitario, lo cual requiere que los cafetales sean renovados o repoblados con plantas de calidad. El cultivo de tejidos mediante la micropropagación es una técnica que puede contribuir a cubrir dicho requerimiento. El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones de cultivo para inducir la embriogénesis somática en *Coffea arabica* var. Colombia a partir de tejidos de hoja. Segmentos de hoja fueron cultivados durante 0, 3, 5, 8 o 10 días en medios de cultivo que contenían las sales de Yasuda o Murashige y Skoog (MS), 1.12 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), 0.5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.6 mM de sorbitol. El medio que contenía las sales de Yasuda, 1.12 mg L⁻¹ de BAP y 0.6 mM de sorbitol, promovió la formación de embriones sin una fase de callo (embriogénesis directa). El medio de cultivo compuesto por las sales MS, 0.6 mM de sorbitol, 1.12 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-D indujo la embriogénesis somática indirecta en los explantes de hoja. El porcentaje de explantes que formaron embriones fue superior en la embriogénesis directa (77.8) respecto a la indirecta (55); el número de embriones por explante formados mediante embriogénesis indirecta (153.2) fue significativamente mayor que aquellos generados por embriogénesis directa (10.3). Las condiciones de cultivo establecidas en este trabajo permitieron la formación de embriones somáticos en la variedad Colombia.

Palabras clave: *Coffea arabica*, café, cultivo de tejidos, embriogénesis somática, sorbitol.

ABSTRACT

Mexico is one of the top ten coffee producers in the world; however, the current state of its plantations faces genetic and phytosanitary problems that require for coffee plantations to be renewed or repopulated with high quality plants. Tissue culture by micropropagation

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 4, abril. 2018. pp: 30-35.

Recibido: diciembre, 2017. **Aceptado:** abril, 2018.



could help meet this requirement. The aim of this study was to establish culture conditions to induce somatic embryogenesis in *Coffea arabica* Colombia variety from leaf tissues. Leaf segments were cultured for 0, 3, 5, 8 or 10 days on media containing Yasuda or Murashige and Skoog salts (MS), 1.12 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and 0.6 mM sorbitol. The culture medium containing the Yasuda salts, 1.12 mg L⁻¹ BAP and 0.6 mM sorbitol promoted the formation of embryos without a callus phase (direct embryogenesis). The medium composed of MS salts, 0.6 mM sorbitol, 1.12 mg L⁻¹ BAP, and 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D acid induced indirect somatic embryogenesis in explants. The percentage of explants that formed embryos was higher in direct embryogenesis (77.8) compared to indirect embryogenesis (55); the number of embryos per explant formed by indirect embryogenesis (153.2) was significantly higher than those generated by direct embryogenesis (10.3). The culture conditions established in this study allowed the formation of somatic embryos in Colombia variety.

Key words: *Coffea arabica*, coffee, tissue culture, somatic embryogenesis, sorbitol.

ser una técnica útil en la propagación de genotipos sobresalientes de café. Una de las vías morfogénéticas que permite la regeneración de plantas *in vitro* es la embriogénesis somática, que consiste en la formación de embriones, a partir de células somáticas, los cuales son morfológica y fisiológicamente similares a los cigóticos. La formación de los embriones somáticos puede involucrar una fase de callo previa (embriogénesis indirecta) o formarse sin requerir que se forme callo (embriogénesis directa) (Yang y Zhang, 2010).

Aun cuando existen protocolos para la propagación de distintas variedades e híbridos de café mediante embriogénesis somática (Etienne, 2006; Ahmed *et al.*, 2013), hasta donde se tiene conocimiento, para la variedad Colombia no existen un protocolo de regeneración por embriogénesis somática, y dado que la respuesta *in vitro* está en función del genotipo, es necesario desarrollar protocolos específicos para cada especie o variedad (Silva *et al.*, 2015).

El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para inducir la embriogénesis somática en *C. arabica* var. Colombia a partir de tejidos de hoja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfestación del material vegetal

El primer par de hojas jóvenes obtenidas de plantas de seis meses de edad de *Coffea arabica* var. Colombia, se colocaron en una solución fungicida al 1 % (Promyl®) durante 15 min y luego en una solución de hipoclorito de sodio con 1.8% de cloro activo (Cloralex®) por 20 min; para finalmente, enjuagarlas con agua destilada esterilizada.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de café arábica (*Coffea arabica* L.) en México representa una actividad estratégica que involucra más de tres millones de empleos, de los cuales el 70% está vinculado a productores y familias de comunidades indígenas del país (AMECAFE, 2012). Los estados de Chiapas y Veracruz aportan 72 % de la producción nacional y constituyen del 20 al 35 % de superficie sembrada de este producto (SIAP, 2013).

Factores como la falta de prácticas agrícolas adecuadas y la presencia de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) afectan de manera significativa este cultivo en México (SENASICA, 2013). Asimismo, las plantaciones presentan problemas de índole genético y fitosanitario, por lo que es necesario renovarlas o repoblarlas con plantas de buena calidad. Los métodos convencionales de propagación, como esquejes o semillas, pueden enfrentarse al alto costo de la mano de obra requerida, baja tasa de enraizamiento o rápida pérdida de la viabilidad (Etienne *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2015). Por otro lado, la incidencia de la roya en el cultivo del café impacta no sólo en la cantidad y la calidad de la producción, sino también en el costo que representa implementar las medidas de control en los cultivos susceptibles (CABI, 2013).

La variedad Colombia, cuyos progenitores son el "Híbrido de Timor" y la variedad "Caturra", presenta cualidades como alto rendimiento, buena adaptación y calidad de taza, además de tolerancia a la roya (Santana *et al.*, 2004; Santos-Briones y Hernández-Sotomayor, 2006).

Herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos, ha permitido la propagación masiva de distintas especies de importancia económica (Venkataiah *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016; Georget *et al.*, 2017), por lo que puede

Embriogénesis somática directa

Segmentos de 1 cm² provenientes de hojas (explantes) previamente desinfectadas se cultivaron durante 0, 3, 5, 8 y 10 días en el medio nutritivo que consistió de las sales de Yasuda *et al.* (1985), 1.12 mg L⁻¹ de 6-bencilamino-purina (BAP), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 5.2 g L⁻¹ de phytigel, 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 0.6 mM de sorbitol (medio 1); después, los explantes se transfirieron a un medio con la misma composición, pero sin sorbitol. El pH del medio se ajustó a 6.3 y se esterilizó durante 15 min en una autoclave a 121 °C.

Embriogénesis somática indirecta

Los explantes se cultivaron durante 0 y 10 días en un medio que contenía las sales basales de Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionadas con 0.5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1.12 mg L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 5.2 g L⁻¹ de phytigel, 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 0.6 mM de sorbitol (medio 2); transcurrido este tiempo los explantes se subcultivaron en el mismo medio, pero carente de sorbitol. El medio se ajustó a un pH de 5.7 y se esterilizó durante 15 min en una autoclave a 121 °C.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se incubaron en una cámara de ambiente controlado a 25±2 °C en oscuridad total.

Variables de respuesta y diseño experimental

Después de seis meses de cultivo se cuantificó el porcentaje de explantes que produjeron embriones y el número de embriones que se formaron en cada explante o gramo de callo. El diseño experimental para la embriogénesis di-

recta consistió en uno completamente al azar con cinco tratamientos y 10 repeticiones cada uno, se consideró una caja Petri con seis explantes como una repetición. Para la embriogénesis indirecta el diseño experimental fue completamente al azar con dos tratamientos y 10 repeticiones cada uno, una caja Petri con seis explantes se consideró como una repetición. Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos expresados en porcentaje se transformaron con la función arcoseno.

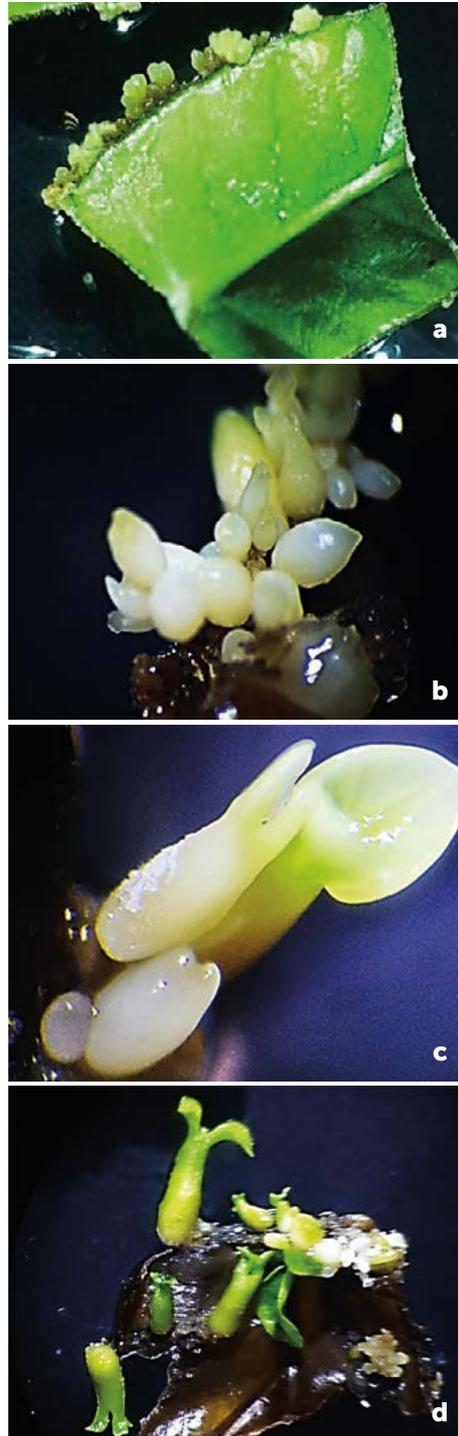


Figura 1. Embriogénesis somática directa de *Coffea arabica* var. Colombia. a) Masas proembriogénicas. b) Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. c) Embriones somáticos en etapa cotiledonar. d) Embriones somáticos germinados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Embriogénesis somática directa

Se formaron masas proembriogénicas en los márgenes de los explantes de todos los tratamientos después de cuatro semanas de cultivo (Figura 1a). Las masas proembriogénicas sufrieron una serie de divisiones organizadas que dieron lugar a la diferenciación de embriones somáticos (Figura 1b-d), tal como lo observaron Gatica *et al.* (2007) en *Coffea arabica* variedad Caturra y Catuaí.

Después de seis meses de cultivo el porcentaje más alto de explantes que formaron callo embriogénico (77.8) y el número máximo de embriones por explante (10.3) se obtuvo en el medio 1 sin sorbitol; los valores más bajos para ambas variables se registraron en los explantes que permanecieron en sorbitol durante 10 días (Cuadro 1).

Al respecto, Cueva-Agila *et al.* (2015) indican que la exposición de los explantes de *Cattleya maxima* Lindl a 0.4 M de sorbitol por más de cuatro horas en medio líquido, inhibió la formación de callos y causó la muerte de los explantes

Cuadro 1. Embrionénesis somática directa en *Coffea arabica* var. Colombia después de seis meses de cultivo.

Tiempo en exposición al sorbitol (días)	Explantos que formaron embriones (%)	Número de embriones por explante
0	77.8 a	10.3 a
3	33.3 b	3.6 b
5	44.4 b	3.8 b
8	33.3 b	3.5 b
10	0.0 c	0.0 c

Valores con la misma letra dentro de las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey; $P \leq 0.05$).

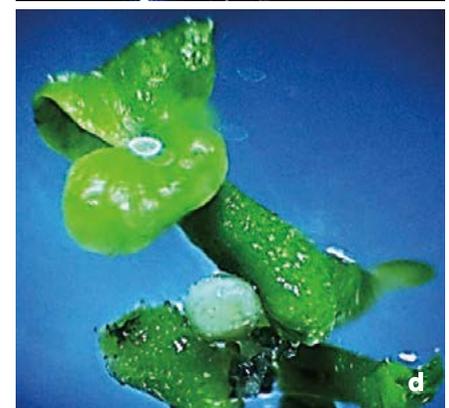


Figura 2. Embrionénesis somática indirecta en explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Colombia. A) Callo compacto. B) Callo friable. C) Embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo. D) Embrión somático germinado.

(protocormos). Por su parte, Ghane y Nikam (2014) observaron bajo número de embriones somáticos en *Guizotia abyssinica* Cass cuando agregaron 0.01, 0.04 y 0.06 M de sorbitol al medio de cultivo.

Embrionénesis somática indirecta

No se observaron diferencias significativas para el porcentaje de explantes que formaron callo embriogénico ni para el número de embriones que se formó en un gramo de callo cuando se cultivaron en el medio 2 con y sin sorbitol (Cuadro 2). Es posible que la concentración o el tiempo de exposición al sorbitol utilizados generaran un nivel de estrés por arriba del que los explantes tenían la capacidad de soportar, afectando negativamente la embriogénesis somática indirecta.

El estrés osmótico afecta el contenido de agua disminuyendo el potencial hídrico extracelular y la turgencia, lo cual puede repercutir en la supervivencia de las células y en su capacidad morfogénica (Lee y Huang, 2013; Odjakova y Conger, 1999).

Después de ocho semanas de cultivo fue posible observar la formación de callo friable (disgregable) y compacto (no disgregable) en los márgenes de los explantes, a partir de los cuales se formaron masas de proembriogénicas que dieron lugar a la diferenciación de los embriones somáticos (Figura 2 a y b).

Los callos generados por los explantes expuestos durante 10 días al sorbitol, así como aquellos que no lo fueron, formaron embriones somáticos después de seis meses de cultivo (Figura 2 c), mismos que se convirtieron en plántulas

Cuadro 2. Embrionénesis somática indirecta en *Coffea arabica* var. Colombia después de seis meses de cultivo.

Tiempo en exposición al medio 2 (días)	Explantos con embriones (%)	Número de embriones por gramo de callo
0	55.0 a	153.2 a
10	35.0 a	114.4 a

Valores con la misma letra dentro de las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey; $P \leq 0.05$).

cuatro semanas más tarde (Figura 2 d). Los resultados obtenidos indican que la composición medio de cultivo (sales nutritivas, reguladores de crecimiento, agente gelificante, pH) puede determinar la ruta morfogénica (directa o indirecta) que las células de un explante sigue para formar embriones somáticos. Pasternak *et al.*, (2002) y Ötvös *et al.* (2005) postulan que las auxinas como el 2,4-D y factores que causan estrés abiótico, son factores clave en la adaptación celular, reprogramación de la expresión genética, el metabolismo y la fisiología celular, que se traduce en totipotencia celular y adquisición de la capacidad para formar embriones somáticos. Asimismo, se ha propuesto, que la desdiferenciación celular y la embriogénesis somática son procesos asociados al estrés (Dutis *et al.*, 1995). De igual manera, Davletova (2001) encontró que varios genes relacionados con el estrés se inducen durante los primeros estados de la embriogénesis somática de alfalfa (*Medicago sativa*).

Considerando que el callo generado durante seis meses a partir de un explante (un gramo aproximadamente) produjo hasta 153.2 embriones (embriogénesis indirecta), mientras que, en el mismo periodo, los explantes que siguieron la vía directa de la embriogénesis sólo formaron un máximo de 10.3 embriones, se infiere que la embriogénesis somática indirecta es una ruta morfogénica más eficiente que la embriogénesis directa, bajo las condiciones de cultivo probadas en esta investigación. Mediante embriogénesis somática directa, es posible producir plantas fieles al tipo en un tiempo relativamente corto, pero su tasa de multiplicación generalmente es baja; en tanto que la embriogénesis

indirecta, podría causar algunas variaciones genéticas, no obstante, hace factible la propagación masiva (Jayanthi *et al.*, 2011; Bobadilla *et al.*, 2013).

La capacidad de formación de embriones mediante embriogénesis indirecta y las características de los callos embriogénicos obtenidos en la presente investigación, hacen factible su uso en la producción de plantas de café a gran escala por medio de biorreactores.

CONCLUSIONES

La formación de embriones somáticos por la vía directa o indirecta, estuvo en función de las sales nutritivas, reguladores de crecimiento, agente gelificante y pH utilizados en el medio de inducción. El sorbitol mostró un efecto negativo tanto en la embriogénesis directa como en la indirecta. Las condiciones de cultivo probadas en la presente investigación permitieron establecer un protocolo de propagación *in vitro* de la variedad Colombia mediante embriogénesis somática.

LITERATURA CITADA

- Ahmed W., Tileye F., Tesfaye D. 2013. Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. J. Hort. Sci. Biotech. 88: 469-475.
- Alves-dos Santos M.R., Augusto-de Souza C., Felix-da Rocha J., Ventura-de Araujo L., Curitiba-Espindula M. 2015. Comparison of economic efficiency between *in vitro* and field methods for vegetative propagation of *Coffea canephora*. Austr. J. Basic Appl. Sci. 9: 1-7.
- AMECAFE. 2012. Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café. Plan Integral de Promoción del Café de México.
- Bobadilla L.R., Cenci A., Georget F., Bertrand B., Camayo G., Dechamp E., Simpson J., Herrera J.C., Santoni S., Lashermes P., Etienne H. 2013. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. PLOS One 8: e56372.
- CABI. 2013. Centre for Agriculture and Biosciences International. Crop Protection Compendium. CAB International, Walling-Ford, UK.
- Cueva-Agila A.Y., Guachizaca I., Cella R. 2015. Combination of 2,4-D and stress improves indirect somatic embryogenesis in *Cattleya maxima* Lindl. Plant Biosyst. 149: 235-241.
- Davletova S., Mészáros T., Miskolczi P., Oberschall A., Torok K., Magyar Z., Dudits D., Deák M. 2001. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. J. Exp. Bot. 52: 215-221.
- Dudits D., Gyorgyey J., Bogre L., Bako L. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. *In vitro* embryogenesis in plants. In: Thorpe T.A. (ed) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. pp. 267-308.
- Etienne H. 2006. Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.) In: Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. S.M. Jain and P.K. Gupta (eds.). Springer. Dordrecht, Netherlands. pp. 167-179.
- Etienne H., Anthony F., Dussert S., Fernandez D., Lashermes P., Bertrand B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant 38: 129-138.
- Gatica A.M., Arrieta E.G., Espinoza A.M. 2007. Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. Agron. Costar. 3: 85-94.
- Georget F., Courtel P., Malo G.E., Hidalgo M., Alpizar E., Breitler J.C., Bertrand B., Etienne H. 2017. Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. Sci. Hort. 216: 177-185.
- Ghane S.G., Nikam T.D. 2014. Influence of osmotic stress, physicochemical factors and nitrogen supplements on embryogenesis and plantlet formation in *Guizotia abyssinica* Cass. Ind. J. Plant Physiol. 19: 263-272.

- Jayanthi M., Mohan N.M., Mandal P.K. 2011. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration in oil palm. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 249-251.
- Lee S.T., Huang W.L. 2013. Osmotic stress stimulates shoot organogenesis in callus of rice (*Oryza sativa* L.) via auxin signaling and carbohydrate metabolism regulation. *Plant Growth Regul.* 73: 193-204.
- McCook S., Vandermeer J. 2015. The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. *Phytopathol.* 105: 1164-73.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Odjakova M.K., Conger B.V. 1999. The influence of osmotic pretreatment and inoculum age on the initiation and regenerability of switchgrass suspension cultures. *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant* 35: 442-444.
- Ötvös K., Pasternak T.P., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Szucs A., Bottka S., Dudits D., Fehér A. 2005. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J.* 43: 849-860.
- Pasternak T.P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Vanonckelen H.A., Dudits D., Fehér A. 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129: 1807-1819.
- Santana N., González M.E., Valcárcel M., Canto-Flick A., Hernández M.M., Fuentes-Cerda C.F.J., Barahona F., Mijangos-Cortés J., Loyola-Vargas V.M. 2004. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant* 40: 95-101.
- Santos-Briones C.D., Hernández-Sotomayor S.M. 2006. Coffee biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 217-227.
- SENASICA. 2013. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Manual operativo de la campaña preventiva contra la roya del café. Ciudad de México.
- SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de Producción de Cultivos Cíclicos y Perennes 2011. Ciudad de México.
- Silva A.T., Barduche D., do Livramento K.G., Paiva L.V. 2015. A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cell. Develop. Biol.-Plant* 51: 93-101.
- Venkataiah P., Bhanuprakash P., Kalyan S.S., Subhash K. 2016. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *J. Gen. Engin. Biotech.* 14: 55-60.
- Verma S.K., Das A.K., Cingoz G.S., Uslu E., Gurel E. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. *Biotech. Rep.* 10: 66-74.
- Yang X., Zhang X. 2010. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29: 36-57.
- Yasuda T., Fujii Y., Yamaguchi T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597.

