

# DESDIFERENCIACIÓN CELULAR *IN VITRO* DE *Coffea arabica* L. "CAFÉ" VAR. CATURRA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

**Mauro QUIÑONES AGUILAR**

Universidad Ricardo Palma  
Mauro.quinones@urp.edu.pe

**Nathalie YAFAC, Romina GARAVITO-SALINI,  
Leydi PRINCIPE**

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad Ricardo Palma

## RESUMEN

*Coffea arabica* L "café" Var. Caturra de la familia Rubiaceae, uno de los principales cultivos de agro exportación del Perú. El presente estudio se realizó con el propósito de obtener células desdiferenciadas o callos viables *in vitro* a partir de explantes foliares, para buscar resistencia a la roya por variabilidad genética. Los explantes se sometieron al sistema de esterilización: Lavado con detergente; fungicida Cobox; alcohol al 96%; hipoclorito de Calcio (CaClO) al 5% y enjuague, a continuación se realizó pequeños cortes (heridas), luego fueron introducidos en tubos de ensayo con medio de cultivo de Murashige y Skoog (1992) suplementado con 1,5 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0,5 mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como primer tratamiento, y, con 2,5 mg/L de Kinetina y 1 mg/L de 2,4-D como segundo tratamiento; todo el proceso de introducción *in vitro* se desarrolló en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar. Los cultivos se incubaron en el cuarto de transferencia en condiciones de oscuro a una temperatura de 20-22°C. Como resultado se obtuvo células desdiferenciadas o callos viables en 100% de explantes en primer tratamiento y en 80 % de explantes en el segundo tratamiento, a veinte días de introducción *in vitro*. Se observó fenolización en los explantes como producto de la reacción de oxidación, lo que causó el cambio de color en las células desdiferenciadas de verde amarillento a pardo claro. El sistema de esterilización aplicado, permitió eliminar los agentes patógenos en 90 % de los explante.

## PALABRAS CLAVE

*Coffea arabica*; desdiferenciacion celular; callo viable; *in vitro*; 6-BAP; 2,4-D; Kinetina

## *IN VITRO* CELLULAR DE DIFFERENTIATION OF *Coffea arabica* L. "CAFÉ" VAR. CATURRA FROM FOLIAR EXPLANTS

## ABSTRACT

*Coffea arabica* L "coffee" Var. Caturra of the Rubiaceae family on of the main agricultural export crops in Peru. The present study was carried out with the purpose of obtaining *in vitro* from foliar explant, to search for resistance to rust due to genetic variability. The explants were subjected to the stylization system: Washing with detergent; Cobox fungicide; 96% alcohol; Calcium Hypochlorite (CaClO) at 5% and rinsing, then small cuts (wounds) were made then they were introduced into test tubes with culture medium from Murashige and

Skoog (1992) supplemented with 1.5 mg/L of 6-benzylaminopurine (6-BAP) and 0.5 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) as the first treatment; and, with 2.5 mg/L of Kinetin and 1 mg/L of 2,4-D as a second treatment; the entire *in vitro* introduction process was carried out under aseptic conditions Within the laminar flow chamber. The culture were incubated in the transfer room under dark conditions at 20-22°C. As results, dedifferentiated cells or viable callus were obtained in 100% of the explants in the first treatment and in 80% of the explants in the second treatment, twenty days after *in vitro* introduction. Phenolization was observed in the explants as a product of the oxidation reaction, which caused the color change in the dedifferentiated cells from yellowish green to light brown. The applied sterilization system allowed the elimination of pathogens in 90% of the explants.

## KEY WORDS

*Coffea arabica*; cell dedifferentiation; viable callus; *in vitro*; 6-BAP; 2, 4-D, Kinetina

Recibido: 06/04/2020

Aprobado: 20/07/2020

## INTRODUCCIÓN

**C***offea arabica* L. "café" es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional y en el Perú. La economía de muchos países productores de café depende en gran medida de la productividad de este cultivo; es por eso que el rendimiento, la resistencia a plagas y la calidad organoléptica son características que presentan variedades mejoradas en los cultivos de café. En los últimos años, el Perú viene enfrentando un problema en el cultivo del café: la roya, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. Este hongo se presenta en la planta como polvillo amarillo en el envés de las hojas causando la caída prematura de hojas y granos de café. Esto conlleva al uso de técnicas biotecnológicas como la embriogénesis somática, el cual es un proceso biotecnológico que permite obtener embriones somáticos a partir de una célula sin la necesidad de fusión de gametos y regenerar plántulas conocidas como variantes somaclonales para el mejoramiento genético en busca de variedades genéticamente resistentes a la roya, como una alternativa para la caficultura peruana. Esta técnica es considerada como una alternativa, debido a que, no solo permite acortar el tiempo de mejoramiento genético, sino también la multiplicación clonal masiva de las plantas obtenidas por la desdiferenciación celular y/o embriogénesis somática, dando la posibilidad de elevar los índices de producción de café en el Perú, y con ella mejorar la calidad de vida de los agricultores dedicados a la cafecultora.

La ausencia o presencia de algunos componentes en el medio de cultivo como sales minerales, fitohormonas, antioxidantes o fungicidas, desencadenan respuestas variadas que en muchas ocasiones no son las más adecuadas para lograr la desdiferenciación celular y/o embriones somáticos. Partiendo de estas consideraciones, el presente trabajo de investigación tiene como finalidad lograr la desdiferenciación celular *in vitro* de *Coffea arabica* L. Var. Caturra a partir de explantes foliares, estableciendo un procedimiento de inducción de embriogénesis somática de

*Coffea arabica* que permita la óptima multiplicación *in vitro* mediante la determinación del tipo y concentración de reguladores de crecimiento en *Coffea arabica* L. Var. Caturra y, por ende, pueda establecerse una nueva técnica de cultivo mejorado en el Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

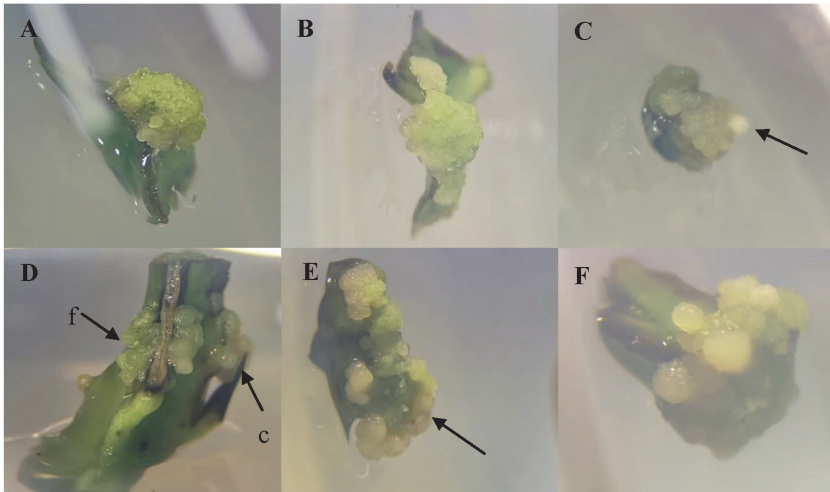
Los explantes foliares de *Coffea arabica* Var. Caturra "Café" fueron obtenidos del campus de la Universidad Ricardo Palma, donde se cortó con unas tijeras y se depositó en un Beaker los explantes foliares más jóvenes sin daños físicos ni síntomas de enfermedad, luego fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal, estas se lavaron con detergente y se enjuagaron. En la cámara flujo laminar previamente esterilizada con UV, se sumergieron los explantes en solución fungicida Cobox 1g/L por 30 minutos, luego en alcohol 96% por 1 minuto a continuación fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de calcio (Ca ClO)<sub>2</sub> al 5% (p/v) durante 10 minutos, enjuagándose cuatro veces con agua destilada previamente esterilizada con un intervalo de 5 minutos entre cada enjuague. Con ayuda de un bisturí y sobre una placa Petri previamente esterilizada, se realizó cortes (heridas) en los explantes foliares y de peciolo los cuales se sembraron en 10 tubos Falcón con medio de cultivo MS enriquecido con 1,5 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y 0,5 mg/L de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para el primer tratamiento; y, otros 10 tubos falcon con medio de cultivo MS enriquecido con 2,5 mg/L de Kinetina y 1 mg/L de 2,4-D para el segundo tratamiento. Luego se flameó, se cerró, se rotuló y se incubó en condiciones de oscuridad a 20-22°C. Se observó interdiariamente para determinar el inicio de la desdiferenciación celular y/o formación de tejido calloso y visualizar la presencia de agentes contaminantes en los cultivos. Se cuantificó el número de explantes que formaron callo durante las primeras 4 semanas de cultivo.

## RESULTADOS

Se lograron obtener callos de color verde amarillento de aspecto granulado y seco en los explantes foliares de *Coffea arabica* en un 100% y 80% para el primer y segundo tratamiento respectivamente, a los 20 días de la introducción *in vitro* (Tabla 1 y Fig 1). Presentó contaminación de 10% solo en el segundo tratamiento (Tabla 2, Fig 2) y fenolización baja y media en ambos tratamientos (Tabla 3 y 4 y Fig 3).

**Tabla N° 1.** Efecto del 6-BAD, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y kinetina en la iniciación de callo en explantes *Coffea arabica*

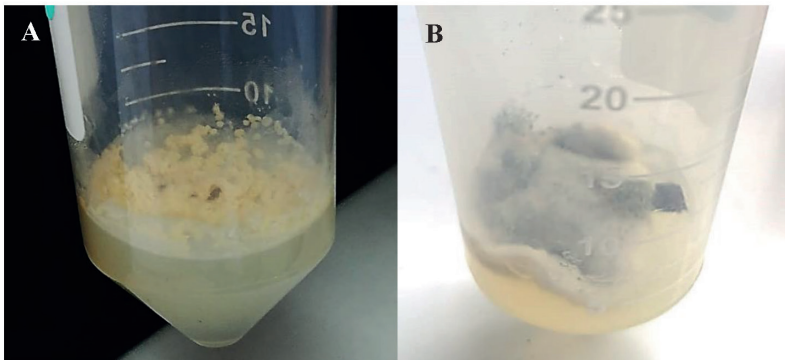
Tratamiento	Porcentaje de explantes que iniciaron la formación de callo
T1: MS + 1,5 mg/L 6-BAP + 0,5 mg/L 2,4-D	100%
T2: MS + 2,5 mg/L KIN + 1,0 mg/L 2,4-D	80%



**Fig 1.** Tipos de callo según tratamientos de *Coffea arabica*. **A.** Callo friable, tratamiento 1; **B.** callo friable, tratamiento 1; **C.** callo compacto (flecha) tratamiento 1; **D.** callo friable (f) y callo compacto (c) tratamiento 2; **E.** callo fenolizado (flecha) tratamiento 2; **F.** callo compacto, tratamiento 2

**Tabla N° 2.** Número y porcentaje de contaminación de explantes de *Coffea arabica* en cada tratamiento.

Tratamientos	Número de explantes contaminados	Porcentaje de contaminación
T1	0	0%
T2	2	10%



**Fig 2.** Contaminación del medio y explantes en *Coffea arabica*. **A.** contaminación bacteriana. **B.** contaminación fúngica

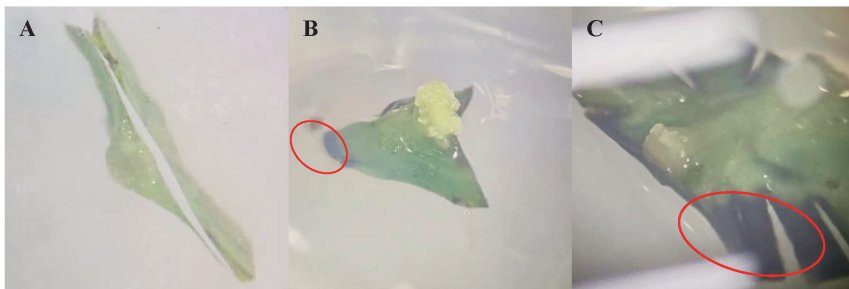
**Tabla N° 3.** Intensidad y porcentaje de oxidación de explantes de *Coffea arabica*

Oxidación	Tratamiento 1		Tratamiento 2	
	MS + 1,5 mg/L 6-BAP + 0,5 mg/L 2,4-D		MS + 2,5 mg/L KIN + 1,0 mg/L 2,4-D	
	Número de explantes oxidados	Porcentaje de oxidación	Número de explantes oxidados	Porcentaje de oxidación
Baja	6	60%	3	37.5%
Media	2	20%	4	50%
Alta	0	0%	1	12,5%
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>80%</b>	<b>8</b>	<b>100%</b>

**Tabla N° 4.** Número y porcentaje total de oxidación de explantes de *Coffea arabica*

Tratamientos	Número de explantes*	Número de explantes totales oxidados	Porcentaje total de oxidación
<b>T1</b>	10	8	80%
<b>T2</b>	8	8	100%

\*número de explantes sembrados por tratamiento sin contar los explantes contaminados



**Fig 3.** Oxidación en explantes de *Coffea arabica*: **A.** oxidación ausente; **B.** oxidación baja; **C.** oxidación media

## DISCUSIÓN

López-Gómez P. *et al* (2010) determinaron que los explantes que provienen de hojas inmaduras y de hojas jóvenes presentan una mayor capacidad de respuesta morfogénica que los de las hojas maduras, refiriéndose a la obtención del callo.

En esta investigación seleccionamos los explantes foliares más jóvenes de *Coffea arabica*, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente por López-Gómez.

Sondahl y Sharp (1977) afirman que los reguladores del crecimiento de las plantas, desarrollan un papel importante en la inducción de la actividad mitótica de diferentes poblaciones celulares de los tejidos cultivados, que propiciaron diferentes tiempos de los ciclos celulares y diversos bloqueos, según el estado regulatorio particular de una población de células. Moncada *et al* (2004) determinaron la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L. variedad Catuai Amarillo en el medio Murashige y Skoog (MS) con 5.30 mg/L de 6-bencilaminopurina (6-BAP) estimulando el desarrollo de embriones somáticos. Concluyeron que el BAP y el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) juntos promueven el desarrollo de callos con raíces y con potencial embriogénico; por otro lado, las concentraciones bajas de estos dos reguladores de crecimiento inducen un mayor desarrollo de callos embriogénicos, es por ello que se optó por utilizar concentraciones bajas de ambas fitohormonas para el primer tratamiento, siendo de 1,5 mg/L y 0,5mg/L respectivamente, dado esto, se obtuvo un resultado de 80% y 100% de inicio de formación del callo para el primer y segundo tratamiento respectivamente. Así podemos afirmar que el uso de concentraciones bajas de ambas fitohormonas promueve una mayor inducción de formación de callo, y a la vez, es un beneficio económico ya que genera menor gasto de ellas.

Los resultados del ensayo de iniciación de callo indican que la auxina 2,4-D, a una concentración de 0,5 mg/l, induce la formación de callo friable, y la combinación de 6-bencilaminopurina (6-BAP) incrementa la intensidad de proliferación estimulando el desarrollo de embriones somáticos, esto es corroborado con los resultados de Moncada *et al* (2004), Ibrahim *et al.* (2013) y Sánchez Jhong *et al* (2019). Sin embargo, utilizando como fitohormonas 2,4-D y Kinetina se obtuvo mayor porcentaje de callo compacto (Fig.1) pero con un resultado favorable en cuanto a la proliferación del callo lo cual concuerda con lo reportado por Cevallos *et al.* (2002) cuya investigación obtuvo frecuencias más altas de los callos embriogénicos cuando el medio estuvo suplementado con la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina. Por otro lado, Ciridhar *et al* (2004) empleó el triacantanol en el medio de cultivo para la obtención de embriones somáticos en *C. arabica* y *C. canephora*, en esta investigación no se utilizó este agente.

En las investigaciones realizadas en la regeneración de plantas de *Coffea arabica* "café" por Gatica, A. 2002, se utilizó distintos métodos de esterilización en los explantes de hojas. La esterilización con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.6% por 30 minutos no fue el adecuado para desinfectar los explantes. Sin embargo, al aumentar la concentración de NaOCl a 5.25% por 30 minutos y utilizando Agrimycin (bactericida) y Benlate (fungicida) por 5 minutos logró reducir considerablemente la contaminación. En nuestra investigación los explantes foliares de *Coffea arabica* L. Car. Caturra fueron esterilizados con hipoclorito de calcio (CaClO) al 5% por un tiempo de exposición de 10 min, el cual fue mayor comparado con otros autores y permitió la esterilización de los explantes y por consiguiente la desdiferenciación celular. Paz, A. (2000) empleó Benomyl para la

desinfección, optamos por la utilización del fungicida Cobox por un tiempo de exposición de 30 minutos.

En nuestros ensayos los explantes se contaminaron con bacterias y *Cladosporium spp.*, que se identificó por características macroscópicas. Además, estos son microorganismos que comúnmente se encuentran en el medio ambiente, corroborando lo mencionado por Gatica, A.

## CONCLUSIONES

- Se logró la desdiferenciación celular *in vitro* de *Coffea arabica* L. Var. Caturra a partir de explantes foliares
- La formación de callo a partir de explantes de *Coffea arabica* L. Var. Caturra "café" fue de 80% a 100% en medio de cultivo MS enriquecido con ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación con 6-bencilaminopurina para el primer tratamiento y, con Kinetina para el segundo tratamiento.
- La mayor proliferación de callo friable se obtuvo en explantes de *Coffea arabica* L. Var. Caturra "café" cultivados en medio MS enriquecido con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (0.5 mg/l) y 6-bencilaminopurina (1,5 mg/L). Sin embargo, se obtuvo mayor porcentaje de callo compacto con el segundo tratamiento.
- La exposición de explantes de *Coffea arabica* L. Var. Caturra "café" a hipoclorito de calcio al 5% a un tiempo de exposición de 10 minutos permiten lograr la esterilización de los explantes.
- Se obtuvo un porcentaje de oxidación de 80% y 100% en el primer y segundo tratamiento respectivamente.
- La oxidación de explantes y callos no presenta un problema en el establecimiento *in vitro* ni en la inducción de embriones somático pero induce a un cambio ligero de color en el callo.

## RECOMENDACIONES

- Continuar investigaciones posteriores.
- Utilizar otras sustancias esterilizantes para determinar y evaluar cual da un mejor resultado.
- Realizar ensayos con uso de antioxidantes para determinar su efecto y evitar la fenolización.
- Investigar el efecto de la humedad relativa ambiental de donde se extraen los explantes en los niveles de contaminación que se obtienen *in vitro*.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cevallos, M.; Sánchez, I.; Montes, S. (2002). Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* var. Robusta. *Protección Vegetal* 17(1): 14-19.
- Ciridhar, P., Indu, E. P., Ravishankar, G. A., & Chandrasekar, A. (2004). Influence of triacontanol on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. ex Fr. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(2), 200-203.
- Gatica, Andrés (2002). Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica. pp. 70.
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyo, R., Purwito, A., & Sudarsono, S. (2013). Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica coffee (*Coffea arabica*).
- Márquez D. Kadir, Arévalo Luis, Gonzales Raúl (2014). Efectos del Abonamiento Nitrogenado sobre la Roya Amarilla (*Hemileia vastatrix* Berck et. Br.) en dos Variedades de *Coffea arabica*.
- Moncada, E., Vielma, M., & Mora, A. (2004). Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arábica* L. Variedad Catuaí Amarillo.
- Paz R., Angel A. (2000). Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 30 p.
- Sánchez Jhong, K; Cabrera Pintado, R; Jiménez D. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria* 10(2): 259 – 264.
- Sondahl, M. R. y Sharp, W. R.(1977). High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explant of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 81: 395-408