



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE ARONOMÍA

Tesis en opción al Título de Ingeniero Agrónomo

**Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L.
cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo
RITA® y su conversión en casa de cultivo**

Autora: Hien Nguyen Thi

Tutores:

Dr. C. Raúl Barbón Rodríguez.

Dr. C. Manuel de Feria Silva.

Consultante principal:

Dr. C. Michel Leiva Mora.

Santa Clara

2014

Hago constar que el presente trabajo de diploma fue realizado en la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas como parte de la culminación de estudios de la especialidad de Ciencias Agronómicas, autorizando a que el mismo sea utilizado por la Institución, para los fines que estime conveniente, tanto de forma parcial como total y que además no podrá ser presentado en eventos, ni publicados sin autorización de la Universidad.

Firma del Autor

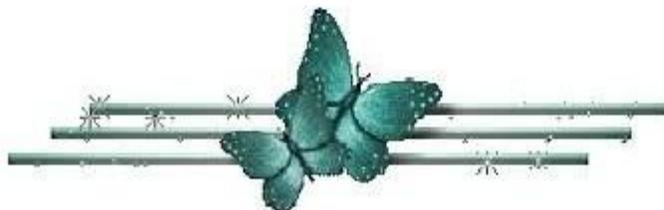
Los abajo firmantes certificamos que el presente trabajo ha sido realizado según acuerdo de la dirección de nuestro centro y el mismo cumple con los requisitos que debe tener un trabajo de esta envergadura referido a la temática señalada.

Firma del Autor

Firma del Jefe de Departamento donde se defiende el trabajo

Firma del Responsable de
Información Científico-Técnica

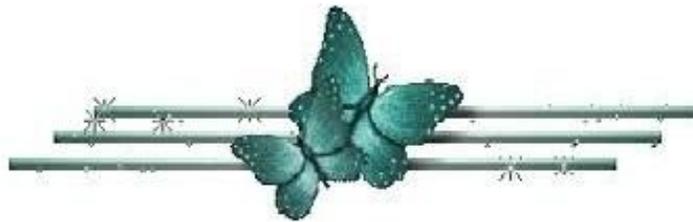
PENSAMIENTO



"Lo más valioso que un hombre posee es la vida. Se le da a él sólo una vez y por ello debe aprovecharla de manera que los años vividos no le pesen, que la vergüenza de un pasado miserable y mezquino no le quemé y que muriendo pueda decir: he consagrado toda mi vida y todas mis fuerzas a lo más hermoso en el mundo, a la lucha por la liberación de la humanidad..."

"Así se templó el acero" - Nikolai Ostrovski

DEDICATORIA



A mis padres por haberme dado la vida, por el amor de la vida

A mis hermanos Huy y Hòà

A toda mi familia

AGRADECIMIENTO



A mis padres por sus amores sin condiciones, sus sacrificios, son mi razón, mi aspiración.
A mis hermanos Huy y Hòa, a mi cuñada Hằng y mis sobrinos Thủy Tiên y Trường Giang:
gran parte de mi vida que les quiero.

A toda mi familia que siempre me apoyan.

A mis tutores, Dr. C. Raúl Barbón Rodríguez, Dr. C. Manuel de Feria Silva por la ayuda
sin condiciones, por brindarme sus conocimientos y ayuda en todos momentos que los
necesite.

A mi consultante Dr. C. Michel Leiva Mora por su gran ayuda y consulta para terminar
este trabajo.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que me han enseñado
no solo el conocimiento sino la formación de personalidad durante los años de la carrera,
son reflejo de mi formación y ejemplo a seguir.

A los investigadores y trabajadores de Instituto de Biotecnología de las Plantas por la
simpatía y la ayuda en el tiempo que he trabajado aquí.

A mis queridos profesores Yolanda Morales y Carlos Andreu: es una maravilla de
conocerles en mi vida gracias por la atención, la ayuda y el cariño que me han prestado.

A mis amigas: Hoàng Hên, Thùy Dung, Lý Nương y Thu Hà. Gracias a la amistad sincera
de ustedes, siempre están en mi corazón.

A mis compañeros vietnamitas en Cuba: Ngọc Anh "Sara", Elena Hường, Hải, Tú,
Hương, Thảo, Bắc, Nghĩa, Lan, Daniela, Quỳnh, Việt...por estar siempre a mi lado, y
haber compartido tanto en los buenos y malos momentos.

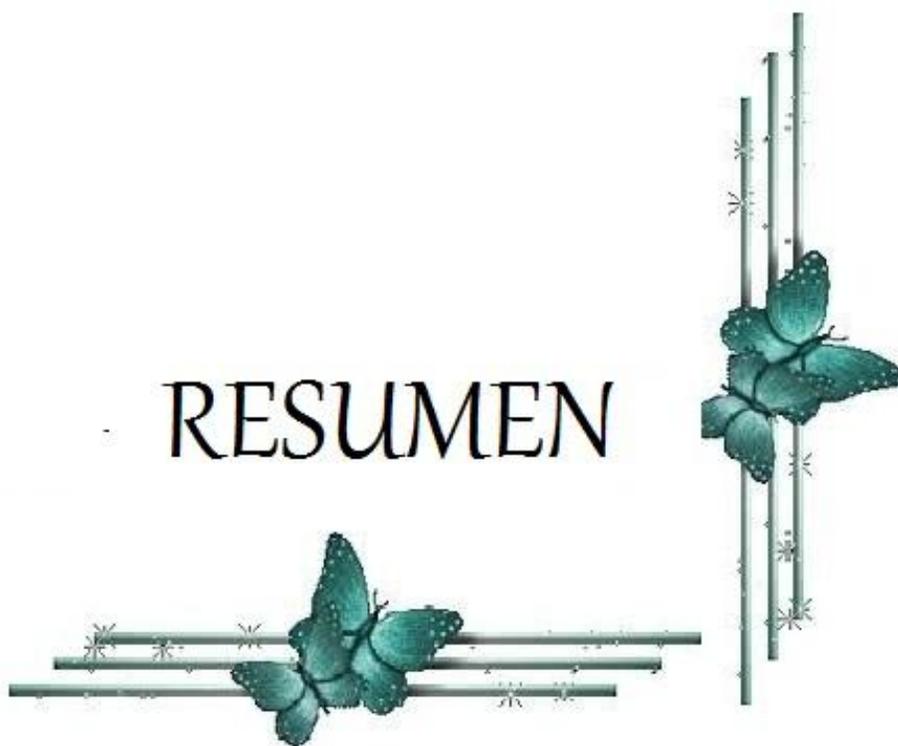
A mis compañeros de aula: Dorivaldo, Rosalí, Hianny, Alberto, Dairon, Diana, Domingo,
Urbano, Alfredo, Alejandro Pérez, Orduña, Ramón y Yamila por su amistad y ayuda en
los años de la carrera, nunca les olvidaré.

A los profesores de la dirección de atención a los estudiantes extranjeros: Luis Romero
y Amelita por sus atenciones.

A la revolución cubana y la amistad entre Viet Nam y Cuba que me han brindado la
oportunidad de estudiar, conocer Cuba.

A todos, muchas gracias !!!

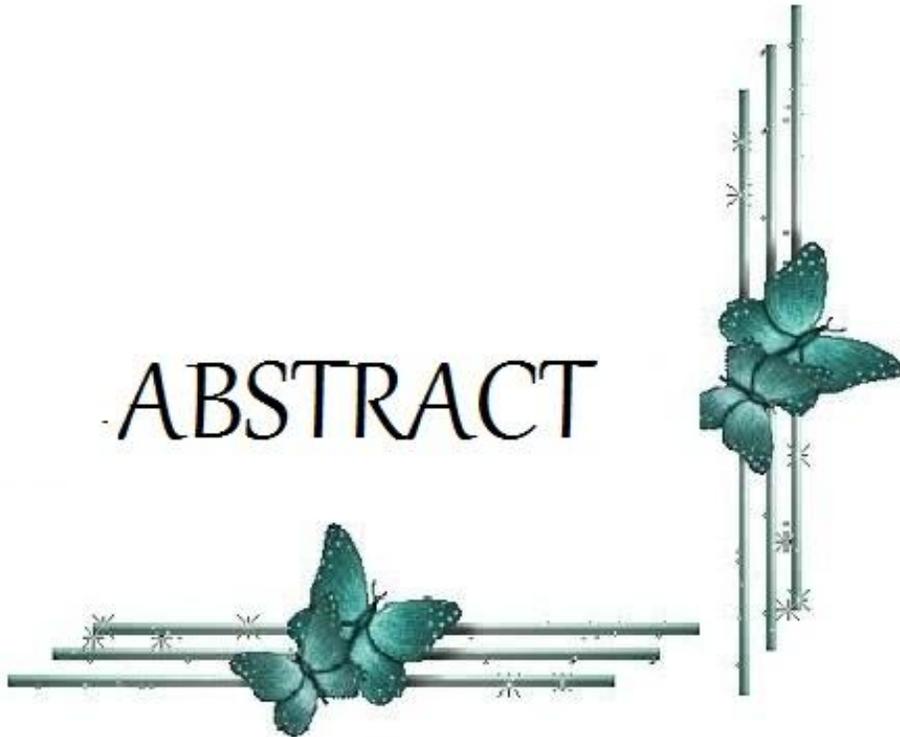
RESUMEN



RESUMEN

El cultivo de café constituye un renglón importante para incrementar los ingresos de la economía nacional por concepto de exportación del grano. El desarrollo de la embriogénesis somática de cafeto en medios de cultivo líquido es una alternativa viable para la propagación de esta especie. El empleo de los medios de cultivo en estado líquido combinado con sistemas de cultivos basados en la inmersión temporal de los explantes, podría incrementar la germinación y mejorar la calidad de las plantas para su conversión en condiciones *ex vitro*. Para ello se propusieron como objetivos determinar el efecto de la densidad de inoculación en la germinación de los embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®], además de evaluar el efecto de la composición y tipo de sustrato en el crecimiento y desarrollo de las plantas en la fase de aclimatización. Se emplearon diferentes densidades de inóculo (40, 50, 60, 70 y 80 embriones somáticos por RITA[®]). A los 90 días de cultivo se evaluaron variables morfológicas como: el número de embriones somáticos con germinación parcial y total, síntomas de hiperhidricidad, número de hojas verdaderas, longitud y desarrollo radicular. Mientras que, en la fase de aclimatización se emplearon diferentes composiciones de sustrato (85% humus de lombriz-15% Zeolita, 75% humus de lombriz-25% Zeolita, 65% humus de lombriz-35% Zeolita, 50% humus de lombriz-50% Zeolita) y se evaluó: la altura de las plantas, el número de hojas, longitud de la raíz principal, la masa fresca, la masa seca, el área foliar. El mejor resultado en los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®] se logró con la densidad de inóculo de 70 ES por RITA[®] con un 60% de germinación y con un buen desarrollo de longitud de las plantas y número de hojas con respecto a los otros tratamientos. Se alcanzó un buen desarrollo y supervivencia de las plantas procedentes de embriogénesis somática en los diferentes tratamientos de composición y tipo de sustrato. Sin embargo, el mejor resultado en cuanto al desarrollo morfológico de las plantas se obtuvo con los sustratos compuestos por 75% Humus de lombriz-25% Zeolita y 85% Humus de lombriz-15% Zeolita, con una supervivencia de 100 y 96.4% respectivamente.

ABSTRACT



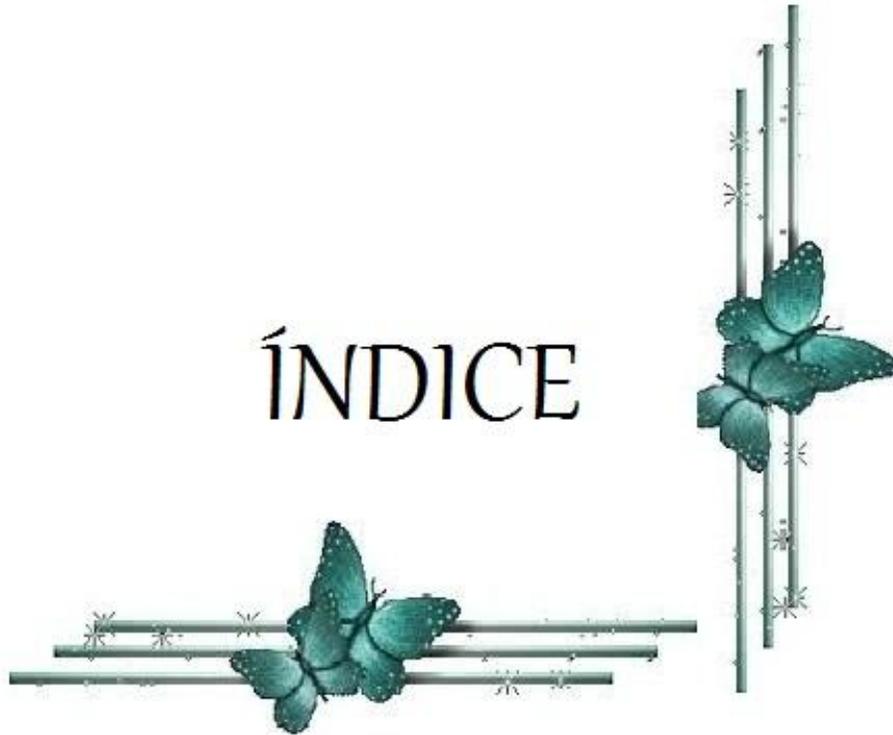
Hien Nguyen Thi (2014)

Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® y su conversión en casa de cultivo

ABSTRACT

The cultivation of coffee is an important income increase of the national economy from exports of grain screed. The development of somatic embryogenesis of coffee in liquid culture medium is a viable alternative to the propagation of this species. The use of liquid culture medium in combination with temporary immersion systems of explants, it could increase the germination and improve the quality of plants for conversion to *ex vitro* conditions. It were proposed as objective to determine the effect of inoculation density germination of somatic embryos of *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo in Temporary Immersion Systems RITA[®] type and the effect of composition and substrate type on growth and development of plants in the acclimatization phase. It were used different inoculum densities (40, 50, 60, 70 and 80 somatic embryos per RITA[®]). After 90 days of culture and morphological variables were evaluated: the number of somatic embryos with partial and total germination, hyperhydricity symptoms, number of true leaves, length and root development. While in the acclimatization phase various compositions of substrate were used (85% worm humus-15% zeolite, 75% worm humus-25% zeolite, 65% worm humus-35 % zeolite, 50% worm humus -50% zeolite) and it was evaluated: plant height, number of leaves, length of the main root, fresh weight, dry weight, leaf area. The best result in Temporary Immersion Systems RITA[®] type was achieved with inoculum density of 70 somatic embryos by RITA[®] with 60% of germination and nice growth of plant length and number of leaves with respect to the other treatments. It was reached a good growth and survival of plants from somatic embryogenesis in the differents treatments and type of substrate composition. However, the best result in terms of the morphological development of the plants was obtained with substrates composed worm humus 75%-25% zeolite and 85% worm humus-15% zeolite , with a survival of 100 and 96.4% respectively .

ÍNDICE



Hien Nguyen Thi (2014)

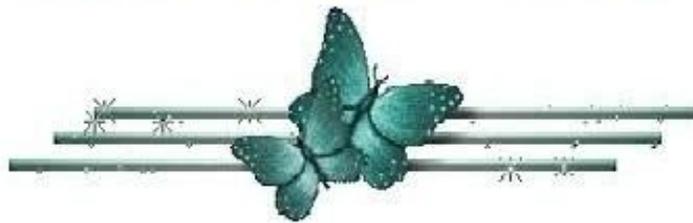
Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® y su conversión en casa de cultivo

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. El cafeto. Generalidades	3
2.1.1. Ubicación taxonómica y descripción botánica	4
2.2. Propagación <i>in vitro</i> . Generalidades	5
2.2.1. Embriogénesis somática	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Determinación del efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®	22
3.2. Efecto de la composición y tipo de sustrato en el crecimiento y desarrollo de las plantas obtenidas <i>in vitro</i> en la fase de aclimatización	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Determinación del efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de <i>Coffea arabica</i> L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®	27
4.2. Efecto de la composición y tipo de sustrato en el crecimiento y desarrollo de la planta <i>in vitro</i> en la fase de aclimatización	33
5. CONCLUSIONES	46
6. RECOMENDACIONES	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes, ocupa el segundo lugar en el comercio internacional después del petróleo. Como cultivo abarca aproximadamente 10.2 millones de hectáreas en más de 80 países sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y América Latina. La economía de muchos países productores de café depende en gran medida de las ganancias de este cultivo. Más de 100 millones de personas obtienen sus ingresos directa o indirectamente de las áreas cultivadas de café (ICO, 2010).

En Cuba, el cultivo de cafeto constituye un renglón importante para incrementar los ingresos de la economía nacional por concepto de exportación del grano; por esto, existen alrededor de 160 000 ha destinadas a su cultivo (MINAGRI, 2010).

El cultivo de células y tejidos vegetales desempeña un papel importante en la biotecnología agrícola. La embriogénesis somática como método de regeneración de plantas se ha logrado en un gran número de familias y especies y se ha usado para los estudios básicos de fisiología vegetal y en aplicaciones más prácticas, como la micropropagación y la transformación genética.

El cultivo de tejidos aplicado al cafeto es un tema que actualmente ocupa a varios laboratorios en todo el mundo. La producción de embriones somáticos en biorreactores, su germinación en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), la crioconservación y el mejoramiento genético han sido y continúan estando entre las principales temáticas de investigación (Santana-Buzzy *et al.*, 2007).

La aplicación de la embriogénesis somática para la multiplicación acelerada de plantas de café se ha desarrollado a partir de numerosas técnicas que simplifican este proceso que busca establecer la producción de plantas de gran potencial y reducir los costos de producción de posturas (de Rezende *et al.*, 2012).

A principios de 1990, se lograron importantes avances hacia la implementación comercial de la embriogénesis somática de cafeto en medio de cultivo líquido (Zamarripa *et al.*, 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992; Zamarripa *et al.*, 1993; Van Boxtel y Berthouly, 1996). Estos avances dieron lugar a la realización de estudios a escala de biorreactores.

La germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo semisólido es un proceso que demora entre ocho y doce semanas de cultivo para completarse y disponer de plantas con al menos cuatro pares de hojas y las características necesarias para su transferencia a condiciones *ex vitro*. Los porcentajes de germinación que se logran en estas condiciones de cultivo no superan el 60% y no siempre se logra una germinación completa de los embriones somáticos (de Feria *et al.*, 2005).

El desarrollo de la embriogénesis somática de café en medio de cultivo líquido es una alternativa viable con respecto a la propagación en medios de cultivo semisólido según se ha demostrado al trabajar con *Coffea canephora* P. ex F. (Robusta) e híbridos F1 de *Coffea arabica* L. (Ducos *et al.*, 2007).

El empleo de medios de cultivo en estado líquido combinado con sistemas de cultivos basados en la inmersión temporal de los explantes, podría disminuir aún más estos plazos de tiempo, incrementar en los porcentajes de germinación y mejorar la calidad de las plantas para su conversión en condiciones *ex vitro*.

Es por ello, que se propone como **hipótesis** de trabajo la siguiente:

Con el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®] se logrará la germinación de los embriones somáticos de café y la obtención de plantas con mayor calidad para su aclimatación.

Objetivo general:

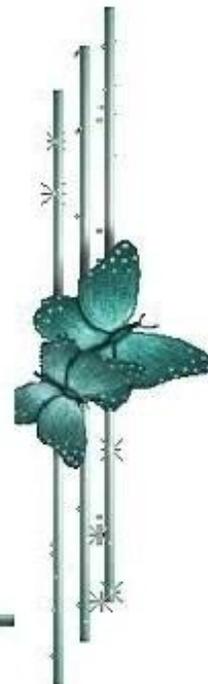
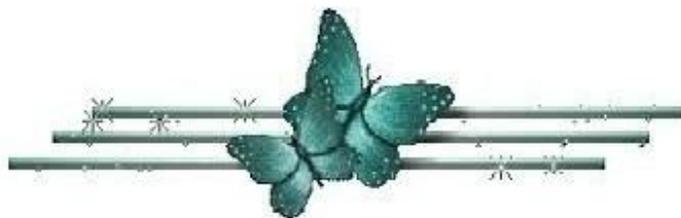
- Lograr la germinación de embriones somáticos de café en sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®] y la supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*.

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la densidad de inóculo en la germinación de embriones somáticos de café en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®].
- Evaluar la composición y tipo de sustrato en la respuesta de la planta propagada *in vitro* durante su desarrollo en casa de cultivo.

CAPÍTULO 11

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El café. Generalidades

El género *Coffea*, pertenece a la gran familia botánica de las rubiáceas, de las cuales existen hasta hoy catalogadas unas cinco mil especies o más. A este mismo género pertenecen la ipecacuana, la rubia, la quina, el dagame y otras con propiedades muy diferentes. Existentes plantas herbáceas, arbustos y árboles más o menos corpulentos que en muchas localidades constituyen la mayor parte de la vegetación forestal, pero sin que tengan en su aspecto, frutos, flores y propiedades nada en común con el café a no ser el pertenecer a una misma familia botánica. Después de realizar muchos estudios botánicos profundos de estas especies se pudo revisar y depurar el género *Coffea* de un cierto número de vegetales que se encontraban en él de manera desplazada, recibiendo el nombre de falsos cafés. En lo que al género se refiere existen unas setentas especies de las cuales solo una decena tiene importancia desde punto de vista agrícola, para la producción de café. Se han señalado un número de rubiáceas, cuyos frutos se asemejan más o menos a los del género de *Coffea*, existiendo un hecho muy curioso y que sus semillas no contienen cafeína (Fernández *et al.*, 1988).

El café es una planta provista de un eje central, que presenta en su extremo una parte meristemática en crecimiento activo permanente que da lugar a la formación de nudos y entrenudos. Las ramas laterales o plagiotrópicas se alargan en forma permanente, lo que sumado al crecimiento vertical le da una forma piramidal a la planta. Las ramas primarias son aquellas que condicionan el crecimiento lateral de los cafés, conociéndose también con el nombre de "bandolas". En tanto que, las ramas ortotrópicas permiten el crecimiento vertical de las plantas y solo producen yemas vegetativas y nunca flores (Duicela y Sotomayor, 1993).

La fructificación del café de cada año, se va formando en nudos nuevos, en tejido vegetal de un año y por una sola vez. En otras palabras, el área productiva de las plantas o cosecha del año forma en los nudos que se desarrollan el año precedente (Duicela y Sotomayor, 1993). La flor del café es hermafrodita y en cuanto a la semilla, se caracteriza por tener un embrión bastante pequeño y de color blanquecino, localizado en la parte dorsal y basal de esta; este consiste en un cuerpo cilíndrico que tiene los cotiledones superpuestos que miden de dos a cinco milímetros. Durante la fase de

Hien Nguyen Thi (2014)

germinación de la semilla, brota la radícula que se curva luego hacia la tierra o arena para producir raicillas laterales. El hipocótilo se desarrolla levantado los cotiledones que se encuentran envueltos en el pergamino. La película plateada y el resto del endospermo posteriormente se destruyen.

2.1.1. Ubicación taxonómica y descripción botánica

Según Cronquist (1988), desde el punto de vista de la ubicación taxonómica, la especie en estudio se encuentra dentro de la:

Clase: Magnoliophyta

Subclase: Asteridae

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: Coffea

El género *Coffea* Linn. Syst. ed I (1735), está dividido en cuatro secciones, *Paracoffea* Weg., *Argocoffea* Che., *Mascarocoffea* Chev. y *Eucoffea* K. Shum.

Dentro de la sección *Eucoffea*, se agrupan todas las especies cultivadas, pero fundamentalmente y dentro de la subsección *Erythracoffea* Chev. se encuentran las dos especies más importantes, *Coffea arabica* Linn. Sp. Pl. 172. y *Coffea canephora* Pierre. ex Froehn.

La especie *Coffea arabica* L. es originaria de las regiones montañosas del Sudán y del sudoeste de Etiopía. Este cafeto alotetraploide, es autofértil y se multiplica prácticamente por autofecundación (Charrier, 1989). Se trata de un arbusto de dos a cuatro metros de altura, hojas con pecíolo corto y opuestas, las estípulas interpecioladas son deltoides y acuminadas, el ovario es ínfero (bilocular) y la germinación de la simiente es retardada. El Caturra una variedad de Buorbón, se ha cultivado ampliamente en los últimos años por su gran producción y su muy buena adaptación en el medio ambiente en la zona cafetalera. Se cultiva principalmente en América Latina y es muy consumida en el mundo debido a su alta calidad de la bebida y productividad.

La especie *Coffea canephora* Pierre. ex Froehn. es originaria de la zona comprendida desde la costa occidental de África hasta el norte del Lago Victoria (Congo). Esta especie se caracteriza por ser de mayor altura que la especie *C. arabica* L. es diploide por lo que

Hien Nguyen Thi (2014)

es autoincompatible, presenta hojas grandes con nervaduras salientes y con simientes menores con respecto a *C. arabica* L. (Coralsa, 2009).

2.2. Propagación *in vitro*. Generalidades

El cafeto es un cultivo importante del mundo. Al igual que con muchos cultivos perennes de plantación, el café es extremadamente difícil de mejorar. Lleva cuatro años a partir de semillas para sembrar y a los menos seis ciclos de autopolinización; casi 28 años están obligados a completar un ciclo de reproducción. Para ello es necesario desarrollar estrategias alternativas para el mejoramiento genético del cafeto.

El cultivo de tejido vegetal desempeña un papel importante en la biotecnología agrícola, permite la regeneración *in vitro* y multiplicación de plantas en condiciones axénicas, proceso conocido como la micropropagación. Hasta la fecha, la micropropagación es la aplicación más común de cultivo de tejidos. El alto costo de la micropropagación, sin embargo, limita su aplicación sobre todo a las plantas ornamentales de alto valor, cultivos de plantación y la silvicultura. El cultivo de tejidos de café se estudia actualmente en varios laboratorios en todo el mundo (Van der Vossen, 2001). La producción de embriones somáticos en biorreactores, la producción de la semilla artificial, la crioconservación, la variación somaclonal y transformación genética son las principales áreas de investigación. También se ha descrito la utilización de otras técnicas de cultivo *in vitro*, como el rescate de embriones apicales, la fusión de protoplastos, así como micropropagación de yemas axilares (Santana *et al.*, 2007).

El cafeto se propaga convencionalmente por semillas o por esquejes vegetativos. La propagación de semillas se asocia con la variación genética incontrolada inherente a cultivares heterocigotos, bajas tasas de multiplicación de semillas y el corto espacio de viabilidad de la semilla. La propagación de cafeto por esquejes vegetativos garantiza la uniformidad, aunque se generan relativamente bajas tasas de multiplicación, ya que sólo se pueden obtener en las ramas ortotrópicas. La multiplicación por técnicas de cultivo de tejidos podría proporcionar una alternativa viable a estos métodos tradicionales de propagación de cafeto. Los métodos de cultivo de tejidos permiten la producción de plantas relativamente uniformes a escala masiva en un período más corto, y con una base genética más estrecha que los menores de los métodos convencionales. Diversos

Hien Nguyen Thi (2014)

enfoques que se han considerado para la multiplicación *in vitro* de especies de café son la embriogénesis somática, el cultivo de meristemas, de yemas axilares y el desarrollo de yemas adventicias (Kumar *et al.*, 2006).

2.2.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que en todo tejido somático vegetal existe la capacidad de desarrollarse un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento (Kamle *et al.*, 2011). La primera demostración de que las plantas podían producir embriones somáticos *in vitro* fue publicada en (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958). Este es un hecho bien establecido en más de 200 especies de importancia agronómica. Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, de tejidos reproductivos, de embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de las partes de la planta (Jiménez, 2005).

En el caso del café, las variedades de la especie *Coffea arabica* L. son vendidas en forma de semillas luego de un proceso de selección relativamente largo, que necesita al menos 20 años. La embriogénesis somática puede permitir la rápida propagación de clones seleccionados de la propia especie incompatibles *C. canephora* P. ex. F. (Robusta) y el híbrido Arabusta (*C. canephora* X *C. arabica*). Para la especie *C. arabica* L. (autógamas) su uso principal es para la propagación de híbridos F1 (Lacerra *et al.*, 2010).

En el café, se puede lograr la embriogénesis somática de forma directa (ESD) a partir de células proembriogénicas del tejido con ausencia de callo embriogénico o por embriogénesis somática indirecta (ESI) a través de la formación de callo (Jiménez, 2001; Molina *et al.*, 2002). Este proceso en *Coffea arabica* L. se ha demostrado histológicamente por Sondahl *et al.* (1979), Michaux-Ferrière *et al.* (1989) y Quiroz-Figueroa *et al.* (2002). La embriogénesis somática directa tiene la ventaja de reducir la variación somaclonal y puede ser el único procedimiento para la obtención de la embriogénesis somática para los genotipos de café recalcitrantes a ESI (Van Boxtel y Berthouly, 1996). Además, el tiempo necesario para la obtención de embriones somáticos por la ESD es más corto en comparación con ESI (Giridhar *et al.*, 2004).

Hien Nguyen Thi (2014)

En las plantas, el proceso embriogénico tiene lugar normalmente dentro de la semilla después de la fusión de polen con el óvulo. Sin embargo, este proceso también puede inducirse en las técnicas *in vitro*, o de las células del gametofito sin la fertilización o de las células del explantes vegetativas. El proceso de embriogénesis somática (ES) es inducido, en general, exponiendo el explante a un estrés y/o la presencia de reguladores de crecimiento exógenos. Las células competentes responden directamente comenzando la embriogénesis del explante o indirectamente produciendo callo seguido por la formación del embrión somático (Thorpe y Stasolla, 2001). Ambos, tanto la embriogénesis somática directa como la embriogénesis somática indirecta pueden determinarse en el mismo explante.

La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Esta técnica permite incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los costos de producción y la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (de Feria, 2000).

En *C. arabica* L., se ha inducido callos con éxito a partir de semillas, hojas y anteras de dos cultivares diferentes (Mundo Novo y Bourbon Amarelo) (De Sharp *et al.*, 1976). Durante los últimos años, un número de protocolos para la embriogénesis somática han sido desarrollados para diversos genotipos de café (Etienne *et al.*, 2002).

El primer protocolo para obtener callos con alto potencial embriogénico a partir de los explantes foliares de *C. arabica* L. cv. Bourbon utilizó dos composiciones de medios de cultivo diferentes: un primer medio de cultivo de "condicionamiento" y un segundo medio de cultivo de "inducción" (Sondahl y Sharp, 1977; Sondahl *et al.*, 1979). La disponibilidad de la auxina es crítico para la inducción de callos embriogénicos (Sondahl and Sharp, 1977). En el café, se establecieron tanto la embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) y la embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF). Durante la inducción de embriones somáticos en *C. arabica* L. cv. Caturra Rojo, dos tipos de grupos de células se observaron: células embriogénicas y no embriogénicas se observaron (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). Se observaron las diferencias en la expresión génica, tanto a nivel de ARN y proteínas entre los grupos de células embriogénicas y las no embriogénicas. Además, se observó que el número de genes no expresados en las células somáticas

Hien Nguyen Thi (2014)

para adquirir el estado embriogénico es mayor que los genes que están activados (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002).

2.2.3.1. Fases de embriogénesis somática

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye las siguientes fases (Freire, 2003):

- Inducción de los embriones somáticos
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación
- Conversión

Inducción

Todas las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La expresión temporal y espacial de los genes es fuertemente regulada para permitir la diferenciación de varios sistemas de órganos, así como el desarrollo de una planta. La inducción de la embriogénesis somática consiste en la terminación del patrón de expresión de los genes presentes en el tejido del explante, siendo esto reemplazado con un programa de expresión de genes o gen de la embriogénesis en aquellas células del tejido del explante que pudieran dar lugar a embriones somáticos. Este concepto fue planteado por primera vez por Evans *et al.* (1981), Sharp *et al.* (1984) y Etienne *et al.* (2002) quienes usaron los términos siguientes:

-*Inducción de la embriogénesis en determinadas células* (IEDC) para describir una embriogénesis celular que tuvo origen en una célula no embriogénica.

-*Células somáticas determinadas preembriogénicamente* (CsDPE) para describir aquellas células de embriones cigóticos de plantas, las cuales siempre expresan un programa de expresión de los genes embriogénicos.

En la mayoría de casos la inducción de callo es variable, y sólo en algunos tejidos se logra una mayor proporción de callo embriogénico, caracterizado por la presencia de células isodiamétricas con núcleos grandes; otros tejidos producen mayor cantidad de

Hien Nguyen Thi (2014)

callo conformado por células parenquimatosas alargadas no embriogénicas. El grado de desarrollo de los explantes como hipocótilos y hojas, puede inducir la formación de la embriogénesis directa (Dublin, 1981; Giridhar *et al.*, 2004), en lugar de callo embriogénico con alto potencial de multiplicación (López *et al.*, 2010).

Las aplicaciones de inhibidores de la producción de etileno como los cationes cobalto (Co^{2+}) y de los cationes de plata (Ag^+) impiden la formación de los embriones somáticos. Los resultados obtenidos por (Fuentes *et al.*, 2000) indican que el etileno desempeña un papel importante en la regulación de la embriogénesis somática de *Coffea canephora* P. ex F.

Nomura y Komamine (1995) plantearon la hipótesis en la que el nivel endógeno de auxinas provocaba la polaridad de la masa embriogénica, lo cual es indispensable para la inducción de la embriogénesis somática. Las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad de la masa embriogénica al difundirse dentro de la misma, lo que induce la inhibición del proceso embriogénico iniciado por las auxinas endógenas, por lo que esta hipótesis postula que las auxinas juegan un doble papel. Este papel de las auxinas y específicamente el 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) fue descrito por Puigderrajols *et al.* (2001) en la inducción de la embriogénesis somática en *Quercus suber* L.

La inducción de la embriogénesis somática activa rutas de control genético similares a las que presenta la embriogénesis cigótica, lo cual se puede considerar como un fenómeno universal para todas las plantas; sin embargo genotipos individuales dentro de una especie muestran capacidad embriogénica variada. Tales diferencias genotípicas en la capacidad embriogénica son el reflejo de diferencias en la activación de elementos importantes en la ruta embriogénica.

Proliferación

Uno de los más poderosos aspectos de la embriogénesis somática que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a proliferar o multiplicarse indefinidamente (Merkel *et al.*, 1996). Los procesos de multiplicación han recibido varios términos como embriogénesis somática secundaria, recurrente o repetitiva.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La proliferación de células embriogénicas es aparentemente influenciada por un número de factores, algunos de los cuales pueden ser controlados durante el proceso y otros que todavía no han sido definidos, siendo muchos de estos los mismos que afectan el proceso de inducción de la embriogénesis somática anteriormente señalados. El más fuerte factor asociado con la continua proliferación de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo, parece ser que el efecto del regulador de crecimiento no puede ser considerado independiente, lo cual evidencia la interacción entre ambos. Una vez que un grupo de células embriogénicas han sido obtenidas, la presencia continuada del regulador de crecimiento inhibe el normal desarrollo y maduración del embrión somático, pero si el nivel de auxinas es relativamente alto, un nuevo ciclo de producción de embriones somáticos es iniciado (Jiménez, 2005).

El papel exacto de la auxina en el estímulo de la proliferación en oposición al desarrollo del embrión somático es desconocido. Además los niveles de auxina necesarios para mantener la embriogénesis repetitiva varían entre especies. Si los niveles de este regulador de crecimiento baja demasiado o es eliminada se produce el desarrollo y maduración de los embriones somáticos (Jiménez, 2005).

En cafeto, la proliferación celular es usualmente obtenida sin dificultad a partir de suspensiones celulares embriogénicas establecidas en Erlenmeyers. Los protocolos que describen el establecimiento de suspensiones embriogénicas para diferentes especies de cafeto, y su regeneración eficiente, han estado descritos por varios investigadores. Las suspensiones celulares embriogénicas son el material más frecuentemente empleado para inocular biorreactores con vista a lograr la producción masiva de embriones somáticos (Zamarripa *et al.*, 1991; Noriega y Söndahl, 1993; Van Boxel y Berthouly, 1996; Etienne *et al.*, 1997).

En investigaciones realizadas en Sistemas de Inmersión Temporal, Dufour *et al.* (1995) observaron para diferentes genotipos de *Coffea arabica* L. que ese crecimiento del callo embriogénico fue mayor en Erlenmeyers en agitador orbital. Además, observaron que la inducción de la inmersión jugó un papel importante en el proceso morfogénico. Una inmersión de 1 min cada 6 h fue condición óptima para la proliferación celular; mientras que, una inmersión más larga (15 min) aplicada en la misma frecuencia (cada 6 h) indujo a completar la regeneración de embriones somáticos.

Hien Nguyen Thi (2014)

Maduración

La etapa de maduración es un complejo período de desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y se adquieren tolerancia a la desecación (Parrott, 1993).

En términos de nutrición es fundamental tener en cuenta los suplementos del medio de cultivo como las auxinas, los carbohidratos, el nitrógeno y el ABA (ácido abscísico) (Frenando y Gamage, 2000).

La presencia de nitrógeno en el medio de cultivo se garantiza con la adición de nitratos, amonios, aminoácidos y caseína hidrolizada. McKersie y Bowley (1996) encontraron que la adición de prolina como suplemento del medio de cultivo favorece el número y el tamaño de embriones somáticos de *Medicago sativa* L. (alfalfa); mientras la glutamina y la arginina sólo incrementan el tamaño del embrión somático.

La correcta acumulación de sustancias de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de los embriones somáticos lo que indica una alta calidad en el vigor e influye positivamente en su posterior germinación (Fuji *et al.*, 1990).

La adición de ABA durante la etapa de maduración del embrión somático promueve la acumulación de sustancias de reserva; esto, seguido de un apropiado tiempo de secado, puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático. Sin embargo, en algunas especies no es necesaria la desecación para lograr una buena germinación (Arcioni y Mariotti, 1982; Kott y Beversdorf, 1990).

Germinación y Conversión en plantas

Varios autores al pasar embriones somáticos de las condiciones de maduración a germinación directamente han alcanzado pobres resultados (Merkle *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que un tratamiento postmaduración es requerido, aunque no es necesario en todas las especies de plantas.

Se ha podido comprobar que en muchos casos, en el embrión somático durante la maduración puede inducirse artificialmente dormancia (Gray y Purohit, 1991). Para romper la misma se pueden emplear tratamientos con frío o aplicación de ácido giberélico, lo cual provoca una aceleración en la germinación y crecimiento del embrión somático, así como el tratamiento con otros reguladores del crecimiento como las citoquininas.

Hien Nguyen Thi (2014)

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La adición de concentraciones de ácido abscísico (ABA) durante la fase de maduración de los embriones somáticos promueve la acumulación de sustancias de reserva. Esto seguido de un apropiado tiempo de secado puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático. La desecación, es requerida para la correcta transición de embrión maduro a la germinación (Kermode, 1990). La imposición de un tratamiento de secado parcial a total al embrión somático aumenta su posterior germinación y crecimiento, normalizando y sincronizando la germinación, además de dar una mejor sincronización del crecimiento de las raíces y el brote. La tolerancia a la desecación puede ser inducida por la aplicación de ABA, prolina y tratamientos con calor (Merkel *et al.*, 1996). Sin embargo, en algunas especies no es necesaria la desecación para lograr una buena germinación (Arcioni y Mariotti, 1982; Kott y Beversdorf, 1990).

La desecación o deshidratación de los embriones somáticos hasta un 10–15% de humedad, incrementa la germinación *in vitro* en muchos cultivos. Esta puede ser lograda al transferir los embriones somáticos maduros en un medio de cultivo de libre reguladores de crecimiento, a un envase cerrado y seco durante una semana. Una vez basados estos de nuevo a un medio de cultivo, los embriones somáticos germinan de forma rápida y uniforme en solo dos semanas (Parrot *et al.*, 1988). Este proceso constituye una parte normal de desarrollo de la semilla botánica y parece jugar un papel importante en la preparación del embrión cigótico para la germinación.

En la mayoría de los trabajos realizados, los autores hacen poca distinción entre los procesos de germinación y conversión (Merkel *et al.*, 1996). Sin embargo la germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o brote, mientras que la conversión es definida por Stuart y Strickland (1984) como la sobrevivencia y desarrollo en fase de propágulos en condiciones ambientales *ex vitro* o sea en suelo. Muy a menudo se reporta por los autores la habilidad del embrión somático para la germinación pero se ofrecen muy pocos datos sobre su conversión. La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Fuji *et al.*, 1990).

Pocos análisis bioquímicos y fisiológicos han sido realizados para comparar los patrones de germinación de embriones cigóticos y somáticos. Las reservas de proteínas y lípidos en el embrión somático declinan sustancialmente a partir del primer día en condiciones

Hien Nguyen Thi (2014)

de imbibición o bien antes de la elongación de la raíz (Cry *et al.*, 1991). La degradación tan rápida de las sustancias de reserva en el embrión somático, la cual es diferente en un embrión cigótico, es probablemente el resultado de la falta del tejido nutritivo que lo rodea; es por esto que las plantas de embriones somáticos son más pequeñas y débiles que las de semilla. Fuji *et al.*, (1990) reportan que 25 días de tratamiento con ABA durante la maduración del embrión somático estimuló al aumento del peso seco, la acumulación de almidón y la germinación de 5–80 %. Todo lo anterior señalado apoya lo planteado sobre la necesidad de la acumulación de abundante sustancias de reservas durante la maduración del embrión somático, para lograr una buena germinación y conversión. También juegan un papel importante en la germinación la adición de citoquininas en el medio de cultivo, las cuales contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y la proliferación.

Un gran número de plantas producidas *in vitro* no sobreviven el traslado desde el medio ambiente *in vitro* para medio ambiente *ex vitro* en condiciones de invernadero o de campo. Debido a sus características anatómicas y fisiológicas, este tipo de plantas necesitan una adaptación gradual o la aclimatación a ambientes *ex vitro* con el fin de sobrevivir y ser productivo. En condiciones de invernadero y campo existen una humedad relativa menor, mayor nivel de luz y un ambiente séptico que son estresantes para las plantas micropropagadas en comparación con condiciones *in vitro* (Hazarika, 2003; Hazarika y Bora, 2010). Las plántulas que se desarrollan dentro de los recipientes de cultivo con un nivel bajo de luz, en condiciones asépticas, en un medio de cultivo que contiene azúcar y nutrientes para permitir el crecimiento heterótrofo y una atmósfera con un alto nivel de humedad. Esto conduce a un fenotipo que no puede sobrevivir a las condiciones ambientales cuando se colocan directamente en condiciones de invernadero o en el campo. Las características fisiológicas y anatómicas de las plantas *in vitro* requieren que deban ser aclimatizadas gradualmente al medio ambiente del invernadero o el campo (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

La embriogénesis somática como tecnología de propagación ha sido reconocida por muchos autores como la futura generación en la regeneración de plantas a escala masiva por las ventajas en la eficiencia productiva. Sin embargo, se registra en la literatura científica especializada diversos problemas confrontados durante su empleo. Se

Hien Nguyen Thi (2014)

destacan los bajos porcentajes de germinación de los embriones somáticos formados, la presencia de plantas hiperhidratadas y los pocos estudios en condiciones del campo, lo que ha limitado su aplicación en la producción *in vitro* a escala comercial (Suárez *et al.*, 2012).

La aclimatización consiste en trasplantar plántulas obtenidas en condiciones controladas *in vitro* a condiciones donde las mismas se desarrollan para su cultivo (Morales *et al.*, 2009). Se considera una de las etapas más importantes de la micropropagación (PROMECAFE, 2009). Dado fundamentalmente, al hecho de que en su continuo crecimiento y desarrollo, se requiere de un proceso de adaptación a factores bióticos y abióticos (Chacón *et al.*, 2005).

Además, Sánchez (2007) señala que durante la aclimatización las plántulas pasan de un estado heterótrofo a uno autótrofo con diferentes niveles de nutrientes y en correspondencia con Cruz *et al.* (2008) la composición del sustrato es un factor con marcada influencia en la obtención de una planta de óptima calidad.

Mantener adecuada capacidad fotosintética durante el cultivo *in vitro* y adecuado equilibrio para el intercambio gaseoso durante la etapa de multiplicación permite garantizar una aclimatización exitosa de las plántulas (Isaac *et al.*, 2010).

Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® (SIT)

El método de cultivo con Sistema de Inmersión Temporal consiste en la colocación de los tejidos vegetales sobre soportes sólidos que son inoculados periódicamente con soluciones de nutrientes. Ofrece las ventajas de los cultivos en medio de cultivo líquido, por lo que la reducción de los costos laborales, sin las desventajas de un medio de cultivo líquido. Etienne y Berthouly (2002) describen los diferentes Biorreactores de Inmersión Temporal (TIB) que se han aplicado para la micropropagación de plantas desde la década de 1980 por algunos investigadores como Aitken-Christie *et al.* (1985) y Tisserat and Vandercook (1985).

Los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® comercializado por el CIRAD (*Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*-Francia) tiene un volumen de 1 l y contiene 0.2 l de medio líquido. Una película fina se coloca en la parte inferior de la parte superior para mantener los explantes. El sistema

Hien Nguyen Thi (2014)

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

está cargado con los tejidos en la parte superior y medio de cultivo fresco en la parte inferior, que está conectado a una pequeña bomba de aire. Cuando la bomba está activada, el aire entra en la sección inferior y, como la presión se acumula, el medio de cultivo líquido es empujado a la parte superior. Cuando la bomba se desactiva, el medio de cultivo fluye hacia abajo simplemente con el efecto de la gravedad (Ducos *et al.*, 2007).

La técnica de inmersión temporal se desarrolló con el objetivo de reducir los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos, la complejidad del equipamiento así como lograr un aumento en la eficiencia de la micropropagación dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de propágulos (Teisson y Alvard, 1995; Escalona *et al.*, 1999). El sistema permite el contacto del medio de cultivo líquido con el material vegetal de manera intermitente y por un corto período de tiempo, con una disminución de los costos de producción en comparación con las formas convencionales de micropropagación (Berthouly y Etienne, 2005). La renovación de la atmósfera y el medio de cultivo reducen la humedad relativa e incrementa la asimilación de agua y nutrientes (Teisson y Alvard, 1995). Por otra parte, producto de las inmersiones los explantes quedan recubiertos por una fina película de medio de cultivo líquido que evita la desecación sin obstaculizar la difusión de los gases (Escalona *et al.*, 1999; 2003; Yang y Yeh, 2008). Además es de fácil manejo y uso.

Varias investigaciones se desarrollan con el objetivo de estudiar los principales parámetros de cultivo en los Sistemas de Inmersión Temporal que posibilitan una mejor respuesta fisiológica. La duración del tiempo y la frecuencia de inmersión tienen gran importancia tanto para la asimilación de los nutrientes como para controlar la hiperhidricidad. Además, permiten el control de la atmósfera interna del vaso de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005). La ventilación forzada, la composición y volumen de los medios de cultivo así como el volumen de los frascos son algunas de las variables que se pueden controlar para evitar la hiperhidricidad (Wu *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011). La ventilación forzada es un aspecto que genera ventajas desde punto de vista de calidad morfológica de las plantas (Lai *et al.*, 2005).

El efecto positivo de los Sistemas de Inmersión Temporal en la micropropagación de plantas se ha empleado con éxitos en la proliferación de meristemos, cultivo de

Hien Nguyen Thi (2014)

microestacas, desarrollo de embriones somáticos a partir de callos, así como también en la germinación y conversión de embriones somáticos. Por lo general, la calidad del desarrollo de los brotes es mejor que la obtenida con el empleo de medio de cultivo líquido o semisólido. Lezcano *et al.* (2011) describen que con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal la morfología, el comportamiento fisiológico de los brotes son muy semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro*, debido entre cosas al mejoramiento de la atmósfera del sistema, lo que facilita su adaptación a condiciones de campo una vez que se haya aclimatizados.

2.2.3.2. Factores que influye en la embriogénesis somática.

La regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática se ha reportado en varios estudios. Sin embargo, el desarrollo de métodos de regeneración que cumplan con las exigencias físicas y químicas de las células de la planta sigue siendo un proceso en gran medida empírico. La identificación de condiciones ideales en el cultivo *in vitro* puede ser extremadamente difícil debido a la gran cantidad de factores que contribuyen a la inducción, el desarrollo y la conversión del embrión somático. Con el objetivo de superar las dificultades y determinar las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* a través de la embriogénesis somática, los efectos de estos factores han sido estudiados en un número significativo de especies de plantas (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

Evidentemente los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material vegetal. Estos son los siguientes:

- El genotipo de la planta (Rodríguez–Otubo *et al.*, 2000).
- Las condiciones de cultivo (Bornhoff y Harst, 2000).
- Los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo (Perrin *et al.*, 2001).
- El tipo y estado fisiológico del explante (Fiore, 2002).

La naturaleza misma de la embriogénesis somática permite su aplicación en sistemas de cultivo líquido. Los mismos regeneran una mayor cantidad de material vegetal uniforme y el procedimiento es de gran valor para acelerar los métodos de mejoramiento genético

clásico, pues permitirían lograr una multiplicación de variedades de híbridos intraespecíficos.

- Genotipo

La regeneración *in vitro* está determinada en gran medida por el genotipo. En algunos casos las respuestas observadas han estado relacionadas con factores genéticos identificables (Song *et al.*, 2009), conocidos: genes nucleares, genes citoplasmáticos y la interacción de genes. Los genes nucleares que influyen en la regeneración se han caracterizado por tener una alta habilidad general para interactuar, ser recesivo, dominante o parcialmente dominante o por ser aditivo (Ranch y Palmer, 1987; Kita *et al.*, 2007).

Al evaluar en *C. canephora* P ex F., *C. arabica* L. e híbridos Arabusta, Zamarripa y Pétiard (2004) describieron un fuerte efecto del genotipo sobre la inducción de la embriogénesis somática. Por tal motivo es frecuente observar que un medio de cultivo induzca distintas respuestas en la inducción de la embriogénesis en diversos genotipos (Zamarripa y Pétiard 2004; Cueto *et al.*, 2007).

Barbón *et al.* (2003) confirmaron la influencia del genotipo en la respuesta embriogénica y considera este es un aspecto que debe tomarse en consideración para la optimización del proceso de la embriogénesis somática en medios de cultivo líquido para cada especie o cultivar en particular.

- Explante

Por lo general, el proceso embriogénico somático consta de dos pasos principales, la inducción del proceso y la expresión de los embriones resultantes (Rodríguez-Garay *et al.*, 2000; Gutiérrez-Mora *et al.*, 2004; Jiménez, 2005). El proceso se inicia con las células somáticas teóricamente a partir de cualquier parte de la planta; sin embargo, las diferencias sustanciales en competencia se encuentran en la práctica. Las células que son más competentes para la embriogénesis somática son generalmente los que proceden de los tejidos jóvenes y los embriones cigóticos inmaduros. Sin embargo, los tallos, las raíces y las hojas pueden ser útiles también.

El tipo del explante, tamaño, la edad y la orientación sobre el medio del cultivo son aspectos que pueden determinar la inducción y regeneración de los embriones somáticos (George *et al.*, 2008).

Hien Nguyen Thi (2014)

El cultivo exitoso *in vitro* de un material vegetal está fuertemente influenciado por la edad del explante, la cual puede estar directamente relacionada con el grado de diferenciación del tejido y la edad ontogénica o fase de crecimiento, entre otros (Hiraga *et al.*, 2007).

Los explantes con capacidad de formar embriones somáticos expresaron tal capacidad días después que aquéllos que sólo pudieron formar células del callo, porque el callo embriogénico crece más lento que el callo no embriogénico (González *et al.*, 2002).

Los explantes provenientes de hoja madura de los dos genotipos de café (*C. arabica* L. y *C. canephora* P. ex F.) no presentaron capacidad alguna para la formación de callo a los 30 días en fase de inducción (López *et al.*, 2010).

- Reguladores de crecimiento

Por lo general, los embriones somáticos son inducidos por una simple manipulación de las condiciones en el cultivo *in vitro*. Uno de los principales elementos en el medio de cultivo son las sustancias reguladoras del crecimiento (SRC) tales como auxinas, citoquininas, ácido abscísico, giberelinas y otros componentes. Además, es importante mencionar que los reguladores endógenos juegan un papel importante en el proceso embriogénico somático. Fuera de lo anterior SRC, como las auxinas son los componentes más importantes en la inducción del proceso (Dodeman *et al.*, 1997; Jiménez, 2005; Feher, 2006; Jiménez y Thomas, 2006). Las células somáticas necesitan la señal para la polarización celular y la división asimétrica dada por las auxinas como ocurre en sus homólogos cigóticos (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2004; Pagnussat *et al.*, 2009.). La participación de la otra SRC es importante en el equilibrio de los componentes hormonales necesarios para lograr la embriogénesis somática.

- Medios de cultivo

El medio de cultivo es uno de los factores importantes a considerar para el cultivo *in vitro* de células vegetales y que puede ser utilizado en estado semisólido o líquido. Asimismo, deberá suministrar los minerales esenciales necesarios para el crecimiento y el desarrollo. El medio de cultivo más utilizado en el cultivo *in vitro* de plantas es el desarrollado por Murashige y Skoog (1962) el cual se utiliza en la regeneración de plantas de varias especies (Kevers *et al.*, 2002; Mohan y Krishnamurthy, 2002; Ascencio-Cabral *et al.*, 2008; Konieczny *et al.*, 2008). Alternativamente, el medio de cultivo B5 se ha usado para la regeneración *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* (Gaj, 2001). Además,

Hien Nguyen Thi (2014)

Thuzar *et al.* (2011) empleó un medio de cultivo N6 en el cultivo *in vitro* para promover la embriogénesis somática y la regeneración de plantas de *Elaeis guineensis* Jacq. Además de estos, la embriogénesis somática de *Agave tequilana* ha sido descrito en un medio de cultivo de Schenk y Hildelbrant (SH) (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011).

Los componentes del medio de cultivo están entre los factores que influyen en la embriogénesis somática. Barbón *et al.* (2004) determinaron el efecto de los agentes selectivos kanamicina y sulfadiacina para este proceso en *C. arabica* L. cv. Caturra rojo y González y Barrios (2003) utilizaron el RIZOBAC en la fase de calogénesis de *C. arabica* L. y *C. canephora* P. ex. F.

En las dos especies cultivadas, *C. canephora* P. ex. F. y *C. arabica* L., la producción de embriones somáticos se ha llevado a cabo con éxito en medio de cultivo líquido (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

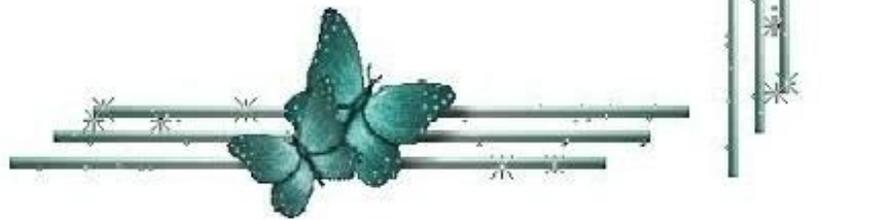
- Condiciones del cultivo

En cuanto a las condiciones de cultivo, González *et al.* (2005) consideraron que la toma de muestras foliares en los períodos mayo–junio, enero–febrero y noviembre-diciembre es favorable, dado por bajo índice de actividad peróxidasa, oxidación fenólica y contaminación fúngica, así como un elevado porcentaje de formación de callos y un mayor contenido de proteínas en los mismos.

Por otra parte, los factores físicos como la luz, el fotoperíodo, la temperatura, el ambiente gaseoso y la presión osmótica tienen que ser controladas en el cultivo *in vitro*. Con el fin de encontrar las condiciones ambientales más adecuadas para producir embriones somáticos se han realizado varios trabajos (Gutiérrez–Mora *et al.*, 2012).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las investigaciones se desarrollaron en el Instituto de Biotecnología de las Plantas perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas en el período comprendido desde diciembre de 2013 a mayo de 2014.

Procedimientos generales

Instrumental de laboratorio

Para la manipulación de los explantes en condiciones de asepsia se utilizó una cabina de flujo laminar. Las pinzas y los bisturíes se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.0% (v/v) durante 15 minutos. Las placas de Petri o platos metálicos empleados en la manipulación del material vegetal fueron esterilizadas en la estufa (Mim, Alemania) a 180°C durante dos horas.

Sistema de Inmersión Temporal

El concepto y la operación de los Sistemas de Inmersión Temporal empleado en el experimento se fundamenta en un diseño de un frasco, descrito por Teisson *et al.* (1996). Este diseño consiste de un frasco subdividido en dos compartimentos separados por una membrana que permite el flujo o paso del medio de cultivo y sobre la cual se coloca el material vegetal en el compartimento superior; mientras que, en el compartimento inferior se almacena en el medio de cultivo.

El sistema comprende además, una conexión a través de filtros hidrofóbicos de 0.2 μm que garantiza la esterilidad del aire de entrada, cuya presión se controla por un manómetro. La frecuencia y tiempo de inmersión fueron regulados por un temporizador, el cual controla una electroválvula de tres vías que permite la circulación del aire y por consiguiente del medio de cultivo del compartimento inferior al superior (Figura 1).

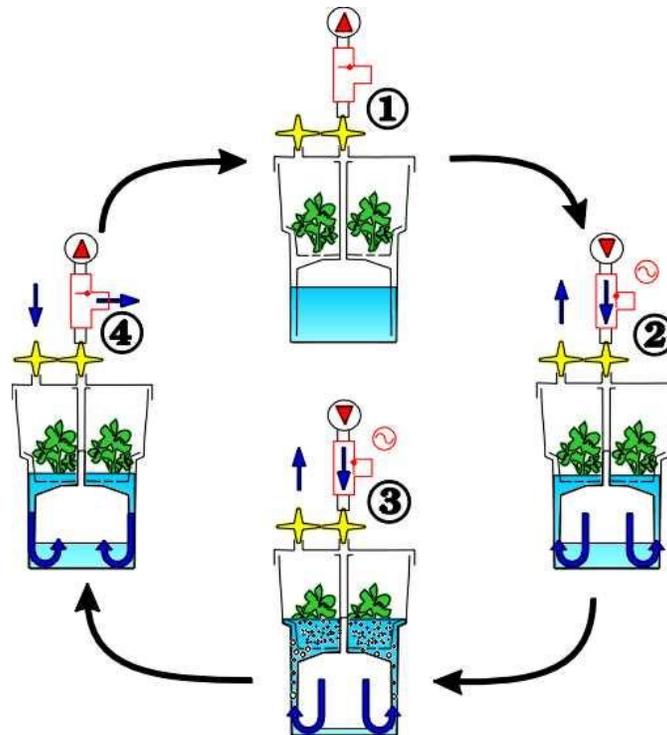


Figura 1. Esquema del Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA® empleado en los experimentos mostrando su principio de funcionamiento

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en esta investigación se especifica en el experimento. Se dosificaron 200 mL de medio de cultivo por Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA®. El pH del medio de cultivo fue ajustado antes de la esterilización a 5.8 con soluciones de NaOH y HCl (0.1N). Se realizó la esterilización del medio de cultivo en una autoclave a una temperatura de 121 °C y 1.2 kg cm⁻² de presión, durante 20 min.

Condiciones de cultivo

La fase de germinación de los embriones somáticos de café en Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA® se realizó en una cámara de crecimiento de luz solar con un flujo fotosintético de fotones que osciló entre 48.0 – 62.5 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ con una duración del período luminoso máximo y mínimo de 14h y 10h, y una temperatura de 25.0 \pm 2.0 °C.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas SigmaStat versión 3.0 y SPSS versión 18.0 para Windows y para la elaboración de ficheros y datos y gráficos se utilizó

Hien Nguyen Thi (2014)

el programa EXCEL del paquete Microsoft Office 2013. Se aplicó la prueba de Kolmogorov–Smirnov para comprobar si los datos cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. En cada experimento se detallan las pruebas estadísticas que se realizaron.

3.1. Determinación del efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®

El objetivo del siguiente experimento fue determinar la mejor densidad de inoculación de embriones somáticos para la fase de germinación de los embriones somáticos en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®.

Como material vegetal se utilizaron embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en etapas avanzadas de desarrollo (torpedo y cotiledonar) (Figura 2). Los embriones somáticos fueron obtenidos a partir de suspensiones celulares embriogénicas en fase de diferenciación según la metodología descrita por de Feria (2005) y se empleó el medio de cultivo propuesto por Zamarripa *et al.* (1991) para la germinación de los embriones somáticos de café.



Figura 2. Embriones somáticos en etapas de torpedo y cotiledonar empleados para inocular en los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®

Diferentes densidades de inoculación se aplicaron en los RITA® conformándose cinco tratamientos con 40, 50, 60, 70 y 80 ES por RITA®. Para cada tratamiento se establecieron tres réplicas y el sistema fue programado para transferir el medio de cultivo y sumergir los embriones somáticos durante un minuto cada ocho horas.

A los 90 días de cultivo se evaluó:

El número de embriones somáticos con germinación total

Hien Nguyen Thi (2014)

El número de embriones somáticos con germinación parcial

Presencia de embriones somáticos con síntoma de hiperhidricidad

El desarrollo morfológico de las plantas obtenidas: Número de hojas verdaderas, longitud de la planta y desarrollo radicular

Para el análisis de los datos se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows.

3.2. Efecto de la composición y tipo de sustrato en el crecimiento y desarrollo de las plantas obtenidas *in vitro* en la fase de aclimatización

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la composición y tipo de sustrato en la supervivencia de las plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo obtenidas *in vitro* a partir de la germinación de los embriones somáticos en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®. Estas se seleccionaron de acuerdo a su desarrollo morfológico con las siguientes características: tres pares de hoja verdaderas, tamaño entre 2.5 – 3.5 cm y con desarrollo radicular (Figura 3).



Figura 3. Plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo utilizadas en la fase de aclimatización, obsérvese el desarrollo homogéneo de las mismas

Previo a la plantación en la fase de aclimatización, las plantas *in vitro* fueron lavadas con agua corriente y posteriormente colocada en bandejas de polipropileno negras de 28 alvéolos con una capacidad de 200 cm³ cada uno (Figura 4). Se estudiaron distintas

combinaciones de sustratos como se muestra en la tabla 1 que fueron mezclados manualmente.



Figura 4. Bandeja de polipropileno de 28 alvéolos

Tabla 1. Diferentes composiciones de sustratos utilizados en el experimento para evaluar la respuesta de las plantas obtenidas *in vitro* en condiciones *ex vitro*

Tratamiento	Humus de lombriz (%)	Zeolita (%)
I	85	15
II	75	25
III	65	35
IV	50	50

Las características físico-químicas de los sustratos utilizados se muestran en la tabla 2. La zeolita utilizada fue producida por la Empresa GEOMINERA de Villa Clara y el Humus de lombriz (Figura 5) fue obtenido del Complejo Científico Productivo Biofábrica de Villa Clara).



Figura 5. Vista general de los sustratos empleados para la preparación de la mezcla: A. Zeolita y B. Humus de lombriz

Tabla 2. Características físico-química de la zeolita.

Composición química	(%)
Óxido de Silicio (SiO ₂)	70.10
Óxido de Aluminio III (Al ₂ O ₃)	11.20
Óxido de Hierro III (Fe ₂ O ₃)	2.20
Óxido de Hierro II (FeO)	0.30
Óxido de Magnesio (MgO)	0.60
Óxido de Calcio (CaO)	4.50
Óxido de Sodio (Na ₂ O)	1.50
Óxido de Potasio (K ₂ O)	1.30
Pentóxido de difósforo (P ₂ O ₅)	0.07
Agua (H ₂ O)	4.70
Composición mineral	%
Clinoptilolita	40.00
Modernita	40.00
Otros (Calcita, cuarzo, feldespato)	20.00
Propiedades físicas	Valor
Tamaño de la partícula	0.01-1.0 mm
Densidad (δ)	0.37 g cm ⁻³
Densidad de la fase sólida (γ)	1.77 g cm ⁻³
Porosidad total (PT)	80.59 % vol.

Una vez sembradas, las plantas fueron colocadas para su desarrollo en casa de cultivo, a una temperatura promedio durante el día de $27 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad relativa del 70% e intensidad luminosa que osciló entre 224 y 457 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ medida con un luxómetro EXTECH Light meter 401025. Se utilizó un sistema de riego por microaspersión el cual se encontraba automatizado. La frecuencia de riego fue de dos minutos de duración cuatro veces al día (9.00 am; 11.00 am; 14.00 pm y 16.00 pm). Se utilizaron 28 plantas por tratamiento.

La supervivencia, se definió como el número de plantas que sobrevivieron a los 15 días. Luego de pasar 90 días se evaluó la altura de las plantas (cm) desde

3. MATERIALES Y MÉTODOS

la base hasta el ápice, el número de hojas, longitud de la raíz principal. Además se evaluó: la masa fresca, la masa seca y el área foliar.

Para el análisis de los datos se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis/ Mann Whitney previa comprobación de los supuestos de normalidad, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®

En los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® las primeras señales del desarrollo de los embriones somáticos ocurrieron alrededor de los quince días de cultivo después de ser colocados en el medio de cultivo para la germinación, cuando los embriones somáticos cambiaron de un color crema a verde brillante (Figura 6).

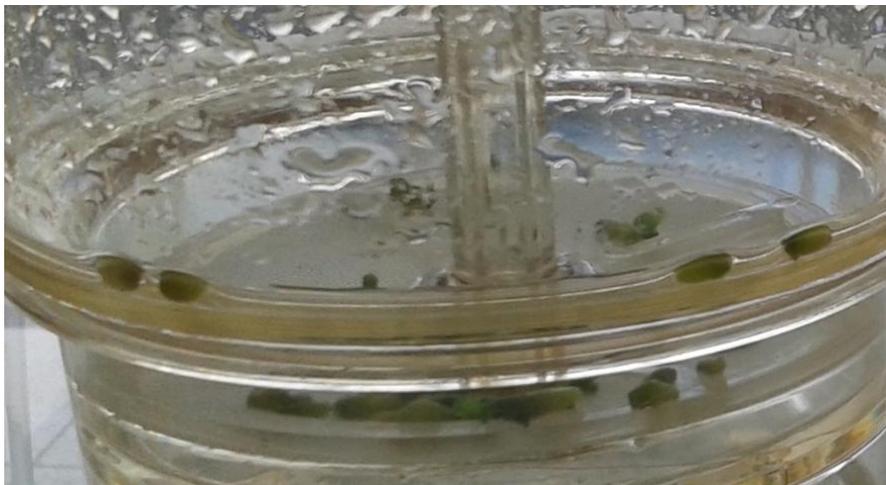


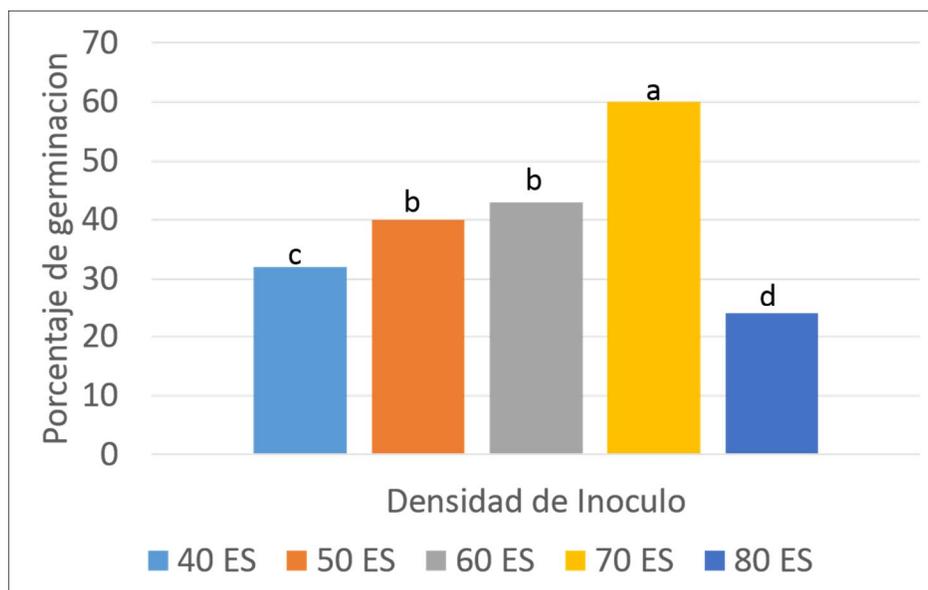
Figura 6. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® durante la fase de germinación

Los resultados revelaron que existe una relación entre la densidad de inóculo y el nivel de germinación de los embriones somáticos en los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) tipo RITA®. A los 90 días de cultivo se observó en los SIT tipo RITA® la presencia de embriones somáticos germinados en los diferentes tratamientos (Figura 7).



Figura 7. Germinación de embriones somáticos de café en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® con una densidad de 70 embriones somáticos a los 90 días de cultivo

Los mayores valores de porcentaje de germinación (60%) se obtuvieron al germinar los embriones somáticos en SIT tipo RITA® con una densidad de 70 embriones somáticos (Figura 8); siendo estos resultados similares a los descritos por Etienne *et al.* (1999), pero en otro cultivar de *Coffea arabica* L.



Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0,05$

Figura 8. Efecto de la densidad de inóculo en la germinación de embriones somáticos de café en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® a los 90 días de cultivo

Hien Nguyen Thi (2014)

A través de la caracterización visual y por la respuesta morfológica observada, las plantas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos en los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® no presentaron ningún rasgo de hiperhidricidad (Figura 9), aspecto también señalado por Cabasson *et al.* (1997), en embriones somáticos de *Citrus deliciosa* L. y por Escalona (1999), en brotes de *Ananas comosus* (L.) Merr multiplicados en SIT.



Figura 9. Características morfológicas de las plantas *in vitro* obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L cv. Caturra rojo en SIT tipo RITA®

En los tratamientos con una densidad de inóculo inferior a 70 embriones somáticos se obtuvo un menor porcentaje de germinación con respecto a este tratamiento. La densidad de inóculo como variable tuvo su fundamento en la cantidad de volumen de medio de cultivo disponible por explante, además del espacio físico para su desarrollo. Teniendo esto como base es posible que en el tratamiento con menor densidad de inóculo (40 ES), el cual se corresponde con el mayor volumen de medio de cultivo por explante, estos estaban expuestos a condiciones de cultivo que provocaron estrés. En dependencia de la magnitud del estrés, los explantes pueden normalizarse por un incremento en su desarrollo morfofisiológico (Joyce *et al.*, 2003). Sin embargo, si se exceden los límites de tolerancia se observan daños permanentes en el desarrollo y crecimiento e incluso la muerte de los embriones somáticos como pudo haber sucedido en el tratamiento con una menor densidad de inóculo (Figura 10).

Hien Nguyen Thi (2014)



Figura 10. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo no germinados en los sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®]

Por otra parte, autores como Lorenzo *et al.* (1998) en el cultivo de *Saccharum* spp. en SIT, sugirieron que la influencia negativa de mayores volúmenes de medio de cultivo por explante se debe a que sustancias químicas que se secretan al medio de cultivo y estimulan el desarrollo de brotes son diluidas en el mismo. Al respecto, Escalona *et al.* (1999) informaron de igual manera dicha influencia negativa de mayores volúmenes de medio de cultivo en el desarrollo y crecimiento de brotes de *Ananas comosus* (L.) Merr en SIT.

El proceso morfogénico en las plantas está controlado por una interacción entre el material vegetal, el medio de cultivo y el ambiente *in vitro* (Piqueras *et al.* 1998), aspecto que es de vital importancia en los Sistemas de Inmersión Temporal.

Por otra parte, en el tratamiento con 80 embriones somáticos como densidad de inóculo hubo una mayor competencia por los nutrientes, lo que se evidencia en el menor desarrollo de foliar y una mayor presencia de germinación parcial de los embriones somáticos (Figura11).



Figura 11. Embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo con germinación parcial en los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA®

Aparentemente según Ziv (1999) esto pudiera ser el resultado de la interrupción y la no sincronización de señales de inducción en la secuencia normal de los eventos de organización celular.

Por su parte, al analizar las variables longitud y número de hojas de las plantas *in vitro* procedentes de la germinación de las diferentes densidades de inóculo en los RITA®, se determinó que con respecto a la longitud de la planta en los tratamientos inferiores a 70 ES por RITA® y este propio tratamiento no hubo diferencias. Sin embargo, los mejores resultados en el número de hojas por planta se obtuvieron en las variantes con densidades de inóculo de 50 y 60 embriones somáticos (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de la densidad de inóculo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® sobre la longitud y número de hojas en las plantas procedentes de la germinación de los embriones somáticos

Tratamientos	Longitud (cm)	Número de hojas
40 ES	2.1 a	2.4 b
50 ES	2.1 a	2.7 ab
60 ES	2.0 a	2.98 a
70 ES	1.97 a	2.4 b
80 ES	1.7 b	2.0 c

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0,05$

Hien Nguyen Thi (2014)

Con los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®], el comportamiento y la morfología de las plantas obtenidas parecen generalmente más cercanos a la norma *in vivo* y al comportamiento que se encuentra con el cultivo *in vitro* en medios de cultivo semisólido. Los embriones somáticos en estos sistemas germinan de forma individualizada y tienen una morfología que se parece a la de los embriones cigóticos, aspectos descritos anteriormente por Etienne y Berthouly (2002). En ninguno de los tratamientos se encontró presencia de hiperhidricidad, ni en los embriones somáticos ni en las plantas germinadas a partir de ellos. Todas las ventajas de estos sistemas parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son: la permanencia de una película superficial de medio de cultivo líquido sobre los tejidos parece ser una de las principales razones de éxito de este sistema, pues no solamente asegura una disponibilidad nutritiva fuera de los períodos de inmersión, sino también interrumpe mucho menos los intercambios gaseosos que la inmersión total. Esta permanencia del agua residual explica también la ausencia de daños y desecación de los embriones somáticos, incluso en el caso de una inmersión muy ocasional y breve, lo cual también fue descrito por Etienne y Berthouly (2002).

Otra variable ligada con las condiciones físicas que parece significativa es la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo líquido cuyo efecto en los fenómenos *in vitro* es conocido desde hace muchos años (Teisson *et al.*, 1999). En el Sistema de Inmersión Temporal esta concentración alcanza la saturación solo un minuto después del burbujeo. En el caso de Erlenmeyer agitados sin tejido vegetal y sin consumo de oxígeno, la concentración de este gas disuelto nunca sobrepasa los 95% de saturación. Todos estos puntos significan que, en tal aparato, las condiciones físicas de nutrición, de intercambios de gases y de relaciones con el agua de los tejidos vegetales son completamente diferentes de las que se encuentran en las técnicas tradicionales. Estas condiciones fisiológicas conducen a un comportamiento totalmente diferente (Cabasson *et al.*, 1997).

4.2. Efecto de la composición y tipo de sustrato en el crecimiento y desarrollo de la planta *in vitro* en la fase de aclimatización

A las 15 semanas de cultivo de las plantas bajo diferentes composiciones de mezcla de sustrato, se determinó que había diferencias en cuanto a la supervivencia y morfología (Figura 12).



Figura 12. Las plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo bajo diferentes composiciones de sustrato

Hien Nguyen Thi (2014)

Al estudiar el efecto de la composición física del sustrato en la supervivencia de las plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo se demostró que el tratamiento II (75% Humus de lombriz - 25% Zeolita) se obtuvo un 100% de supervivencia de las plantas con diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos. Fue en el tratamiento IV (50% Humus de lombriz - 50% Zeolita) donde se lograron los valores más bajos de supervivencia (89.3%) (Figura 13).

De acuerdo con Santana *et al.* (1996) y Marcelo (2000) en sus investigaciones relacionadas con el estudio de la aclimatización en cafeto, informaron que la supervivencia de las plantas *in vitro* de *Coffea arabica* L. obtenidas de embriogénesis somática fue superior al 90%.

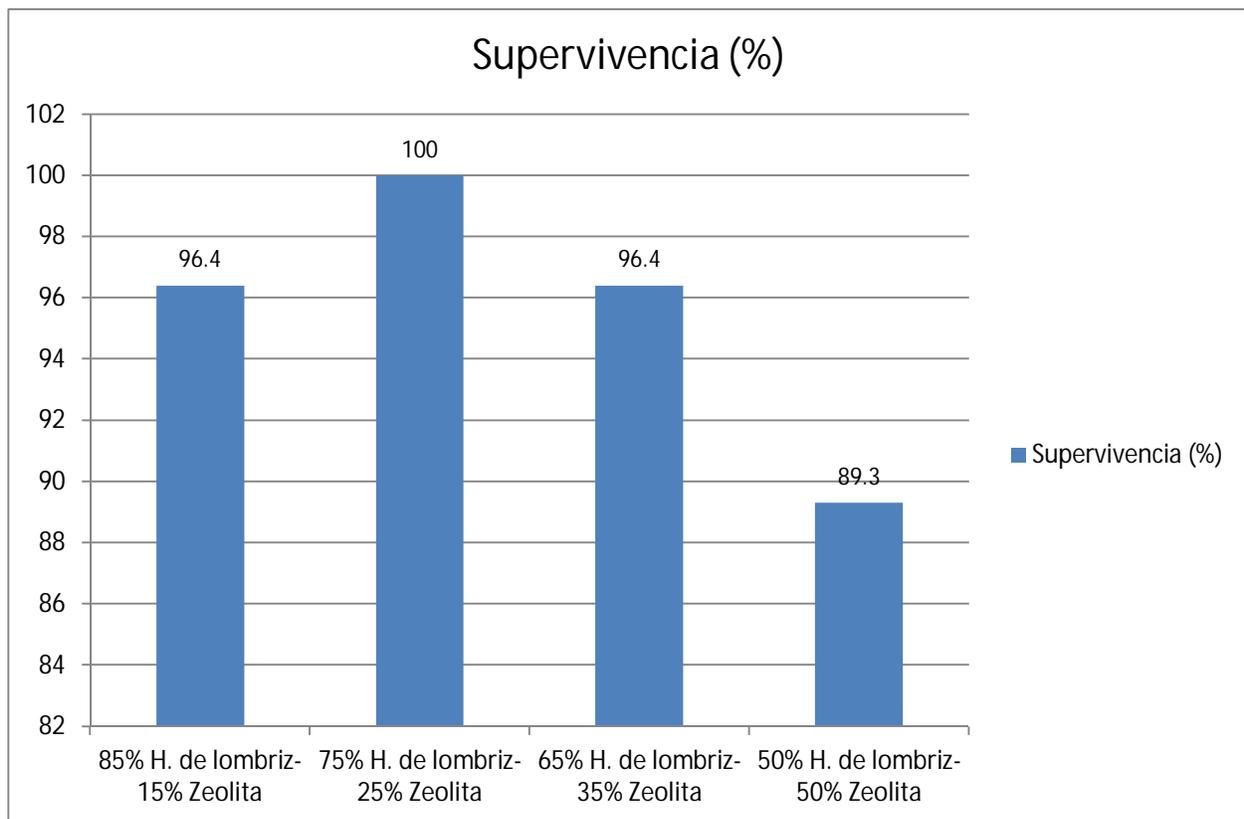


Figura 13. Influencia de la composición física del sustrato en la supervivencia de plantas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo propagadas vía embriogénesis somática

Según Santana *et al.* (2007) los mejores resultados durante la fase de aclimatización de las plantas de *C. arabica* L. y *C. canephora* P. ex. F. se obtuvieron con una mezcla de Hien Nguyen Thi (2014)

materia orgánica y suelo (1:1) o también con una mezcla de musgo de turba, agrolite y suelo (1:1:1). Sin embargo, Etienne *et al.* (2002) con sustratos compuesto por suelo, arena y pulpa de café (2:1:1) lograron un porcentaje de conversión de las plantas con valores de un 65%. Según Ducos *et al.* (2007), en la fase de aclimatización de *C. arabica* L. varía la respuesta de los diferentes clones obteniéndose un rango de conversión de los embriones somáticos a plántulas entre un 25% a 67% de supervivencia.

Según Barranco (2001) para la fase de aclimatización de plantas de banano (*Musa* AAAB, cv. FHIA -18) obtenidas de embriones somáticos se utilizó un sustrato artificial formado por una mezcla de casting y zeolita (3:1) y el porcentaje de supervivencia de las plantas que se obtuvo fue de un 98.5%.

En este sentido, Rivas *et al.* (2005) emplearon para la aclimatización de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) diferentes tipos de sustrato y los mejores resultados lo obtuvieron cuando combinaron humus de lombriz con zeolita en las proporciones de 50:50 y 75:25. Sin embargo, estos autores no lograron la supervivencia de las plantas cuando emplearon como sustrato 100% de zeolita. Mientras que, Vílchez (2001) obtuvo en la fase de aclimatización de plantas de la especie *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40 solamente 47.5% de la supervivencia empleando humus de lombriz. Según Rodríguez *et al.* (2009) para lograr un 80% de supervivencia de las plantas de *Carica papaya* L. var. Maradol roja se debe realizar bajo condiciones del cobertor de nylon y con el empleo de un sustrato compuesto por 70% de Humus de lombriz y 30% de zeolita. Se plantea también por otros autores el uso de la fibra de palma soyate en la fase de aclimatización para el cultivo de *Laeliae yermaniana* obteniéndose un 46.9% de supervivencia (Juan *et al.*, 2011).

Sin embargo, hubo diferencias en el aspecto morfológico de las nuevas hojas emitidas en las plantas en la fase de aclimatización bajo las diferentes composiciones de sustrato. Los tratamientos I (85 % Humus de lombriz- 15 % Zeolita) y II (75 % humus de lombriz – 25 % Zeolita) presentaron desde punto de vista morfológico una mejor calidad en cuanto a coloración y calidad de planta; y no se presentaron daños por necrosis en el área foliar (Figura 14).



Figura 14. Plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo obtenidas en la fase de aclimatización bajo diferentes composiciones de sustrato

Hien Nguyen Thi (2014)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó una incidencia en la composición física del sustrato con respecto al número de días requeridos para emitir el primer par de hojas en la planta de cafeto propagadas vía embriogénesis somática durante su aclimatización. Se observó que las plantas comenzaron a emitir nuevos pares de hojas a partir de los 27 días de sembradas en la fase de aclimatización (Tabla 4).

Durante la fase de conversión de las plantas en diferente composición física del sustrato, el menor tiempo para emitir un nuevo par de hojas se determinó que fue el tratamiento II que contenía 75% humus de lombriz–25% Zeolita con un período promedio de 27.5 días; este tratamiento no tuvo diferencias significativas con respecto al tratamiento I (85% Humus - 15% Zeolita) que presentó un período 29 días para la emisión de un nuevo par de hojas. Sin embargo, el tratamiento IV fue el que demoró más tiempo para emitir el primer par de hojas a los 33.77 días.

Tabla 4. Número de días para la emisión del primer par de hojas en plantas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en diferentes composiciones de sustrato

Tratamiento	Nº de días para emitir el primer par de hojas	
	Media	Rango promedio
85% Humus-15% Zeolita (I)	29.00	52.18 ab
75% Humus-25% Zeolita (II)	27.50	47.02 b
65% Humus-35% Zeolita (III)	29.50	56.38 a
50% Humus-50% Zeolita (IV)	33.77	68.89 a

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$.

Al realizar el análisis del número total de hojas emitidas durante el período de cultivo en la fase de aclimatización se determinó que en el tratamiento I (85% Humus - 15% Zeolita) fue donde se obtuvo el mayor número de pares de hojas con respecto a los otros tratamientos (Tabla 5).

Según del Rivero (2008), al estudiar el efecto de diferentes sustratos en la conversión de los embriones somáticos de *Anthurium andraeanum* L., el número de hojas emitidas de las plantas fue mejor en el tratamiento con 80% Humus de lombriz y 20 % Zeolita.

Tabla 5. Número de pares de hojas nuevas en plantas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en diferentes composiciones de sustrato

Tratamiento	Número de pares de hojas nuevas	
	Media	Rangos medios
85% Humus-15% Zeolita (I)	4.89	32.85 a
75% Humus-25% Zeolita (II)	4.20	21.60 b
65% Humus-35% Zeolita (III)	3.60	13.60 c
50% Humus-50% Zeolita (IV)	3.70	13.95 c

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$

Según del Rivero (2008), también es importante la composición del sustrato para un buen desarrollo de nuevas hojas en la planta. En este estudio se corroboró que la elección del tipo de sustrato debe garantizar permeabilidad, elevada capacidad de retención de agua, baja densidad aparente, capacidad de intercambio catiónico, capacidad para mantener constante el pH y mínima velocidad de descomposición; además de servir como soporte (Henry *et al.*, 2002).

Las hojas tienen un importante papel en el desarrollo de las plantas *in vitro*. Hazarika (2003) describe que es conocido que las hojas producidas en condiciones *in vitro* son empleadas como almacén de sustancias carbonadas, las cuales son utilizadas en el crecimiento y desarrollo de las plántulas. Cuando son transferidas a las condiciones *ex vitro* mantiene esta función hasta tanto no exista una nueva emisión foliar. El primer par de hojas emitidas en condiciones *ex vitro* son de características autotróficas y acumulan temporalmente fotosintatos; donde una parte de estos, es retenida por la hoja para su crecimiento y metabolismo y la otra parte es exportada fuera de la hoja hacia tejidos y órganos no fotosintéticos. Los fotoasimilados producidos tienen dos funciones la producción de energía y la síntesis de nuevos compuestos como coenzima del complejo B, que son esenciales para el desarrollo radicular y el metabolismo respiratorio. La formación de un sistema radicular desarrollado permitirá la absorción de nutrientes del suelo y agua para el mantenimiento de la planta (Hopkins and Hüner, 2004).

También se presentó diferencias en cuanto al área foliar de las plantas obtenidas *in vitro* de *C. arabica* L. en la fase de aclimatización en diferentes composiciones de sustratos.

En el tratamiento II se obtuvo una mayor área foliar 0.90 dm², lo cual contribuye a una mayor superficie para actividad fotosintética de la planta; aunque este tratamiento no presentó diferencias significativa con los tratamientos I y III. Sin embargo, en el tratamiento IV solamente se obtuvo 0.37 dm² de área foliar (Tabla 6).

Tabla 6. Área foliar en plantas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en diferentes composiciones de sustrato

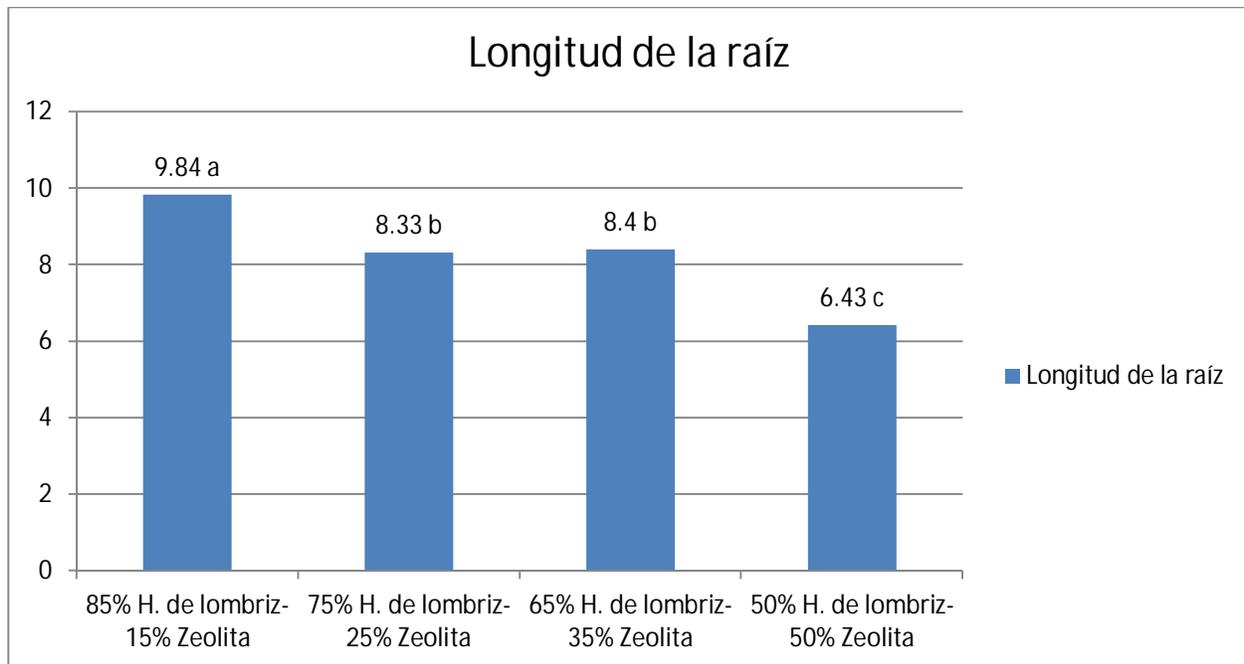
Tratamiento	Área foliar (dm ²)	
	Media	EE
85% Humus-15% Zeolita (I)	0.88 a	± 0.05
75% Humus-25% Zeolita (II)	0.90 a	± 0.03
65% Humus-35% Zeolita (III)	0.67 ab	± 0.03
50% Humus-50% Zeolita (IV)	0.37 b	± 0.01

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba de Bonferroni para $p < 0.05$

Este resultado fue mejor al obtenido por Barry–Etienne *et al.* (2002) cuando utilizaron cotiledones largos de 2.9 cm en sustrato compuesto por suelo–arena–pulpa de café (2:1:1) en la fase de aclimatización y solo obtuvieron un promedio de 0.18 dm² de área foliar.

También se determinó la influencia de la composición del sustrato en la longitud de la raíz de las plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo en la fase de aclimatización en la casa de cultivo. En el tratamiento I (85% Humus de lombriz y 15% Zeolita) se obtuvo un mayor crecimiento de la raíz con una longitud de 9.84 cm a los 115 días de plantadas y crecimiento en casa de cultivo, con diferencias significativa con los otros tratamientos. Siendo el tratamiento IV donde se obtuvo la menor longitud de la raíz (4.63 cm) (Figura 15).

Barry-Etienne *et al.* (2002) utilizaron sustratos compuestos por suelo, arena y pulpa de café (2:1:1) en la fase de aclimatización de embriones largos de *C. arabica* L. y obtuvieron un crecimiento rápido y vigoroso.



Medias con letras desiguales en una misma columna difieren según prueba de Bonferroni para $p < 0.05$

Figura 15. Efecto de la composición física del sustrato en la longitud de la raíz de las plantas de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo obtenidas por embriogénesis somática

Las plantas de café durante los primeros días en fase de aclimatación perdieron las raíces que habían emitido durante la germinación y emitieron nuevas raíces. Lo anteriormente descrito pudo deberse a que las raíces tenían una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote, lo que produce un mal funcionamiento de estas estructuras (García *et al.*, 2000) y su pérdida.

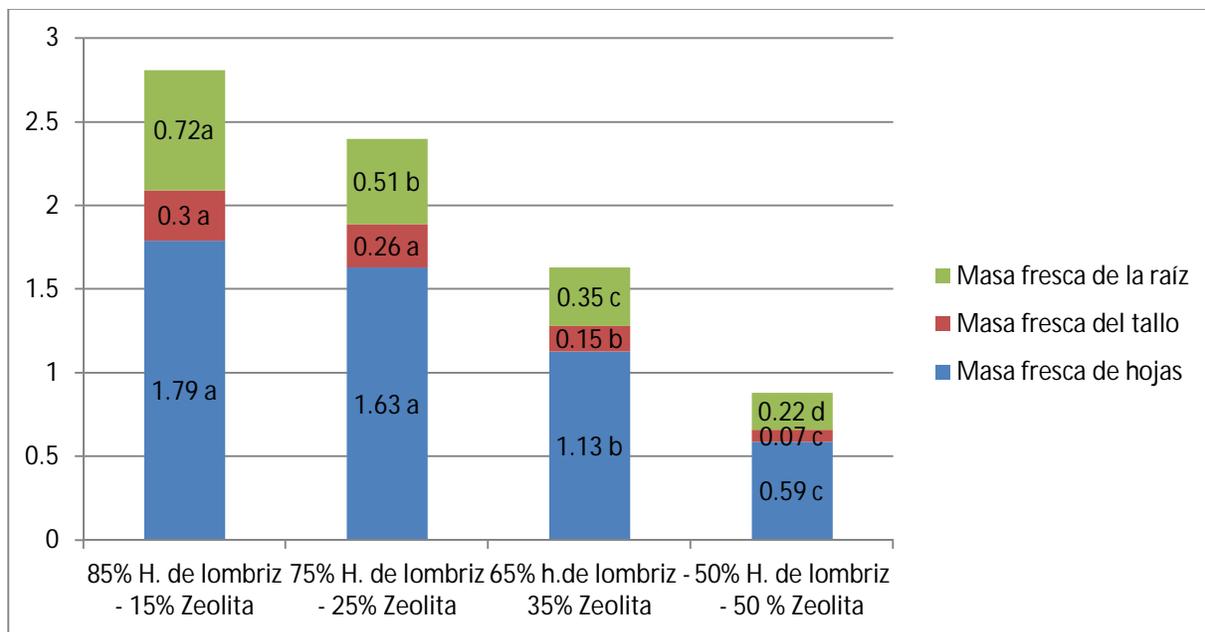
Los resultados descritos en el presente trabajo pudieran estar relacionados con las características que le confiere la zeolita a la materia orgánica. Según (Flores *et al.*, 2006) la zeolita, reduce drásticamente la lixiviación de los cationes potasio (K^+) y amonio (NH_4^+), también facilita la solubilización de los fosfatos haciendo el fósforo más asimilable a las plantas y en consecuencia, estimula el desarrollo radicular. La zeolita es un aluminio silicato hidratado cristalino con estructuras tridimensionales, caracterizados por la habilidad de retener y liberar agua e intercambiar iones sin modificar su estructura atómica, intercambian cationes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y NH_4^+ ; así como diversos compuestos de fosfatos, amonio y componentes de la materia orgánica. Posee una estructura tridimensional rígida conformada por una red de túneles interconectados creando una amplia área superficial para realizar el intercambio catiónico y la adsorción

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de humedad. Estas características redundan en que no todos los objetivos de los tratamientos pretendidos con zeolitas resultan adecuados si no se conoce el tipo de material a utilizar para cada actividad en particular. La retención de agua por parte de la zeolita coadyuva a disminuir la concentración de nitratos presentes en la lixiviación del suelo. La zeolita, al ser altamente hidrofílica, facilita la absorción de nutrientes por las plantas, ya que éstos son tomados por las raíces (Chica *et al.*, 2006).

Respecto a la masa fresca y la masa seca de las plantas *in vitro* de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo en su fase de aclimatización. En los tratamientos I y II se obtuvo el mayor contenido de masa fresca y seca de hojas (1.79 g) y tallo (0.3 g). Sin embargo en el tratamiento I los valores de masa fresca y masa seca de la raíz fueron superiores al tratamiento II (Figura 16 y 17).

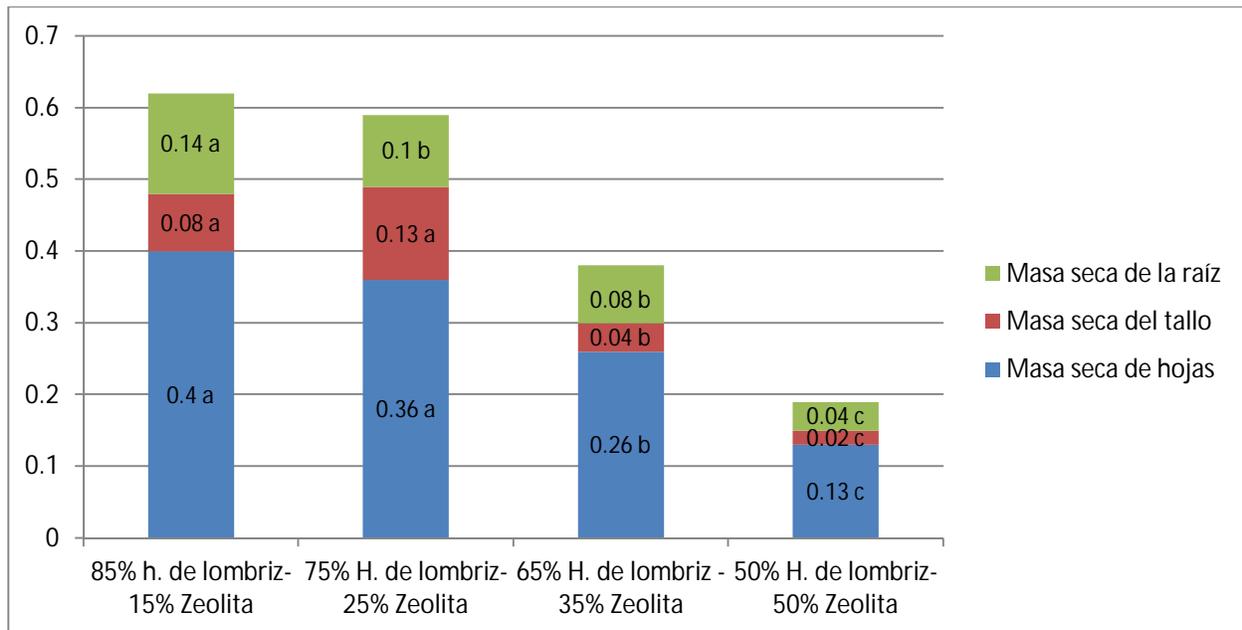
El tratamiento IV obtuvo menor masa fresca y masa seca de hojas, tallo y raíz lo cual indica que no tuvo un crecimiento eficiente como los otros tratamientos (sustancia de reserva y agua). Lo cual indica la necesidad de incrementar el porcentaje de materia orgánica como humus de lombriz en la composición del sustrato.



Para las variables masa seca de las hojas y masa seca del tallo las medias con letras desiguales difieren según prueba de Bonferoni para $p < 0.05$ y para la variable la raíz las medias con letras desiguales difieren según la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$

Figura 16. La influencia de la composición física del sustrato en la masa fresca de la planta de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo en la fase de aclimatización

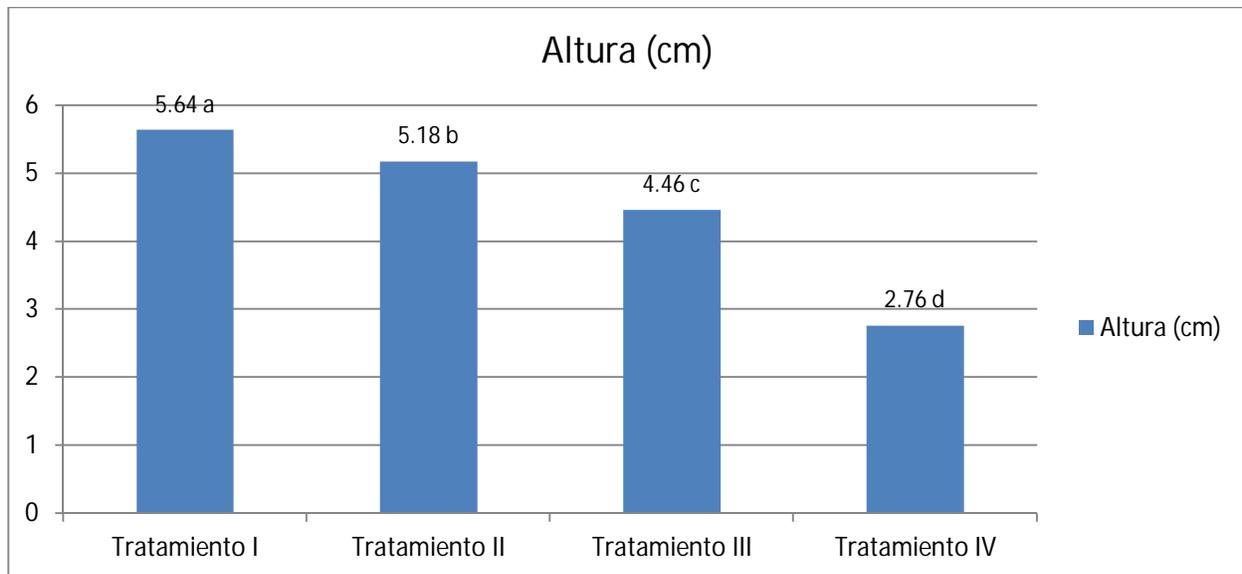
Hien Nguyen Thi (2014)



Para la variable masa seca de las hojas las medias con letras desiguales difieren según prueba de Bonferroni para $p < 0.05$ y para las variables masa seca de la raíz y el tallo las medias con letras desiguales difieren según la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$

Figura 17. La influencia de la composición física del sustrato en la masa seca de la planta de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo en la fase de aclimatización

En cuanto a la altura de las plantas obtenidas en la fase de aclimatización, como se observa en la figura 18 el tratamiento I obtuvo la mayor altura de la planta con promedio de 5.64 cm y se presentó diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, mientras que, el tratamiento IV solo obtuvo una altura de 2.76 cm como promedio.

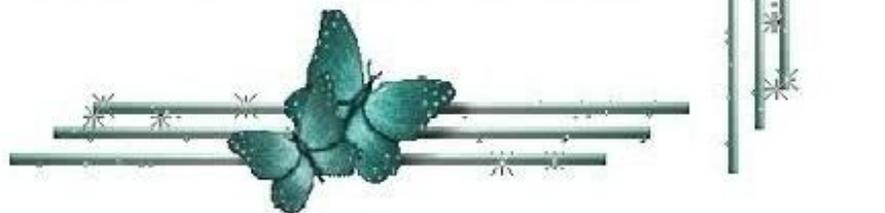


Medias con letras desiguales difieren según la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0.05$

Figura 18. Efecto de la composición física del sustrato en la altura de las plantas obtenidas *in vitro* de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo en la fase de aclimatización

De acuerdo con del Rivero (2008) al estudiar el efecto de diferentes sustratos en la conversión de los embriones somáticos de *Anthurium andraeanum* L., la altura obtenida de las plantas fue mejor en el tratamiento con 80% Humus de lombriz y 20% Zeolita. Los resultados obtenidos mostraron que en todos los sustratos evaluados se logró la conversión en plantas de los embriones somáticos germinados. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron en los sustratos compuestos por 75% Humus de lombriz - 25% Zeolita y 85% Humus de lombriz-15% Zeolita.

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

1. Los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®] son factibles para la germinación de embriones somáticos de café.
2. Los mejores resultados de germinación (60%) en los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA[®] se obtienen con una densidad de 70 embriones somáticos por RITA[®].
3. Los mejores resultados en cuanto al desarrollo morfológico de las plantas se obtuvieron con sustratos compuestos por 75% Humus de lombriz-25% Zeolita y 85% Humus de lombriz-15% Zeolita, además de lograrse una supervivencia de 100 y 96.4% respectivamente.

RECOMENDACIONES



6. RECOMENDACIONES

1. Emplear los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® para la germinación de los embriones somáticos de café.
2. Profundizar en el estudio de otras condiciones de cultivo en los Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® para incrementar el porcentaje de germinación de los embriones somáticos de café.
3. Utilizar sustratos compuesto por 75% Humus de lombriz - 25% Zeolita y 85% Humus de lombriz - 15% Zeolita para un buen desarrollo morfológico de las plantas de café en la fase de aclimatización.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIS, R., POSADA-PÉREZ, L., RAFAEL, G., REYES, M. & TEJEDA, M. 2009. Aclimatización de plantas de *Carica papaya* var. Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática. *Biotechnología Vegetal*, 9(2), 91 - 97.
- ANDRÉS, M., GRISELDA, A. & ANA, M. 2008. Direct somatic embryogenesis in *coffea arabica* L. cvs. Caturra and catuaí: effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. *Agronomía Costarricense*, 32(1).
- ARCIONI, S. & MARIOTT, I. D. 1982. Tissue culture and plant regeneration in the forage legumes *Onobrychis viciaefolia* Scop., *Carolina varia* and *Lotus corniculatus* L. *Plant Tissue Culture. Fujiwara. A. De Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo.*
- BARBÓN, R., JIMÉNEZ, E. & CAPOTE, A. 2004a. Influencia del genotipo y la densidad de inoculación sobre la diferenciación de embriones somáticos de *C. arabica* cv. Caturra rojo y *C. canephora*. *Biotechnología Vegetal*, 3(3), 131 - 135.
- BARBÓN, R., JIMÉNEZ, E., CAPOTE, A., GIL, V. & OCAÑA, B. 2004b. Efecto de los agentes selectivos kanamicina y sulfadiacina sobre el proceso de embriogénesis somática en *Coffea arabica* cv. Caturra rojo. *Biotechnología Vegetal* 4(4), 217 - 223.
- BARRANCO, L. 2001. *Embriogénesis somática en banano (Musa AAAB, cv. FHIA-18) empleado medios de cultivos líquidos*. Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- BARRY - ETIENNE, D., BERTRAND, B., SCHLÖNVOIGT, A. & ETIENNE, H. 2002. 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, Tissue and Organ Culture*, 68, 153 – 162.
- BERTHOULY, M. & ETIENNE, H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: HVOSLEF-EIDE AK, P. W. (ed.) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht: Springer.
- CABASSON, C., ALVARD, D., DAMBIER, D., OLLITRAULT, P. & TEISSON, C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 50, 33 - 37.
- CHACÓN, A., GABRIELA, L., GÓMEZ, S. & TORRES, F. 2005. Aclimatización de plántulas de Yambí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. alata*) producidas *in vitro*. *Agronomía ostarricense*, 29 (3), 47 - 58.
- CHICA, F., LONDOÑO, L. & ÁLVAREZ, M. 2006. La zeolita en la mitigación ambiental. *Revista Lasallista de Investigación, Corporación Universitaria Lasallista Antioquia, Colombia*, 3(1), 30 - 34.
- CORALSA. 2009. *Cómo llegó a Cuba?* [Online]. <http://www.coralsa.com.cu/cafe/cafe.htm>. [Accessed 27, enero 2014].
- CRUZ, M., DARÍAS, L., CABRERA, D., PÉREZ, A., CRUZ, M., PICHARDO, M., RA, T., KOSKY, G. & PORTAL, O. 2008. Enraizamiento y aclimatización de plantas transgénicas de papaya var. Maradol roja. *Biotechnología Vegetal*.
- CRY, D., WEBSTER, F. & ROBERTS, D. 1991. Biochemical events during germination and early growth of somatic embryos and seed of interior spruce (*Piceaglaucaengelmannii* complex). *Seed. Sct. Res.*, 1, 91-104.

- DAS, D., REDDY, M., UPADHYAYA, K. & SOPORY, S. 2002. An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep*, 20, 991 - 1005.
- DE FERIA, M. 2000. *Empleo de biorreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de Coffea arabica L. cv. Catimor 9722*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, UCLV.
- DE FERIA, M., JIMENÉZ, E., BARBÓN, R., ALINA, C., MAITÉ, C. & ELISA, Q. 2005. Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9772 obtenidos en agitador orbital. *Biotecnología vegetal*, 5(2), 95 – 101.
- DE REZENDE, J., DE CARVALHO, C., CAROLINA, R., PASQUAL, M. & BATISTA, J. 2012. Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, 34(1), 93 - 98.
- DEL RIVERO, N. 2008. *Embriogénesis somática de Anthurium andraeanum Lind. variedad "LAMBADA" en medio de cultivo semisólido*. Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
- DODEMAN, V., DUCREUX, G. & KREIS, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(313), 1493-1509.
- DUBLIN, P. 1981. Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabust. *Café Cacao Thé*, 25, 237 – 242.
- DUCOS, J., LAMBOT, C. & PÉTIARD, V. 2007. Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1(1), 1 - 12.
- DUFOUR, M., BERTHOULY, M., ALVARD, D., CARASCO, C. & TEISSON, C. 1995. El sistema de inmersión temporal : un nuevo método de propagación *in vitro* del cafeto en medio líquido. *Proceedings of the XVII Símpoio sobre Caficultura Latinoamericana*. San Salvador, El Salvador.
- DUICELA, L. & SOTOMAYOR, I. 1993. *Principales variedades. Manual del cultivo del café*, Quevedo, Ecuador.
- ESCALONA, M., LORENZO, J., GONZÁLEZ, B., DAQUINTA, M., GONZÁLEZ, J., DESJARDINS, Y. & BORROTO, C. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep*, 18, 743 - 748.
- ESCALONA, M., SAMSON, G., BORROTO, C. & DESJARDINS, Y. 2003. Physiology of the effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 39, 651.
- ETIENNE, B., BERTRAND, B., VASQUEZ, N. & ETIENNE, H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep*, 19, 111-117.
- 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. Dev. Biol. Plant*, 38, 129 – 138.
- ETIENNE, H. & BERTHOULY, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215 - 231.
- ETIENNE, H., BERTRAND, B., ANTHONY, F., CÔTE, F. & BERTHOULY, M. 1997. L'embryogenèse somatique : un outil pour l'amélioration génétique du caféier.

- Proceedings of the 17th International Scientific Colloquium on Coffee* Nairobi, Kenya: ASIC.
- EVANS, D., SHARP, W. & FLICK, C. 1981. Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T. (ed.) *Plant Tissue Culture, methods and applications in agriculture*. New York: Academic Press.
- FEHER, A. 2006. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A. & SAMAJ, J. (eds.) *Plant Cell Monographs*. Berlin Heidelberg: Springer - Verlag.
- FERNÁNDEZ, J., COLLAZO, E., CORTEZ, S. & MARTÍN, J. 1988. *Cultivo de café*, La Habana, Departamento de publicaciones del Instituto Superior de Ciencias Agrarias de La Habana.
- FLORES, J., MAUBERT, A. & MARTÍN, N. 2006. Evaluación de los intercambios iónicos en una zeolita natural Mexicana para la separación de N₂-O₂ en el aire atmosférico. *Revista mexicana de ingeniería química, Universidad autónoma metropolitana – Iztapalapa, Distrito Federal, México*, 5(2), 119 - 129.
- FUENTES, S., CALHEIROS, M., MANETTI-FILHO, J. & VIEIRA, L. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 5 - 13.
- FUJI, J., SLADE, D., OLSEN, R., RUZIN, S. & REDENBAUGH, K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science (Limerick)*, 72, 93 - 101.
- GARCÍA, M., JUNCO, L., NODA, A. & LORENZO, D. 2000. Aclimatación de vitroplantas de tres especies del género *Eucalyptus*. *CIGET, Laboratorio de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río, CUBA*, 2(4).
- GEORGE, E., HALL, M. & JAN DE KLERK, G. (eds.) 2008. *Plant propagation by tissue culture*: Springer.
- GIRIDHAR, P., KUMAR, V., INDU, E., RAVISHANKAR, G. & CHANDRASEKAR, A. 2004. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. ex Fr. *Acta Bot. Croat*, 63, 25–33.
- GONZÁLEZ, M. & BARRIOS, M. 2003. Estudio sobre contaminantes fúngicos en la formación de callos a partir de explantes foliares de *Coffea* sp. *Biotecnología Vegetal*, 3(2), 97 - 100.
- GONZÁLEZ, M., HERNÁNDEZ, M., MARZORRA, L., SANTANA, N., RODRÍGUEZ, Y. & CABRERA, M. 2005. Influencia de la época del año en la respuesta *in vitro* del café *C. canephora* P. var. Robusta. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(1), 5 - 14.
- GONZÁLEZ, O., SILVA, J., ESPINOZA, A., ROS, C., ACOSTA, L., MENESES, S. & HERNÁNDEZ, M. 2002. La embriogénesis somática en *Ipomoea* : Una posibilidad para la multiplicación y conservación de los recursos vegetales. *Cuad. Biodiversidad*, 4, 15 – 21.
- GRAY, D. & PUROHIT, A. 1991. Somatic embryogenesis and development of synthesis seed technology. *Plant Sciences*, 10, 33 – 61.
- GRIGA, M. 2000. Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via somatic embryogenesis. *Biología Plantarum*, 43 (2), 161 - 165.
- GUTIÉRREZ-MORA, A., GONZÁLEZ-GUTIÉRREZ, A., RODRÍGUEZ-GARAY, B., ASCENCIO-CABRAL, A. & LI-WEI, L. (eds.) 2012. *Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations Embryogenesis*: InTech, China.

Hien Nguyen Thi (2014)

Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® y su conversión en casa de cultivo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUTIÉRREZ-MORA, A., RUVALCABA-RUIZ, D., RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, J., LOERA-QUEZADA, M. & RODRÍGUEZ-GARAY, B. 2004. Recent advances in the biotechnology of Agave: A embryogenesis cell approach. *Recent Research Developments in Cell Biology*.
- GUTIÉRREZ - MORA, A., GONZÁLEZ - GUTIÉRREZ, A., RODRÍGUEZ - GARAY, B., ASCENCIO - CABRAL, A. & LI - WEI, L. 2012. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations Embryogenesis. In: KEN - ICHI, S. (ed.). China: InTech.
- HAZARIKA, B. 2003. Acclimatization of tissue culture plants. *Current Science (Bangalore)*, 85(12), 1704 - 1712.
- HENRY, R., NORMA, D. & CHEN, J. Year. Progress in ornamental aroid breeding reseach. In: VIII Int. Aroid Conf. Missouri Bot. Garden, 2002. St. Louis, MO, 5.
- HIRAGA, S., MINAKAWA, H., TAKAHASHI, K., TAKAHASHI, R., HAJIKA, M., HARADA, K. & OHTSUTO, N. 2007. Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars. *Plant Biotechnology Journal*, 24, 435 - 440.
- HURTADO, O. 2012. *Aclimatización y multiplicación vegetativa en casas de cultivo de plantas cultivadas in vitro de Bambusa vulgaris var. vulgaris Schrad. ex Wendl.* Tesis Maestría, Univeridad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- ISAAC, E., GONZÁLEZ, J., RIVAS, M. & MORENO, A. 2010. Evaluación de la actividad fotosintética asociada con el intercambio gaseoso de dos variedades de *C. arabica* L. obtenidas por cultivo *in vitro* *Cultivos Tropicales*, 31(2), 74 - 76.
- IVANOVA, M. & VAN STADEN, J. 2011. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in Aloe polyphylla. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104, 13-21.
- JIMÉNEZ, V. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47, 99 - 110.
- JIMÉNEZ, V. & THOMAS, C. 2006. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: MUJIB, A. & SAMAJ, J. (eds.) *Plant Cell Monographs*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- JUAN, J., ANTONIO, R., JIMÉNEZ, A., DE JESÚS, S., ARENAS-OCAMPO, M., VENTURA-ZAPATA, M. & EVANGELISTA, L. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* Rchb. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica*, 32, 107 - 117.
- KAMLE, M., BAJAI, A., CHANDRA, R., KALIM, S. & KUMAR, R. 2011. Somatic embryogenesis for crop improvement. *GERF Bulletin Biosciences*, 2(11), 54 - 59.
- KITA, Y., NISHIZAWA, K., TAKAHASHI, M., KITAYAMA, M. & ISHIMOTO, M. 2007. Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *plant Cell Reports*, 26, 439 - 447.
- KOTT, L. & BEVERSDORF, W. 1990. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of Brassica napus by chilling partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 23, 187 - 196.
- KUMAR, V., NAIDU, M. & RAVISHANKAR, G. 2006. Developments in coffee biotechnology - *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87(1), 49-65.

Hien Nguyen Thi (2014)

Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® y su conversión en casa de cultivo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LACERRA, J. 2010. *Selección de variedades cubanas Coffea arabica L. con resistencia incompleta a Hemileia vastatrix Berk y Br.* . Máster en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana.
- LAI, C., LIN, H., NALAWADE, S., FANG, W. & TSAY, H. 2005. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *J of Plant Physiol*, 162, 355 - 361.
- LEZCANO, Y., ESCALONA, M. & DAQUINTA, M. 2011. Multiplicación *in vitro* de *Paeonias* sp. variedad "SeSu" en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal*, 10(3), 169 - 175.
- LÓPEZ, G., IRACHETA, D., CASTELLANOS, J., MÉNDEZ, L., SANDOVAL, E., AGUIRRE - MEDICINA, J., OJEDA - ZACARÍAS, C. & GUITIÉRREZ, D. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotécnica mexicana*, 33(3).
- LORENZO, J., GONZÁLEZ, B., ESCALONA, M., TEISSON, C., ESPINOSA, P. & BORROTO, C. 1998. Sugarcane shoot formation in an temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 54 197-200.
- MARCELO, A. 2000. *Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto (Coffea spp.), mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares.* Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana.
- MCKERSIE, B. & BROWLEY, D. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seed in forage legumes. *Seed Science Research*, 6, 109 - 126.
- MERKLE, S., PARROTT, W. & FLINN, B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. (ed.) *In vitro Embryogenesis in Plant*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- MORALES, C., DE LA FE, C., CORBERA, J. & CALAÑA, J. 2009. Estudio de la aclimatización de vitroplantas de anturio (*Anthurium andreaeanum* Lin.) *Cultivos Tropicales*, 30(4), 48 - 51.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473 - 497.
- NEUENSCHWANDER, B. & BAUMANN, T. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 10, 608 - 612.
- NOMURA, K. & KOMAMINE, A. 1995. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. (ed.) *In vitro Embryogenesis in Plants*.
- NORIEGA, C. & SÖNDAHL, M. 1993. Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors. *Proceedings of the 15th International Scientific Colloquium on Coffee* Montpellier, France: ASIC.
- ORGANIZATION, I. I. C. 2010. *ICO Annual Review 2010* [Online]. Available: <http://www.ico.org/> [Accessed 2010].
- PAGNUSSAT, G., ALANDETE - SAEZ, M., BOWMAN, J. & SUNDARESAN, V. 2009. Auxin dependent patterning and gamete specification in the *Arabi dopsis* female gametophyte. *Science & Culture*, 324(5939), 1684 - 1689.

Hien Nguyen Thi (2014)

Germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal tipo RITA® y su conversión en casa de cultivo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PARROTT, W. 1993. Cell culture the Biotechnology applications for banana and plantain improvement. *Proceeding of the workshop on biotechnology applications for banana and plantain improvement*. San Jose, Costa Rica. INBAP.
- QUIROZ-FIGUEROA, F., FUENTES-CERDA, C., ROJAS- HERRERA, R. & LOYOLA-VARGAS, V. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Reports*, 20(12), 1141–1149.
- RANCH, J. & PALMER, R. 1987. A ploidy variant regenerated from embryogenetic tissue cultures of soybean. *Soybean Genet, Newslett*, 14, 116 - 163.
- REINERT, J. 1958. Über die kontrolle der morphogenese und die induction von adventivembryonen an gewebekulturenauskarotten. *Planta (Heidelberg)*, 53, 318 – 333.
- RIVAS, F., RUZ, R., BATISTA, E., SANTIAGO, R. & LEYVA, H. 2005. Evaluación de sustratos para la producción de posturas de tabaco en condiciones de casa de cultivo. *Centro Agrícola, Centro Universitario de Las Tunas, provincia de Las Tunas*, 32(4).
- RODRÍGUEZ-GARAY, B., SANTACRUZ-RUVALCABA, F., LOERA-QUEZADA, M. & GUTIÉRREZ-MORA, A. 2000. Embriogénesis sexual y somática en plantas. *Horticultura Mexicana*, 8(1), 104 - 113.
- SÁNCHEZ, A., SUARÉZ, E., LABARCA, C., VILORIA, Z., ALBANY, N., VÍLCHEZ, J. & BRACHO, B. 2007. Aclimatación de vitroplantas sin raíces de zábila (*Aloe vera* L. Burm. f.) de diferentes tamaños. *Rev. Fav. Agron.*, 24(1), 67 - 72.
- SANTANA - BUZZY, N., ROJAS - HERRERA, R., GALAZ - ÁVALOS, R., KU - CAUICH, J., MIJANGOS - CORTÉS, J., GUTIÉRREZ-PACHECO, L., ADRIANA, C., QUIROZ - FIGUEROA, F. & LOYOLA - VARGAS, V. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant* 43, 507–520.
- SANTANA, N., CORTÉS, S., MARTÍN, J. & MONTES, S. 1996. Adaptación de vitroplantas de embriones somáticos de cafeto (*C. arabica* L.) variedad Catimor (9722). *Cult. Trop*, 11, 429 – 435.
- SHARP, W., EVANS, D., AMMIRATO, P. & YAMADA, Y. 1984. Principles and Applications. *Plant Cell and Tissue Culture*, 892 - 898.
- SONDAHL, M. & SHARP, W. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschriftfur Pflanz en physiologie*, 81, 395 - 408.
- SONDAHL, M., SPAHLINGER, D. & SHARP, W. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschriftfur Pflanz en physiologie*, 94(2), 101– 108.
- SONG, X., HAN, Y., TENG, W., SUN, G. & LI, W. 2009. Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.). *Plant Cell Reports*, 10.
- STEWART, F., MAPES, M. & MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45, 705–708.

- STUART, D. & STRICKLAND, S. 1984. Embryogenesis from cell culture of *Medicago sativa*. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Sciences Letters*, 34, 74 - 82.
- SUARÉZ, M., KOSKY, G., CHONG, B., REYES, M., GARCÍA, L., SARRÍA, Z., ORELLANA, P., RODRÍGUEZ, A., TRIANA, R., PÉREZ, Z., GONZÁLEZ, M., LEÓN, M. & PÉREZ, B. 2012. Estrategia de innovación tecnológica para el empleo de embriogénesis somática en medios de cultivo semisólido en *Musa* spp. y su impacto económico. *Biotecnología Vegetal*, 12(1), 41 - 48.
- TEISSON, C. & ALVARD, D. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: TERZI, M., CELLA, R. & FALAVIGNA, A. (eds.) *Current plant science and biotechnology in agriculture, 22: current issues in plant molecular and cellular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publ.
- THORPE, T. & STASOLLA, C. 2001. Current trends in the embryology of angiosperms. In: BHOJWANI, S. & SOH, W. (eds.). Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers.
- VAN - BOXTEL, J. & BERTHOULY, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 44, 7 - 17.
- VAN DER VOSSEN, H. 2001. Coffee breeding practices. In: CLARKE, R. & VITZTHUM, O. (eds.) *Coffee recent developments*. London: Blackwell Science.
- VILCHEZ, J. 2001. *Embriogénesis somática y regeneración de plantas en el guayabo Psidium guajava L. cv. Enana Roja Cubana EEA 18-40*. Tesis Maestría en Biotecnología Vegetal, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- WU, Z., CHEN, L. & LONG, Y. 2009. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45, 483-490.
- YANG, S. & DM, Y. 2008. In vitro leaf anatomy, ex vitro photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 93, 201-207.
- ZAMARRIPA, A. 1993. *Study and development of somatic embryogenesis in liquid medium of coffee*. PhD Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- ZAMARRIPA, A., DUCOS, J., TESSERAU, H., BOLLON, H., DUFOUR, M. & PETIARD, V. 1991. Production d'embryons somatiques de café en milieu liquide. Effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao Thé*, 35, 233-244.
- ZIV, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Hortic Rev* 24, 1 - 30.