

Inducción de callos en hojas de caféto (*Coffea* sp.)*

****Vladimir OROZCO GARCÉS,**
****Gerardo de la CRUZ LICEA,**
****Dania MATEO HERNANDEZ**
y ****Orestes BARBAN VINAJERA**

RESUMEN. *Se estudió la inducción de callos en fragmentos de hojas de caféto. Se estableció un procedimiento de desinfección diferenciado que dio buenos resultados en la descontaminación. Se hallaron diferencias en la callogénesis, tanto para los distintos pares de hojas como para las diferentes variedades.*

INTRODUCCION

La técnica de inducción de callos se aplica con diversos fines en el cultivo *in vitro*. La masa de células, fundamentalmente indiferenciadas, que forma un callo, se utiliza para la obtención de suspensiones celulares y aislamiento de protoplastos; así como para la regeneración de plantas por organogénesis, en particular por embriogénesis somática, cuya manifestación constituye uno de los resultados más espectaculares en la biotecnología vegetal.

En el caféto la obtención de callos, como par-

te del proceso de embriogénesis somática, ha sido una de las técnicas que ha recibido mayor atención por diversos investigadores (Herman y Haas, 1975; Söndhal y Sharp, 1977; Dublin, 1981; Martínez, 1983; Pierson *et al.*, 1983; García y Menéndez, 1987; Santana, 1987).

Los objetivos de este trabajo fueron obtener una técnica de desinfección adecuada y determinar las hojas más aptas para la formación de callos en distintas variedades de caféto.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron hojas procedentes del primero al quinto nudos de las ramas plagiotrópicas en tres variedades de caféto: *Coffea arabica* L. (Caturra Rojo), y los híbridos CA-5, generación F₃, e Isla 6-14, generación F₆. La colecta del material se realizó en áreas de producción donde

se seleccionaron muestras sanas, vigorosas y sin daño mecánico.

*Manuscrito aprobado en enero de 1993.

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", apartado postal 2360, Bayamo, Granma, Cuba.

Para la desinfección, las hojas se lavaron con solución de detergente comercial al 1%, se enjuagaron con abundante agua corriente, y se colocaron en hipoclorito de calcio. Se utilizó un sistema diferenciado de concentraciones de cloro activo, según el par de hojas utilizado: primer par (1,56%), segundo par (1,95%), tercer par (2,34%), y cuarto y quinto pares (2,73%).

La desinfección se realizó en vacío (3,2 kPa) durante 10 min; tres veces consecutivas; se realizaron tres enjuagues con agua desionizada estéril, en condiciones asépticas; finalmente, las hojas se colocaron en solución de cisteína (25 mg/L).

Para el establecimiento del cultivo las hojas se seccionaron en porciones de un centímetro cuadrado aproximadamente, eliminando el borde y el nervio central. Los fragmentos se inocularon en tubos de ensayos de 25 x 150 mm, que contenían 10 mL del medio de cultivo, con el haz sobre la superficie del medio.

La solución nutritiva estaba compuesta por sales minerales de Murashige y Skoog (1962); vitaminas de Morel y Wetmore (1951); sacarosa 0,087 M; ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 5 μ mol; bencilaminopurina (BAP) 13,5 μ mol y agar 0,4%. El pH se ajustó a 5,6.

Los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, y humedad relativa de 75-80%.

Los resultados de la desinfección se evaluaron a las 72 h del establecimiento, y se determinaron los porcentajes de descontaminación.

El crecimiento de los callos en masa fresca se evaluó a las 12 semanas de iniciados los experimentos, utilizando la escala de Crocomo *et al.* (1976) modificada de la siguiente forma:

| Índice | Masa fresca (mg) |
|--------|----------------------------------------|
| 0 | Sin crecimiento |
| 1 | Crecimiento mínimo (menor de 750 mg) |
| 2 | Crecimiento medio (de 750 a 2 500 mg) |
| 3 | Crecimiento máximo (mayor de 2 500 mg) |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la desinfección del material vegetal se utilizaron inicialmente algunos tratamientos expuestos por Dublin (1981), Schöpke (1984) y Santana (1987), pero no se obtuvieron resultados satisfactorios (menos de 10% de descontaminación).

Después de una serie de ensayos se adoptó el procedimiento de desinfección diferenciado con el que se obtuvieron resultados superiores (Tabla 1). Los porcentajes de descontaminación más elevados se lograron en el segundo, el tercero y el cuarto pares de hojas para todas las variedades. Las concentraciones utilizadas no resultaron dañinas para el material vegetal.

El inicio del crecimiento del callo ocurrió a los seis días de establecido el cultivo, y se manifestó como un tejido de color crema que se originó en las superficies de corte. Este resultado coincide con lo obtenido por García y Menéndez (1987), pero supera lo logrado por Martínez

TABLA 1. Resultados del tratamiento de desinfección diferenciado (%).

| Número del par de hojas | Caturra | | |
|-------------------------|---------|------|-----------|
| | CA-5 | Rojo | Isla 6-14 |
| I | 65 | 50 | 75 |
| II | 100 | 60 | 90 |
| III | 80 | 80 | 90 |
| IV | 90 | 70 | 85 |
| V | 50 | 25 | 40 |

(1983), Mónaco *et al.* (1977), Montes (1981) y Sharp *et al.* (1973), que plantean un periodo de tiempo más prolongado para la iniciación del crecimiento de los callos.

Santana (1987) planteó que la posición de la hoja y su estado fisiológico desempeñan un papel determinante en la respuesta del tejido, y obtuvo los mejores resultados con las hojas del tercer y cuarto nudos de las ramas. Esto coin-

ide con lo obtenido en el presente trabajo, aunque también se exponen aspectos nuevos no planteados por otros autores.

Las hojas correspondientes al cuarto par presentaron la mejor tasa de inducción de callos, a cual fue de 100% en las tres variedades analizadas (Figs. 1, 2, 3). En relación con la magnitud del crecimiento de los callos hubo diferencias entre las distintas variedades.

En la variedad CA-5 (Fig. 1) el crecimiento máximo lo presentaron los explantes correspondientes al primer par de hojas, mientras que en la variedad Caturra Rojo ocurrió en los frag-

mentos foliares del tercer y quinto nudos (Fig. 2), y en Isla 6-14 se presentó en las secciones del cuarto par de hojas (Fig. 3). Estas diferencias pueden tener un origen varietal.

Al examinar el índice de crecimiento del callo en las diferentes variedades (Tabla 2), se observó que en CA-5 hubo un crecimiento máximo en 71,8% de los explantes, por lo que superó a la Caturra Rojo y a la Isla 6-14; sin embargo, esta última fue la única que presentó formación de callos en 100% de los explantes, independientemente del par de hojas a que correspondían.

% en cada nivel
120

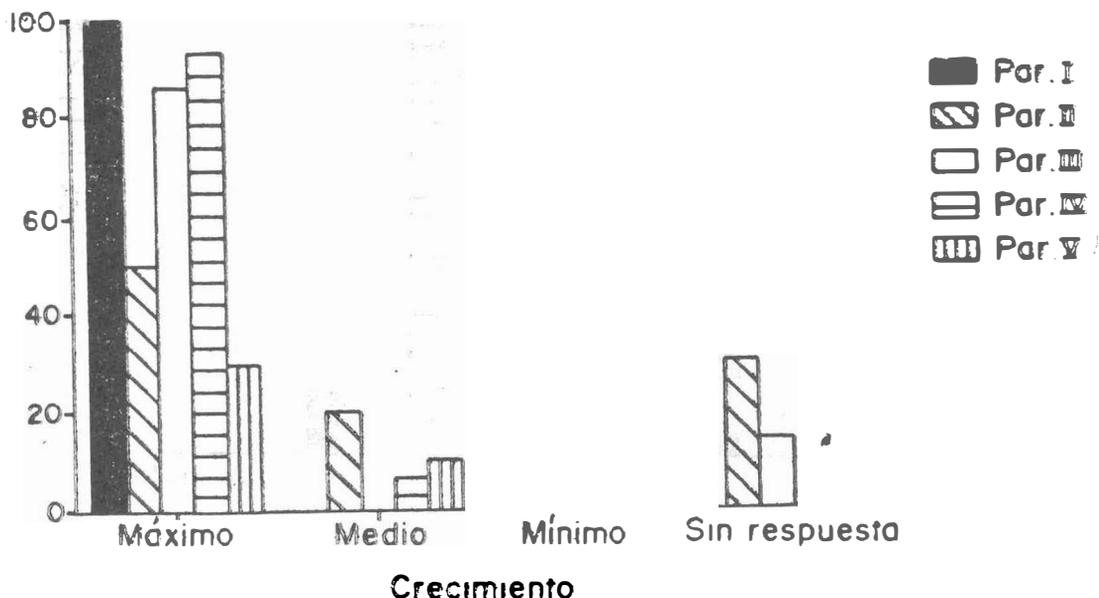


Fig. 1. Niveles de crecimiento de los callos en la variedad CA-5.

TABLA 2. Niveles de crecimiento de los callos en las diferentes variedades (%).

| Variedad | Niveles de crecimiento | | | |
|--------------|------------------------|-------|--------|---------------|
| | Máximo | Medio | Minimo | Sin respuesta |
| CA-5 | 71,8 | 7,4 | 12,0 | 8,8 |
| Caturra Rojo | 42,5 | 10,0 | 45,0 | 2,5 |
| Isla 6-14 | 43,4 | 37,0 | 19,6 | 0 |

% en cada nivel

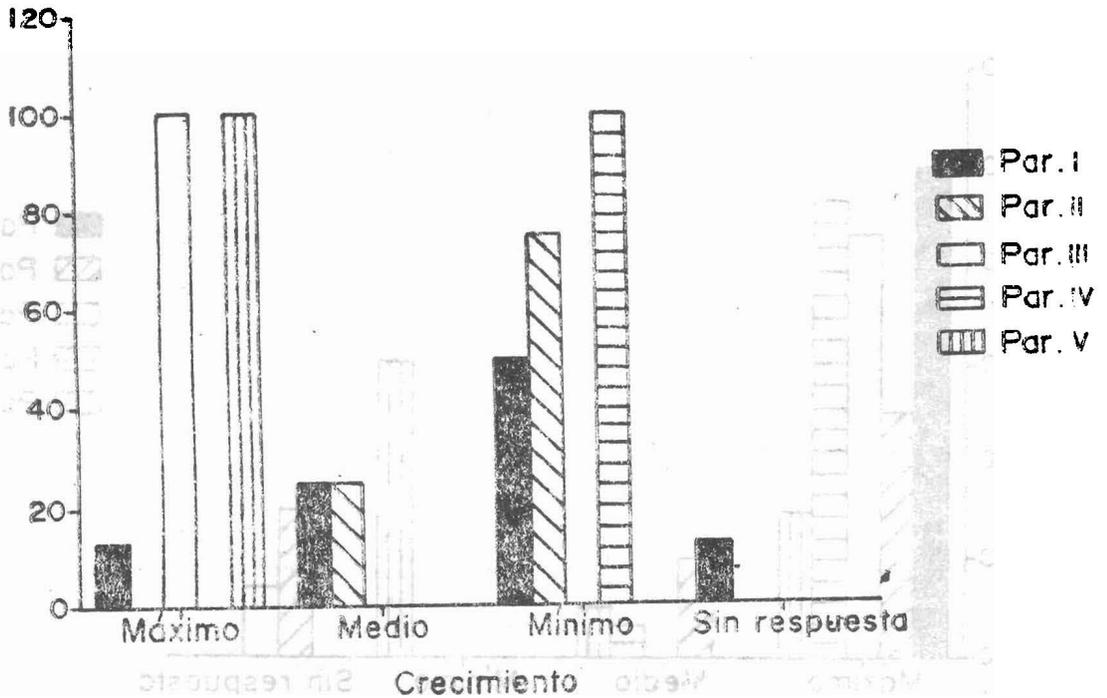
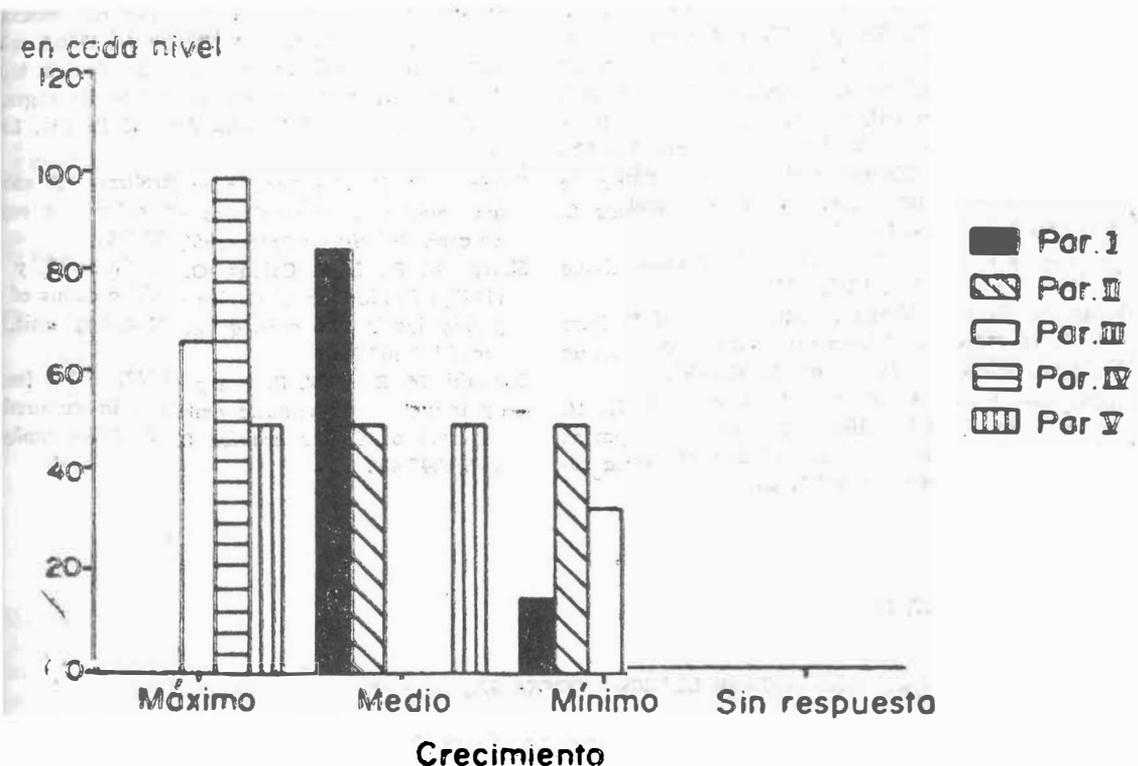


Fig. 2. Niveles de crecimiento de los callos en la variedad Caturra Rojo.



3. Niveles de crecimiento de los callos en la variedad Isla 6-14.

CONCLUSIONES

Existe una relación entre el origen del callo y el uso a que se le destina. Para la embriogénesis somática se necesitan callos con determinada potencialidad embriogénica que no es posible establecer en la fase de inducción de los

callos. Resultados preliminares de la fase de diferenciación (datos no mostrados) exhiben una embriogénesis más precoz y acentuada en las hojas del cuarto nudo de la variedad Isla 6-14.

REFERENCIAS

Alonso, C. J., J. E. Peters, y W. R. Sharp (1976): Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba*, 26(3):232-236.

Blin, P. (1981): Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Calé Cacao Thé*, 25(4):237-242.

García, E. de, y A. Menéndez (1987): Embriogénesis

somática a partir de explantes foliares del caféto

"Catimor". *Calé Cacao Thé*, 31(1):15-21.

Herman, E. B., y G. J. Hass (1975): Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *Hort. Sci.*, 10(6):588-589.

Martínez, G. (1983): "Propagación asexual *in vitro*

de *Coffea arabica* L. var. Caturra Amarillo, a partir de secciones de hoja", tesis de diploma, Xalapa, Veracruz, México, 63 pp.

- Mónaco, L. C., M. R. Sondahl, A. Carvalho, O. J. Crocomo, y W. R. Sharp (1977): Applications of tissue cultures in the improvement of coffee. En *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture* (J. Reinert y Y. P. S. Bajaj, eds.), Springer-Verlag, Berlín, pp. 109-129.
- Montes, S. (1981): Obtención de callus a partir de cultivo *in vitro* de anteras de *Coffea arabica* L. *Cultivos Tropicales*, 1:37-44.
- Morel, G., y R. H. Wetmore (1951): Fern callus tissue culture. *Amer. J. Bot.*, 13:201-217.
- Murashige, T., y F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and broassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15:473-497.
- Pierson, E. S., A. A. M. van Lammeren, J. H. N. Scheel, y G. Staritsky (1983): *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 115(2/3):208-216.
- Santana, N. (1987): "Determinación del método de selección del material vegetal, desinfección del mismo y el control de la oxidación de los tejidos" [inédito], informe del cumplimiento de etapa, Instituto Nacional de Ciencia Animal (INCA), La Habana.
- Schöpke, C. (1984): Resultados preliminares sobre el aislamiento de protoplastos en diferentes especies de café. *Boletín de Promecaté*, 25:7-9.
- Sharp, W. R., L. S. Caldas, O. J. Crocomo, y otros (1973): Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyton*, 31(2):67-74.
- Söndahl, M. R., y W. R. Sharp (1977): High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81(5):395-408.

Ciencias Biológicas 27, 1994

CALLUS INDUCTION ON COFFEE-TREE LEAVES (*COFFEA* SP.)

Vladimir OROZCO GARCÉS,
Gerardo de la CRUZ LICEA,
Dania MATEO HERNANDEZ
and Orestes BARBAN VINAJERA

ABSTRACT. *Callus induction on coffee-tree leaves was studied. A procedure for differentiated disinfection was established, it produced good results. Some differences in callogenesis were found either in different pair of leaves and different varieties.*

