

Respuesta de veinte variedades de café (*Coffea spp.*) a la reproducción vía embriogénesis somática

Response of twenty coffee varieties (*Coffea spp.*) to reproduction via somatic embryogenesis

Henry Omar Calderón Acuña¹

María Elena Montes de Godoy²

Universidad Católica de El Salvador, El Salvador

Fecha de recepción: 07-05-2024 Fecha de aceptación: 02-07-2024

Resumen

La respuesta del café (*Coffea spp.*) bajo condiciones in vitro es diversa, sobre todo cuando se establece por medio de la embriogénesis somática; y varía dependiendo la variedad o el genotipo que se utilice. Se evaluaron veinte variedades de café provenientes del jardín de variedades del Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador, las cuales se indujeron a embriogénesis somática, utilizando fragmentos de láminas foliares cultivadas en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962), con 30 g L⁻¹ de sacarosa más 1 mg L⁻¹ de BAP (Bencil aminopurina) con diferente concentración de 2,4-D (2, 4-Diclorofenoxiacético).

De los tratamientos T1 y T2, el tratamiento T1 respondió mejor para la inducción de callos. Posteriormente, se evaluó la capacidad de los callos provenientes de ambos tratamientos para generar embriones, los cuales fueron introducidos en un medio de cultivo MS suplementado con 50 mg L⁻¹ de L-cisteína, 0.1 mg L⁻¹ de Kinetina y 0.5 mg L⁻¹ de IBA (Acido indol butírico). Se verificó que solo siete variedades generaron embriones somáticos con respuesta no significativa, a excepción de la variedad Libérica abenountae que presentó significancia. Por otro lado, Borbón fue la variedad que regeneró más embriones somáticos.

Palabras claves: Embriogénesis somática, callo génesis, explante, callo friable.

Abstract

Coffee (*Coffea spp.*) exhibits diverse responses under in vitro conditions, particularly when established via somatic embryogenesis, with variations depending on the genotype. This study evaluated 20 coffee varieties from the Ministry of Agriculture and Livestock's variety garden in El Salvador. Leaf lamina fragments were cultured on MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 1 mg L⁻¹ BAP (6-Benzylaminopurine), and varying concentrations of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid). Among the treatments, T1 yielded better results for callus induction. Subsequently, callus from both treatments was evaluated for its ability to generate embryos using MS medium enriched with 50 mg L⁻¹ L-cysteine, 0.1 mg L⁻¹ kinetin, and 0.5 mg L⁻¹ IBA (Indole-3-butyric acid). Seven varieties produced somatic embryos, with Liberica abenountae showing significant results. Bourbon had the highest somatic embryo regeneration.

Keywords: Somatic embryogenesis, callogenesis, explant, friable callus.

1. Maestro en Gestión Ambiental, investigador independiente. ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8406-7685>; email: henry.calderon1@catolica.edu.sv
2. Maestra en Horticultura, docente investigadora, Facultad de Ingeniería y Arquitectura. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2293-7361>; email: maria.montes@catolica.edu.sv

1. Introducción

La caficultura es un sector clave en la economía de la región centroamericana y de El Salvador, ya que es uno de los principales productos de exportación que genera empleos en la región (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2021). Además, la calidad del café regional ha sido reconocida a nivel mundial, lo que ha impulsado la demanda de este producto en los mercados internacionales (Gatica, Arrieta, & Espinoza, 2008) (Castillo, y otros, 2023).

Sin embargo, la caficultura enfrenta desafíos como la variabilidad climática, la competencia con productos de importación y la presión sobre los precios, lo que dificulta la sostenibilidad de la producción. Es aquí donde la biotecnología juega un papel importante, ya que puede mejorar la producción de café de diversas maneras (Montes-de Godoy, 2019). En otro sentido, la biotecnología puede ser utilizada para desarrollar variedades de café más resistentes a enfermedades y plagas, lo que reduce los costos de producción y aumenta la eficiencia (Etienne, y otros, 2002). También puede ser empleada para mejorar la calidad de los granos de café, lo que aumenta su valor en el mercado (Fernández, Guglielmo, & Menéndez, 2010).

La propagación tradicional del café, tal como la siembra de semillas y estacas, presentan desventajas como, el tiempo en el que se demora para poder multiplicar un material

de interés comercial; además de la diseminación de plagas y enfermedades (Pincay Bajaña, 2017). Las técnicas *in vitro*, al contrario, ofrecen tasas de regeneración más elevadas, material limpio y sano que no ofrece riesgos de diseminación de enfermedades ni plagas; no obstante, cada variedad de café responde a diferentes formulaciones de medio de cultivo, por lo que es importante analizar las variedades de café involucradas a la hora de establecer un protocolo de micropropagación (Morales, 2017) (Samsom, y otros, 2006). En El Salvador existe un jardín de variedades del Ministerio de Agricultura y Ganadería, ubicado en el municipio de Santa Tecla, departamento de La Libertad; el cual posee una colección *in situ* de plantas de café de diversos orígenes, que pueden ser de mucha importancia en el mejoramiento genético y futura transformación de la caficultura del país. De ahí que se decidió micropropagar veinte de esas variedades mediante la técnica de embriogénesis somática y evaluar su respuesta a este procedimiento.

2. Materiales y Métodos

Se seleccionaron veinte variedades de plantas de café del jardín de variedades del Ministerio de Agricultura y Ganadería, ubicado en el municipio de Santa Tecla, departamento de La Libertad, El Salvador, con la finalidad de inducir los explantes foliares de hojas jóvenes a callogénesis, y posteriormente a embriogénesis somática. El material foliar

se trasladó inmediatamente al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Católica de El Salvador, ubicado en el municipio de Santa Ana en el departamento del mismo nombre. Ahí se aplicó un protocolo de desinfección, lavando las hojas con agua purificada más dos gotas de tween 80/100 ml que es un agente emulsionante y surfactante con acción detergente; posteriormente, las hojas se sumergieron en una solución de fungicida (Azoxistrobina) al 2% durante treinta minutos. Pasado este tiempo, el material se introdujo en hipoclorito de sodio al 5%, durante quince minutos. Luego, las hojas se llevaron a cámara de flujo laminar en donde se aplicaron tres enjuagues con agua esterilizada. Después de la desinfección, se procedió a cortar las hojas en pequeños trozos de 1 cm³ aproximadamente y sin nervadura; posteriormente fueron introducidos en dos tratamientos, conteniendo medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), con 30 g L⁻¹ de sacarosa más 1 mg L⁻¹ de BAP (Bencil aminopurina) con diferente concentración de 2-4 D (2, 4- Diclorofenoxiacético). Para el tratamiento 1 (T1) se utilizó una dosis de 0.48 mg L⁻¹ de 2-4 D y para el tratamiento 2 (T2), la dosis fue de 0.96 mg L⁻¹. El pH se ajustó a 5.7. La esterilización del medio de cultivo se realizó en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión/pulg², durante quince minutos. El fotoperiodo de incubación fue de oscuridad total, con una temperatura promedio de 25°C.

Luego de 25 días, aproximadamente, se observó la presencia de callos por explante de cada variedad de café; y de estos se tomaron treinta callos formados de cada variedad estudiada y tratamiento establecido, trasladándolos a un medio de cultivo de inducción de embriones, MS suplementado con 50 mg L⁻¹ de L-cisteína, 0.1 mg L⁻¹ de Kinetina y 0.5 mg L⁻¹ de IBA (Acido indol butírico). La incubación se realizó en oscuridad total. A los treinta días se observó la presencia de embriones, generados en los callos de siete variedades de café que respondieron al tratamiento. Estos embriones fueron trasladados a un medio de cultivo MS con macro sales a la mitad y 1mg L⁻¹ de BAP para convertirlos a plántulas; sub cultivándolos cada veinte días, en condiciones de luz difusa hasta su desarrollo.

El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial, en donde los factores fueron las variedades de café, tratamientos T1 y T2 de 2-4D. Las variables fueron el número de callos regenerados por variedad, así como el número de embriones obtenidos. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA, comparación de medias por LSD de Fisher y Test de Rangos Múltiples. Para el análisis de datos se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XIX.I. Las unidades experimentales fueron: tres explantes por cada variedad de café en

dos diferentes dosis de 2-4 D; siendo 0.48 mg L⁻¹ (T1) y 0.96 mg L⁻¹ (T2). Y tres callos por cada variedad de café provenientes de los tratamientos T1 y T2. Se realizó un mínimo de diez repeticiones por cada tratamiento.

3. Resultados y Discusión

La callogénesis dio inicio alrededor de los 25 días (Figuras 1 y 2) para las variedades

Borbón, Arábigo, Excelsa, Dewevrel y Villa Sarchi; en el resto de las variedades, se demoró hasta siete semanas. Se puede observar que en T1 la formación de callos fue superior para todas las variedades con resultados altamente significativos ($p \leq 0.01$), con excepción de la variedad Libérica que no presentó diferencias significativas (Tabla 1).

Figura 1

Formación de callos a los 25 días



Figura 2

Formación de callos a los 30 días

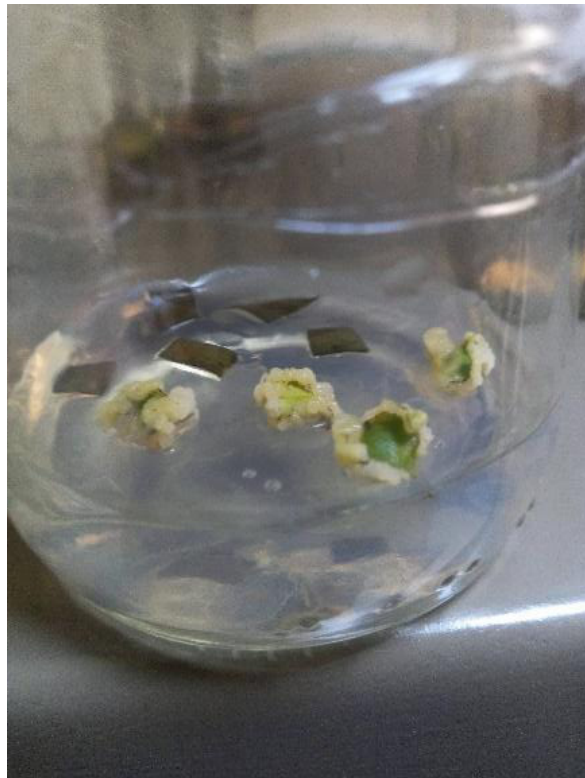


Tabla 1*Comparación de medias por LSD de Fisher para veinte variedades de café (Coffea spp.)*

Variedad	Media		Significancia (a)
	T1	T2	
Arábigo	2.6	1.5	s
Borbón Charloti (accesión)	2.1	1.2	s
Borbón	2.7	1.8	s
Borbón Puerto Rico (accesión)	2.4	1.5	s
Canephora	2.3	1.3	s
Catuái	1.9	1.1	s
Catisic	1.7	0.8	s
Cuscatleco	1.9	1.2	s
Dewevrell	1.9	1.1	s
Excelsa	2.6	1.5	s
Libérica	1.5	0.8	ns
Libérica abenoun-tae	2.1	1.0	s
Maragogipe	1.7	0.7	s
Moka	2.2	1.1	s
Mundo novo	2.3	1.1	s
Pacas	2.4	1.1	s
Pacamara	2.0	0.9	s
Robusta	0.9	0.4	s
Sarchimor	2.0	1.2	s
Villa Sarchí	2.2	1.0	s

Nota. Significancia (a); en donde: n.s. = no significativo, s = diferencias significativas según la prueba de LSD de Fisher ($p \leq 0.01$).

La variedad Borbón presentó una media de 2.7 callos por explante, seguida de la variedad Excelsa y Arábigo, con una media de 2.6; todo con resultados altamente significativos ($p \leq 0.01$). Para T2 se obtuvo en todas las variedades una menor tasa de regeneración de callo génesis; siendo 1.8 callos por explante,

siempre para la variedad Borbón. Las variedades Arábigo, Borbón accesión Puerto Rico y Excelsa tuvieron una tasa de 1.5 callos por explante siempre con diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$). La única variedad que no presentó diferencias entre T1 y T2 fue Libérica.

Los embriones somáticos se definieron en los callos a los treinta días después del cambio de medio de cultivo de inducción de embriones (Figuras 3 y 4). En donde solo siete variedades respondieron al medio de cultivo (Figura 5), siendo la variedad Borbón la que presentó un promedio 3.0 embriones en los

callos formados de T1, en el que no hay significancia respecto a la media de T2; seguido de las variedades Excelsa con un promedio en T1 de 2,8 y Arábigo con un promedio de 2,6, las cuales no poseen significancia respecto a la media de T2.

Figura 3

Formación de embriones somáticos a los treinta días



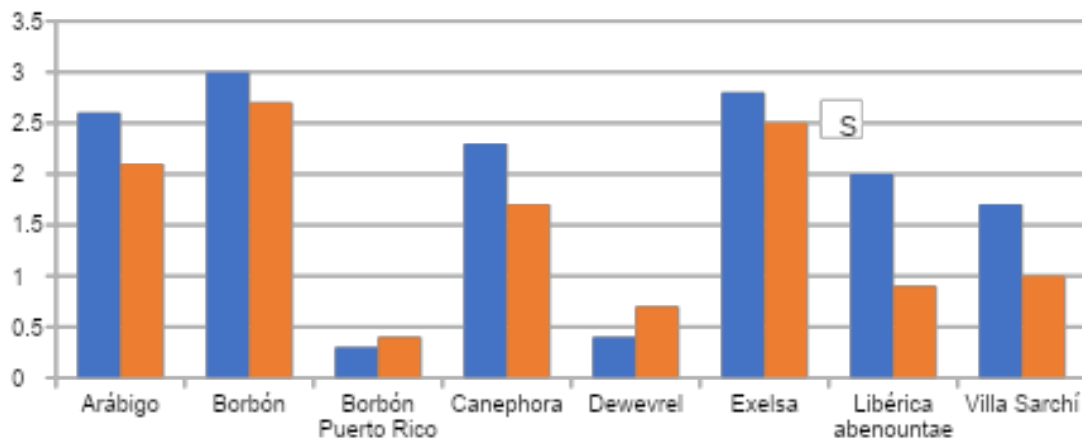
Figura 4

Embriones somáticos diferenciados en la variedad Borbón



Figura 5

Variedades de café que generaron embriones en los callos de los tratamientos T1 y T2



Nota. Las muestras fueron trabajadas en medio de cultivo MS suplementado con 50 mg L⁻¹ de L-cisteína, 0.1 mg L⁻¹ de Kinetina y 0.5 mg L⁻¹ de IBA (Acido indol butírico). S= significativo.

Las variedades que presentaron un promedio considerable de embriones, no mayor a 2,5 fueron: Canephora con un promedio de 2,3 embriones provenientes de los callos del tratamiento T1, en donde no se encontró significancia respecto a T2. La variedad Libérica abenountae, por el contrario, obtuvo un promedio de 2,0 embriones provenientes de los callos T1, con diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$), respecto a los callos generados por T2. Por otra parte, la variedad Villa Sarchí generó un promedio 1,7 embriones formados en los callos de T1; no obstante, no se encontró significancia alguna respecto a T2.

En menor medida, las variedades que generaron pocos embriones menores a la media de 0,9 fueron: Dewevrel con un promedio de 0,7 embriones generados en los callos que provenían del tratamiento T2; de igual manera, el máximo de embriones que obtuvo la variedad Borbón Puerto Rico fue un promedio de 0,4 embriones en T2. Ambas variedades no presentaron diferencias significativas con respecto a los promedios de T1.

4. Conclusiones

El tiempo de inducción de callos embriogénicos en café es un factor clave en el éxito de la embriogénesis somática. En el caso de Paredes, Peña & Jádán (2013), la callo génesis en explantes foliares de la variedad Canephora, demoró entre los 20 y 45 días de inicio del cultivo. Se evidenció en los resultados de

esta investigación que, algunas variedades como: Borbón, Arábigo, Excelsa, Dewevrel y Villa Sarchi respondieron a la callogenesis más pronto que otras, como lo indica Samsom & otros (2006), dependerá del tipo de medio de cultivo y la concentración de auxinas y citoquininas. De acuerdo con los resultados obtenidos por Santana & otros (2004), no solo influyó el medio de cultivo para la callogénesis, sino también el genotipo de café seleccionado. Similar situación reporta Pintado, Jhong & Jiménez (2019), en donde una variedad de café generó callos solo con citoquinina BAP, a diferencia de las otras dos variedades en estudio que reaccionaron en combinación con auxinas.

Cabe destacar que la auxina 2-4D es un elemento fundamental para la generación de callos en explantes foliares de café; sin embargo, Moncada, Vielma & Mora (2004) señalan que las altas concentraciones de esta auxina promueven la formación de raíces en los callos, y las bajas concentraciones deberán ser suplidas con citoquininas para que el callo logre un estado friable. Para Paredes, Peña & Jádán (2013); González-Vega (2003) y Cruz-Cardona (2003), las mejores dosificaciones de 2-4D se encuentran entre 0.5 mg/L-1 y 1.0 mg/L-1, en combinación con diferentes dosis de citoquinina, logrando un mayor crecimiento y friabilidad en los callos; esto se comprobó en los resultados obtenidos. Al utilizar las dosis de 0.48 y 0.96

mg/L-1 de 2-4D en combinación con 1.0 mg/L-1 de BAP, se logró una mayor formación de callos en cada explante con diferencias significativas entre ambos tratamientos, verificando que la dosis de 0.48 mg/L-1 fue la más adecuada para promover la formación de callos.

Por otro lado, la friabilidad de los callos y la capacidad para generar embriones es un factor clave para obtener buenos resultados en la micropropagación in vitro de café. Autores como Paredes, Peña & Jádán (2013) indican que, para inducir la formación de embriones, es necesario adicionar concentraciones bajas de auxinas o no adicionar. Sin embargo, para Quiroz-Figueroa, Fuentes-Cerda, Rojas-Herrera & Loyola-Vargas (2002), debe tomarse en cuenta la edad fisiológica de la planta donde se toman los explantes y el precondicionamiento de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo en interacción con los explantes. Esta situación se observó

en estos resultados, al utilizar solo un medio de cultivo de inducción de embriones; debido a eso, solo siete variedades de café lograron responder a la embriogénesis somática. Gatica, Arrieta & Espinoza (2008) mencionan que existe una influencia en la capacidad embriogénica de los callos, dependiendo del genotipo de cada variedad, el protocolo que se utilizó y el explante.

En este estudio se logró determinar la factibilidad en la formación de callogénesis en las variedades de café estudiadas, así como de la producción de embriones somáticos, los cuales posteriormente regenerarán plantas completas. Sin embargo, la producción de estos depende de la variedad; en este caso, la variedad que mayor número regeneró de ellos fue Borbón con T1, a pesar de que la variedad Libérica abenountae fue la que obtuvo diferencias significativas entre el T1 y T2.

5. Referencias

- Castillo, U.; Juachin, E.; Martínez, M.; Velásquez, E.; Pacas, L. & Núñez, M. (2023). Capacidad antioxidante y contenido cafeína en Cafés especiales de El Salvador. *Revista Minerva*, 75-84.
- Cruz-Cardona, R. Y. (2020). *Tesis: Embriogénesis somática con explantes foliares de Coffea arabica Centroamericano y Coffea canephora Conilón*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- 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 Cellular & Developmental Biology-Plant*, 129-138.

- Fernández, R.; Guglielmo, Z. & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación*, 57-84.
- Gatica, A. M.; Arrieta, G. & Espinoza, A. M. (2008). Comparison of three in vitro protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *Agronomía Costarricense*, 86-94.
- González-Vega, M. (2003). Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canephora* P.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16-22.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (01 de Mayo de 2021). *La caficultura salvadoreña es vida y desarrollo*. <https://www.mag.gob.sv/2021/10/01/la-caficultura-salvadorena-es-vida-y-desarrollo/>
- Moncada, E.; Vielma, M. & Mora, A. (2004). Inducción in vitro de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arabica* L. variedad Catuai amarillo. *Universidad de los Andes Venezuela*, 23-28.
- Montes-de Godoy, M. E. (2019). Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (*Coffea arabica*) resistente a roya (*Hemileia vastatrix*). *Cultivos Tropicales*, 40.2.
- Morales, R. (2017). *Propagación in vitro de café (Coffea arabica L.)-variedades Geisha y Sarchimor-a partir de láminas foliares y meristemas axilares*. Tesis: Zamorano.
- Paredes, G.; Peña, C. & Jádán, M. (2013). Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 63-83.
- Pincay-Bajaña, V. (2017). *Multiplificación in vitro de café caturra rojo Coffea arábica L. con la interacción de dos fitohormonas*. Tesis: Universidad de Guayaquil.
- Pintado, R.; Jhong, K. & Jiménez, J. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 259-264.
- Quiroz-Figueroa, F. R.; Fuentes-Cerda, C. J.; Rojas-Herrera, R. & Loyola-Vargas, V. M. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 1141-1149.
- Sansom, N. P.; Campa, C.; Le Gal, L.; Noirot, M.; Thomas, G.; Lokeswari, T. S. & Kochko, A. (2006). Effect of primary culture medium composition on high. *Plant cell, tissue and organ culture*, 37-45.



Santana, N.; González, M. E.; Vacárcel, M.; Canto.Flick, A.; Hernández, M. M.; Fuentes-Cerda, F. J. (...) & Loyola-Vargas, V. M. (2004). Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 95-101.