

Regeneración y desarrollo de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* L. en biorreactores de inmersión temporal¹

Ramón Antonio Ramos-Navas^{**}, Felipe Martínez-Suárez^{**}, Tefera Wondyifraw^{*}, María Ester González-Vega^{****}, Gebre Endale^{***}, Teresa Alemayehu^{*}, Yojana Rodríguez-Benito^{**} y Abebe Zerihun^{*}

Resumen

La presente investigación fue diseñada con el objetivo de evaluar los efectos de diferentes ciclos de inmersión, características de los embriones y composición del medio líquido sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. en biorreactores de inmersión temporal. Se condujo en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas en JARC (Jimma Agricultural Research Centre, Etiopía) en el período de septiembre de 2006 y enero de 2008. Hojas saludables y con crecimiento activo a partir de plantas de café crecida en invernadero se utilizaron como material inicial. Híbridos F1 de *Coffea arabica* L. obtenidos del cruzamiento entre accesiones silvestres originadas en Etiopía, se usaron durante el experimento. Biorreactores de inmersión temporal (RITA) se usaron para la fase de regeneración y desarrollo a partir de suspensiones embriogénicas. Diferentes medios, combinaciones hormonales, tiempos y ciclos de inmersión se probaron en la regeneración y desarrollo de los embriones. De todos los tratamientos evaluados, el tratamiento 3 (1 min de inmersión cada 12 h y 300 mg de agregados embriogénicos) mostró la mayor formación de masa embriogénica para los tres híbridos de café evaluados; de igual forma fue este el tratamiento que mayor número de embriones en estado torpedos obtuvo. Se logró el 100 % de la regeneración a planta de los embriones con cotiledones largos, un 57 % para los medianos y un 31 % para los pequeños. Se lograron regenerar los embriones de los tres híbridos estudiados, convertir a planta y aclimatar por este sistema.

Palabras clave: *inmersión temporal*, *Coffea arabica* L., híbridos de café, regeneración, embriones somáticos.

Abstract

The present investigation was designed with the objective of evaluating the effects of different immersion cycles, characteristic of the embryos and composition of the liquid means on the regeneration of somatic embryos of *Coffea arabica* L. in bio-reactors of temporary immersion. It was carried out in the laboratory of biotechnology of the plants in JARC (Jimma Agricultural Research Centers, Ethiopia) between September of the 2006 and January of the 2008. Healthy leaves and with active growth starting from plants of coffee grown in hothouse were used as initial material. Hybrid F1 of *Coffea arabica* L. obtained of the crossing among wild agreements originated in Ethiopia, they were used during the experiment. Bio-reactors of temporary immersion (RITA) were used for the regeneration phase and development starting from embryonic suspensions. Different means, hormonal combinations, times and immersion cycles were proven in the regeneration and development of the embryos. Of all the evaluated treatments, the treatment 3 (1 minute of immersion every 12 hours and 300 mg of having added embryonic) it showed the biggest formation of embryonic mass for the three hybrid of evaluated coffee, of equal it forms it was this the treatment that bigger number of embryos in state 'torpedo' were obtained. 100 % was achieved from the regeneration to plant of the embryos with long cotyledons, 57 % for the medium ones and a 31 for the small ones. They were possible to regenerate the studied hybrid embryos of the three, to convert to plant and to acclimatize for this system.

Key words: *temporary immersion*, *Coffea arabica* L., hybrid of coffee, regeneration, somatic embryos.

¹ Recibido; 20/6/2011

Aprobado: 2/11/2011

* Jimma Agricultural Research Centre (JARC)

** Estación Experimental Agro-Forestal UCTB Tercer Frente, Santiago de Cuba. genetica1@tercerfrente.inaf.co.cu

*** Ethiopian Agricultural Research Organization (EARO)

**** Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)

Introducción

Cuando se compara con la propagación convencional, la micropropagación ofrece numerosas ventajas para la multiplicación clonal de plantas. Sin embargo, el cultivo *in vitro* en medio líquido frecuentemente se ve asociado a problemas tecnológicos, tales como asfixia, hiperhidratación, fuerzas de cortes y las necesidades de equipos complejos y costosos (Etienne y Berthouly, 2002).

Para evitar tales problemas los sistemas de inmersión temporal han sido propuestos en la micropropagación.

Aunque el uso de los biorreactores se ha dirigido principalmente al cultivo de las suspensiones celulares y la producción de metabolitos secundarios, investigaciones dirigidas a mejorar los biorreactores para la embriogénesis somática han sido reportados para diferentes especies de plantas (Ziv *et al.*, 1998).

El contacto temporal entre el material vegetal y el medio líquido generalmente favorece el crecimiento y la proliferación, comparado con el contacto permanente sobre los medios semisólidos. Exitosas demostraciones en inmersión temporal con varias especies de plantas cultivables importantes, incluyendo *Musa acuminata*, *Pinus radiata*, *Citrus*, *Hevea brasiliensis*, *Coffea*, *Saccharum* spp. y *Ananas comosus*, mostraron efectos positivos en todas las etapas de proliferación de brotes (Aitken-Christie y Jones, 1987; Alvard *et al.*, 1993; Lorenzo *et al.*, 1998) y en la embriogénesis somática (Cabasson *et al.*, 1997; Etienne *et al.*, 1997; Barry-Etienne *et al.*, 2002).

Aunque el primer sistema de cultivo en inmersión temporal fue desarrollado para la micropropagación por Harris y Mason (1983), ellos han sido utilizados a gran escala en los últimos diez años, en la medida en que gradualmente se han simplificado (Etienne y Berthouly, 2002). Hasta el momento, la mayoría de los trabajos se han enfocado a la comparación de la eficiencia de este nuevo sistema con los tradicionales, tales como cultivo en medio semisólido o en medio líquido.

Pocos resultados están disponibles sobre el efecto de los diferentes parámetros de cultivos, tales como densidad de cultivo, volumen del medio usado, volumen del recipiente de cultivo, composición del medio de cultivo o la frecuencia y el tiempo de inmersión.

Barry-Etienne *et al.* (2002) demostraron con embriones somáticos de *Coffea arabica* L. que una densidad de cultivo superiores a 1600 embriones por 1 L biorreactor afecta positivamente la morfología del embrión en de-

sarrollo, causando mayor elongación de los axis. Dichos embriones mostraron mejor porcentaje de conversión a plantas luego de la siembra directa en el vivero. Sin embargo, durante los primeros meses en vivero las plantas derivadas de los embriones producidos en inmersión temporal exhibieron un bajo vigor y crecimiento lento cuando se compararon con las semillas.

Las ventajas de los sistemas de inmersión temporal están relacionadas con la ventilación de aire en el biorreactor y la alta e intermitente superficie de contacto entre los tejidos y el medio líquido (Teisson y Alvard, 1995). Los ciclos de inmersión –frecuencia y duración– probablemente influyen en el éxito del proceso de micropropagación a través de la asimilación de agua y nutrientes, y de esta forma regulan la hiperhidratación del material cultivado.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la regeneración y el desarrollo de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* L. en biorreactores de inmersión temporal.

Materiales y métodos

La investigación fue conducida en el Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, en el Jimma Agricultural Research Centre (JARC), Etiopía, entre septiembre de 2006 y enero de 2008.

Híbridos F1 de *Coffea arabica* L., obtenidos del cruzamiento entre accesiones silvestres originadas en Etiopía, fueron usados durante el experimento. Estos híbridos fueron producidos en el JARC.

El proceso de embriogénesis somática conllevó primeramente la esterilización de hojas jóvenes, saludables, vigorosas y con crecimiento activo usadas como fuente de explantes para la iniciación del cultivo. Estos se cultivaron por 1,5 meses para la formación de callos en medio MS suplementado con 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) y 3 mg/L de bencil amino purina (BAP), transferidos por seis meses a oscuridad y 27 ± 2 °C, para la formación de callos embriogénicos al medio MS, complementado con 0,1 m/L de ácido naftaleno acético (ANA) y 0,5 mg/L de furfural amino purina (kinetina o KIN). Las porciones embriogénicas se transfirieron posteriormente a un medio MS líquido de proliferación, formado por 1,5 mg/L de 2,4-D y 1,5 mg/L de kinetina hasta lograr la suspensión celular de los agregados embriogénicos.

Biorreactores de inmersión temporal (Teisson y Alvard, 1995) se usaron para la fase de regeneración a partir de suspensiones embriogénicas. Estos se cargaron con 200 mL de medio de regeneración conteniendo ANA (0,1 mg/L) y kinetina (0,5 mg/L) y se inocularon con 100 mg, 200 mg y 300 mg de agregado embriogénico. Tres ciclos de inmersión (1 min, 3 min y 9 min cada 12 h) fueron comparados, a los 4,5 meses de cultivo,

por su eficiencia mediante la medición de parámetros biológicos tales como cantidad y calidad morfológica (torpedo).

Al finalizar la fase de regeneración se evaluaron tres hormonas en el desarrollo y germinación de los embriones, aproximadamente 1000 por biorreactor cargados con medio MS líquido, suplementado con hormonas vegetales (Tabla 1).

Tabla 1. Hormonas evaluadas para el desarrollo y conversión a planta de los embriones somáticos

Tratamiento	Auxina (mg/L)		Citoquinina (mg/L)		Ácido giberélico (mg/L)
	AIB	ANA	Kinetina	BA	GA ₃
1	0,1		0,5		
2	0,2		0,5		
3	0,5		0,5		
4		0,2		0,5	
5		0,1		0,5	
6		0,1		0,5	0,05
7		0,1		0,5	0,5

A los 45 días de cultivo se evaluaron los parámetros siguientes: longitud de 50 embriones, presencia de raíz, presencia de hojas y porcentaje de conversión a planta.

Las condiciones ambientales para la transferencia directa de los embriones somáticos al suelo (endurecimiento) fueron fijadas similares a las definidas para el cultivo de los embriones *in vitro*. Se extrajeron de los biorreactores, se lavaron con abundante agua destilada por 30 min y se distribuyeron homogéneamente, garantizando el contacto con el sustrato (una parte de suelo y cuatro partes de arena) previamente esterilizado con tratamiento químico (formaldehído 30 %). Se emplearon bandejas plásticas, y luego de ser endurecidos por tres semanas, los embriones germinados se sembraron verticalmente para la aclimatación en la que se empleó un sustrato formado por dos partes de suelo, una parte de arena, una parte de pulpa de café completamente descompuesta, esterilizado mediante tratamiento químico (formaldehído 30 %). Los potes plásticos utilizados para la aclimatación fueron dispuestos bajo techo de nailon transparente e irrigados con agua tres veces al día.

Resultados y discusión

Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) fueron observadas entre los tratamientos para las eva-

luaciones de la masa de agregado embriogénico en el biorreactor en todo el período evaluado (Tabla 2). Se evidenció una tendencia de aumentar el peso fresco de la biomasa en el biorreactor en la medida en que se aumenta la masa embriogénica inicial. De los tratamientos evaluados, el 3 y el 6, consistentes en 1 y 3 min de inmersión cada 12 h con 300 mg de masa embriogénica, respectivamente, mostraron la mayor formación de masa embriogénica para los tres híbridos de café, siendo el tratamiento 3 el que mayor número de embriones totales y torpedos presentó.

La producción de embriones totales y la masa embriogénica dentro del reactor disminuyó en la medida en que se incrementó el tiempo de inmersión.

El peso fresco de la biomasa, el número y la morfología de los embriones producidos en el biorreactor difirieron significativamente para los tiempos de inmersión evaluados (Tabla 2). Un incremento en la duración de la inmersión de 1 a 9 min (para 300 g de masa embriogénica) produjo una reducción significativa en la biomasa de 13,2 g a 10,4 g y en el número de embriones por biorreactor de 3682 a 432.

Albarrán *et al.* (2005) encontraron resultados similares optimizando la duración y la frecuencia de inmersión durante la regeneración de embriones somáticos

de *Coffea arabica* L. Ellos demostraron que al incrementar la frecuencia de inmersión con poca duración también se incrementa la biomasa, el número y la calidad de los embriones somáticos. Sin embargo, un incremento en la duración de la inmersión causó una reducción significativa de la biomasa y el número de embriones.

En esta investigación el aumento de duración de la inmersión tuvo efecto adverso sobre la calidad de los embriones, manifestándose mediante el incremento de la frecuencia de embriones hidratados, aunque normalmente la heterogeneidad morfológica es frecuentemente observada en los embriones somáticos durante las diferentes etapas de su formación y desarrollo (Fig. 1).

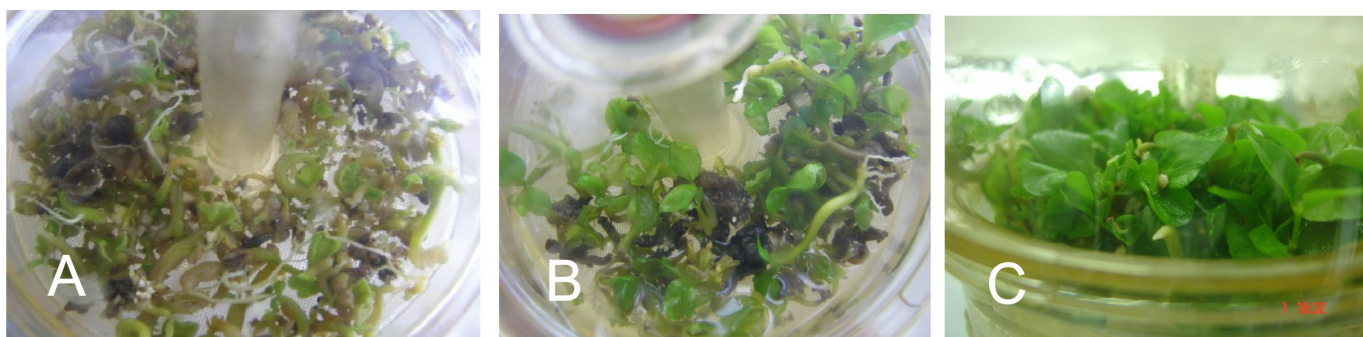


Fig. 1. Embriones de híbridos F1 de *Coffea arabica* L. (dos, cuatro y seis semanas, respectivamente) en biorreactores de inmersión temporal (RITA). A) y B) Embriones germinados con cotiledones de diferentes tallas (pequeños, medios y largos). C) Embriones somáticos totalmente germinados y listos para endurecer.

Problemas con la calidad de los embriones somáticos (anormalidades morfológicas, hidratación, desarrollo asincrónico, heterogeneidad en la talla) y la dificultad en extender su desarrollo, luego del estado torpedo en medio líquido, ha sido reportado por Etienne *et al.* (2002).

Aunque el proceso de embriogénesis somática usando biorreactores de inmersión temporal favorece la producción de masa y la sincronización en la germinación de embriones somáticos, no se logró una homogeneidad suficiente para ir directamente a la aclimatización sin antes realizar una previa selección de los embriones germinados según la talla. Esta manipulación incrementa los costos de producción en la multiplicación masiva, lo que hace necesario el uso de tamices para clasificar los embriones y favorecer la aplicación comercial de la embriogénesis somática.

Al respecto, Gupta *et al.* (1993) y Timmis (1998) plantearon que estas operaciones, que son desarrolladas manualmente en los medios de cultivo semisólidos y mediante tamizado para los medios de cultivos líquidos, complican los protocolos e incrementan los costos de producción.

Obtener embriones con buena calidad es vital para su conversión a plantas. En caso de que exista alta heterogeneidad, se hace necesaria, para sincronizar el cultivo de embriones, la selección de los capaces de regenerar plantas.

Diferentes autores han mostrado que la morfología de los embriones afecta directamente el éxito de la conversión en planta en condiciones *in vitro* (Lazzerri *et al.*, 1987; Wetzstein y Baker, 1993).

La composición hormonal del medio de cultivo mostró influencia estadísticamente significativa sobre la longitud, presencia de hojas, raíz y el porcentaje de conversión de los embriones a planta. El proceso de crecimiento que ocurre inmediatamente luego de la germinación es limitante, en términos de eficiencia, en la conversión de los embriones *in vitro* a planta. Es por ello que demanda atención especial lograr una combinación óptima (Tabla 3).

Se evidenció una influencia positiva del ácido giberélico en el porcentaje de conversión de los embriones a plantas. La baja concentración (0,05 mg/L) mostró el mayor porcentaje de conversión (60,89 %), diferenciándose estadísticamente del resto de las combinaciones hormonales utilizadas.

Tabla 2. Efecto del ciclo de inmersión sobre la regeneración de embriones somáticos a partir de agregados embriogénicos de suspensiones celulares

No.	Ciclos de inmersión (min cada 12 h)	Agregado embriogénico (mg)	Peso fresco de la biomasa (mg)	Producción de embriones somáticos				
				Total	Torpedo			
1	1	100	13,35	d	727,24	d	574,77	c
2	1	200	17,61	cd	1157,33	bc	890,95	b
3	1	300	36,35	a	3717,89	a	2795,99	a
4	3	100	11,57	d	550,62	ef	391,38	d
5	3	200	15,05	d	777,00	d	582,47	c
6	3	300	26,56	b	1169,20	b	818,64	b
7	9	100	14,26	d	456,04	f	241,74	e
8	9	200	14,91	d	658,89	de	401,89	d
9	9	300	23,00	bc	1001,84	c	571,31	c
ES			1,55		185,26		143,06	
CV			41,96		84,8		92,0	

Medias en una misma columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente, usando la prueba de Rangos Múltiples de Duncan (DMRT) a un nivel de probabilidad del 5 %.

Se ha demostrado que las giberelinas promueven la germinación de semillas de diferentes especies y ayudan a romper la dormancia de los brotes (Albert 1970; Chandra and Chauman 1976; Chin *et al.*, 1988). Ellas también son útiles en lograr la germinación y el desarrollo uniforme de las masas de embriones. Ziv

et al. (1998) usaron inhibidores de la biosíntesis de giberelinas para reducir el crecimiento del tallo y las hojas con resultados positivos. Resultados similares se obtuvieron en esta investigación con la utilización del ácido giberélico para el porcentaje de plántulas con raíz y hojas cotiledonares.

Tabla 3. Influencia de la composición hormonal sobre el desarrollo de una población de embriones obtenidos en un biorreactor de 1 L de capacidad luego de dos meses de germinación

No.	Tratamientos (mg/L)					Porcentaje de conversión	Longitud embriones	Presencia de raíz	Presencia de hojas cotiledonares
	Auxina		Citoquinina		Ácido giberélico				
	AIB	ANA	Kinetina	BA	GA ₃				
1	0,1		0,5			41,16 c	8,35 a	70 b	92 a
2	0,2		0,5			36,75 d	6,17 c	84 ab	84 abc
3	0,5		0,5			30,01 e	6,13 c	86 ab	74 c
4		0,2		0,5		35,09 d	7,51 b	36 c	80 abc
5		0,1		0,5		40,54 c	7,19 b	48 c	76 bc
6		0,1		0,5	0,05	60,89 a	6,41 c	100 a	92 a
7		0,1		0,5	0,5	53,82 b	5,83 c	100 a	90 a
ES						0,567	0,072	0,023	0,019
CV						24,9	19,7	57,4	44,1

El endurecimiento de los embriones en bandejas con arena lavada y suelo (4:1) ayudó a una mejor aclimatización (Fig. 2).

Este sistema permite una mejor automatización del proceso por disminuir los gastos debido al menor uso de tiempo de trabajo.



Fig. 2. Embriones obtenidos de los biorreactores. A) Listos para endurecer. B) Aclimatados.

La aclimatización realizada en potes plásticos cubiertos con nailon transparente evitó la deshidratación de los embriones por mantener la humedad constante y disminuir la evapotranspiración.

El tipo de morfología del embrión somático germinado bien formado fue la de mayor frecuencia en el biorreactor (72 %), y solo el 28 % estuvo representado por los embriones no germinados con poca posibilidad de aclimatización.

Los embriones germinados, bien formados y con iniciación de la raíz obtuvieron los mayores porcentajes de conversión a planta luego de la siembra (100 % para el embrión largo y 75 % para el embrión con cotiledón pequeño) (Fig. 3).

Los embriones somáticos no germinados lograron un porcentaje de germinación mucho más bajos que los germinados.

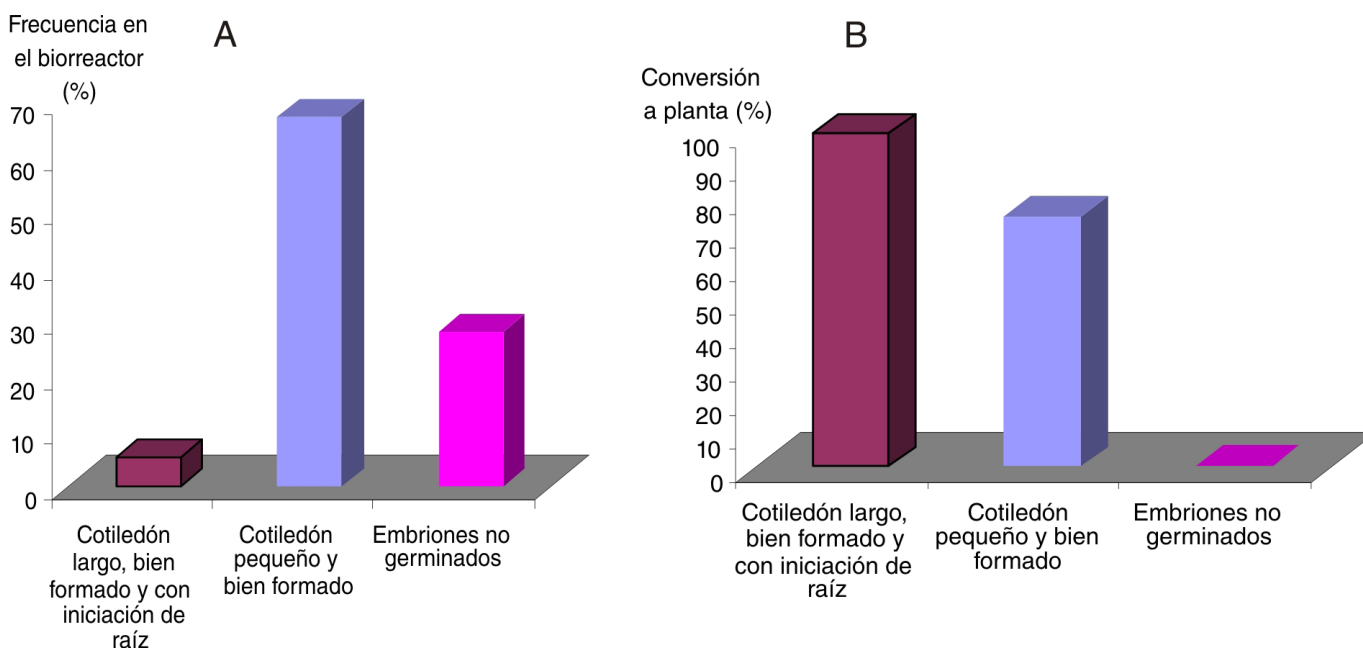


Fig. 3. Caracterización y conversión a plantas de una población de embriones obtenidos en un biorreactor. A) Frecuencia en el biorreactor (%). B) Conversión a planta luego de la siembra (%).

Conclusiones

- Con el uso de los biorreactores de inmersión temporal en la regeneración y desarrollo de embriones somáticos de café se favorece la sincronización del proceso y posibilidad de usar la metodología para la propagación a gran escala.

Bibliografía

- Aitken-Christie, J. & C. Jones: Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 8: 185-196, 1987.
- Albarrán, J.; Bertrand, B.; Lartaud, M. y H. Etienne: Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 81:27-36, 2005.
- Albert, R. V.: Effect of gibberellic acid on germination and initial seedling growth of northern red oak. *For. Sci.*, 16: 427-432, 1970.
- Alvard, D.; Cote, F. and C. Teisson: Comparison of methods of liquid medium culture of banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 55-60, 1993.
- Barry-Etienne, D.; Bertrand, B.; Schlonvoi, A. and H. Etienne: The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* (in press), 2002.
- Cabasson, C.; Alvard, D.; Dambier, D.; Ollitrault, P. and C. Teisson: Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 33-37, 1997.
- Chandra, J. P. and P. Chauman: Notes on germination of spruce seeds with gibberellic acid. *Indian For.*, 102:721-725, 1976.
- Chin, H. F.; Krishnapillay, B. and Z. C. Alang: Breaking dormancy in Kentia palm seeds by infusion technique. *Pertanika*, 11:137-141, 1988.
- Etienne, H. and M. Berthouly: Temporary immersion systems in plant micropropagation (review). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* (in press), 2002.
- Etienne, H.; Bertrand, B.; Anthony, F.; Cote, F. and M. Berthouly: Somatic embryogenesis: a tool for coffee breeding. *Proceedings of 17th Colloquium of International Coffee Science Association*, Nairobi, Kenya. Vevey, Switzerland: ASIC: 457-465, 1997.
- Etienne, H.; Anthony, F.; Dussert, S.; Fernandez, D.; Lashermes, P. and B. Bertrand.: Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38:129-138, 2002.
- Gupta, P.; Pullman, G.; Timmis, R.; Kreitinger, M.; Carlson, W.; Grob, J. and E. Welty: Forestry in the 21st century. The biotechnology of somatic embryogenesis. *Bio/Technology*, 11: 454-459, 1993.
- Harris, R. E. And E. B. Mason: Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. *Can. J. Plant Sci.*, 63: 311-316, 1983.
- Lazzerri, P.; Hildebrand, D. And G. Collins: Soybean somatic embryogenesis: Effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 10: 209-220, 1987.
- Lorenzo, J. C.; González, B. L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P. And C. Borroto: Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 54: 197-200, 1998.
- Teisson, C. and D. Alvard: A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: *Mterzi et al. (eds.) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 105-110, 1995.
- Timmis, R. *Bioprocessing for tree production in the forestry industry: Conifer somatic embryogenesis. Biotechnol. Prog.* 14: 156-166, 1998.
- Wetzstein, H, and C. Baker: The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Sci.*, 92: 81-89, 1993.
- Ziv, M.; Ronen, G. and M. Raviv: Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large-scale micropropagation of plants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 34:152-158, 1998.