

# IICA



## PROMECAFÉ



**Informe Final del Proyecto  
Desarrollo y Reproducción de Variedades  
con resistencia a la Roya del Café:**

**CULTIVO DE TEJIDOS**

**Proyecto Control de Plagas del Café  
AID/ROCAP (596-0090)**

IICA  
F3D  
85421



Centro Interamericano de  
Documentación e  
Información Agrícola

10 NOV 1993

IICA — CIDIA

**IICA**



**PROMECAFÉ**



**Informe Final del Proyecto  
Desarrollo y Reproducción de Variedades  
con resistencia a la Roya del Café:**

**CULTIVO DE TEJIDOS**

**Proyecto Control de Plagas del Café  
AID/ROCAP (596-0090)**

**Preparado por M. Berthouly**

**San José, abril de 1991**

W

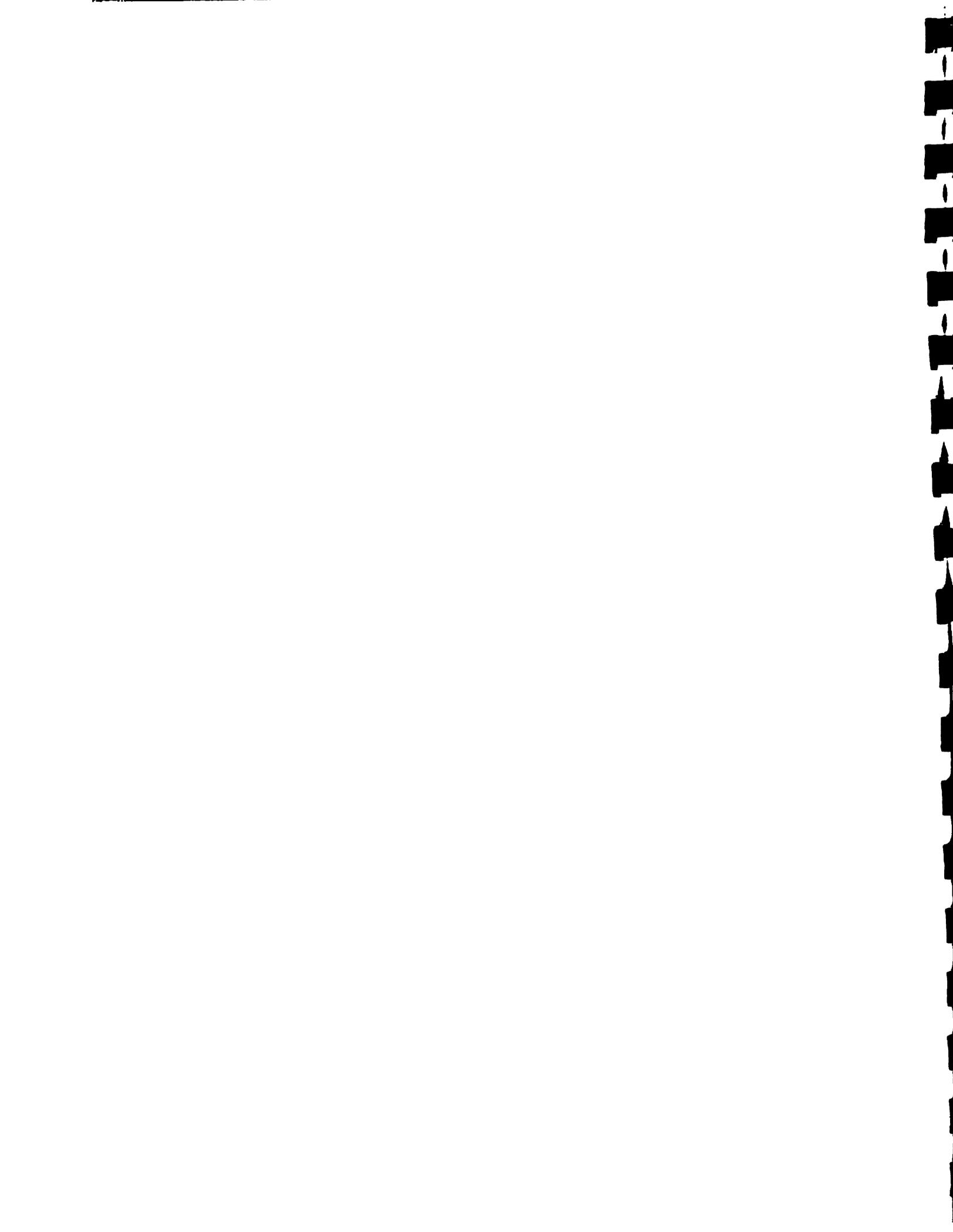
200A

00006815



## CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION .....	1
II. PRINCIPIOS Y ORIENTACIONES .....	1
III. PROMECAFE (1983-1990) .....	2
A. GENERALIDADES .....	2
B. OBJETIVO GENERAL .....	2
C. TECNICAS DE MULTIPLICACION IN VITRO DESARROLLADAS. AVANCES Y RESULTADOS .....	2
C.1 Propagación mediante microestacas .....	3
Cultivo de nudos ortotrópicos .....	3
Multiplicación clonal in vitro .....	7
Enraizamiento y aclimatación .....	9
Ensayos regionales .....	13
C.2 Propagación mediante embriogenesis somática .....	13
Cultivos de fragmento de hojas .....	16
Inducción y formación de embriones .....	17
C.3 Cultivos de ápices .....	21
D. CAPACITACION .....	25
D.1 Técnicos nacionales .....	25
D.2 Estudiantes .....	25
IV. JUSTIFICACIONES Y PERSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGIA EN CAFE EN AMERICA CENTRAL .....	26
A. SITUACION ACTUAL DE LA CAFICULTURA .....	26



	Página
B. AVANCES Y LOGROS EN CULTIVOS IN VITRO .....	27
B.1 Establecimiento de laboratorio .....	27
B.2 Programas de trabajo .....	27
C. PROGRAMA 1991 .....	29
D. RED DE BIOTECNOLOGIA EN CAFE .....	29
E. PERSPECTIVAS .....	30
E.1 Nuevos enfoques en mejoramiento .....	30
E.2 Presupuesto necesario (5 años) .....	31
F. PRESUPUESTO GENERAL PARA 5 AÑOS .....	32
V. CONCLUSIONES .....	33
VI. ANEXOS .....	35



## I. INTRODUCCION

El empleo de las biotecnologías se difunde cada vez más. El desarrollo de estas nuevas tecnologías se debe a las múltiples ventajas y los enormes posibilidades que ofrece en numerosos sectores de investigación: Bioquímica, Fitopatología, Morfogenesis, Fitomejoramiento y Genética.

Si bien es cierto que dicha técnica se ha desarrollado más rápidamente en cultivos ornamentales o anuales por varias razones, su uso en el caso de plantas tropicales perennes es cada día más importante.

Una parte importante de lo que se denomina "**Biología**", reposa esencialmente en el empleo de técnicas de cultivo de tejidos, conocido también como Método in vitro. Entre las diferentes posibilidades que ofrece el cultivo in vitro (obtención de haploides, obtención de plantas libres de virus, ingeniería genética), la multiplicación vegetativa in vitro es la forma más difundida de estos métodos de cultivo de tejidos.

Además, la multiplicación vegetativa es el único procedimiento que permite reproducir en gran escala los genotipos sobresalientes y cuya fijación por vía masiva no puede considerarse por varias razones entre las cuales están la compatibilidad, depuración genética prolongada, etc.

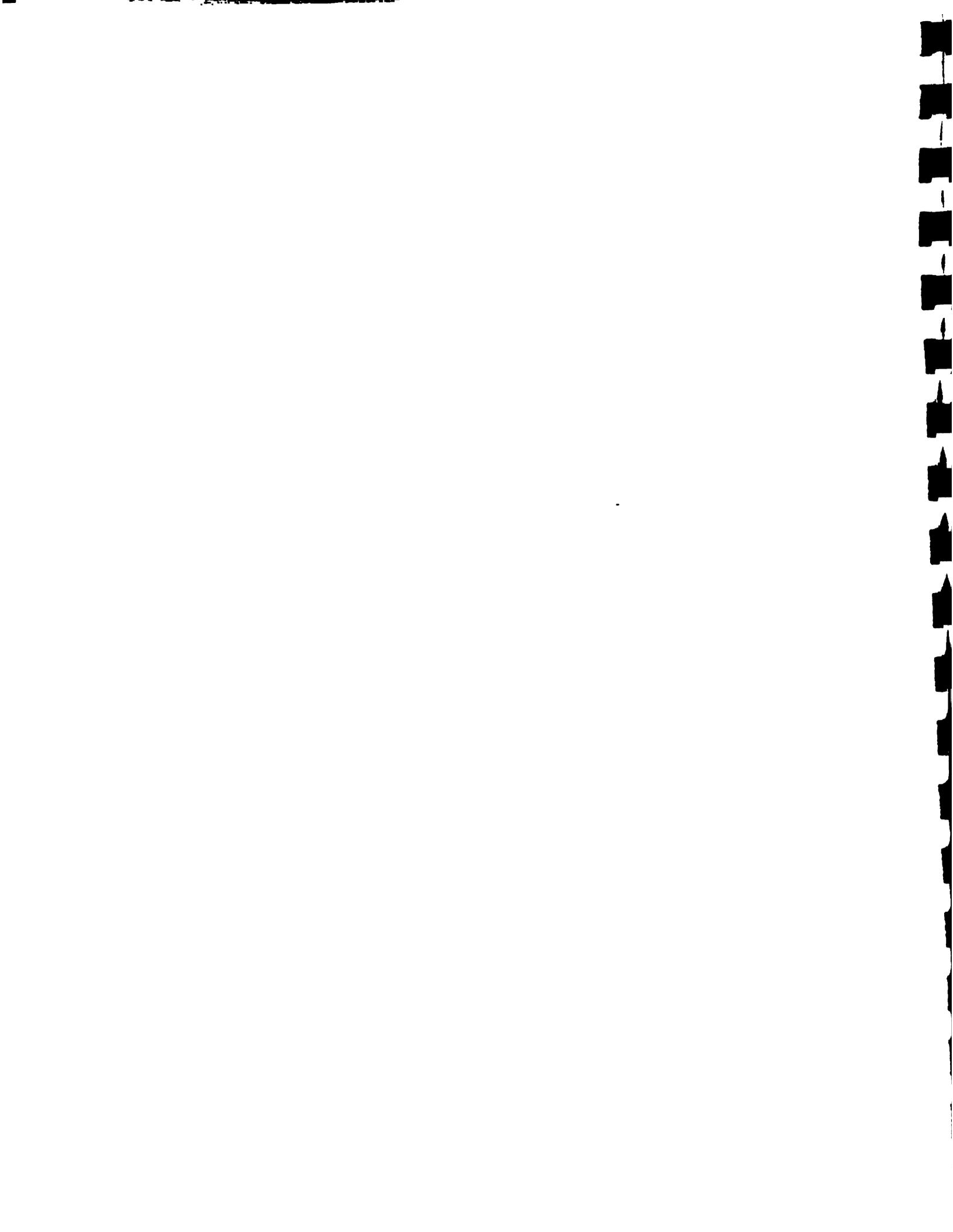
## II. PRINCIPIOS Y ORIENTACIONES

La mayoría del café consumido en el mundo proviene de dos especies: *Coffea Arabica* y *Coffea Canephora*. En el caso del *Coffea Arabica* cultivado principalmente en América Latina es autógama. Por lo tanto se puede reproducir fielmente por semillas. Su mejoramiento hecho hasta ahora, ha llevado a la creación de cultivares relativamente homogéneos (Caturra, Mundo Nuevo).

Hasta el momento, los principios y orientaciones del mejoramiento genético del café ha sido la obtención de variedades homogéneas reproducidas y distribuidas por semillas al productor, lo que significa cerca de 30 a 40 años de trabajo.

La tendencia actual en muchos países productores de café es la creación de híbridos intra e interespecífico no fijado con características agronómicas similares a las variedades comerciales.

Por eso los progresos realizados en biotecnología y especialmente en cultivo de tejidos, abren nuevas perspectivas a los investigadores, utilizando la multiplicación asexual in vitro para producir variedades mejoradas heterocigotas.



Los últimos resultados obtenidos por PROMECAFE, deberían apoyar la definición de nuevos enfoques para el mejoramiento genético del café.

### **III. PROMECAFE (1983-1990)**

#### **A. GENERALIDADES**

Desde 1980, uno de los objetivos principales de PROMECAFE ha sido la evaluación y la distribución de variedades con resistencia a la Roya. Generalmente dicha variedad se distribuya por semillas después de un largo proceso de selección.

Debido a la importancia de esta nueva enfermedad y con el fin de responder a las necesidades de los productores, se incluyó en el programa de trabajo de PROMECAFE el desarrollo de una metodología de multiplicación asexual de las variedades promisorias resistentes a la Roya. Los numerosos trabajos realizados desde 1970 en cultivo de tejidos en café, demuestran que las especies cultivadas *C. Arabica* y *C. Canephora* responden favorablemente a este tipo de cultivo.

#### **B. OBJETIVOS GENERALES**

El objetivo del programa era establecer una metodología de multiplicación asexual de café mediante cultivo in vitro.

Por esta razón, a nivel de IICA-PROMECAFE y con el apoyo del IRCC-CIRAD se ha decidido utilizar dos técnicas de trabajo:

- Propagación asexual mediante microestacas.
- Propagación asexual mediante embriogenesis somática.

#### **C. TECNICAS DE MULTIPLICACION VEGETATIVA IN VITRO DE LOS CAFETOS**

El cultivo in vitro de las plantas es realizado partiendo fragmentos del vegetal completo. Estos trozos de tejido que se usan son llamados comúnmente explantes. De la parte de la planta de la cual van a ser obtenidos dependerá la metodología utilizada. (Foto 1)

En todos los casos, dichas metodologías deben permitir la multiplicación y la producción masiva de plantas idénticas a la planta madre. El nivel de conformidad de las plantas obtenidas in vitro en relación con la planta de origen es de suma importancia.



## **C.1 Propagación mediante microestacas**

La propagación vegetativa in vitro mediante microestacas consiste en obtener, a partir de un nudo o ortotrópico portadores de yemas preexistentes (**Foto 2**), una micro planta cuyos nudos ortotrópicos pueden ser utilizados como estacas in vitro así sucesivamente para obtener un gran número de individuos.

Dicha metodología incluye los siguientes pasos:

- . Cultivo de nudos ortotrópicos y obtención in vitro de tallo ortotrópico.
- . Multiplicación clonal in vitro
- . Enraizamiento y aclimatación (paso de in vitro a condiciones in vivo)

Los cuatro pasos han sido estudiados y establecidos en nuestras condiciones.

### **a. Cultivo de nudos ortotrópicos**

La alta contaminación por bacterias y hongos es uno de los problemas más importantes. También la oxidación fenólica que se manifiesta mediante la aparición de un color café en el medio donde se encuentran sembrados los explantes y que puede producir la muerte de éstos. Esta etapa de la metodología es la más difícil de superar.

El material vegetal utilizado puede provenir de:

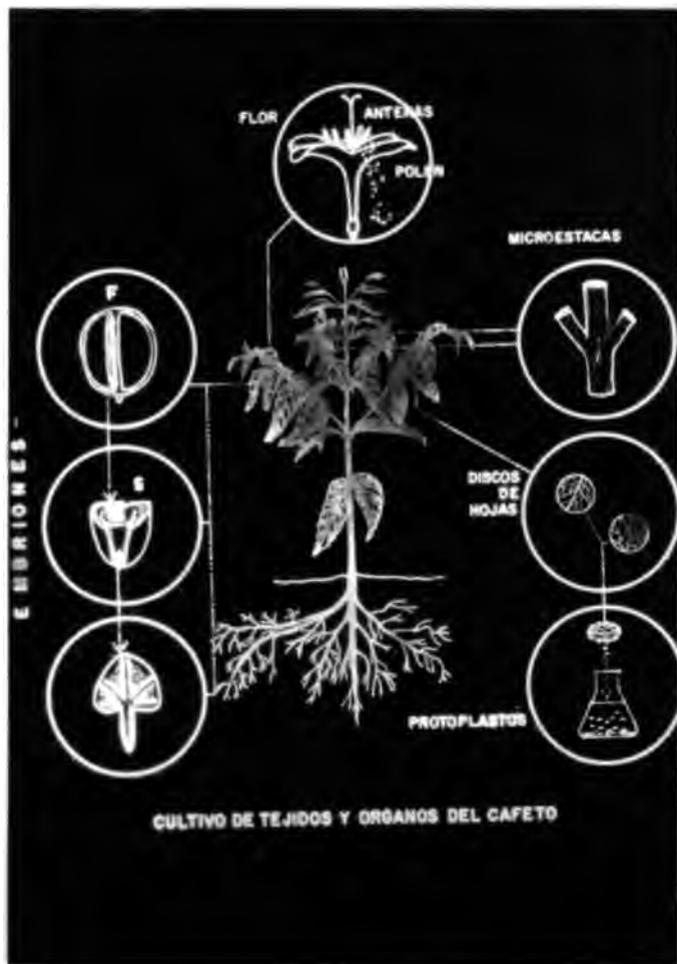
- invernaderos
- directamente del campo

En el segundo caso la contaminación por hongo es muy importante y por consecuencia la pérdida de explantes es grande.

Los trabajos realizados en PROMECAFE han permitido establecer una metodología que permite la utilización de los dos tipos de material vegetal a través de los siguientes pasos:



Foto 1.



Esquema general de los diferentes explantes que se pueden utilizar en cultivos de tejido de una planta. En relación con el tipo de explante se define la técnica utilizada.

Foto 2. Esquema de las ramificaciones y yemas axilares que existen en un eje ortotrópico de café. Se considera que a nivel de cada nudo ortotrópico existen más de cinco yemas axilares capaces de dar un eje ortotrópico cada uno.





### . Desinfección de material vegetal

Generalmente se utiliza una doble desinfección con Hipoclorito de Calcio al 10% y después al 8%. Esto permite obtener un buen porcentaje de sobrevivencia de material vegetal y control aceptable de la contaminación por hongos (mas del 70%).

Si el material vegetal es muy contaminado es posible utilizar en el medio de cultivo un fungicida. En el laboratorio se utiliza de 1 g a 2 g de Benlate por litro de medio en relación con el origen del material vegetal (invernadero o campo).

De esta manera se puede obtener un 50% de explantes no contaminados provenientes del campo.

Además de los hongos muchas veces aparecen bacterias en el medio de cultivo, aunque eso no provoca directamente la muerte del explante, la contaminación bacteriana puede impedir un buen desarrollo y crecimiento del explante.

Los trabajos realizados han permitido controlar dicha contaminación con el efecto combinado de antibióticos en el medio y el ph (400 mg de Ampicilina y ph=4, 6 - 4,8). Además de eso para reforzar el efecto del antibiótico y del ph se utiliza una dosis mas baja de azúcar en el medio (10 gr en lugar de 30 gr).

### .Oxidaciones fenólicas

La oxidación fenólica en el género Coffea varia en relación con la especie y el lugar de procedencia del material vegetal.

La producción de fenoles es muy rápida a nivel de cada "herida" del explante y la aparición en el medio de cultivo puede, en 2 ó 3 días, producir la muerte del explante. Por eso su control es muy importante.

La utilización de antioxidantes (Acido Ascórbico x Acido Cítrico = 300 mg/l+250 mg/l) en combinación con un pre-tratamiento del explante con antioxidantes (15 a 20 minutos) antes de su siembra en el medio de cultivo ha permitido controlar la oxidación a mas de un 95%.

### .Obtención in vitro de tallo ortotrópico

Una vez desinfectado y preparado el explante se siembra en un medio con sales minerales (Murashige y Shoog), vitaminas, azúcar y reguladores de crecimiento. Generalmente se utiliza una citocinina BAP (Benzylamino purine) a una dosis de 1 mg/l para inducir la brotación de las yemas axilares (Foto 4).



Foto 3.

Esquema general de la técnica de multiplicación in vitro mediante micro estacas que comprende las fases:

- obtención in vitro de tallos ortotrópicos
- multiplicación masiva in vitro
- enraizamiento y aclimatación

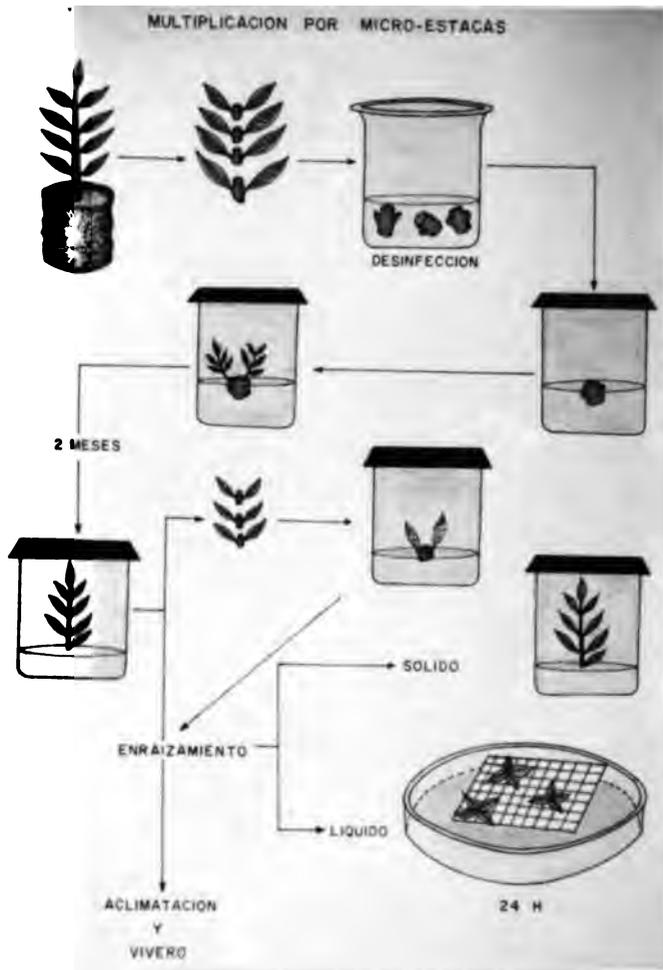


Foto 4.

Inducción de dos yemas axilares de un nudo ortotrópico, que después de desarrollarse en eje ortotrópico con tres o cuatro pares de hojas, será subdividida para dar inicio a la producción de micro estacas.

El número de brotes depende del nivel del nudo y de la concentración en citocininas.





La aparición de mas de dos brotes a nivel del nudo depende de la cantidad de regulador que se utiliza (mas de 1 mg) y del nivel del nudo ortotrópico ( $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$  .. $N_5$ )

#### **b. Multiplicación clonal in vitro**

Una vez establecido el cultivo se constituye un Banco de Germoplasma in vitro a partir del cual se puede iniciar la multiplicación masiva del material.

La cantidad de material que constituye el Banco de Germoplasma va a depender del nivel de producción del laboratorio.

A nivel de PROMECAFE se había establecido un promedio de 80 plantas por variedades, eso en relación con la cantidad de material vegetal necesario para la distribución a los países miembros. (Foto 5)

Generalmente a nivel de cada nudo ortotrópico se induce la brotación de dos ejes ortotrópicos. Dichos tallos que han alcanzado un desarrollo de aproximadamente 3 a 4 pares de hojas se separan del esqueje original y se dividen en micronudos y se colocan en un nuevo medio. (Foto 6)

En PROMECAFE los resultados obtenidos han permitido, bajo buenas condiciones de cultivo, establecer un calendario de multiplicación, o sea:

- multiplicación cada 80 días
- un explante puede producir un promedio de 8 micro-estacas
- la obtención de 18 a 20.000 plantas a partir de un explante inicial

Debido al tipo de cultivo (café) y variedades (enana) cuyo crecimiento es muy lento, la tasa de multiplicación parece ser muy pequeña en comparación con plantas ornamentales.

Pero los últimos resultados obtenidos con otros reguladores de crecimiento (Giberellina) o el estudio mas profundizados de otros factores (luz) deberían permitir una mejor tasa de multiplicación.

Por ejemplo, en el caso de la Giberellina se ha logrado obtener a los 80 días un promedio de 12 microestacas a partir de un explante inicial, lo que significa una producción de mas de 100.000 plantas por año.

La utilización de cantidad de luz mas importante por ejemplo en otros cultivos ha permitido el incremento de la tasa de multiplicación.



**Foto 5.**



Cámara de crecimiento donde se controla la temperatura ( $25^{\circ} \pm 1$ ) y el fotoperíodo (12 horas de luz / 12 horas de noche). Se mantiene también una humedad relativa de 80 a 85%

**Foto 6.**

Plantitas producidas in vitro, de tres meses de edad listas para ser subdividas o aclimatadas en el vivero. En este caso antes se someterá la planta a un proceso de inducción de raíces durante 24 horas en solución líquida con alta concentración de Auxina.





Es muy necesario e importante ahora que la metodología esta establecida, de poder realizar dicho estudio con el fin de ver si es posible mejorar el nivel de multiplicación.

### **c. Enraizamiento y aclimatación**

Una vez obtenida la cantidad de plantas necesarias para cada variedad, es necesario llevarlas al vivero y después al campo.

Debido a que las microplantas que están en condiciones asépticas no tienen raíces y están controladas en buen ambiente, es necesario seguir los siguientes pasos: (Foto 7)

- inducir la formación de raíces
- permitir el desarrollo de dichas raíces
- aclimatar dichas plantas a las condiciones ambientales

#### **i. Enraizamiento**

Generalmente se conduce la formación de raíces (Foto 8) en condiciones in vitro y el desarrollo de las mismas en condiciones in vivo controlada. Este proceso requiere generalmente de 2 a 3 meses y muchas manipulaciones.

Con el fin de reducir tanto el tiempo como el numero de manipulaciones, el costo y la posible perdida de plantas, se ha desarrollado una metodología con la que se ha permitido obtener un 95 a 100% de enraizamiento, con una perdida del 5 al 10% de plantas en la fase de aclimatación.

El objetivo principal era establecer una metodología simple, aplicable en condiciones locales, fácilmente accesible al productor y disminuyendo así el costo de producción.



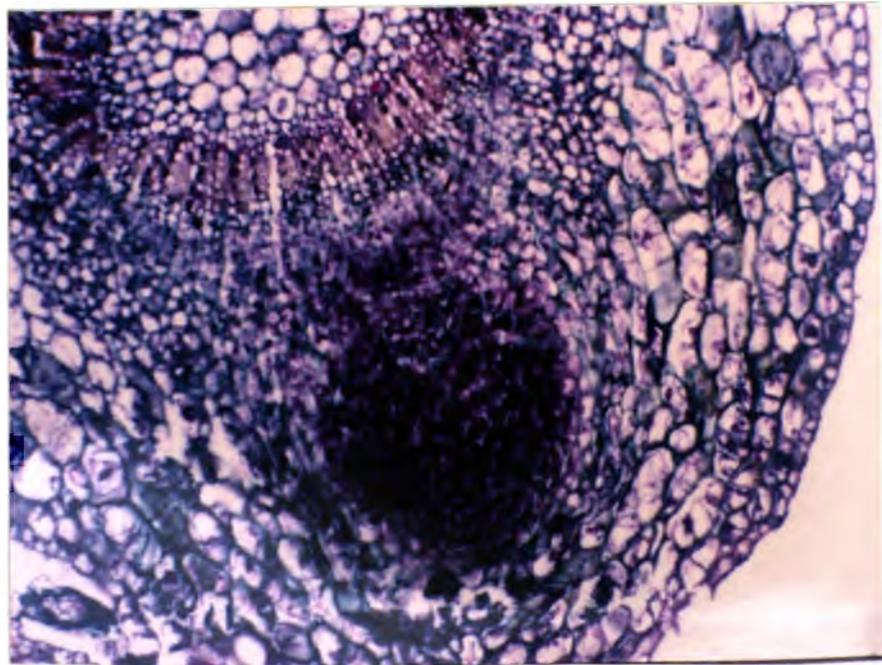
**Foto 7.**

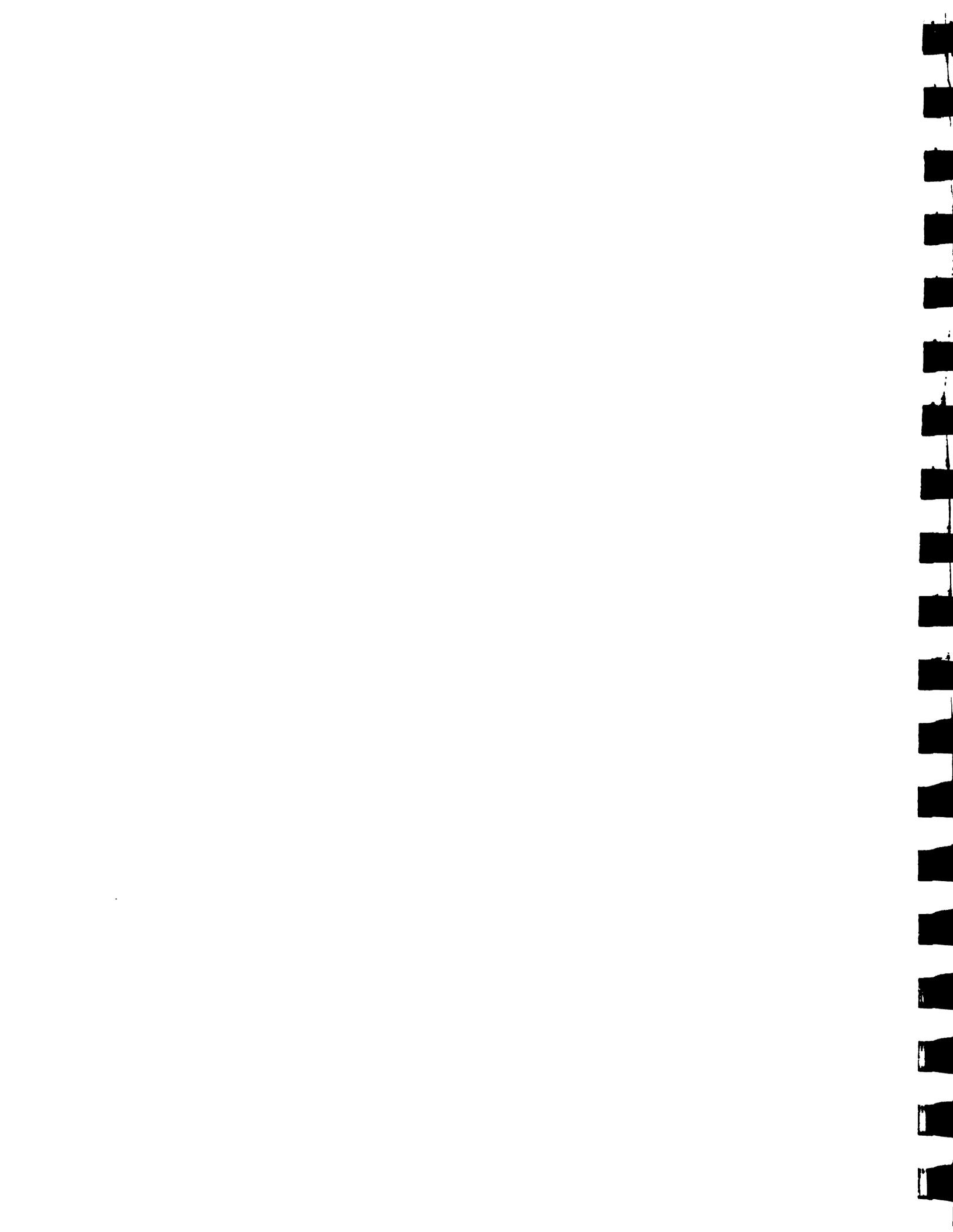


Micro estacas de *Coffea Arabica* de tres pares de hojas. Dicha plantita va a ser sometida a un proceso de inducción de raíces en medio líquido durante 24 horas.

**Foto 8.**

Formación del primordio radical de una raíz adventicia. Esta se origina a partir de células del floema y Cambium, y aparece a los diez días después de poner la microestaca en la solución enraizadora.





## ii. Inducción de raíces

La inducción se realiza in vivo en medio líquido, o sea se prepara un medio líquido (no estéril), con alta dosis de reguladores de crecimiento, en el cual se ponen las plantitas con 3 o 4 pares de hojas y de 1-1.5 cm. de altura. Las plantas se quedan en dicha solución enraizadora durante 24 horas y son sembradas directamente en el suelo en bolsa plástica, llena de un sustrato adecuado. Los estudios histológicos (Tesis de Master) (Foto 9) han permitido demostrar que las raíces inducidas en las microestacas, están normales y bien conectada con el sistema vascular central de la planta como cualquier raíz de una planta proveniente de semilla.

## iii. Aclimatación

Una vez sembradas las plantas en el vivero, se deben observar dos cosas:

- el sustrato que debe permitir un buen desarrollo de las raíces
- el control de la temperatura y la humedad que deben permitir un desarrollo y una sobrevivencia máxima.

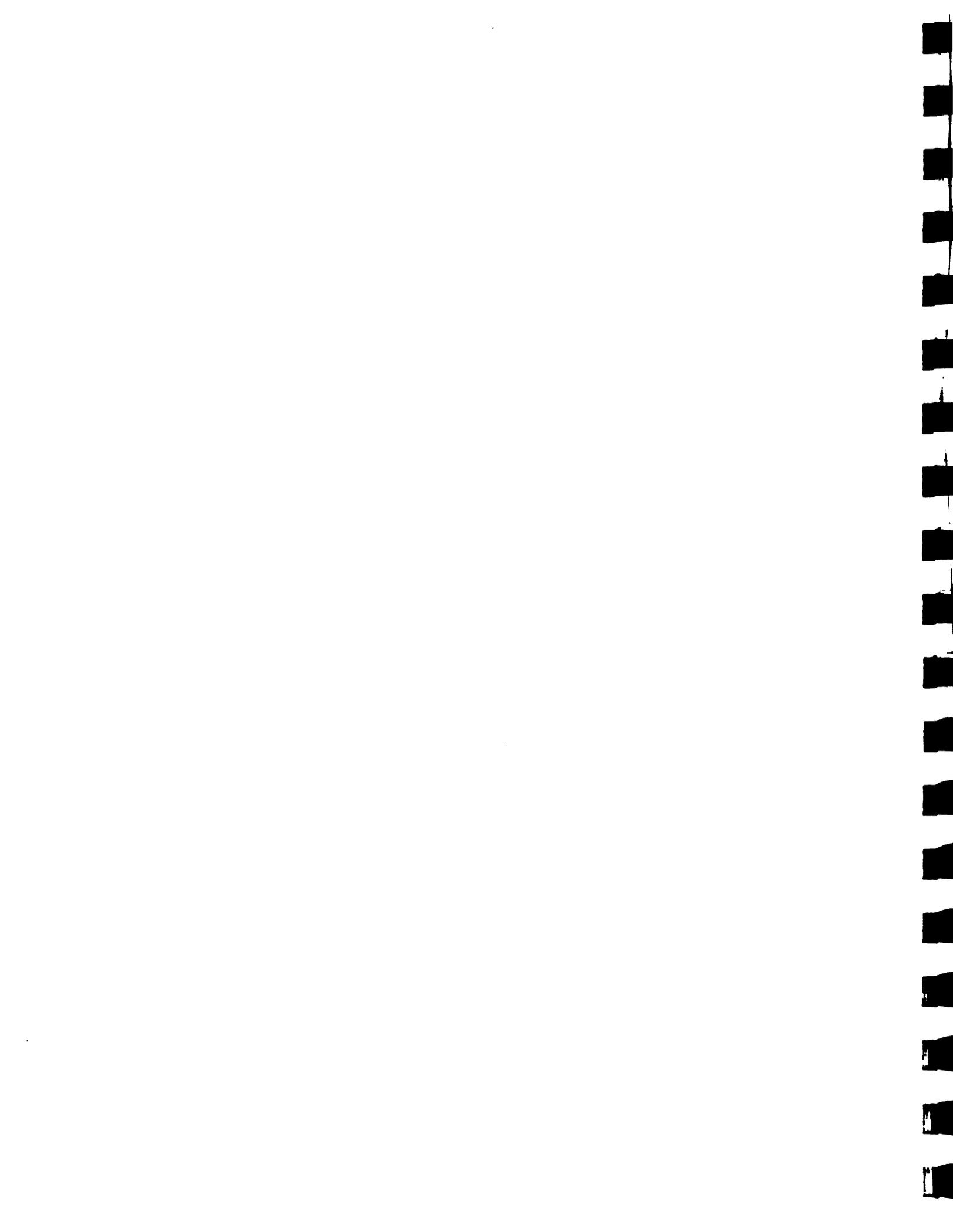
Los trabajos observados permitieron establecer un sustrato adecuado compuesto de una mezcla de 3 volumen de tierras + 1 volumen de arena + 1 volumen de pulpa de café.

Generalmente las raíces empiezan a aparecer a las tres semanas.

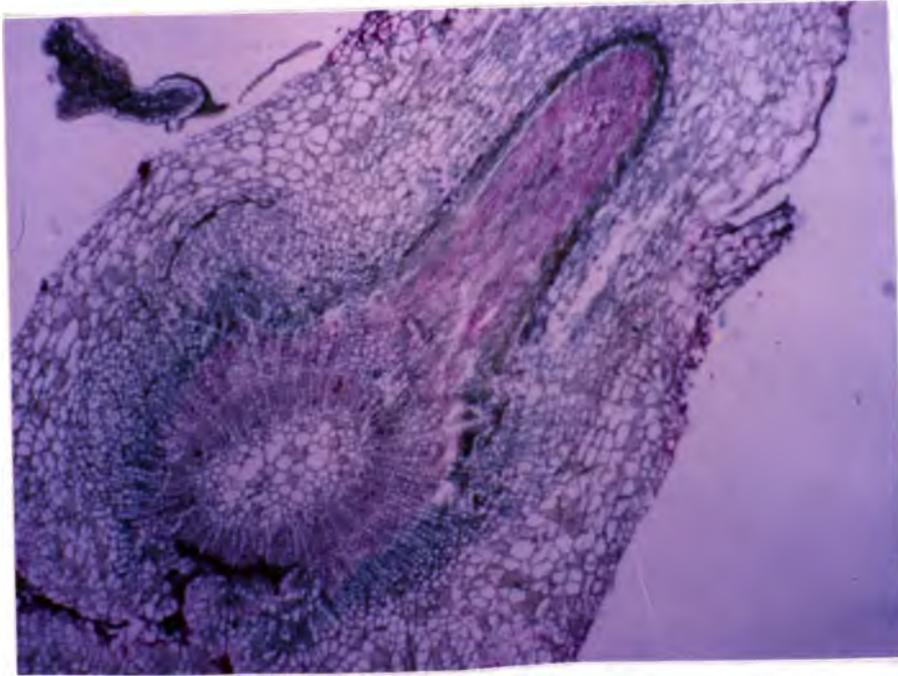
Es muy importante que durante toda la fase de aclimatación se mantenga una alta humedad relativa y una temperatura no muy alta. Por eso una vez sembradas las plantitas colocadas en las bolsas de polietileno, se hace un techo a 10 cm. de altura de plástico o de hoja de banano. La persona encargada del vivero debe regar las plantas en la mañana, al mediodía y en la tarde debajo y encima de dicho techo con el fin de mantener las condiciones adecuadas. (Foto 10)

Cada semana se debe quitar una hoja de plátano o levantar de 10 cm. el techo plástico con el objeto de aclimatar poco a poco las plantas hasta llegar al fin del mes y tener las plantas sin nada, excepto el techo normal del vivero.

Con esta técnica se han logrado obtener muy buenos resultados hasta de mas de un 95% de plantas aclimatadas.



**Foto 9.**



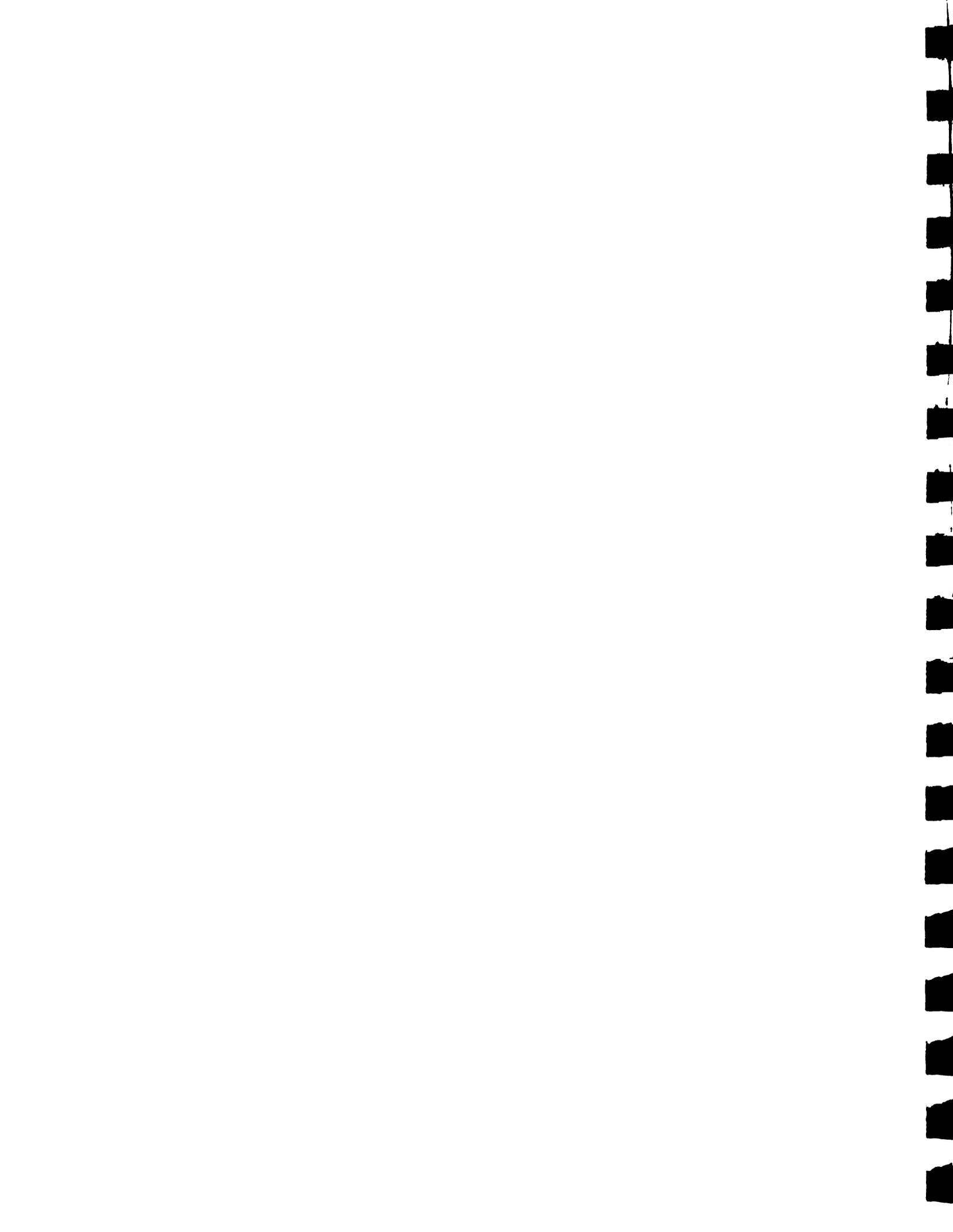
Conexión de la raíz adventicia neoformada con el sistema vascular central. Se observa dicho fenómeno a los 20 días.

La raíz está creciendo y empieza a salir.

**Foto 10.**

Sistema de aclimatación de la planta producida en el laboratorio. Se coloca en techo de plástico o de hoja de palma o banano a diez centímetros de la planta. Esto permite mantener una humedad relativa muy alta y una baja temperatura durante el tiempo de aclimatación (1 mes).





A los 6 ó 7 meses, las plantitas tienen un tamaño normal como cualquier otra planta proveniente de semilla y están listas para ser sembradas en el campo. (Foto 11)

Las plantas así producidas tienen un sistema radical muy bien desarrollado y formado con dos o tres raíces tipo pivotantes. (Foto 12)

#### **d. Ensayos en el campo (Fotos 13 y 14)**

En 1986 PROMECAFE ha decidido realizar la última etapa o sea el estudio del comportamiento a nivel del campo de las plantas producidas mediante microestacas y así se han realizado varios ensayos a nivel de los países de PROMECAFE. Por esto:

- Se han sembrado varios ensayos en Costa Rica en dos zonas diferentes Turrialba y CICAPE (Heredia).
- Se han enviado por avión a varios países (Guatemala, Honduras, Nicaragua y México) plantas después de haberlas sometido a un proceso de inducción de raíces durante 24 horas.

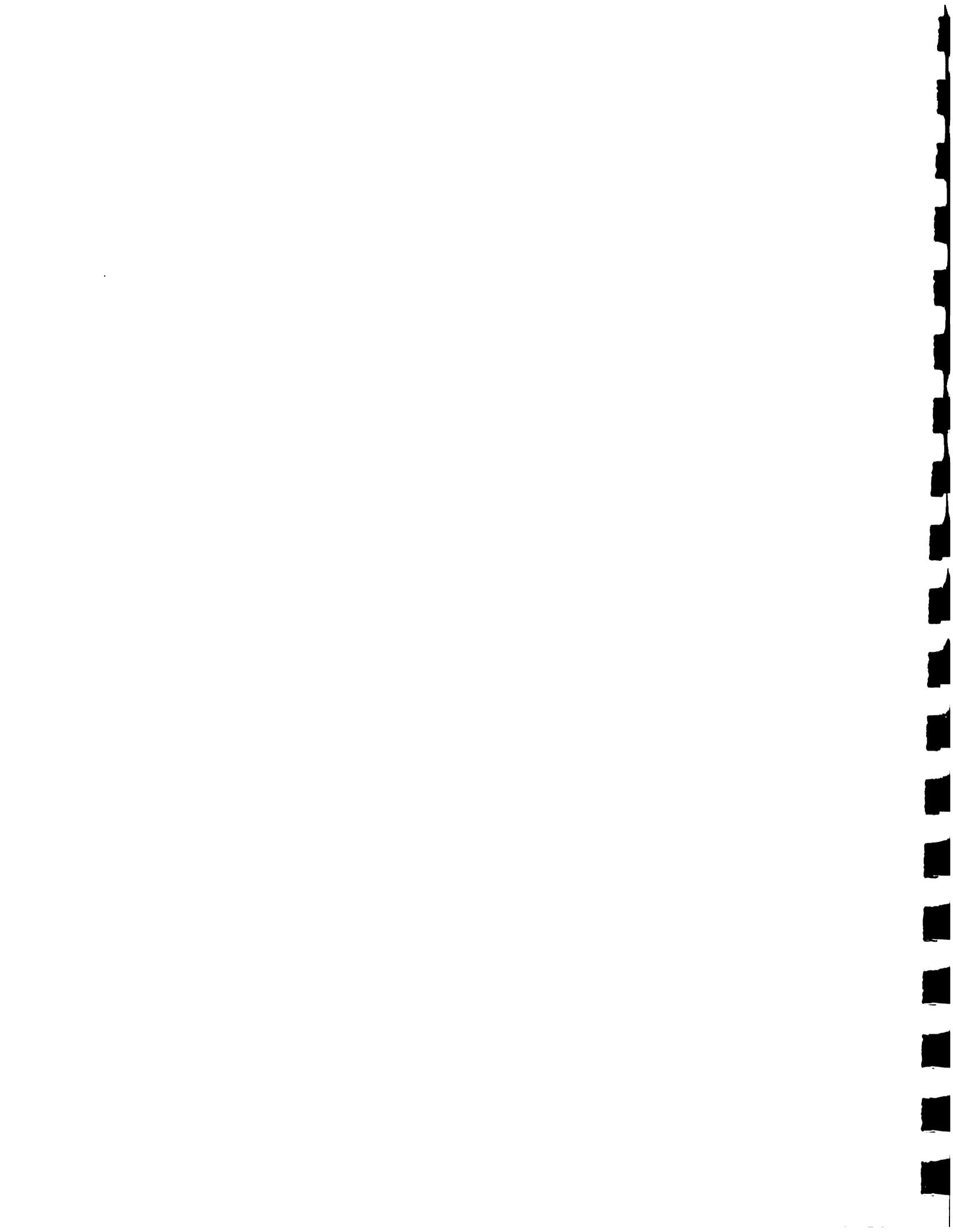
Los resultados obtenidos después de 4 años, demuestran que la metodología ha dado buenos resultados y no afecta el comportamiento de las plantas. Dichas plantas tienen una buena uniformidad y mantienen una buena producción. Las diferencias pueden provenir más del efecto genético.

En el caso de Costa Rica el primer ensayo (1986) ha cumplido su primer ciclo de producción y fue podado en febrero de 1991.

Como se puede observar en los Cuadros 1 y 2 Anexos, generalmente los primeros años de producción, las plantas producidas mediante microestacas superan a las plantas comerciales producidas por semilla. Así, para el impacto real de la metodología se ha decidido para 1992, sembrar el campo con los nuevos ensayos, un testigo "absoluto" -Caturra y Catuai- reproducidos por microestacas. Este trabajo se realiza en los países a través de los laboratorios establecidos.

## **C.2 Propagación mediante embriogenesis somática**

Los primeros casos de embriogenesis somática en el género *Coffea* fueron obtenidas por Staritsky (1970) sobre explantes de *Coffea Canephora*. Desde entonces varios autores han obtenido resultados tanto en *C. Arabica* como en híbridos interespecíficos (Arabusta). El concepto de la embriogenesis somática está basado sobre la extraordinaria capacidad de la célula vegetal, o totipotencia, a regenerar una planta entera.





**Foto 11.**

Plantas reproducidas mediante microestacas de 6 a 7 meses de vivero. Se nota la uniformidad de dichas plantas.

**Foto 12.**

Sistema Radical de plantas producidas mediante microestacas. Generalmente se induce la formación de 2 a 3 raíces.





**Foto 13.**



Ensayo regional de plantas producidas in vitro mediante micro estacas. Se puede observar la homogeneidad de la plantación.

**Foto 14.**

Plantas de dos años de edad en el campo, producidas mediante micro estacas.

Se puede observar una buena primera producción y una buena preparación para el año siguiente.





El objetivo principal de dicha técnica es producir a partir de fragmentos de hojas embriones asexuales. Después dichos embriones se desarrollan en plantas enteras.

Esta técnica comprende los siguientes pasos: **(Foto 15)**

- . Cosecha y desinfección del material vegetal proveniente del campo para su establecimiento in vitro.
- . Inducción y formación de embriones
- . Regeneraciones de embriones y desarrollo de plantas enteras.

En PROMECAFE se ha trabajado con dos técnicas, utilizando fragmentos de hojas y bajo los conceptos definidos por Sondhal y Sharp o sea:

- > LFSE (Low Frequency Somatic Embriogenesis) o embriogenesis somática directa y cuyo nivel de producción es generalmente baja.
- > HFSE (High Frequency Somatic Embriogenesis) o embriogenesis somática indirecta (Callo secundario) cuya tasa productiva es muy alta.

Además PROMECAFE, utilizando las dos técnica, ha realizado trabajos con:

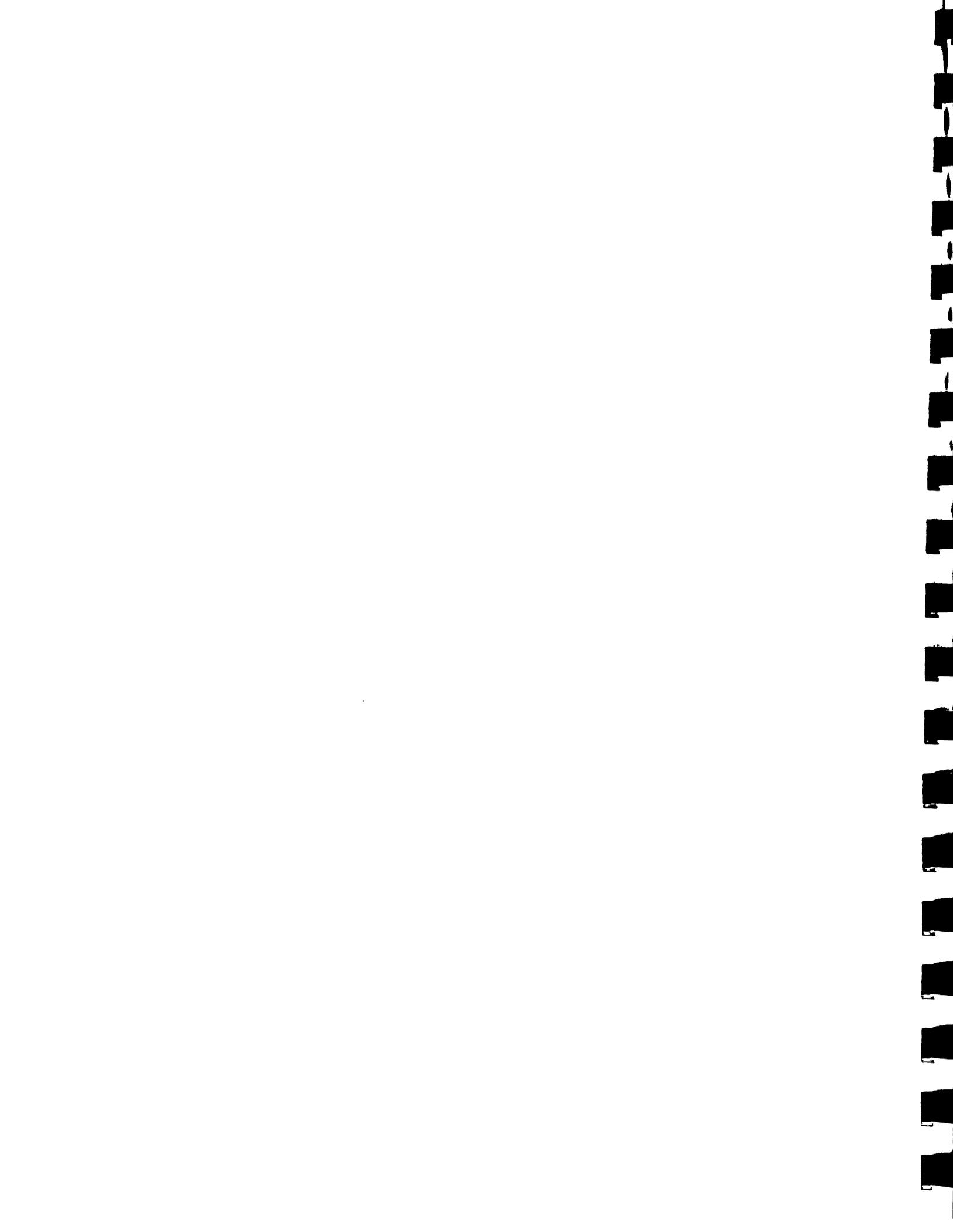
- *C. Arabica* con el objetivo de multiplicar masivamente plantas resistentes a la Roya y otras enfermedades.
- *C. Canephora* con la finalidad de producir patrones de plantas resistentes o tolerantes a nemátodos y otras plagas de las raíces.

#### **a. Cultivos de fragmentos de hojas**

La utilización de materiales vegetales provenientes del campo puede limitar la técnica debido a:

- la alta contaminación por hongos y bacterias
- el estadio fisiológico del material vegetal
- el tipo de explantes que se utiliza (hojas jóvenes)
- la variedad utilizada

El proceso establecido en el laboratorio ha permitido tener un buen control de la contaminación, utilizando una triple desinfección con: Benlate (1 gr./litro), Hipoclorito de Calcio al 10% y Hipoclorito de Calcio al 8%.



Los trabajos realizados durante dos o tres años nos han permitido conocer las épocas mas críticas en cuanto a la alta contaminación. Además, a través de los resultados obtenidos se ha permitido establecer que el primer par de hojas jóvenes dan la mejor respuesta.

#### **b. Inducción y formación de embriones**

Es importante resaltar que la respuesta a la embriogenesis somática responde no solamente al estado fisiológico del explante (nivel de elementos minerales nivel interno de reguladores de crecimiento), pero también al genotipo de la planta (especie, variedad).

##### **- LFSE o embriogenesis somática directa**

Se ha adaptado a las condiciones locales, el medio de Yasuda lo que ha permitido obtener buenos resultados en variedades de Arabica y Canephora.

Actualmente la introducción en cultivos in vitro de plantas seleccionadas se realiza mediante microestaca y embriogenesis somática directa.

En general el *Coffea Canephora* tiene un nivel de producción de embriones bastante superior al de la *C. Arabica*. El caso de esta se produce de 2-3 a 60-70 embriones por explante de 1 cm<sup>2</sup>. En el caso de *C. Canephora* puede ser de 3 a 4 veces más. (Foto 16)

##### **- HFSE o Embriogenesis Somática Indirecta**

Dicha técnica comprende dos fases:

- fase de inducción en la obscuridad
- fase de regeneración a la luz indirecta o directa

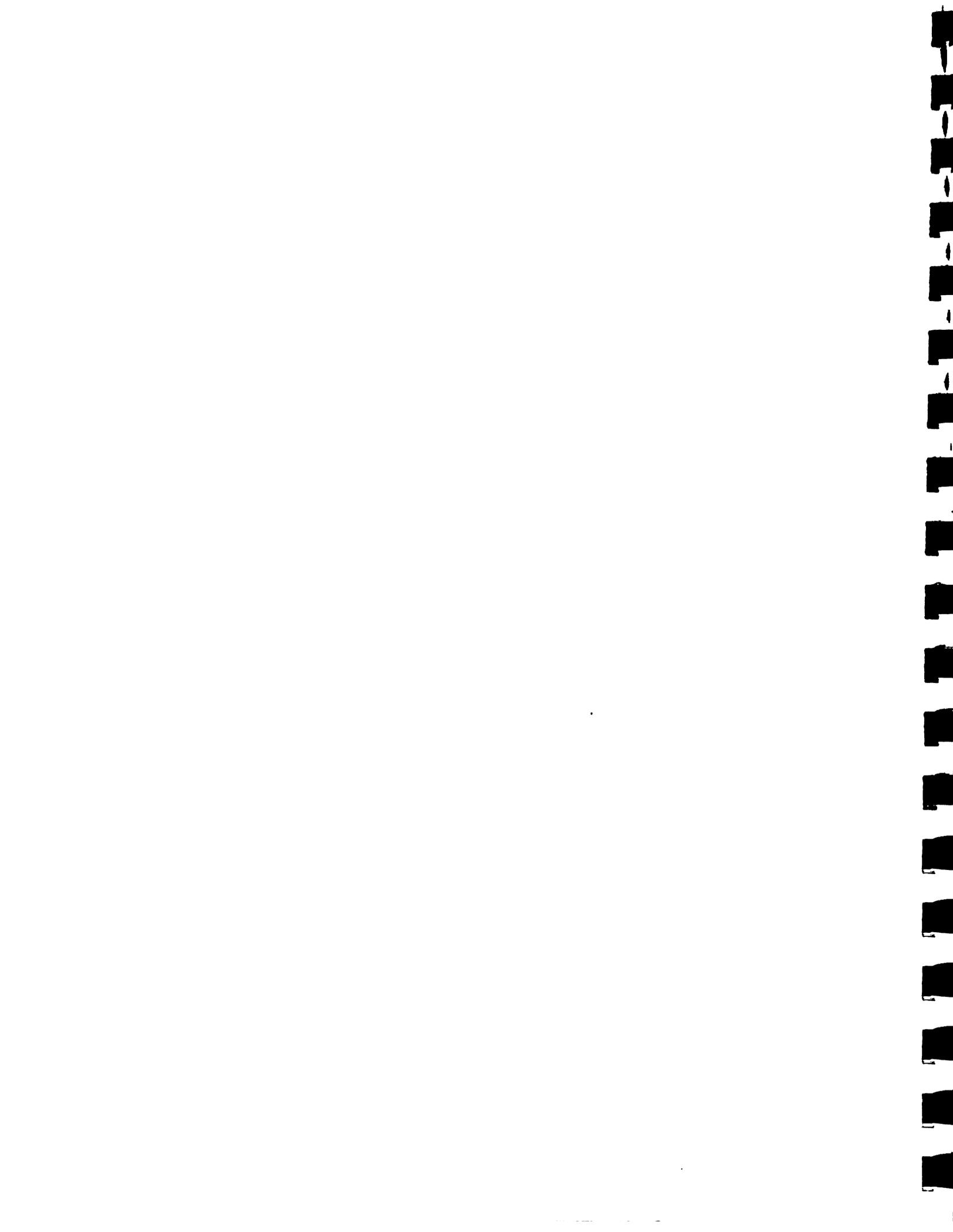
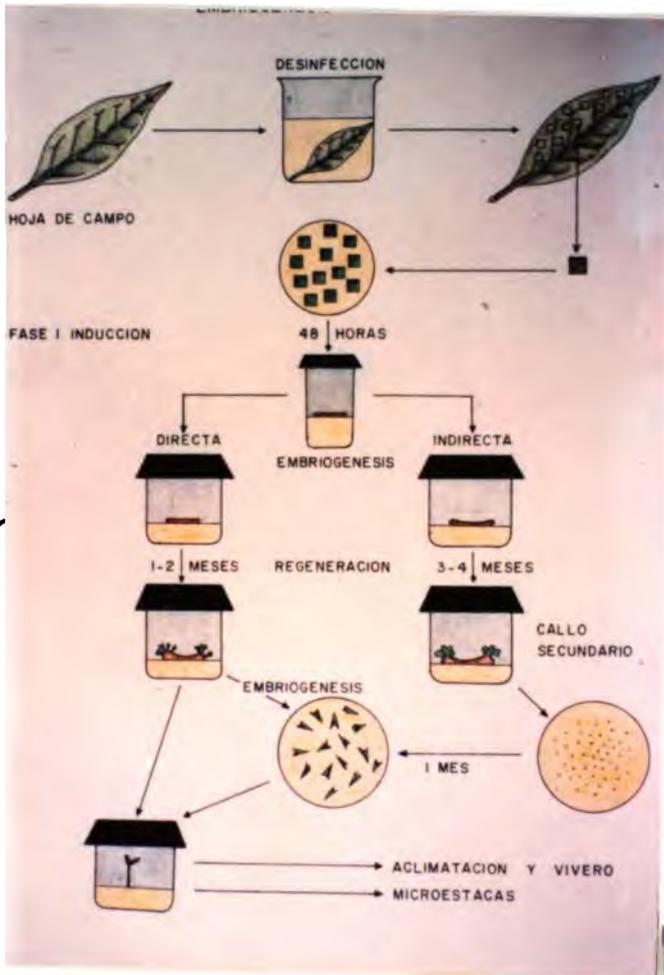


Foto 15.



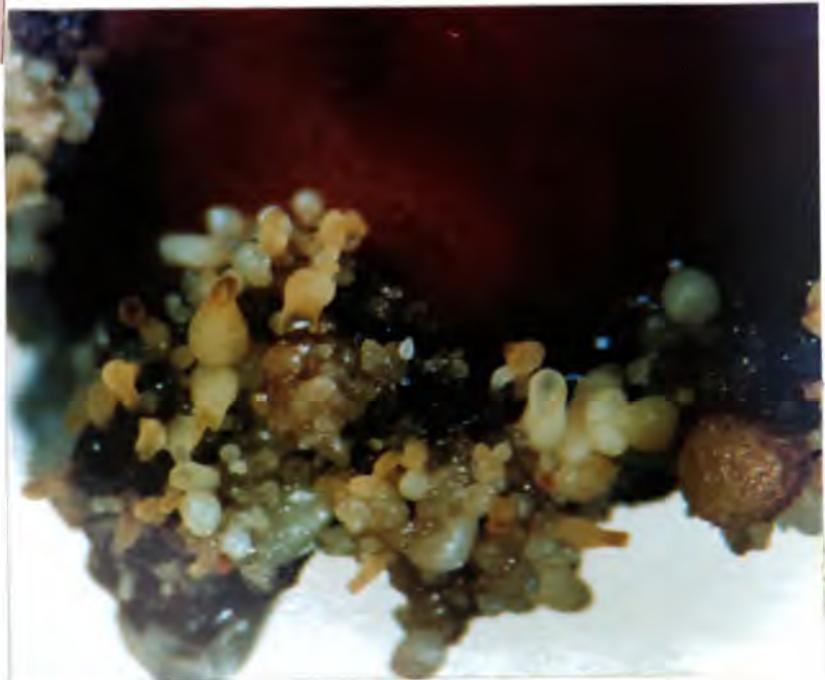
Esquema general de la técnica de multiplicación *in vitro* mediante embriogénesis somática. Comprende dos vías:

- Embriogénesis somática directa
- Embriogénesis somática indirecta

Foto 16.

Embriogénesis somática directa. Los embriones se producen directamente sobre el explante sin pasar por una fase de callo debido a que en el medio de cultivo se pone solamente citocinina.

En el caso de *C. Canephora* la producción de embriones es bastante importante.





La utilización de una mezcla de auxina y citocinina siempre conduce a la formación de un importante callo primario y después un callo secundario amarillo, friable y embriogénico. (Foto 17)

Este callo embriogénico está formado por miles de células embriogénicas, capaces en condiciones adecuadas, de regenerar miles de embriones y al final plantas.

La importancia de dicha metodología es:

- La alta capacidad de producción 10 a 15 veces más en comparación con la LFSE.
- La posibilidad de industrializar la producción

A nivel de *C. Arabica* los resultados obtenidos son prometedores, pero variables, no se ha logrado definir una técnica aplicable a cualquiera variedad de *Arabica*. Es necesario continuar la investigación.

Con la variedad *C. Canephora* se ha logrado establecer una metodología que permite producir embriones en cualquier línea de robusta y en cualquier momento del año.

Los resultados obtenidos han permitido empezar a trabajar sobre la fase de regeneración de los embriones y plantas tanto en medio sólido como líquido. (Foto 18)

Además los resultados obtenidos con *C. Canephora* nos permiten estudiar y entender mejor el fenómeno de la embriogénesis somática. Esto debería permitir en un futuro cercano, lograr los mismos resultados en *C. Arabica*.

Actualmente estamos en la fase de optimización de la producción de embriones en medio líquido, o sea:

- producción de callo secundario embriogénico con cualquier tipo de robusta todo el año



**Foto 17.**



Callo secundario embriogénico producido sobre un explante de hoja. Este callo es de color amarillo y muy friable y puede ser sometido a un proceso de multiplicación (medio líquido) o de regeneración de embriones (medio sólido o líquido).

**Foto 18.**

Embriones somáticos regenerados y germinados en medio sólido. Se puede observar la cantidad producida a partir de un callo formado sobre un explante de hoja de un centímetro.





- multiplicación en medio líquido del callo secundario embriogénico: de 1 gr/l hemos obtenido 350 gr/l en 10 semanas (**Foto 19**)
- regeneración de embriones en medio líquido (equilibrio de reguladores de crecimiento, condiciones físico-químicas del medio) (**Foto 20**)

Los resultados obtenidos nos han permitido entrar a otra etapa de la investigación, al nivel de cultivos celulares en medios líquidos, lo que nos permitirá en el futuro:

- Una optimización y producción comercial de plantas de café
- inducción y creación de variabilidad genética por ingeniería genética

Además de estos trabajos se han realizado varios estudios de histología de suma importancia para entender los fenómenos que ocurren en el cultivo de tejidos. (**Fotos 21 y 22**)

Actualmente se están preparando las publicaciones sobre dichos trabajos y se considera que la técnica, en el caso de Robusta podría estar lista para ser transferida a los países en 1991.

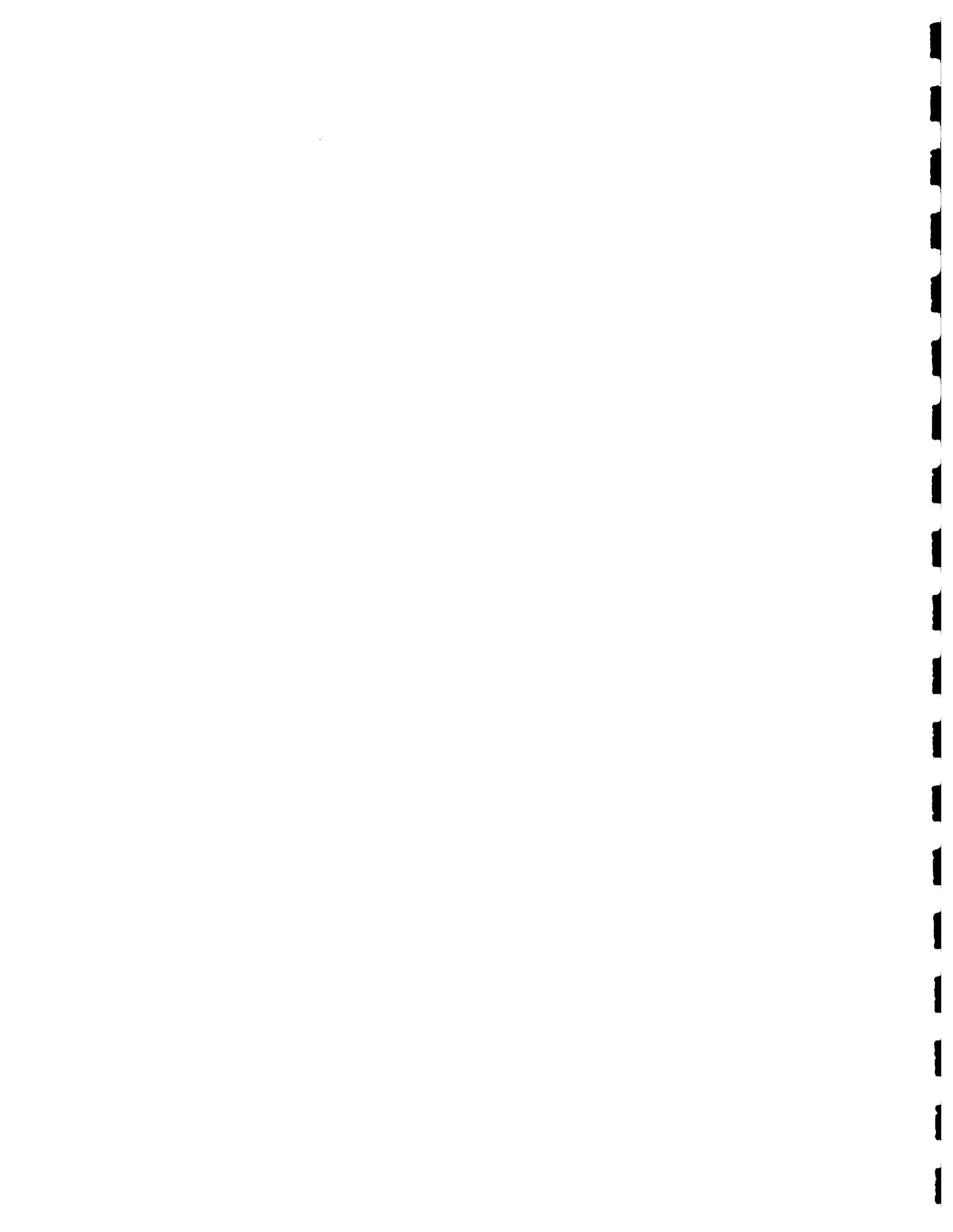
### **C.3 Cultivo de ápices**

Generalmente el cultivo de ápices, debido a su crecimiento lento, se utiliza para la conservación in vitro del material vegetal.

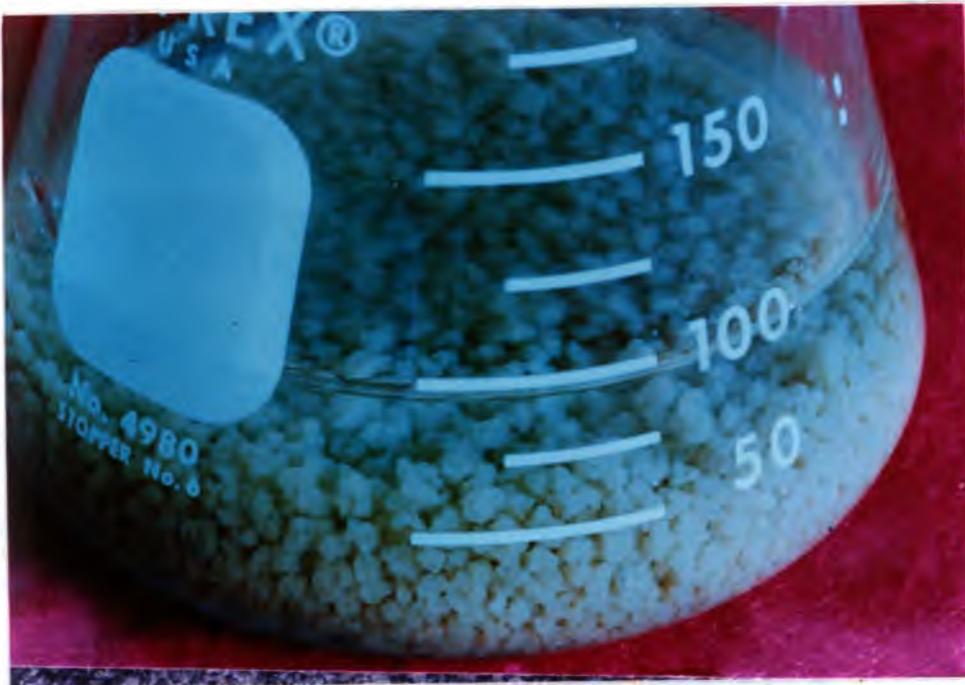
A nivel de PROMECAFE se ha trabajado con este tipo de explante, con el fin de disponer de una metodología que permite la conservación in vitro de especies y variedades de café.

En el laboratorio del CATIE se ha logrado establecer la metodología utilizando directamente material vegetal del campo (**Foto 23**). Además se ha logrado regenerar plantas a partir del cultivo de ápices (**Foto 24**).

Mientras que los estudios de crio-conservación u otros procesos no estén terminados o bien establecidos, el cultivo de ápices puede ser una alternativa como las microestacas a mediano plazo para la conservación de recursos genéticos en café.



**Foto 19.**



Multiplicación en medio líquido del callo secundario. De 5 gr de callo/litro de medio se puede obtener 340 ó 350 gr/litro después de diez a doce semanas.

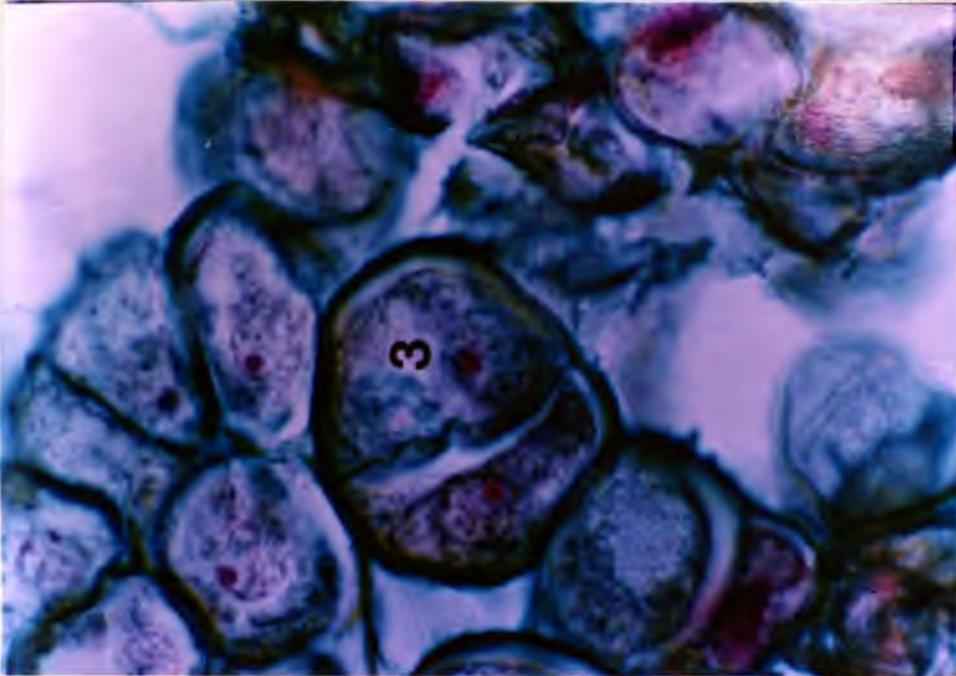
**Foto 20.**

Regeneración y germinación de embriones en medio líquido. El uso de medio líquido deberá permitir no solamente bajar el costo de producción de plantas, sino también facilitar la producción a nivel industrial (fermentadores).





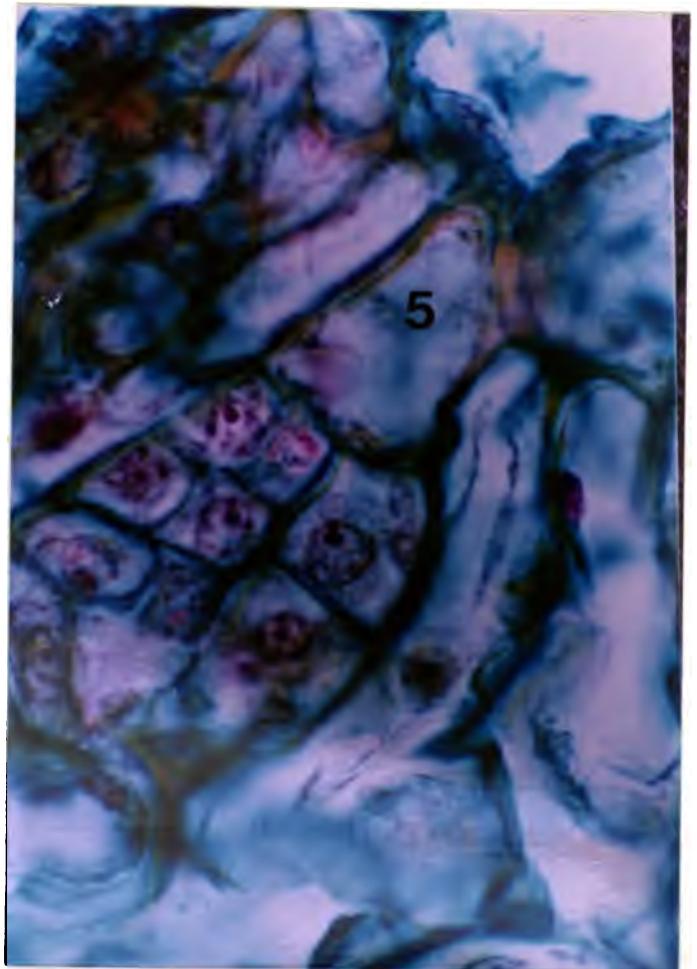
**Foto 21.**

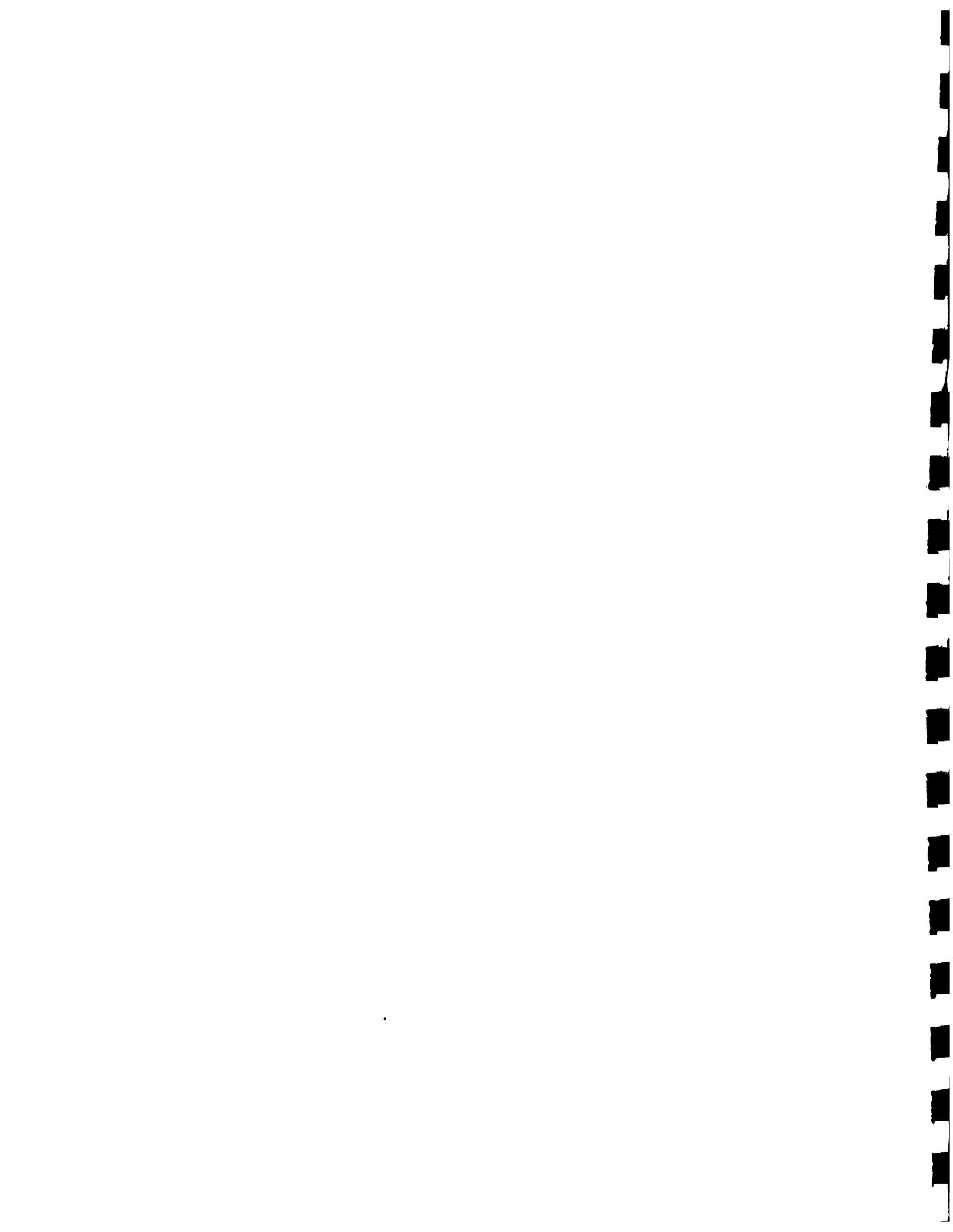


Estudio histológico del callo secundario embriogénico. Este callo está formado por células pequeñas, redondas, no diferenciadas. Se ve (3) la formación de un pro embrión con dos células y la pared para aislarla del resto del tejido.

**Foto 22.**

Corte de un callo secundario en proceso de regeneración. Se observa el desarrollo de un pro embrión con su suspensor (5).





**Foto 23.**

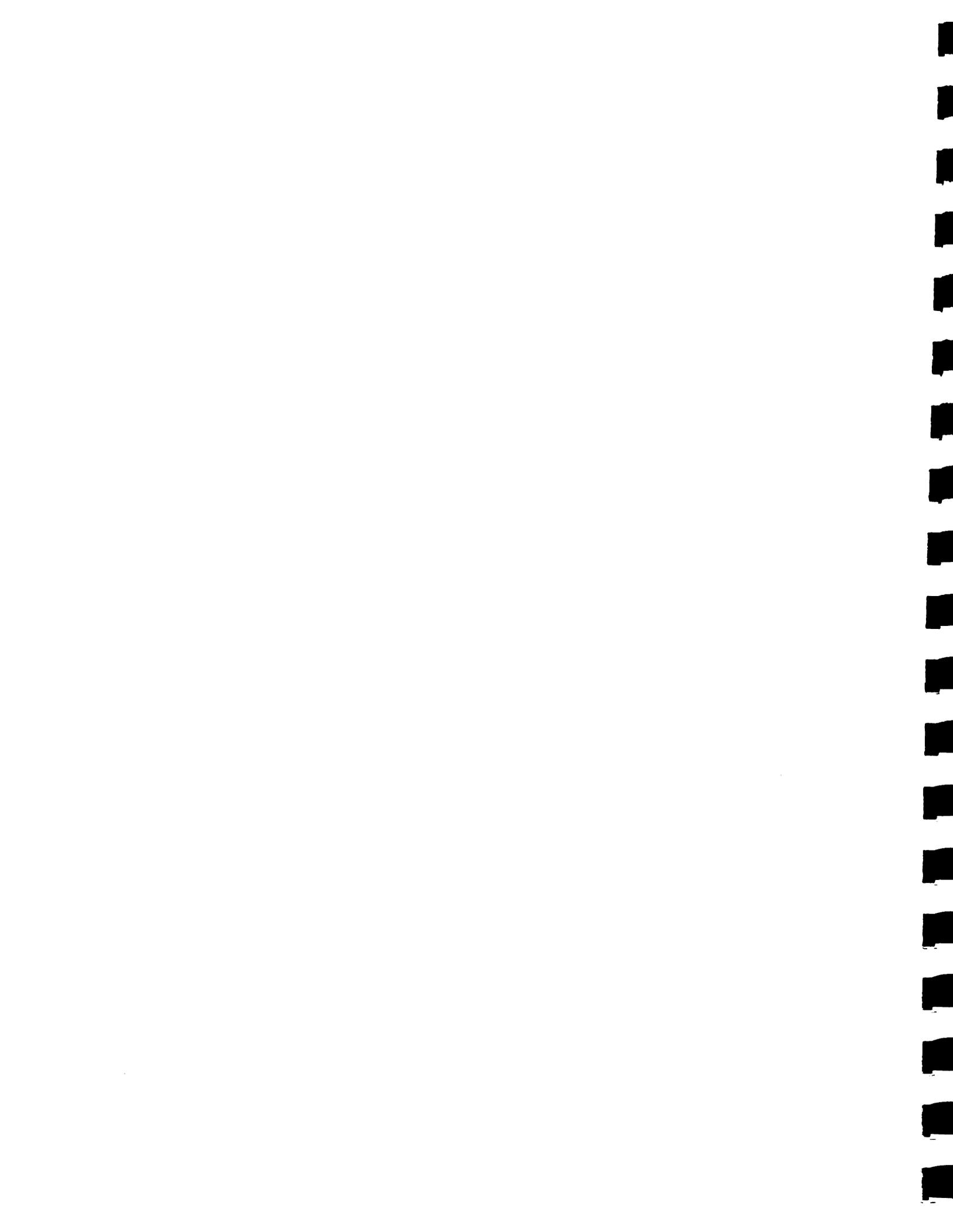


Secuencia de cultivo de ápices provenientes directamente del campo. Dicha metodología puede ser utilizada para la creación de un banco de germoplasma in vitro de café, debido a su lento crecimiento.

**Foto 24.**

Plantas regeneradas a partir del cultivo de ápices. Además de la conservación in vitro se puede utilizar el cultivo de ápice para producir y multiplicar plantas, pero dicha técnica es más lenta que las otras.





## **D. CAPACITACIÓN**

### **D.1 Técnicos nacionales**

Para el establecimiento de los laboratorios ha sido necesario la capacitación de técnicos nacionales en esta técnica.

Se ha realizado capacitación en servicio de 3 meses para dos técnicos de cada país tanto de los, en los cuales se acaba de establecer los laboratorios como en los otros países miembros.

- Guatemala, Honduras, Salvador = 2 por cada uno
- Nicaragua, México = 2 por cada uno
- República Dominicana = 1

### **D.2 Estudiantes**

Con el fin de apoyar la investigación y los resultados se han realizado dos tesis de maestría en el CATIE.

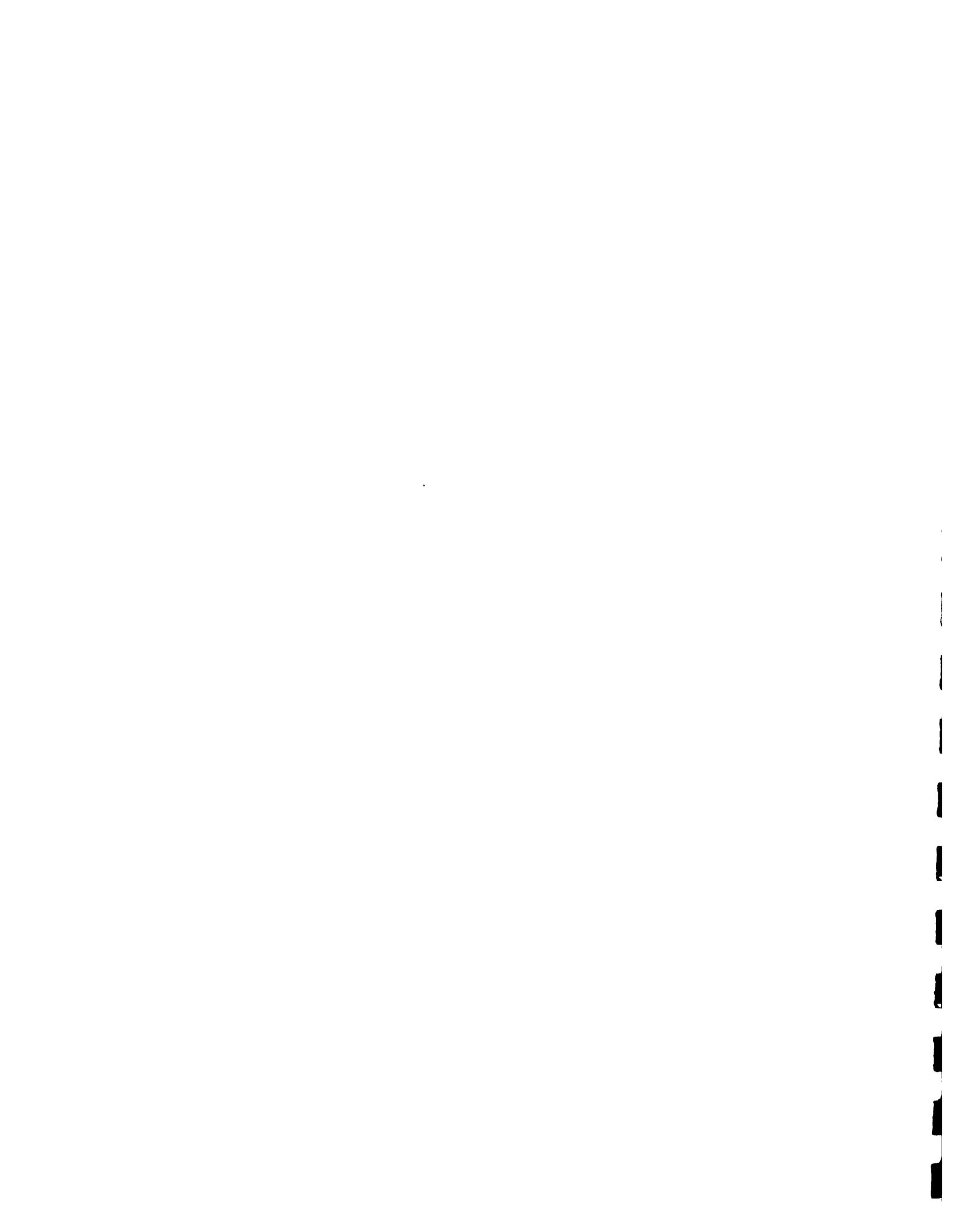
- . Estudio heterológico de la micro injertación de *Coffea Arabica* sobre *Coffea Canephora*
- . Estudio histológico de la formación de raíces en plantas producidas in vitro

El primero de los resultados obtenidos muestran que:

- No hay incompatibilidad entre el patrón (*C. Canephora*) y el injerto (*C. Canephora*)
- que la unión patrón/injerto se realiza muy temprano en condiciones in vitro (10 días)
- que hay una unión perfecta entre los sistemas vasculares del patrón y del injerto
- que se han logrado mas del 90% de éxito en la injertación
- que la tecnología esta disponible para los países

En el segundo, se ha mostrado:

- el origen de la formación del primordio radical de las raíces adventicias (Floema y Cambium)
- el buen desarrollo y formación de dichas raíces



- establecimiento de una buena conexión entre la raíz adventicia y el sistema vascular central de la planta
- que la utilización de plantas con varias raíces adventicias es algo posible y viable.

#### **IV. JUSTIFICACION Y PERSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGIA EN CAFE EN AMERICA LATINA**

Es evidente que la sostenibilidad de una agricultura moderna esta muy ligada a la utilización y aplicación de técnicas de puntas. Hoy en día en cultivos anuales o perennes no se puede hablar de logros importantes sin hablar de **biotecnología**.

En los diez últimos años los grandes progresos realizados en **biotecnología** en general, y en cultivo in vitro en café, abren nuevas perspectivas y esperanzas tanto para los investigadores como para los productores.

##### **A. SITUACION ACTUAL DE LA CAFICULTURA**

El aparecimiento de plagas y enfermedades endémicas como la Roya del Cafe (*Hemileia vastratrix*), han incrementado los costos fitosanitarios por el uso de agroquímicos, ocupando actualmente un 20% de los costos de producción y existiendo la posibilidad de aumentar en mayores costos ante la amenaza de otros parásitos potenciales: nemátodos, CBD, Cochinilla de raíces, etc.

En el Continente Americano, ante estas amenazas y sabiendo de que *Coffea Arabica* dispone de una estrecha base genética en cuanto a fuentes de genes de resistencia a enfermedades y plagas, la tendencia actual, es recuperar a través de cruces intraespecíficos con "variedades" silvestres o espontáneas de *C. Arabica* (Etiopía) o interespecíficos, genes de resistencia a otros parásitos creando híbridos con exigencias ecológicas y características agronómicas similares a las variedades comerciales actualmente cultivadas.

La creación de nuevas variedades comerciales para ser distribuidas a los productores por semilla, requiere 35 a 40 anos de trabajo.

Frente a este plazo, tan largo y con el incremento rápido de la problemática de estos parásitos, el investigador se verá obligado a hacer una selección más precoz al nivel F<sub>1</sub> o F<sub>2</sub>.



La multiplicación vegetativa es el único procedimiento que permitirá reproducir a gran escala los genotipos excepcionales productos de cruces intra o interespecíficos, cuya fijación por vía tradicional (semilla), es difícil por diversas razones:

- Depuración genética larga y onerosa
- Pérdida de variabilidad genética
- Pérdida de vigor híbrido o efecto de heterosis
- Viabilidad corta de algunos híbridos

## **B. AVANCES Y LOGROS EN CULTIVOS IN VITRO EN LA REGION**

### **B.1 Establecimiento de laboratorios**

Los países como Honduras, El Salvador, Guatemala y Costa Rica (CATIE), disponen de un laboratorio de cultivos de tejidos donde con la colaboración y asesoramiento de PROMECAFE/IRCC, y el apoyo financiero de USAID-ROCAP se han alcanzado logros muy significativos.

Se ha capacitado personal en las técnicas de cultivo de tejidos a nivel de Ingeniero Agrónomo o Msc.

Actualmente, dichos países disponen de un laboratorio totalmente equipado (¢32.000 de equipo, productos y materiales) capaz de apoyar a los programas de mejoramiento y producir mediante microestacas gran cantidad de plantas.

El volumen de plantas producido dependerá del espacio de la cámara de crecimiento y el número de personal asignado al laboratorio además del responsable. El buen funcionamiento de los laboratorios depende únicamente del interés y de la voluntad de las instituciones nacionales. Por ejemplo, en 1988-89 se han capacitado dos técnicos de ANACAFE. Ninguno de los dos está trabajando actualmente en esta área.

PROMECAFE a través de la formación de un estudiante de Maestría del CATIE pudo apoyar en esto. Este estudiante, quien terminó su tesis en cultivo de tejido de café, empezará a trabajar en mayo de 1991 con ANACAFE.

### **B.2 Programa de trabajo**

#### **a. Objetivos generales**

El programa de trabajo debe enfocarse hacia tres actividades:

- 1) Multiplicación de híbridos  $F_1$  o  $F_2$  seleccionados por los programas de mejoramiento



2) Conservación in vitro de recursos genéticos: variedades y especies

3) Intercambio de material genético

#### **b. Objetivos específicos**

En relación con el programa de fitomejoramiento, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, deberá realizar los siguientes trabajos:

1. Multiplicación de híbridos de *C. Arabica* F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> para:

- ensayos regionales (estudio y selección)
- multiplicación y producción de las mejores plantas seleccionadas

2. Otras especies

Multiplicación y producción de patrones con énfasis a resistencia o tolerancia a nemátodos y enfermedades y plagas de las raíces.

3. Establecer una red de intercambio de material genético entre países.

#### **c. Estrategias**

Para alcanzar los objetivos definidos se deberán seguir los siguientes pasos:

1. Constitución de un banco de germoplasma in vitro de las mejores plantas seleccionadas por el programa de fitomejoramiento, mediante microestacas y embriogenesis somática.
2. Multiplicar y producir patrones de *C. Canephora* con resistencia o tolerancia a nemátodos u otras especies.
3. Seguir la investigación por la transferencia y adaptación de la metodología de la embriogenesis somática.
4. Introducir clones diferenciales de Roya y otras especies de utilidad.
5. Mantener un intercambio de materiales e información entre los laboratorios de la región.



#### **d. Necesidades para los laboratorios**

1. Personal que debe tener la institución contraparte: un responsable a nivel de Ingeniero Agrónomo o Master y un asistente de laboratorio.
2. Presupuesto para materiales y productos por año.

Reactivos químicos	US\$2,500.00
Cristalería y materiales	2,000.00
Insumos y materiales locales	300.00
Otros	700.00
Total	<u>US\$ 5,500.00</u>

#### **C. PROGRAMA 1991**

Para el año 1991, los laboratorios disponen de nuevas líneas de la variedad Colombiana (microestacas y embriogenesis somática) de Caturra y Catuai y algunos otros híbridos, los cuales deberán ser multiplicados para ser sembrado en 1992 para su estudio y selección.

Se espera al fin del año tener entre 3000 y 5000 plantas producidas por cada laboratorio.

#### **D. RED DE BIOTECNOLOGIA EN CAFE**

Dicha tecnología ha despertado un gran interés en la región. Otros países como Nicaragua y Costa Rica están interesados en iniciarse en esta área.

Eso sería de suma importancia para la caficultura centroamericana ya que permitiría reforzar los lazos entre los diferentes países. El establecimiento de laboratorios en Costa Rica y Nicaragua permitiría implantar la primera Red de biotecnología del café permitiendo, además del apoyo a los programas de investigación en mejoramiento genético, un intercambio de recursos genéticos y otros materiales seleccionados.

Se considera que esta Red está pronta a establecerse y dinamizarse.



## **E. PERSPECTIVAS**

### **E.1 Nuevos enfoques en mejoramiento**

Como se ha mencionado anteriormente, los programas de mejoramiento deben plantear nuevos enfoques para aumentar la sostenibilidad de la caficultura moderna.

Algunos países como Kenya lo decidieron hace varios años y actualmente están trabajando con híbridos  $F_1$  o  $F_2$  que se obtuvieron después de 15 años de trabajo. Pero ellos no disponen aparentemente de una metodología y un potencial para reproducirlos asexualmente.

Los trabajos y programas realizados a través de PROMECAFE en los países con el apoyo de USAID-ROCAP han permitido hacer un paso adelante muy prometedor pues los resultados obtenidos demuestran que la metodología no afecta la planta. Se ha demostrado tanto a nivel del laboratorio (tesis) como a nivel de campo, que el sistema radical de la microestaca es tan funcional como la planta de donde proviene la semilla.

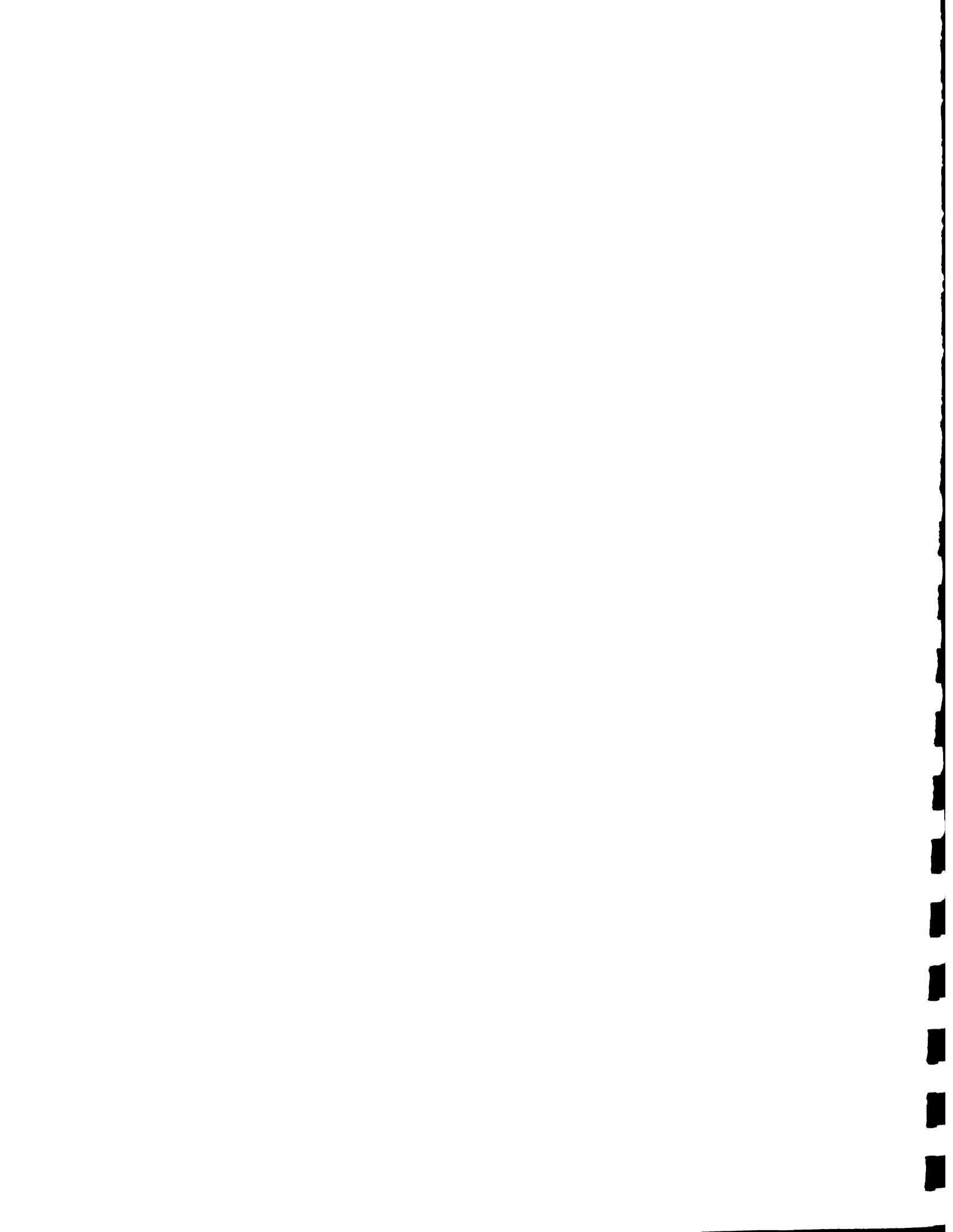
Es importante resaltar además, que desde 1979 a través de una red de trabajo, PROMECAFE ha obtenido logros importantes para la caficultura de la región:

- capacitando personal en mejoramiento y cultivo de tejidos
- dinamizando una red de intercambio entre instituciones e investigadores dentro de la región y fuera de ella.

Debido a esto es muy importante aprovechar estos esfuerzos en general y los resultados de la biotecnología en particular, para dar nuevos enfoques al mejoramiento con el fin de obtener a corto y mediano plazos, nuevas variedades de café.

#### **i) A corto plazo**

- evaluación y producción de patrones resistentes o tolerantes a plagas de raíces
- multiplicación y producción de nuevas fuentes de diversidad genética a través de un programa de hibridación intra e interespecífico ( $F_1$  o  $F_2$ )
- conservación de material genético



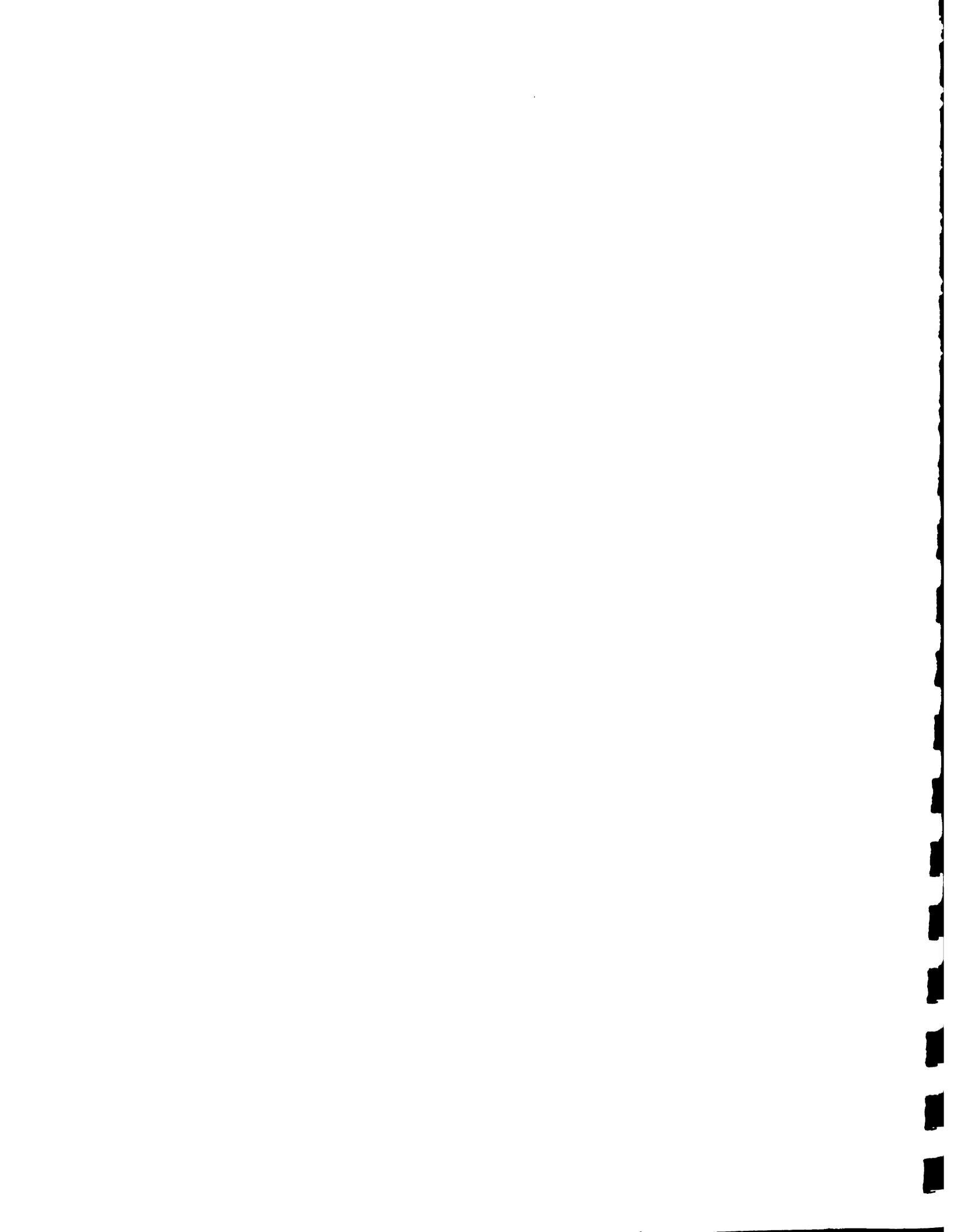
ii) Mediano plazo

Creación y evaluación de nuevos híbridos con resistencia a la Roya, Nemátodos, BCD y Cochinillas de raíces.

- Obtención y utilización de haploides para la creación de nuevas líneas (cultivos in vitro)
- utilización de la biotecnología (cultivos celulares, transformación genética) para la creación de variabilidad genética

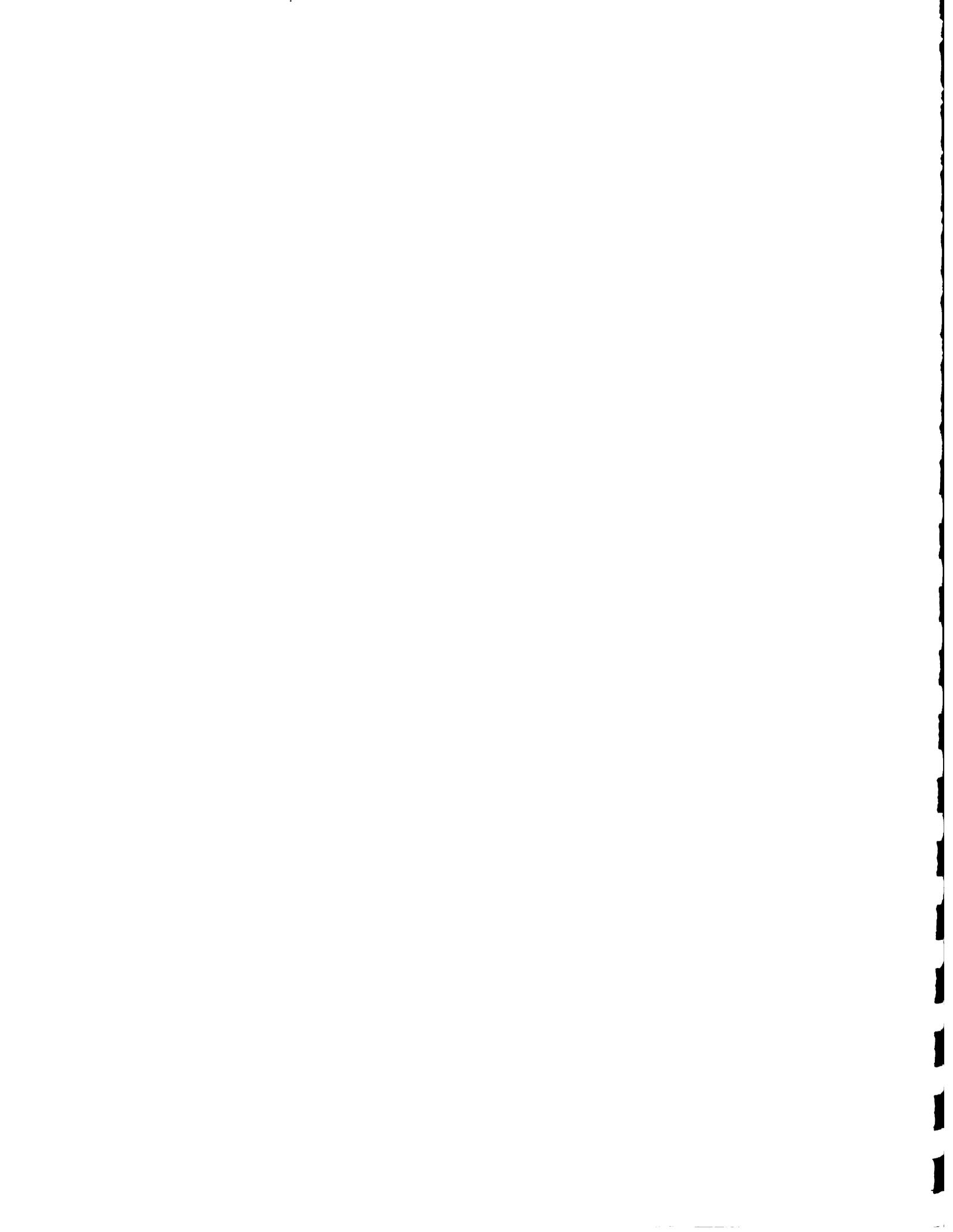
**E.2 Presupuesto**

a.	CATIE	US\$
	<u>Personal</u>	
	1 Biotecnólogo ( )	
	1 Asistente	13.000
	1 Auxiliar	4.800
	<u>Funcionamiento</u>	
	Materiales y productos	5.000
	Viajes	8.000
	Otros	3.000
b.	PAISES	
	<u>Personal en cada país</u>	
	1 Biotecnólogo responsable	
	1 Auxiliar	
	<u>Establecimiento de un laboratorio</u> (Costa Rica y Nicaragua)	
	Equipo (20.000 x 2)	40.000
	Materiales y productos (400 x 2)	8.000
	<u>Funcionamiento de los laboratorios</u>	
	Materiales y productos (4000 x 5)	20.000
	Repuestos (1500 x 5)	7.500
	Otros (publicaciones, etc.) (1000 x 5)	5.000
	Equipo	20.000
c.	REUNIONES	
	2 reuniones por año (6000 x 2)	12.000
d.	CAPACITACION	5.000
	<b>TOTAL</b>	<b>US\$150.000</b>



## F. PRESUPUESTO GENERAL POR 5 AÑOS

DESCRIPCION	1° AÑO	2° AÑO	3° AÑO	4° AÑO	5°AÑO	TOTAL
<u>Personal</u>						
Internacional	PM	PM	PM	PM	PM	PM
Nacional	17.800	18.500	20.430	22.860	25.140	82.210
<u>Equipo</u>	60.000	-	-	-	-	60.000
<u>Materiales y Productos</u>	33.000	2.500	2.500	2.750	2.750	43.500
<u>Mantenimiento y Equipo</u>	-	7.500	-	7.500	-	15.000
<u>Viajes y viáticos</u>	8.000	8.000	8.000	8.800	9.600	42.400
<u>Capacitación</u>	-	5.000	5.000	5.000	-	15.000
<u>Reuniones</u>	12.000	12.000	12.000	13.200	13.200	62.400
<u>Otros</u>	8.000	8.000	8.000	9.600	9.600	43.200
<u>Overhead</u>	20.820	12.610	11.760	14.170	12.760	71.670
<b>TOTAL</b>	<b>159.620</b>	<b>96.240</b>	<b>90.190</b>	<b>108.630</b>	<b>97.800</b>	<b>435.380</b>



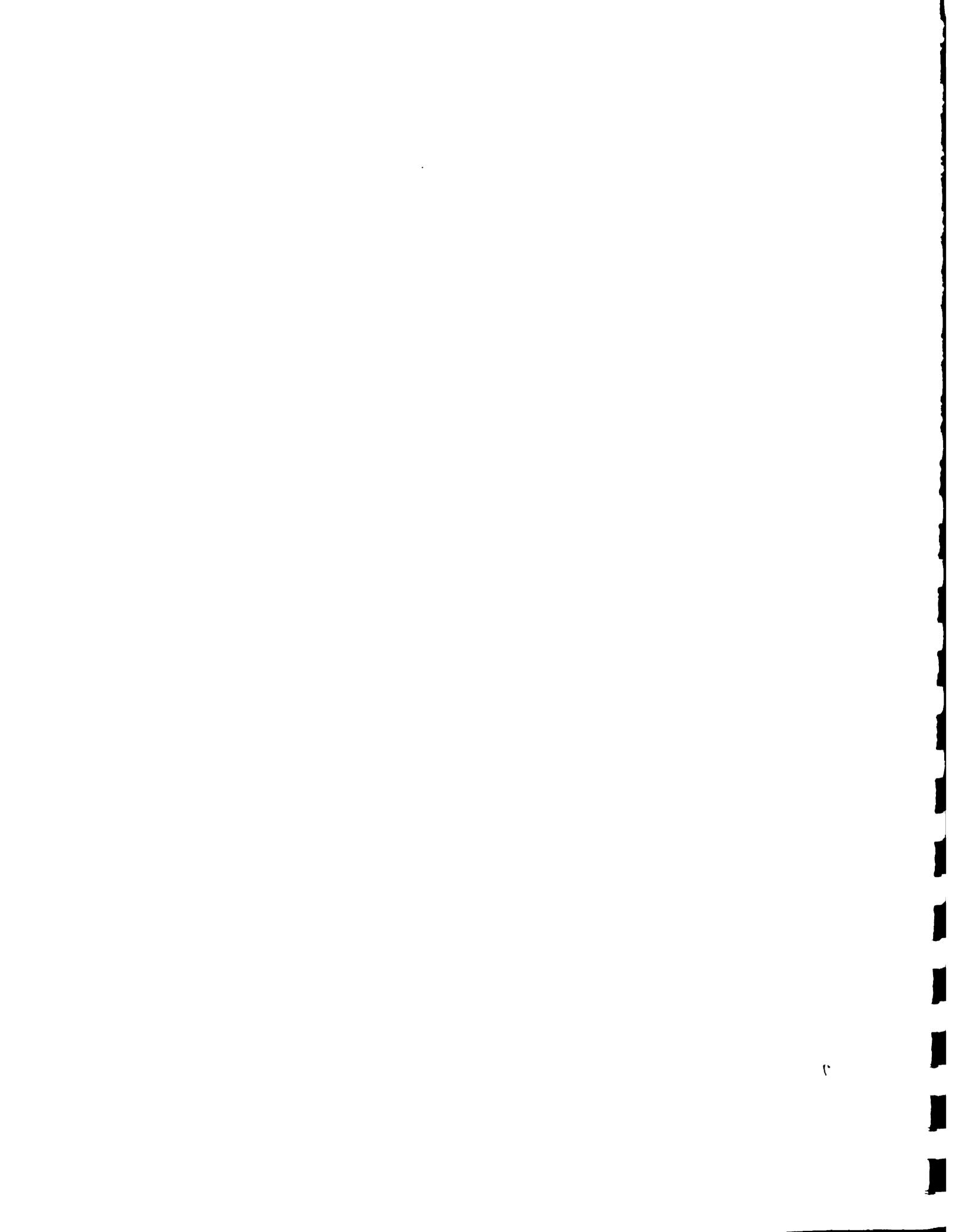
## **V. CONCLUSIONES**

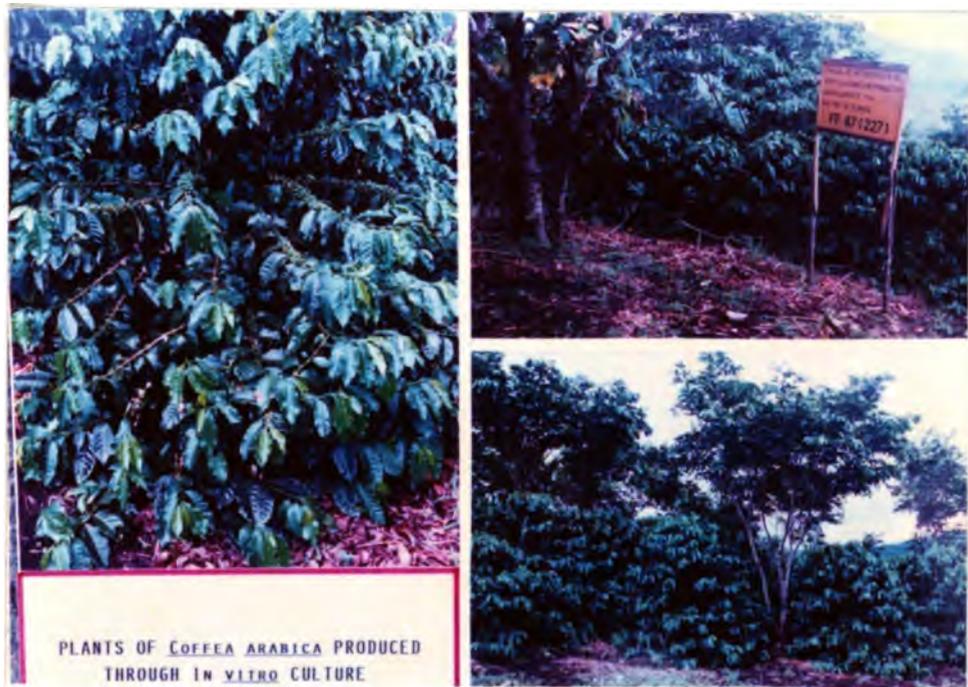
Los trabajos realizados en PROMECAFE han permitido no solamente establecer una metodología de multiplicación asexual in vitro de *C. Arabica*, sino también dinamizar el interés de la biotecnología a través de la capacitación de técnicos y del apoyo para el establecimiento de laboratorios de cultivos de tejidos.

Además, los prometedores resultados a nivel de campo abren nuevas perspectivas para la caficultura centroamericana a través de nuevos enfoques de mejoramiento genético.

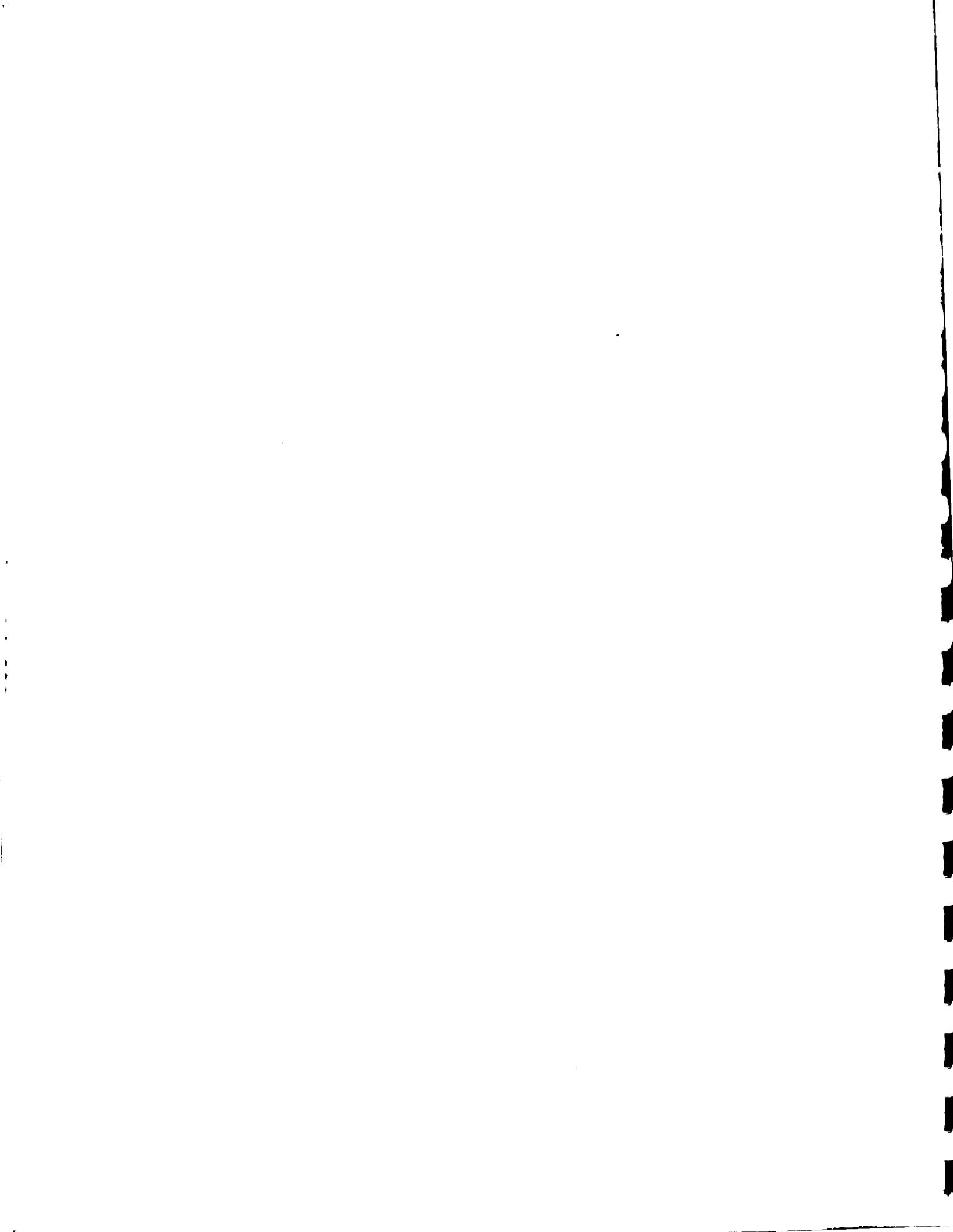
Varios países tienen ya el potencial físico (laboratorios) y humanos (técnicos), y otros (Costa Rica y Nicaragua), están interesados en desarrollar dicha tecnología.

Eso depende ahora de la voluntad de las instituciones nacionales para continuar adelante.

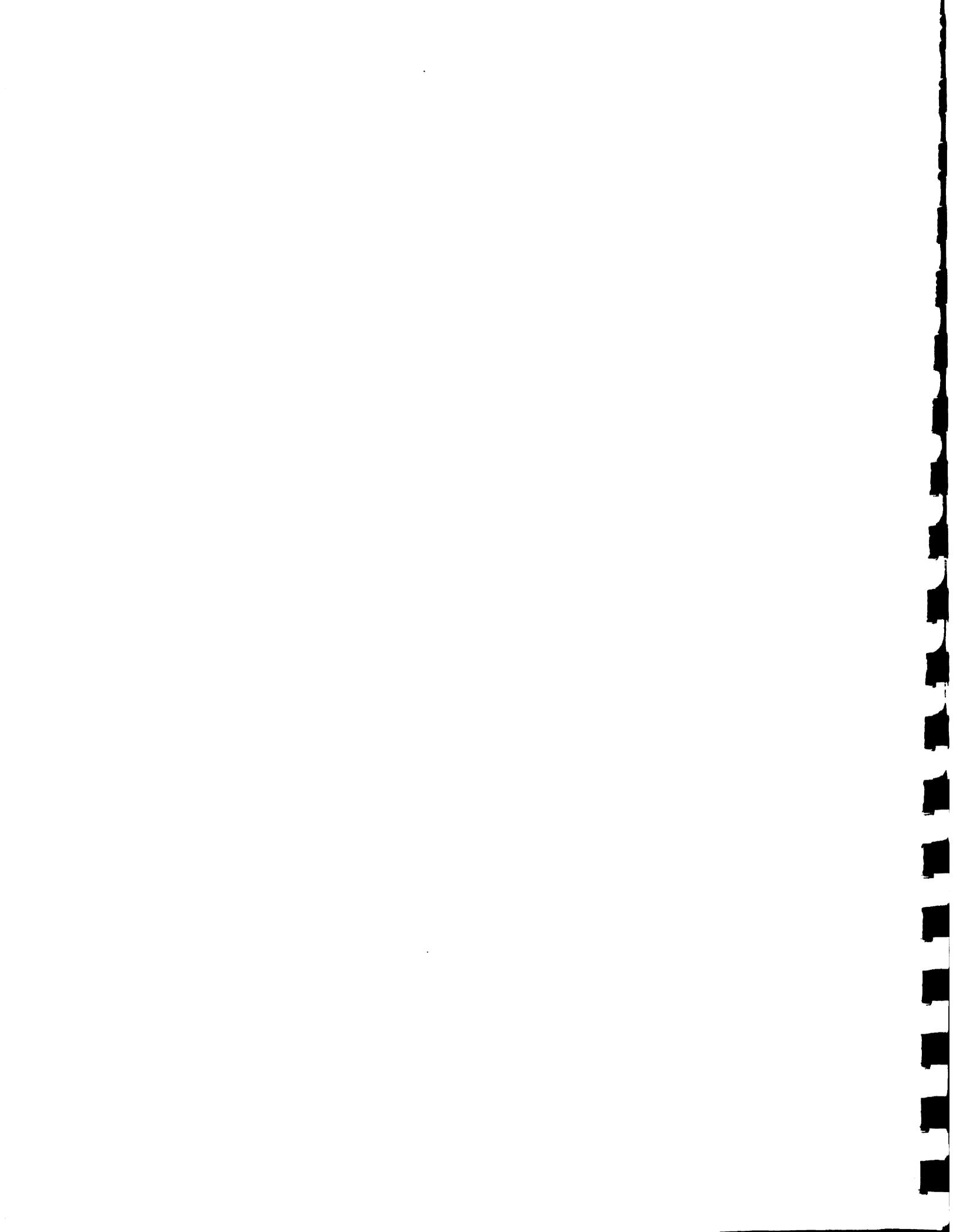




**Foto 25.** Micro estacas o semilla ? No se nota diferencia en el fenotipo. Sin cambiar fundamentalmente el aspecto de la planta, la biotecnología deberá permitir una mejor sostenibilidad de la caficultura moderna, un aprovechamiento más adecuado de los recursos y la variabilidad genética.



## **VI. ANEXOS**



**DESCRIPCION DE LOS MATERIALES EVALUADOS EN EL EXPERIMENTO C.F. 01-MG-402-6-87**

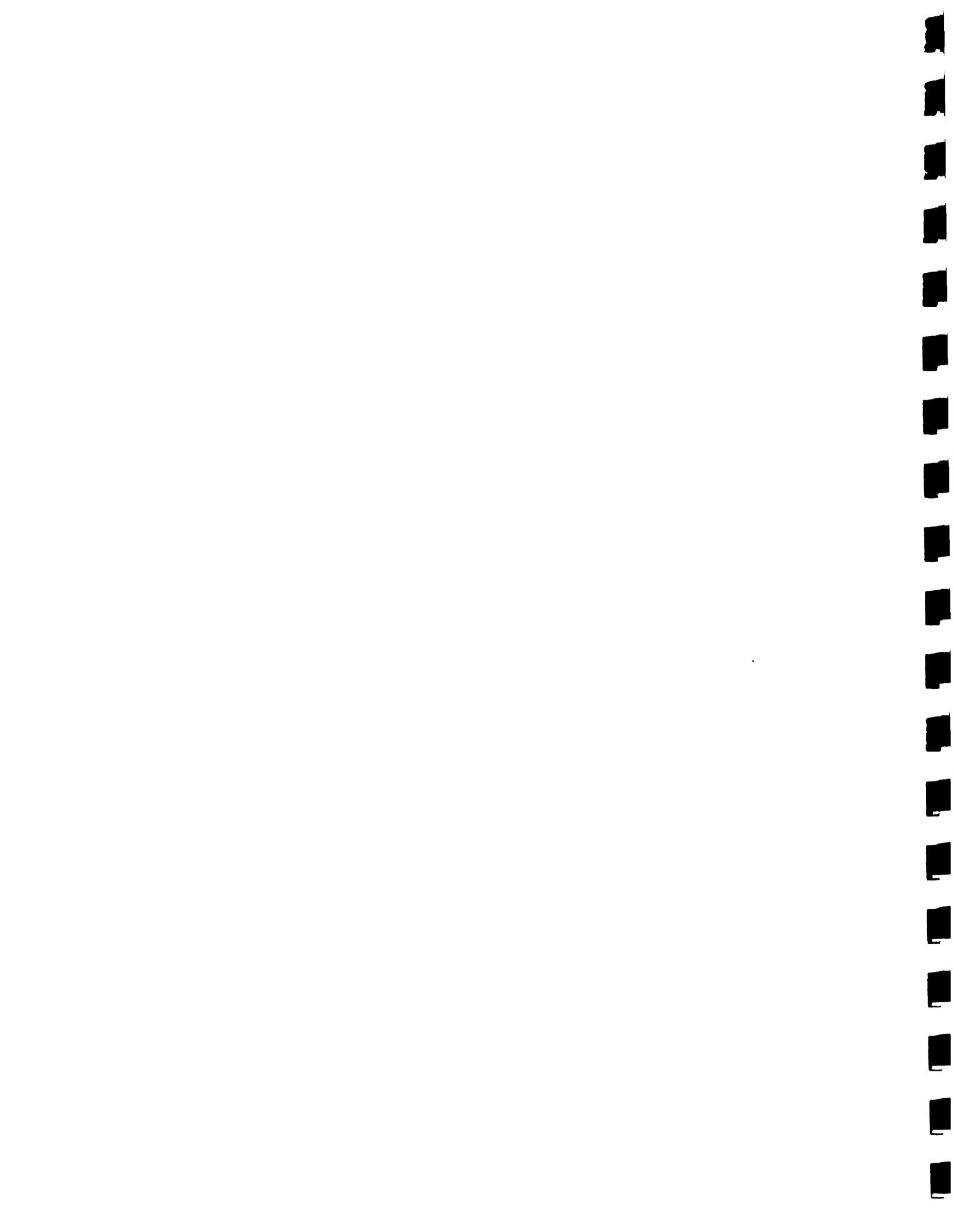
**NOMBRE DEL EXPERIMENTO: EVALUACION DE RETOCRUCES DE COPPA ARABICA**

**REPRODUCIDOS ASEUALMENTE POR CULTIVO DE TENDIDOS**

NUMERO EN EXPERIMENTO	NO INTRODUCCION TURRIALBA	GENERACION	DESCRIPCION	DESIGNACION
1 CR179	17995	F <sub>1</sub>	T-8664 (4-3) x Catusai	Catimor x Catusai
2 CR171	17792	F <sub>1</sub>	T-8663 (1-5) x H-33	Catimor x Híbrido Tico
3 CR172	17793	F <sub>1</sub>	T-8660 (3-4) x Catusai	Catimor x Catusai
4	No tiene	F <sub>1</sub>	T-8667 ( ) x Catusai	Catimor x Catusai
5 CR174	17791	F <sub>1</sub>	T-8664 (2-3) x Mundo Novo	Catimor x Mundo Novo
6 CR127	17570	F <sub>1</sub>	H-689-7963/124x3205/9	Catimor x Catusai Amarillo
7 CR129	16252	F <sub>1</sub>	H-691-7962/100xs3205/9	Catimor x Catusai Amarillo
8 CR132	16253	F <sub>1</sub>	H-696-7963/111 x 3204/5	Catimor x Catusai Rojo
9 CR133	16260	F <sub>1</sub>	H-697-7963/25x3205/9	Catimor x Catusai Amarillo
10 CR134	16250	F <sub>1</sub>	H-700-8825/159x7963-137	Catusai Amarillo x Catimor
11 CR135	16238	F <sub>1</sub>	H-703-8232/243 x 7963/137	Catusai Rojo x Catimor
12 CR073	Semillas	--	-----	Catusai Regional
13 CR167	-----	--	-----	Catusai Regional
14 CR168	-----	--	-----	Villa Sarchí

Fecha de establecimiento: junio de 1987

Distancia de siembras: entre hileras: 1,80 metros  
entre plantas: 0,87 metros



MEJORAMIENTO GENETICO DEL CAFETO

REGISTRO DE PRODUCCION (FRUTA) ANUAL EVALUACION DE RETROCRUCES

DE CAFE ARABICA DE REPRODUCCION ASEXUALMENTE

POR CULTIVO DE TEJIDOS CF-01-MC-401-02-86

NUMERO	NUMERO INTRODUCCION TUBERIALBA COSTA RICA	TRAT. F.	KILOGRAMOS FRUTA/HA.				PROMEDIO TOTAL	PROMEDIO FA/HA	PORCENTAJE TESTIGO	EFECTO	PORCENTAJE RELATIVO
			1988/89	1989/90	1990/91	PROMEDIO					
1	T16250	CR134	10	11129,0	20789,3	15826,8	15914,6	47743,8	61,7	118,2	a
2	T16252	CR129	7	8316,0	21751,8	17475,8	15844,9	47534,7	61,4	117,6	a
3	T17792	CR171	2	8316,0	19377,7	17370,0	15019,1	45057,3	58,2	111,5	ab
4	T16253	CR132	8	8703,0	20890,0	14673,3	14761,0	44283,0	57,2	109,6	ab
5	T	CR175	4	8574,0	19847,4	15808,7	14735,2	44205,6	57,1	109,4	ab
6	---	CR167	13	8355,0	22883,5	12864,3	14632,0	43896,0	56,7	108,6	ab
7	T16238	CR135	11	8735,0	19447,4	14584,9	14244,9	42734,7	55,2	105,7	abc
8	T17570	CR127	6	9993,0	16875,8	14637,2	13780,4	41341,2	53,4	102,3	abc
9	---	CR073	12	2342,0	23217,6	14848,8	13470,7	40412,1	52,2	100,0	abc
10	---	CR168	14	6277,0	23591,8	10379,2	13419,1	40257,3	52,0	99,6	abc
11	T17791	CR174	5	7426,0	18668,1	14123,6	13419,1	40257,3	52,0	99,6	abc
12	T16260	CR133	9	7445,0	15130,1	16110,7	12903,0	38709,0	50,0	95,8	bc
13	T17995	CR179	1	7251,0	20477,1	10306,9	12670,7	38012,1	49,1	94,1	bc
14	T17793	CR172	3	7226,0	18596,0	9581,8	11793,3	35380,0	45,7	87,5	c
			cv	21,5	19,7						



**DESCRIPCION DE LOS MATERIALES EVALUADOS EN EL EXPERIMENTO C.F. 01-MG-402-6-86**

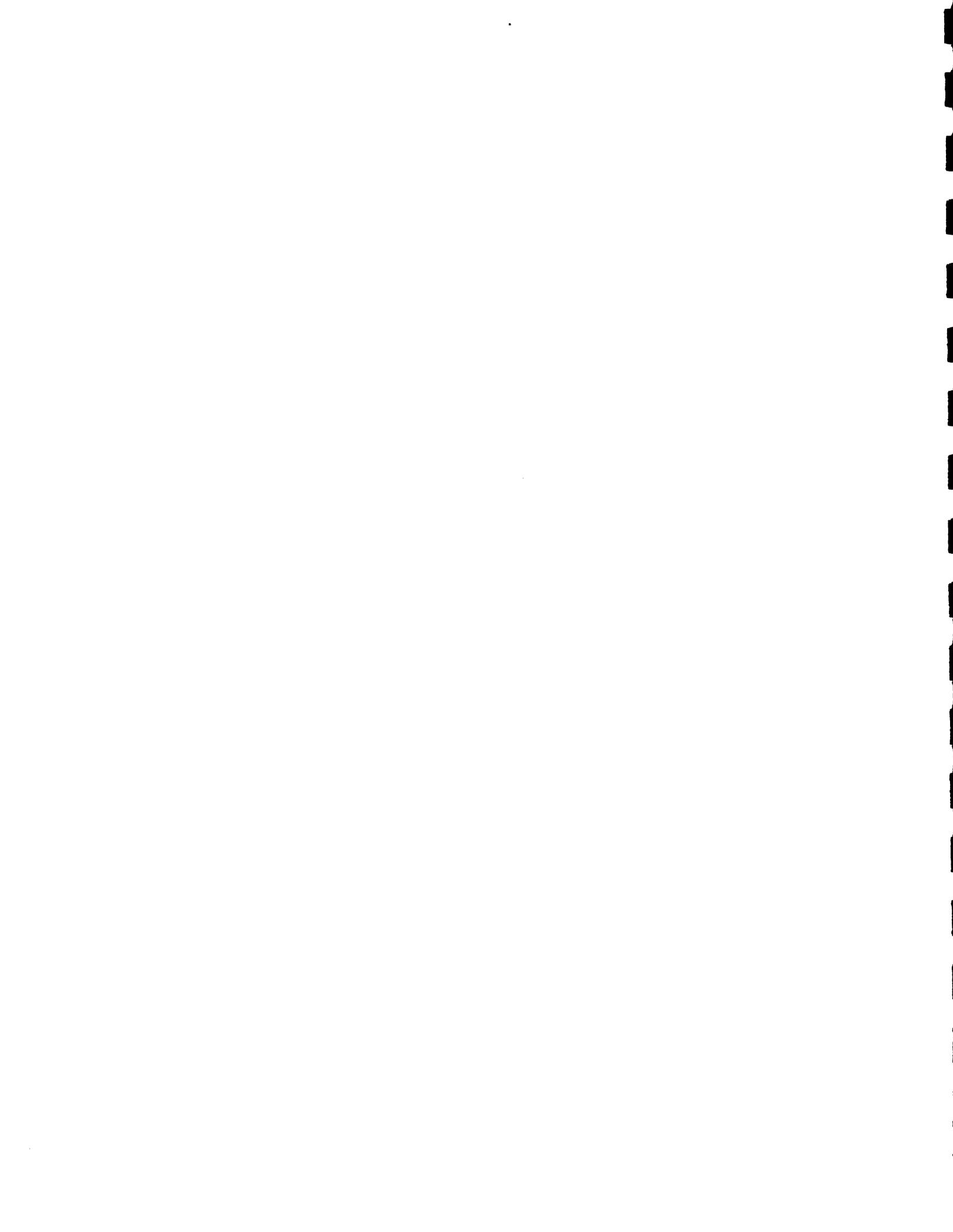
**NOMBRE DEL EXPERIMENTO: EVALUACION DE RETROCESOS DE COPRA ARABICA**

**REPRODUCIDOS ASEXUALMENTE POR CULTIVO DE TRIJIDOS**

NUMERO EN EXPERIMENTO	NO INTRODUCCION TUBERIALBA	GENERACION	DESCRIPCION	DESIGNACION
1 CR124	16242	Clon F1	M-677-CIFC 7962/65 x 3204/7	Catimor x Catuai Rojo
2 CR125	16235	Clon F1	M-678-CIFC 7963/65 x 3205/9	Catimor x Catuai Rojo
3 CR128	16248	Clon F1	M-690-CIFC 7962/84 x 3204/5	Catimor x Catuai Rojo
4 CR130	17243	Clon F1	M-693-CIFC 2482/19-6 x 7963/137	Catuai Amarillo x Catimor
5 CR169	17585	Clon F1		T-8660 (3-4) x Caturra
6 CR170	17586	Clon F1		T-8663 (2-1) x Catuai
7 CR165	16631	Semilla F5	M.W. 26/5-3-45-88	Población 4 de Portugal
8 CR179	T-5159	Clon		Caturra x Híbrido de Timor
9 CR073	17914	Semilla		Catuai Amarillo

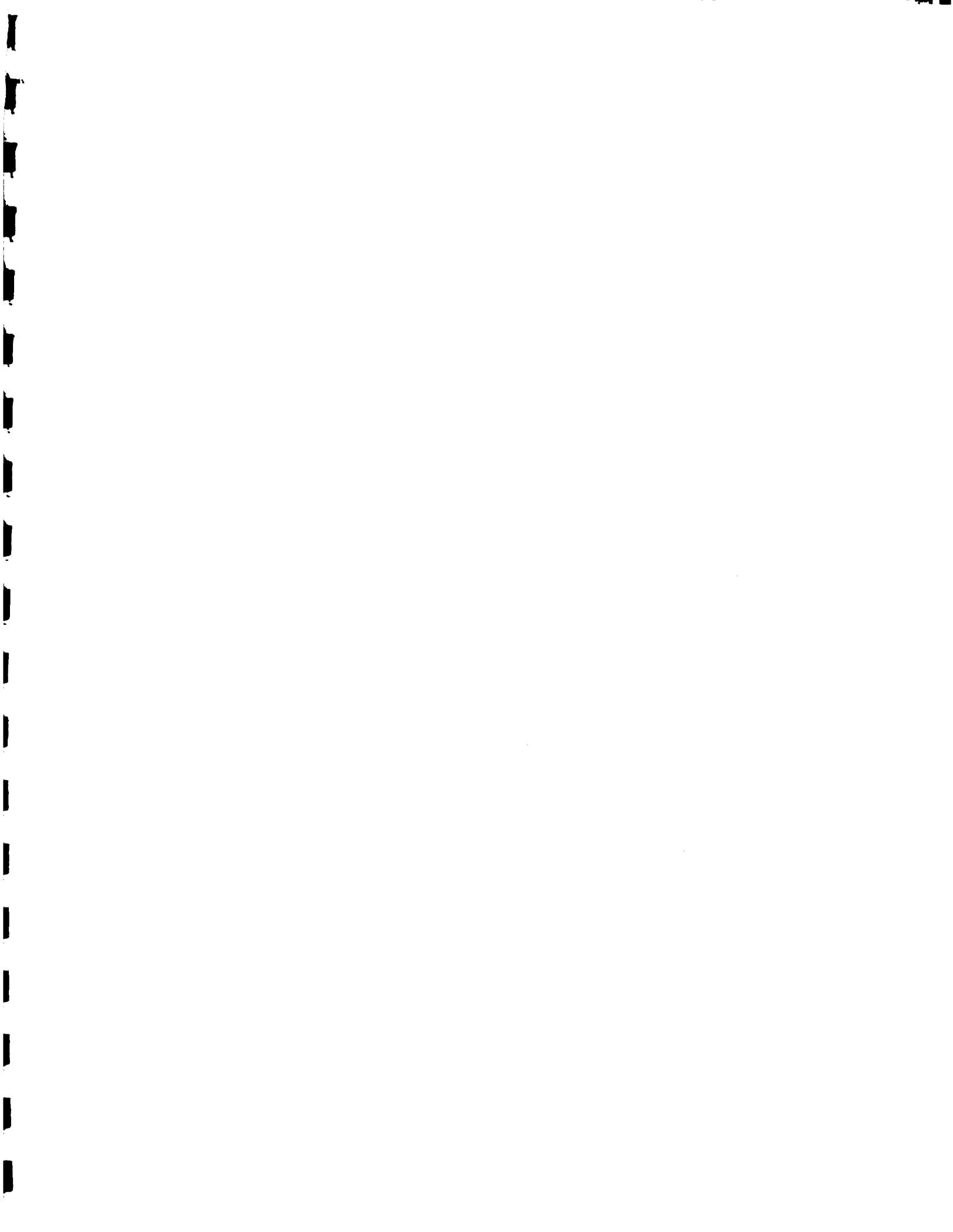
Fecha de establecimiento: junio de 1986

Distancia de siembra: entre hileras: 1,90 metros  
entre plantas: 0,90 metros















INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA  
OFICINA EN GUATEMALA

1a. Avenida 8-00, Zona 9 - Teléfonos: 347602 - 347603 - 316304 - Cable: IICA  
Telenet: IICAGT - Facsimil 326795 - Guatemala, Guatemala