



Ciencias técnicas y aplicadas

Artículo Científico

**Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador**

*Obtention of somatic coffee embryos from leaf explants of the Bourbon Cidra, Caturra Rojo and SL-28 varieties of plantations established in the Province of Carchi, Zone 1, Ecuador*

*Obtenção de embriões somáticos de café a partir de explantes foliares das plantações de Bourbon Cidra, Caturra Rojo e SL-28 estabelecidas na Província de Carchi, Zona 1, Equador*

Silvia Montes-Cruz <sup>I</sup>  
[montessilvia67@gmail.com](mailto:montessilvia67@gmail.com)

Lucia Toromoreno-Arévalo <sup>IV</sup>  
[lctoromoreno@utn.edu.ec](mailto:lctoromoreno@utn.edu.ec)

Jhony A. Atiaja-Llamba <sup>VII</sup>  
[jaatiajal@utn.edu.ec](mailto:jaatiajal@utn.edu.ec)

José M. Lalama-Aguirre <sup>II</sup>  
[joelala12@hotmail.com](mailto:joelala12@hotmail.com)

Santiago M. Salazar-Torres <sup>V</sup>  
[smsalazar@utn.edu.ec](mailto:smsalazar@utn.edu.ec)

José M. Echeverría-Félix <sup>III</sup>  
[jmecheverría@utn.edu.ec](mailto:jmecheverría@utn.edu.ec)

Ernesto S. Benavides-Burgos <sup>VI</sup>  
[esbenavidesb@utn.edu.ec](mailto:esbenavidesb@utn.edu.ec)

**Recibido:** 30 de enero de 2017 \* **Corregido:** 9 de febrero de 2017 \* **Aceptado:** 14 marzo de 2017

<sup>I</sup> Docente, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

<sup>II</sup> Docente, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

<sup>III</sup> Docente, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

<sup>IV</sup> Docente, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

<sup>V</sup> Docente, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

<sup>VI</sup> Docente, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

<sup>VII</sup> Docente, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

Obtención de embriones somáticos de cafeto a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

## Resumen.

El café constituye uno de los productos de mayor comercialización en el mundo, ocupando el segundo lugar después del petróleo. Debido a ello, es que los países productores prestan especial atención al establecimiento de plantaciones con variedades productivas y resistentes a las plagas y enfermedades más comunes que suelen afectar los rendimientos. Para el logro del objetivo planteado, resulta imprescindible la búsqueda de procedimientos eficientes para la propagación acelerada de genotipos promisorios, encontrándose entre éstos la embriogénesis somática. A pesar de la existencia de múltiples protocolos de obtención de embriones por esta vía, diversos laboratorios en el mundo continúan investigando en aras de lograr mayor eficiencia en el proceso. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar en campo plantas madres y establecer un protocolo eficiente y reproducible para la desinfección de explantes, para la obtención de embriones somáticos en medio líquido, lo que permitió estandarizar cada etapa del proceso. El tratamiento que presentó los mejores resultados en la desinfección de los explantes fue el 20% de cloro (NaClO) activo durante 20 minutos, con un 98 y 92% de explantes sanos en las variedades Caturra y SL-28 respectivamente. Los reguladores de crecimiento ensayados para la calogénesis fueron: BAP 2 mg/l y 2,4-D 3 mg/l. En cuanto a las suspensiones celulares establecidas, se lograron embriones somáticos en las variedades antes descritas transcurridos 4 meses. Por lo antes señalado, se considera que los protocolos establecidos han sido eficiente.

**Palabras clave:** *Coffea arabica* var; bourbon; caturra rojo; SL-28 embriogénesis somática; medio líquido.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

### **Abstract.**

Coffee is one of the largest marketing products in the world, occupying the second place after oil. As a result, it is producing countries to pay special attention to the establishment of plantations with productive and varieties resistant to pests and more common diseases that tend to affect yields. For the achievement of the objective raised, is essential the search of procedures efficient for the propagation accelerated of genotypes promising, finding is among these the embryogenesis somatic. Despite the existence of multiple protocols for obtaining embryos in this way, various laboratories worldwide continue investigating in order to achieve greater efficiency in the process. The objective of the present work was select in field plants mothers and establish a protocol efficient and reproducible for the disinfection of explants, for the obtaining of embryos somatic between liquid, what allowed standardize each stage of the process. The treatment that presented the best results in the disinfection of them explants was the 20% of chlorine (NaClO) active during 20 minutes, with a 98 and 92% of explants healthy in them varieties Caturra and SL-28 respectively. The regulators of growth tested for the callogenesis were: BAP 2 mg /l and 2, 4-D 3 mg /l. In terms of established cell suspensions, somatic embryos into described varieties 4 months were achieved. By it before designated, it considered that the protocols established have been efficient.

**Keywords:** Coffea arabica var; bourbon; caturra red and SL-28; embryogenesis somatic; half liquid.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

### **Resumo.**

O café é um dos maiores produtos de marketing do mundo, ocupando o segundo lugar depois do petróleo. Como resultado, é países produtores a prestar especial atenção ao estabelecimento de plantações com variedades produtivas e resistentes a pragas e doenças mais comuns que tendem a afetar rendimentos. Para a realização do objetivo levantado, é essencial a busca de procedimentos eficientes para a propagação acelerada de genótipos promissores, encontrando-se entre estes a embriogênese somática. Apesar da existência de múltiplos protocolos para obtenção de embriões desta forma, vários laboratórios em todo o mundo continuam a investigar, a fim de obter maior eficiência no processo. O objetivo do presente trabalho foi selecionar em plantas de campo mães e estabelecer um protocolo eficiente e reprodutível para a desinfecção de explantes, para a obtenção de embriões somáticos em líquidos, o que permitiu padronizar cada etapa do processo. O tratamento que apresentou os melhores resultados na desinfecção dos explantes foi o 20% de cloro (NaClO) ativo durante 20 minutos, com 98 e 92% de explantes saudáveis nas variedades Caturra e SL-28, respectivamente. Os reguladores de crescimento testados para a calogênese foram: BAP 2 mg / l e 2, 4-D 3 mg / l. Em termos de suspensões de células estabelecidas, foram obtidos embriões somáticos em variedades descritas durante 4 meses. Por ele antes designado, considerou que os protocolos estabelecidos foram eficientes.

**Palavras chave:** Coffea arabica var; bourbon; caturra vermelho e SL-28; Embriogênese somática; meio líquido.

## **Introducción.**

El café representa un importante potencial económico a nivel mundial, lo que ha determinado la búsqueda constante del mejoramiento de su rendimiento como cultivo. Ecuador se ubicó entre los principales países productores de café del mundo durante el año 2015, con un aporte del 0,49% del total y cuya cifra ascendió a 42.000 (en miles de Kg al año) del producto.

En la Zona 1 de Ecuador, conformada por las provincias Imbabura, Carchi, Esmeraldas y Sucumbios, existen condiciones favorables para el crecimiento y desarrollo del cafeto. La Parroquia de Intag perteneciente a la provincia de Imbabura, cuenta con una tradición de manejo del mismo, mientras que en la provincia del Carchi en las parroquias de Goaltal, Gualchan, se han ido implementando numerosas áreas con diversas variedades, lo que propiciará el incremento de los ingresos económicos de las familias dedicadas a esta actividad.

Actualmente la diversidad biológica se encuentra afectada a un ritmo nunca antes visto. A nivel global, el cambio climático limita la supervivencia de numerosas especies de plantas y animales, aunque existen otros factores que también influyen, como la destrucción de hábitats con fines comerciales. En general se espera que los impactos del cambio climático sean negativos para la agricultura, amenazando la seguridad alimentaria mundial, (Gerald, 2009) estos eventos están propiciando mayor incidencia de plagas y enfermedades debido al calentamiento global y es urgente la búsqueda de nuevas alternativas como variedades y/o líneas con mayor tolerancia que puedan minimizar el efecto de los factores antes mencionados ya que se están afectando los rendimientos y arruinando plantaciones, sustento de muchas familias. La humanidad se enfrenta al reto de

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

conservar para revertir los daños que le ha infringido al ambiente, y de esta manera perdurar en el tiempo. (Castilla Valdés, 2012)

Para enfrentar lo expuesto, además de las prácticas agronómicas, se han utilizado diversas técnicas biotecnológicas que abarcan desde el cultivo in vitro hasta la transformación genética. Estas técnicas de reproducción vegetativa in vitro de café se pueden aplicar en los casos de *Coffea arabica*, *C. canephora* y asimismo en los híbridos interespecíficos de ambas especies, en una primera etapa, deberían servir de relevo para la instalación más rápida de los semilleros de selección de los clones recientemente seleccionados. (Fernández, De Guglielmo, & Menéndez, 2010)

Dentro de las aplicaciones de la Biotecnología Vegetal, la embriogénesis somática se define como el proceso que origina un embrión somático sin la fusión de gametos. Típicamente un embrión somático es una planta en su fase inicial de desarrollo y que posee bipolaridad, con brotes y polos radicales opuestos en el mismo eje, no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, y se origina de una o múltiples células, es importante como sistema modelo en diversos cultivos y especialmente en el café.

De otra parte, el establecimiento de suspensiones celulares tiene una enorme capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, facilita la producción a gran escala a través del cultivo en medio líquido y su uso en biorreactores, proporcionando alta frecuencia de reproducción, rápido crecimiento del embrión. Permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente. La embriogénesis somática contribuye a la conservación a largo plazo (crioconservación) de líneas celulares de interés genético y comercial, facilitando el intercambio internacional de germoplasma in vitro, favorece a la absorción de

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

nutrientes y reducción de la labor de subcultivo, sirve de herramienta para el mejoramiento genético, y la validación de nuevos productos biológicos modelo para estudiar el desarrollo de eventos fisiológicos, citológicos y moleculares que sustentan la embriogénesis en plantas, por ser un sistema adecuado para la propagación masiva de especies vegetales. (González Vega, Castilla Valdés, & Hernández Rodríguez, 2011)

A pesar de la existencia de múltiples protocolos para el establecimiento de métodos de obtención de embriones somáticos desde los años 70 en las especies de café de mayor importancia económica, (*Coffea arábica* y *Coffea canephora P.*)(Stariski) las respuestas difieren con el empleo de variedades de diversas procedencias, condiciones climáticas, componentes del medio de cultivo, entre otros. El objetivo de este estudio fue establecer protocolos reproducibles para las diferentes fases de obtención de embriones somáticos en medio líquido de variedades de café arábica, que respondan a las necesidades de las zonas cafetaleras antes señaladas Imbabura y Carchi.

## **Materiales y métodos**

### **Ubicación**

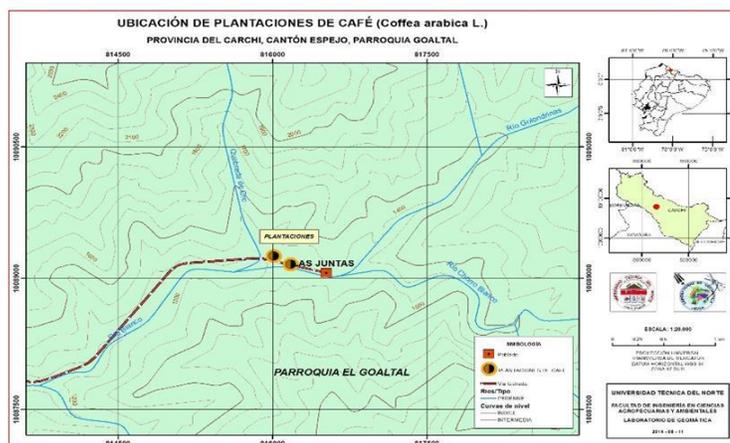
La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte en la Provincia de Imbabura, Ecuador, durante el período 2014-2016.

Las variedades objeto de estudio fueron Bourbon Cidra, Caturra Rojo, y SL-28, se seleccionaron plantas de 3 años de edad considerando su porte, y estado fitosanitario, a partir de las variables analizadas, estas se encuentran en estudio precedente efectuado, pertenecen a la especie

Obtención de embriones somáticos de cafeto a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

*Coffea arabica*, en las áreas cafetaleras plantadas en la Parroquia de Goaltal y Goalchán del Cantón

Espejo de la Provincia del Carchi en el año 2011. (Montes, 1982)



*Ilustración N° 1.- Mapa de ubicación de las plantaciones de café*



*Ilustración N° 2.- Plantación de Café*

Estas variedades han sido las de mayor aceptación por parte de los campesinos de la región dada su precocidad y adecuado comportamiento agronómico.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---



*Ilustraciones N° 3, 4 y 5.- Var. Caturra Rojo; Var. Bourbon Cidra; Var. SL-28*

### **Lavado de hojas y preparación de explantes**

#### **Desinfección:**

El material vegetal de partida para el establecimiento de las fases de callogénesis y embriogénesis somática “in vitro”, fueron hojas sanas, seleccionadas de la zona media de las plantas, las que se trasladaron al laboratorio. Inicialmente se efectuó el lavado con agua y detergente (5 gramos /litro con 2 gotas de tween 20), se enjuagaron 3 veces con agua de la llave, siguiendo el procedimiento descrito por (Santana, Martínez, & González, 1998)

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador



### *Ilustración N° 6.- Preparación de explantes*

En la cámara de flujo laminar se ensayaron 3 tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) 2,5% del producto activo, durante 15, 20 y 30 minutos, los que se denominaron tratamientos de desinfección TD-1, TD-2 y TD-3 respectivamente. En esta etapa del estudio se trabajó con las variedades Caturra rojo, Bourbon Cidra y SL-28.

Después de tres enjuagues con agua destilada y estéril con cisteína - HCL ( $25 \text{ mg/L}^{-1}$ ), las hojas se cortaron en segmentos de  $1 \text{ cm}^2$  y los explantes se colocaron con la superficie adaxial en contacto con el medio de incubación (MI), consistente en las sales de (Murashige & Skoog, 1962), diluidas al 50%, cisteína-HCL: ( $25 \text{ mg/L}^{-1}$ ), sacarosa: ( $20 \text{ g/L}^{-1}$ ) y agar: ( $8,0 \text{ g/L}^{-1}$ ) para el período de incubación que duró 72 horas, y gelrite: ( $2,0 \text{ g/L}^{-1}$ ) en los subsiguientes etapas del estudio en medio sólido.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador



*Ilustración N° 7.- Siembra de explantes*

Cada tratamiento contó con 50 explantes. Se utilizó frascos de 250 ml de capacidad, a los que se le adicionó 20 ml de medio Ms (Murashige & Skoog, 1962) para el establecimiento del cultivo, y se colocaron 5 explantes por frascos.



*Ilustración N° 8.- Cultivo instalado en cuarto oscuro*

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

Pasadas 72 horas, el material sano se transfirió a tres formulaciones de medios de inducción de callo (MIC1, MIC2 y MIC3) (*Tabla N° 1*), en tubos de ensayo conteniendo 15 ml, de cada medio seleccionado.

## Formación de callos

Para inducir a la formación de un callo embriogénico, los explantes que mantuvieron una coloración verdosa en el medio de pre cultivo, se colocaron en un medio sólido similar al anterior al del establecimiento del cultivo, pero suplementado con inositol 100 mg/l<sup>-1</sup>, tiamina 10 mg/l<sup>-1</sup>, cisteína 25 mg/l<sup>-1</sup>, y los reguladores de crecimiento 6-benciladenina (BAP) y 2.4-D diclorofenoxiacético (2.4-D) en las combinaciones y concentraciones indicadas en la (tabla 1). El tejido fue transferido a un medio fresco cada 6 semanas; el pH se ajustó a 5,7 y la esterilización se realizó en autoclave a 121°C, durante 15 minutos y 1,2 kg/cm<sup>2</sup>. La incubación se efectuó en total oscuridad, a una temperatura de 27± 1 oC y una humedad relativa de 42%. Los subcultivos fueron efectuados cada 21 días de acuerdo a estudios precedentes. (Montes, 1982)

### Fase 1: Formación de callos por Tratamientos.

Composición de los medios de cultivo	M/C 0 Testigo litro	M/C 1 Callo litro	M/C 2 Callo litro	M/C 3 Callo litro
Sales MS	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Sacarosa	20 g	20 g	20 g	20 g
Tiamina	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Inositol	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
Ácido (2,4-D)	----	1 mg	2 mg	3 mg
Benzilamino purina (BAP)	-----	2 mg	2 mg	2 mg
Cisteína – HCL	25 mg	25 mg	25 mg	25 mg
Gelrite	2 g	2 g	2 g	2 g

*Tabla N° 1.- Composición de medios para inducción a callo génesis en medio sólido.*

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

## Obtención de embriones somáticos en medio líquido

Para inducir a la diferenciación de los embriones somáticos después de 4 meses de cultivo, se emplearon callos de consistencia friable y fueron utilizadas dos densidades del inóculo inicial: 0.1 y 0.2 g de MF/1<sup>-1</sup> con 10 ml del medio de embriones ya descrito, el callo fue transferido a un medio similar al de inducción de callo, pero con ANA y KNO<sub>3</sub>; las concentraciones de los mismos se indican en la Tabla 2. Los Erlenmeyer fueron colocados en zarandas orbitales termostataadas a una temperatura de 27 +/- 1°C, a 110 rpm y se colocaron en la oscuridad. El cambio de medio se realizó cada 21 días.

Para esta fase del trabajo se analizó el comportamiento de las variedades Caturra, Bourbon Cidra y SL-28, los subcultivos se efectuaron cada 21 días.

### Fase 2: Obtención de embriones somáticos.

Composición de los medios de cultivo	ME-1 Embriones litro	ME-2 Embriones litro	ME-3 Embriones litro
Sales MS	10ml	10ml	10ml
Sacarosa	20g	20g	20g
Tiamina	10mg/l	10mg/l	10mg
Inositol	100 mg	100 mg	100mg
ANA	0,1mg	0.5mg	0,3 mg
Kinetina KNO <sub>3</sub>	0.5mg	0.5mg	0,5mg
Cisteína-HCL	25mg	25mg	25mg

*Tabla N° 2.- Composición de los medios para la fase de obtención de embriones somáticos.*

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

### Medios de cultivo líquido para desarrollo de embriones

Composición de los medios de cultivo: DI masa fresca (MF/100 ml) = 0,1 mg 0,2 mg0	ME-1 Embriones litro
Sales MS	10ml
Sacarosa	20g
Tiamina	10mg/l
Inositol	100 mg
ANA	0,1mg
Kinetina	0.5mg
Cisteína-HCL	25mg

*Tabla N° 3.- Composición de los medios para la fase de crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos.*

### Resultados y discusión.

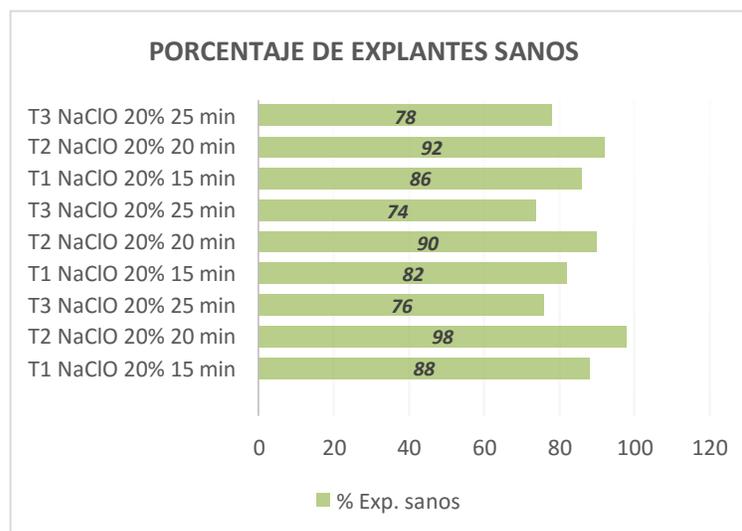
#### Preparación de Explantes

Variables analizadas:

Una de las mayores dificultades en el establecimiento de los cultivos in vitro es la Fase de desinfección, fundamentalmente si el material de partida son hojas adultas de plantaciones establecidas en campo.

Se cuantificó el número de explantes sanos y fenolizados pasados las 72 horas, hasta un periodo de 21 días, luego los explantes fueron transferidos a los medios de callo.

Obtención de embriones somáticos de cafeto a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador



**Ilustración N° 9.- Resultados de los tratamientos de desinfección.**

Tratamientos (T)	Variedad	Total Explantes	Total Exp. sanos	% Exp. sanos	Exp. Fenolizados
T1 NaClO 20% 15 min	Caturra Rojo	50	44	88	0
T2 NaClO 20% 20 min	Caturra Rojo	50	49	98	0
T3 NaClO 20% 25 min	Caturra Rojo	50	38	76	0
T1 NaClO 20% 15 min	Bourbon cidra	50	41	82	0
T2 NaClO 20% 20 min	Bourbon cidra	50	45	90	0
T3 NaClO 20% 25 min	Bourbon cidra	50	37	74	0
T1 NaClO 20% 15 min	<u>SL-28</u>	50	43	86	0
T2 NaClO 20% 20 min	<u>SL-28</u>	50	46	92	0
T3 NaClO 20% 25 min	<u>SL-28</u>	50	39	78	0

**Tabla N° 4.- Resultados de los tratamientos de desinfección.**

Como se observa en la Tabla 6, los porcentajes de explantes sanos logrados en este ensayo fueron satisfactorios, ya que los valores más bajos obtenidos fueron los T3 en las variedad Caturra rojo, con la concentración de NaClO al 20 % durante 25 min, con porcentajes de 76, 74 y 78 % respectivamente. Los T2 tratamientos superan el 80 % de eficiencia. Con relación a estos resultados, se optó por escoger la dosis de NaClO (clorox) al 20 % durante 20 minutos por ser la más efectiva

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

en este estudio ya que el explante se expone menos tiempo en contacto con el agente desinfectante.

No hubo presencia de fenolización en los tratamientos antes señalado, lo que fue favorable.

Cuando se toman los explantes de hojas directamente de plantas ubicadas en el campo, los contaminantes presentes abundan ya que no existen condiciones controladas, situación diferente como cuando se cultivan en los invernaderos. Varios autores han señalado la dificultad de trabajar con explantes obtenidos de hojas de plantaciones en campo, donde se producen contaminaciones endógenas de hongos, bacterias y levaduras que obligan a incluir fungicidas y otros productos en sus protocolos de trabajo durante esta etapa, lo que compromete y encarece el resultado de la investigación.

Al cuantificar los niveles de contaminación se pudo apreciar que éstos resultaron ser bajos en comparación con los informados por (González, y otros, 1998) al trabajar con el híbrido de café Velasco 5, donde se alcanzaron porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica del 60 y 83 %, citados por (González Vega, Castilla Valdés, & Hernández Rodríguez, 2011) que trabajaron con la variedad Robusta y obtuvieron valores similares en cuanto a explantes contaminados, pero también se presentó fenolización alrededor de un 12% de los mismos.

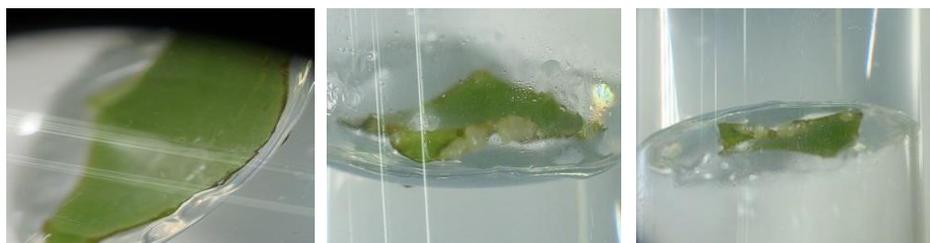
Resultados similares se han obtenido en estudios en guayabo (Viloria, 1993) y otras especies con altos porcentajes de este indicador, como: 85% en chayote (Somarribas, Sandoval, & Müller, 1991) y 75% en yerba mate (Rey, Díaz Sala, & Rodríguez, 1994) esto provoca pérdidas significativas en la fase de establecimiento in vitro del material vegetal.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

Con relación a la variable, explantes fenolizados, no se constató la presencia de ello; los explantes permanecieron de color verde con excepción de aquellos que se contaminaron, el pase de color de verde a marrón se produjo al momento en que los callos van cubriendo la superficie del explante. En estudios precedentes se han obtenido resultados similares en este cultivo, de otra parte, la adición de la cisteína-HCL al momento del traslado de las muestras desde el campo al laboratorio, contribuyó a que permanecieran en perfecto estado hasta en días posteriores a la colecta.

La ausencia de fenolización, ratifica que la dosis y el antioxidante empleado en el estudio fueron satisfactorios. (Azofeifa, 2009) señaló los múltiples factores que intervienen en el problema de la oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados in vitro, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular. (Amiot, Forget, & Goupy, 1996) (Bray, Bailey-Serres, & Weretilnyk, 2000).



*Ilustración N° 10.- Explantes de las variedades donde se aprecian los frascos sin fenolización*

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

## Inducción a callos

En esta fase de inicio de formación de callo se observó que a los 7 días de realizado el subcultivo al medio de inducción por tratamiento (*Tabla N° 1*), empezó la formación de callos de color blanco cremoso (*Ilustración N° 10*) y para su análisis se consideraron las variables peso fresco, tamaño y porcentaje de formación de callos, para lo cual se tomaron tres callos al azar según calendario establecido hasta los 120 días de cada variedad.

Los resultados alcanzados en el porcentaje de formación de callos fueron superiores en el tratamiento MC-3 para las tres variedades, con la dosis de 2 mg de BAP y 3 mg de 2,4-D (*Tabla N° 1*), con el 96,77%, 93,94%, 87,5% de callos formados respectivamente en las siembras realizadas; seguidos del tratamiento MC-2 y MC-1 en la formación de los mismos (*Tabla N° 7*). Estos callos tuvieron una consistencia formal (compacta, friable, esponjosa), y una coloración en general (blanco cremoso, café) de los mismos (*Ilustración N° 11*).

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

**Tabla 5: Comportamiento de los explantes en la formación de callos obtenidos en las tres variedades en estudio**

Tratamientos	N° de Explantes	N° de Callos	% de callos formados (90 días)
MC1 Cat. rojo	33	26	78,79
MC2 Cat. Rojo	33	29	87,88
MC3 Cat. Rojo	33	31	93,94
Testigo (MC) Cat. Rojo	33	17	51,52
MC1 Bou. cidra	31	23	74,19
MC2 Bou. Cidra	31	25	80,65
MC3 Bou. Cidra	31	30	96,77
Testigo (MC) Bou. Cidra	31	19	61,29
MC1 SL-28	32	20	62,50
MC2 SL-28	32	24	75,00
MC3 SL-28	32	28	87,50
Testigo (MC) SL-28	32	15	46,88

**Tabla N° 5.- Porcentaje de callos formados por tratamientos y variedades cultivadas**

Diversos son los factores que pueden influir en el crecimiento y desarrollo de los callos; el genotipo, las dosis que se emplean de reguladores de crecimiento, edad de los explantes, las condiciones de incubación (entre otras). En este estudio comenzó a observarse la fase de cicatrización de los explantes, transcurridos de 7-10 días donde se inicia la separación de la superficie adaxial de la abacial fundamentalmente en la zona de la nervadura donde según (Michaux-Ferriere & Carron, 1989), se encuentran las células peri-vasculares que son las menos diferenciadas y comienza su activa de división celular.



**Ilustración N° 11.- Formación de callos transcurrido los 10 días**

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

El peso fresco de los callos no alcanzó el tamaño esperado, como lo informado por otros autores, un factor que influyó en el primer ensayo fue la temperatura, en el área de estudio donde se encuentra ubicado el laboratorio hay fluctuaciones de temperaturas entre el día y la noche donde se observaron records bajos de hasta 16.7 °C. Esta situación se vio favorecida cuando se controló este factor a temperatura constante de 27±1°C, ya que en las siembras sucesivas los callos alcanzaron un peso medio de 0,060 hasta 0,074 gramos en la variedad Caturra rojo en el MC3, (*Tabla N° 8*).

Las Medias de los pesos frescos de los callos con las mismas letras son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).

Tratamientos	PESO FRESCO DE CALLOS en (g)					
	Peso inicial exp.	21 días	61 días	94 días	$\Sigma$ /Pesos	$\bar{X}$
MC1 Cat. rojo	0,033	0,036	0,042	0,050	0,161	0,040
MC2 Cat. Rojo	0,032	0,044	0,052	0,058	0,186	0,047
MC3 Cat. Rojo	0,030	0,081	0,089	0,095	0,296	0,074
Testigo (MC) Cat. Rojo	0,034	0,035	0,036	0,036	0,141	0,035
MC1 Bou. cidra	0,028	0,032	0,043	0,051	0,154	0,039
MC2 Bou. Cidra	0,030	0,034	0,047	0,060	0,171	0,043
MC3 Bou. Cidra	0,033	0,057	0,073	0,092	0,255	0,064
Testigo (MC) Bou. Cidra	0,032	0,033	0,035	0,036	0,136	0,034
MC1 SL-28	0,034	0,037	0,046	0,053	0,170	0,043
MC2 SL-28	0,029	0,035	0,048	0,061	0,173	0,043
MC3 SL-28	0,034	0,058	0,080	0,092	0,264	0,066
Testigo (MC) SL-28	0,032	0,034	0,034	0,035	0,135	0,034

**Tabla N° 6.- Resultados del peso fresco de callos en las tres variedades/medios de cultivo**

La coloración de los callos fue blanco cremosa, de consistencia más friable en la variedad SL-28 y Caturra rojo (*Ilustración N° 12*).

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

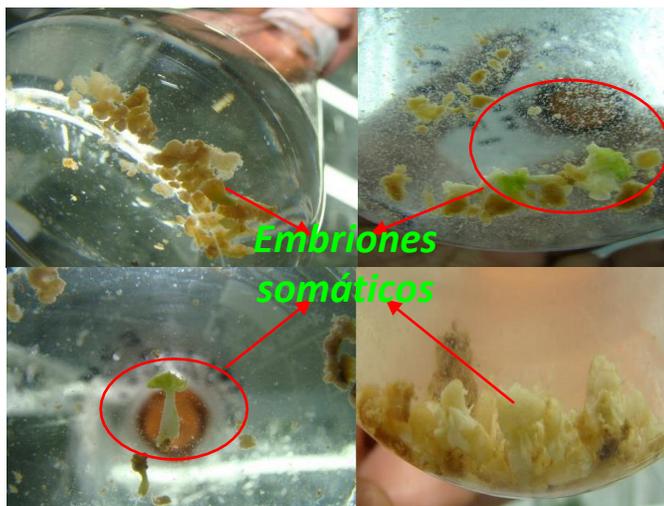


*Ilustración N° 12.- Callos de las tres variedades de color blanco cremoso y consistencia friable*

#### **Suspensiones celulares:**

Esta fase está en desarrollo, se ha instalado el experimento con los callos obtenidos en la fase anterior, está en proceso de evaluación la obtención de los embriones que en el lapso de 90 días se observa la presencia de los embriones en desarrollo vegetativo (*Ilustración N° 12*), y se ha procedido a extraer los embriones para subcultivarlos en medios sólidos.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador



*Ilustración N° 13.- Embriones somáticos en medio líquido*

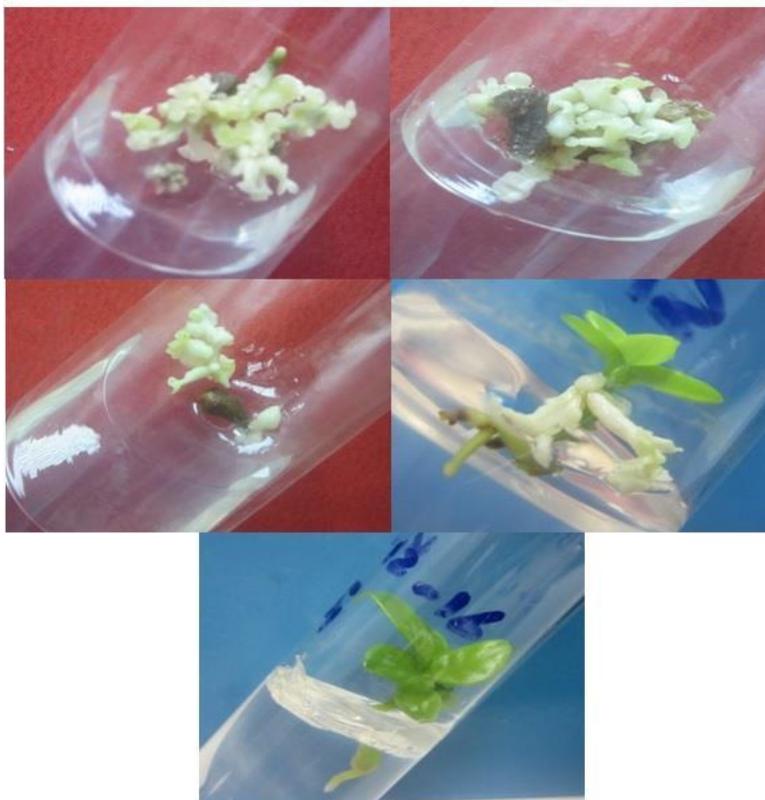
En el estudio efectuado la variedad Bourbon cidra fue la que tuvo mejor respuesta, ya que con las dos densidades de inóculo empleadas fue posible obtener suspensiones celulares altamente embriogénicas, lo que ratifica la importancia de los genotipos en estos estudios.

El rendimiento de embriones somáticos alcanzado fue de más de 2000 embriones en un periodo 8 meses, lo que demuestra la eficiencia del método empleado. Los embriones obtenidos llegaron hasta la fase de conversión, y las vitro plántulas tienen un desarrollo normal y una coloración verde intensa, se logró minimizar la asincronía mediante el tamizaje de las suspensiones celulares.

Los resultados obtenidos son superiores a los informados por diferentes autores, quienes obtuvieron el 35 % y 40-60 %, respectivamente, de plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, producidos en medio líquido. (Neuenschwander & Baumann, 1992) informaron un porcentaje más alto 94,5 % (medio líquido), similares a los obtenidos en esta investigación.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

Como resultado del proceso de la embriogénesis somática se logró una abundante proliferación de embriones que se han convertido en plantas, como se observa en la (*Ilustración N° 13*)



*Ilustración N° 13.- Abundante proliferación de embriones somáticos*

### Conclusiones y recomendaciones

Las plantas promisorias y mejor adaptadas a la zona del cultivo con buenas características fitosanitarias y biomorfométricas fueron de las variedades *Caturra rojo*, *Bourbón cidra*, y *SL-28*.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

El tratamiento que presentó los mejores resultados en la descontaminación de los explantes fue el NaClO 20% de cloro activo durante 20 minutos, con un 98 % de explantes sanos.

De las concentraciones de reguladores del crecimiento ensayadas en la fase de callogénesis, el BAP 2 mg/l<sup>-1</sup> y 2,4-D 3 mg/l<sup>-1</sup> fue la mejor.

Las suspensiones celulares establecidas, lograron embriones somáticos en las variedades antes descritas. Por lo antes señalado, se considera que el protocolo establecido ha sido eficiente.

### **Bibliografía.**

- Amiot, M., Forget, F., & Goupy, P. (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *HerbaPolonica*, 42(1), 237-247.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bray, E., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones, *Biochemistry and molecular biology of plants* (págs. 1158-1203). Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- Castilla Valdés, Y. (2012). Conservación de recursos fitogenéticos de café (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 29-39.
- Fernández, R., De Guglielmo, Z., & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación*, 71(34), 57-84.
- Gerald, N. (2009). Agriculture et changements climatiques: Un programme pour les négociations de Copenhague. *International Food Policy Research Institute (IFPRI)*, 16(1).
- González Vega, M., Castilla Valdés, Y., & Hernández Rodríguez, A. (2011). Obtención de suspensiones celulares y embriones somáticos de café (*Coffea canephora* P.) con el empleo de metabolitos bacterianos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1).
- González, N., Ramírez, J., Aldana, M., Ramos, N., Clifford, S., Péker, B., y otros. (1998). Isolation, characterization and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins. *J. Sci. Food Agric*, 77(1), 368-373.
- Michaux-Ferriere, N., & Carron, M. (1989). Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 19(1), 243-256.

Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador

---

- Montes, S. (1982). Cultivo in vitro de embriones de *Coffea arabica* L. Variedad Caturra. *Cultivos Tropicales*, 4(1), 49-55.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Neuenschwander, B., & Baumann, T. (1992). *A novel type of somatic embryogenesis in Coffea arabica* (Vol. 10). Berlio: Plant Cell Reports.
- Rey, M., Díaz Sala, C., & Rodríguez, R. (1994). Comparison of endogenous polyamine content in hazel leaves and buds between the annual dormancy and flowering phases of growth. *Physiologia Plantarum*, 91(1), 45-50.
- Santana, N., Martínez, O., & González, M. (1998). Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea arabica*). *Cultivos Tropicales*, 10(2), 36-43.
- Somarribas, G., Sandoval, J., & Müller, L. (1991). Propagación vegetativa del chayote (*Sechium edule* (Jacq) Sw). Fase de establecimiento. *Turrialba*, 41(1), 538-544.
- Viloria, V. (1993). *Cultivo in vitro de nudos de guayabo (Psidium guajava L.)*. Fase I. Trabajo de ascenso, Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Maracaibo.