



Federación Nacional de
Cafeteros de Colombia

Gerencia Técnica

Programa de Investigación Científica

Centro Nacional de Investigaciones de Café

"Pedro Uribe Mejía"

ISSN - 0120 - 0178

Cenicafé

AVANCES TÉCNICOS

Número 141

Abril 1989

INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

La Federación Nacional de Cafeteros de Colombia inició investigaciones sobre el cultivo *in vitro* del café en el año de 1977 en el LIQC (Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y Productos Naturales) y, tres años más tarde, en CENICAFE (Centro Nacional de Investigaciones de Café).

Los primeros proyectos de investigación fueron aquellos tendientes a la definición de métodos que permitieran estudiar en las células y bajo condiciones controladas, los mecanismos de defensa del cafeto contra la roya (5).

Posteriormente la Federación continuó apoyando las investigaciones tanto en el LIQC como en CENICAFE, con recursos y personal propios, lo cual permitió la ampliación de los objetivos hacia la obtención de plantas mejoradas.

De las investigaciones desarrolladas y en progreso, se pueden destacar los resultados obtenidos en cuanto al desarrollo de técnicas para la propagación *in vitro* de varias especies del género *Coffea*; la regeneración de plantas por embriogénesis somática, su adaptación, cultivo y evaluación bajo condiciones de campo; el aislamiento y cultivo de protoplastos, tanto de tejido del mesófilo como a partir de células en suspensión y la propagación de híbridos interespecíficos, a través del rescate de embriones (14, 12).

Más recientemente, a partir de 1987, se han estudiado y adaptado nuevas técnicas, tales como el cultivo de anteras y la embriogénesis somática directa.

CENICAFE ha adaptado y desarrollado una tecnología básica para el cultivo de tejidos en café, la cual se está aplicando esencialmente con propósitos genéticos. Algunos de estos trabajos, como el cultivo de embriones, con resultados evidentes en el aumento del número y la obtención de nuevas combinaciones genéticas a partir de plantas híbridas recuperadas de cruzamientos interespecíficos.

El objetivo primordial es obtener por todos los medios, nuevas combinaciones genéticas, útiles en el programa de fitomejoramiento tales como: plantas de *C. arabica* con nuevos genes de resistencia a enfermedades, plagas o condiciones ambientales adversas.

A continuación se describe el estado actual de investigación y desarrollo de las distintas técnicas biotecnológicas en CENICAFE.

PROPAGACION POR MICROESTACAS

Las microestacas son trozos de tallo con un nudo en los cuales se induce *in vitro* el desarrollo de yemas que producen brotes, los cuales se subdividen.

En CENICAFE se ha logrado el desarrollo de brotes desde los ocho días después de sembradas las microestacas. De un mismo nudo, sucesivamente se han obtenido numerosos brotes ortotrópicos. Se ha superado el número reportado en la literatura (máximo 12). En algunos casos se han obtenido hasta 25 brotes de un mismo nudo (microestaca). Además cada brote se puede subdividir, obteniéndose en varios subcultivos numerosas plantas a partir de una estaca (9).



Microestaca con brotes.



Cultivo de brotes subdivididos
provenientes de una
microestaca.

Esta técnica ofrece las siguientes ventajas:

- Reproducción genética idéntica de la planta original.
- Tasa de multiplicación alta, con relación a la producción de estacas en condiciones de enraizador.
- Utilización de materiales excedentes (hojas y meristemas terminales) para la conservación y propagación *in vitro*.
- Asepsia, que puede facilitar el intercambio internacional.
- Permite conservar germoplasma.

En CENICAFE se está utilizando este sistema de propagación para multiplicar materiales valiosos y promisorios de origen híbrido.

CULTIVO DE MERISTEMAS

Los meristemas son los puntos de crecimiento de la planta (yemas) los cuales pueden extraerse y cultivarse *in vitro*. En café se utilizan para propagación las yemas ortotrópicas.

En CENICAFE se estandarizó esta técnica para materiales de *C. arabica* provenientes del campo y se pretende iniciar, con su aplicación, la conservación *in vitro* de germoplasma valioso genéticamente y de algunas especies y variedades de la colección de germoplasma de CENICAFE. Las plantas propagadas por este método tienen crecimiento lento y estabilidad genética (1, 8).



Meristema recién sembrado.



Plántula proveniente de un meristema.

CULTIVO DE EMBRIONES

Es una técnica básica en hibridación interespecífica en café, mediante la cual se pueden aumentar las posibilidades de introducir características de las especies diploides a las variedades cultivadas de la especie *C. arabica*. Muchas semillas de origen híbrido interespecífico no se desarrollan (mueren), debido a la incompatibilidad en el endospermo. Al aislar y cultivar *in vitro* los embriones inmaduros se puede dar origen a nuevos híbridos.

En CENICAFE se ha logrado, durante los años 1988 - 1989, cultivar *in vitro*, más de 3.800 embriones híbridos entre la especie *C. arabica* y las especies diploides, *C. canephora*, *C. liberica*, *C. stenophylla* y *C. racemosa*. Se ha aumentado el número de combinaciones híbridas y se han obtenido algunas nuevas plantas, lo que es imposible por métodos tradicionales.

La técnica permite, además, llevar a cabo estudios de nutrición y estudios físicos y ambientales, ya que las plántulas responden rápidamente a cambios físicos y químicos muy leves en el medio (7).



Embriones inmaduros recién sembrados.



Embriones en germinación.

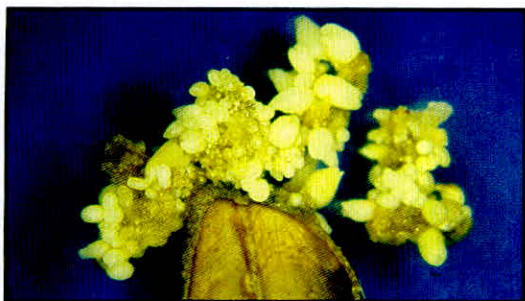


Plántulas provenientes de embriones de híbridos.

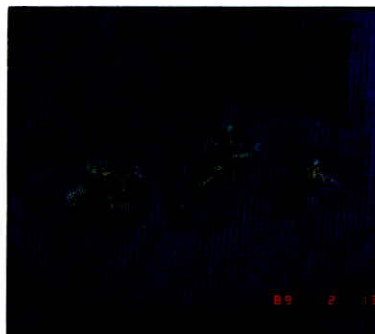
EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA

Esta técnica consiste en obtener embriones directamente a partir de tejido somático como hojas, tallos y raíces. Las características genéticas de los embriones somáticos son diferentes a las de los embriones cigóticos o de semillas.

Mediante la embriogénesis, a partir del trozo de tejido (explante) inicial, hay mayor probabilidad de obtener plantas genéticamente idénticas a la original. Esta técnica puede usarse en la propagación clonal de materiales de importancia genética.



Trozo de hoja con numerosos embriones.



Embriones en desarrollo con nuevos embriones.

Los primeros embriones somáticos obtenidos directamente del trozo de tejido se observan 10 semanas después de sembrado el explante. Es posible obtener numerosos embriones somáticos directos de tejidos de plantas híbridas (8).

Una hoja posee entre 30 y 50 cm² y cada cm² de hoja produce 120 embriones *in vitro* en 100 días. Algunos embriones somáticos pueden ser nuevas combinaciones genéticas (variantes somaclonales).

La embriogénesis somática se está utilizando con el propósito de obtener nuevas combinaciones genéticas de origen interespecífico y como sistema probable de multiplicación masiva de plantas sobresalientes.

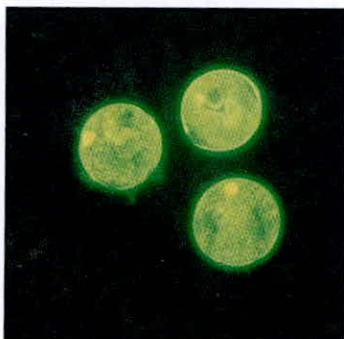
CULTIVO DE ANTERAS Y DE GRANOS DE POLEN AISLADOS

Mediante el cultivo de anteras o de granos de polen *in vitro*, es posible inducir la transformación de los granos de polen inmaduros en embriones, originándose así plantas haploides (con la mitad de las características genéticas del padre). Al duplicarse natural o artificialmente el juego cromosómico, se origina una planta completamente homocigótica (con dos juegos de cromosomas idénticos), en una sola generación.

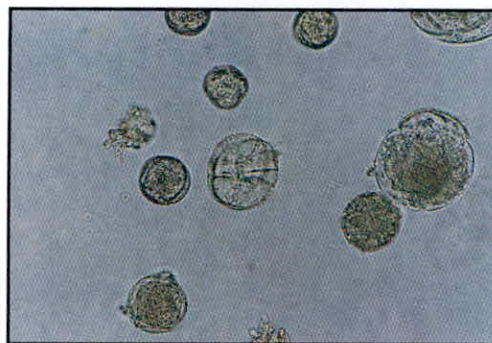
En mejoramiento genético esta técnica permite la producción de combinaciones híbridas homocigóticas en corto tiempo. Es decir, se pueden obtener plantas híbridas que no segregan y se pueden propagar por semilla en pocas generaciones (13).

Se determinó el estado óptimo de desarrollo del botón floral para el cultivo de anteras y se hicieron las variaciones del medio de cultivo. Actualmente se tienen más de 400 plántulas y 2.000 embriones provenientes de anteras de híbridos interespecíficos cultivados *in vitro* y probablemente haploides, éstos, después de su duplicación, se seleccionarán para detectar las combinaciones híbridas deseables (9).

La técnica de cultivo de polen aislado permite controlar y estudiar todos los factores que están determinando el desarrollo esporofítico del polen, y se constituye en una interesante alternativa para la obtención de haploides en café.



Microesporas de café cultivadas *in vitro* y teñidas por la técnica de epifluorescencia.



Polen de café en plena división celular.

Los estudios realizados han permitido utilizar una metodología eficiente para aislar, cultivar y evaluar el desarrollo del polen de café bajo condiciones *in vitro*. Se analizó el efecto de factores tales como el tratamiento de inducción y algunos componentes del medio de cultivo (sales básicas, hormonas y azúcares), sobre la formación de estructuras celulares (microcolonias) derivadas del polen (6). Actualmente se está estudiando el uso de nuevas técnicas que permitan la regeneración de plántulas a partir de las estructuras embriogénicas obtenidas.

CULTIVO DE TEJIDOS DE OTRAS ESPECIES DE LA ZONA CAFETERA

Adicionalmente, se han llevado a cabo investigaciones con especies distintas al café tales como: plátano (*Musa* sp.) (10), naranja (*Citrus sinensis*) (5), pitahaya (*Hilocereus* sp.) (5) y piña (*Ananas comosus*), con resultados que permiten el desarrollo de futuras investigaciones en micropropagación, limpieza de material de siembra y, eventualmente, el mejoramiento genético.



Proliferación de yemas *in vitro*.

Se han llevado a cabo en CENICAFE estudios sobre el desarrollo de todas las yemas del cormo del plátano y se plantaron *in vitro*, encontrándose que todas las yemas son susceptibles de su cultivo con altas tasas de propagación. Se estableció así una metodología adecuada y eficiente para la propagación de variedades de plátano.

CITOLOGIA

Complementariamente, CENICAFE está desarrollando observaciones y análisis de células y tejidos del cafeto, al microscopio, con el objetivo de conocer las características de las células, de los tejidos y de las plántulas que se producen *in vitro*, y con el propósito de aumentar el conocimiento básico de la planta de café y sus partes. Para tal efecto se están adelantando estudios cromosómicos de anteras, granos de polen y raíces (10, 2, 3 y 4).



Cromosomas de *C. arabica*.



Granos de polen de *C. arabica*.

CENICAFE trabaja actualmente en el cultivo de células y tejidos de café como una tecnología básica con aplicaciones genéticas, para facilitar, aumentar y obtener nuevas combinaciones y variantes genéticas y propagar masivamente materiales valiosos, especialmente de origen híbrido, facilitando la obtención de nuevas variedades. En un futuro se pretende ingresar a la etapa de la utilización de la ingeniería genética en café, con el propósito de introducir a nuestras variedades los genes que éstas requieran y no existan, o sea imposible incorporarlos a partir de las especies diploides, tanto por los sistemas tradicionales de cruzamiento, como mediante las técnicas de cultivo *in vitro* ya mencionadas. Por su parte, en el LIQC se continúan las investigaciones utilizando cultivos de células en suspensión orientadas a la selección *in vitro*, estudios sobre fitoalexinas, cultivos haploides, aislamiento y regeneración de plantas de café a partir de protoplastos.

Las investigaciones realizadas coordinadamente por los dos laboratorios, constituyen la base de programas de investigación en Biotecnología Vegetal de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. APONTE DE L., M.E.; PIZZINI, W.R.; RODRIGUEZ, J. Cultivo de meristemas de café. *Cenicafé (Colombia)* 32(3):106-111. 1981.
2. ARCILA P., M.I. Estudio morfológico del desarrollo del embrión en café. *Cenicafé (Colombia)* 38(1-4):77-93. 1987.
3. ARCILA P., M.I.; OROZCO C., F.J. Descripción histológica del embrión de café. *Cenicafé (Colombia)* 38(1-4):79-93. 1987.
4. ARCILA P., M.I.; OROZCO C., F.J. Estudio morfológico del desarrollo del embrión de café. *Cenicafé (Colombia)* 38(1-4):62-78. 1987. Chinchiná (Colombia), CENICAFE, 1987.
5. CADENA G., G.; PEÑA DE, M. Actividades de investigación en Biotecnología de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. In: SEMINARIO Internacional sobre Políticas y Experiencias en Sectores Económicos de Tecnología Avanzada en América Latina y Colombia. Manizales (Colombia) 9-12 de octubre, 1988, Chinchiná (Colombia), CENICAFE, 1986. 6 p.
6. HERRERA P., J.C. Estudio de algunos factores que afectan el desarrollo androgénico *in vitro* de microesporas aisladas de *Coffea arabica* L. var. Colombia. Santafé de Bogotá (Colombia), Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. 1994. 118p. (Tesis Magister Science).
7. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J. El cultivo *in vitro* de células y tejidos del cafeto. *Cenicafé (Colombia)* 37(4):135-146. 1986. (Nota Técnica).
8. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J. Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo *in vitro*. *Cenicafé (Colombia)* 37(4):119-133. 1986.
9. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J. Avances recientes en cultivo de tejidos en café. Concurso Técnico 1988 Alberto Machado; Encuentro de Ingenieros Agrónomos, 5. Melgar (Colombia) agosto 12-15, 1988. Resúmenes.
10. OROZCO C., F.J.; CASSALETT D., C. Estudio cromatográfico de un híbrido interespecífico en café. *Cenicafé (Colombia)* 25(3):65-77. 1974.
11. OROZCO C., F.J.; LONDOÑO R., L.C. Estudio de las yemas del cormo del plátano *Musa AAB* y su cultivo *in vitro*. *Cenicafé (Colombia)* 37(3):75-86. 1986.
12. OROZCO C., F.J.; SCHIEDER, O. Aislamiento y cultivo de protoplastos a partir de hojas de café. *Cenicafé (Colombia)* 33(4):129-136. 1982. También en: SIMPOSIO sobre ferrugens do cafeiro. Oeiras (Portugal) 7-20 outubro. 1983. Sumarios das comunicações. P. 60. También en: Turrialba (Costa Rica) 34(4):534-536. 1984.
13. PACHETTI, P. 1982. Cultivo *in vitro* de anteras de *Coffea arabica* variedad Caturra. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá (Tesis M.S. Biología) 64 p.
14. PEÑA DE, M.; BUITRAGO DE S., H.L. Adaptación de plantas de *Coffea arabica* var. "Mundo Novo" obtenidas por embriogénesis somática, a cultivo bajo condiciones de campo. *Cenicafé (Colombia)* 35(3):66-76. 1984.