

Regeneración de plántulas de café (*Coffea arabica* L.) mediante embriogénesis somática



PERÚ

Ministerio
de Desarrollo Agrario
y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria



BICENTENARIO
DEL PERÚ
2021 - 2024



MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA
DIRECCIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA

**Regeneración de
plántulas de café**
(Coffea arabica L.) mediante
**embriogénesis
somática**

Regeneración de plántulas de café (*Coffea arabica* L.) mediante embriogénesis somática

Ministra de Desarrollo Agrario y Riego

Nelly Paredes del Castillo

Viceministro de Desarrollo de Agricultura Familiar e Infraestructura Agraria y Riego

Pedro Hugo Injante Silva

Viceministro de Políticas y Supervisión del Desarrollo Agrario

Marco Wilson Coronel Pérez

Jefe del INIA

Jorge Juan Ganoza Roncal, M. Sc.

© Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA

Autores:

Rosa María Cabrera Pintado

Kiara Julissa Sánchez Jhong

Colaborador:

Luz Lucila Guzmán Quispe

Editado por:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA

Equipo Técnico de Edición y Publicaciones

Av. La Molina 1981, Lima-Perú

Teléf. (511) 2402100 - 2402350

www.gob.pe/inia

Editor general:

Emely Elizabeth Lazo Torreblanca

Revisión de contenido:

Marko Giuliano García Gutierrez

Diseño y Diagramación:

Luis Enrique Calderon Paredes

Publicado:

Diciembre, 2022

Primera Edición:

Diciembre, 2022

Tiraje:

1000 ejemplares

Impreso en:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA

RUC: 20131365994

Teléfono: (51 1) 240-2100 / 240-2350

Dirección: Av. La Molina 1981, Lima- Perú

Web: www.gob.pe/inia

ISBN:

978-9972-44-111-0

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2022-12884

Prohibida la reproducción de este libro por cualquier medio, total o parcialmente, sin permiso expreso

Tabla de contenido



●	Presentación	6
1.	Introducción	8
2.	Embriogénesis somática	10
3.	Glosario	22
4.	Referencias bibliográficas	24
5.	Anexos	26





PRESENTACIÓN


El café es uno de los principales productos agrícolas de exportación en el Perú y tiene un gran impacto en la economía familiar rural. El café peruano cuenta con una gran aceptación y cada vez está obteniendo un mayor reconocimiento a nivel internacional. La planta de café pertenece a la familia Rubiaceae y al género *Coffea* que presenta un gran número de especies; entre la más importante para el Perú se encuentra *Coffea arabica*, con las variedades Typica, Caturra, Catimor, Pache y Bourbon.

A pesar del crecimiento alcanzado en el sector café en los últimos años, existen algunas limitantes relacionadas al bajo nivel tecnológico en el manejo agronómico, a problemas fitosanitarios, como la roya amarilla y otras plagas importantes; por lo que se considera de gran interés mejorar su producción y calidad. Para lograrlo, las técnicas biotecnológicas —como la embriogénesis somática— se presenta como una alternativa para propagar masivamente clones élite de plantas de café con atributos agronómicos y fitosanitarios sobresalientes.

El Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) a través del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), viene desarrollando trabajos de investigación en el cultivo del café, y como parte de los resultados del Proyecto de Inversión Pública 2276656: “Creación del servicio de transferencia tecnológica a través de un modelo que permita la renovación y rehabilitación de cafetales bajo un sistema agroforestal en el ámbito del VRAEM – región Ayacucho y Cusco”, se elaboró el presente manual que describe el protocolo de **“Regeneración de plántulas de café (*Coffea arabica* L.) mediante embriogénesis somática”**, el cual se pone a disposición de los productores, empresas, técnicos, especialistas y profesionales del sector caficultor y público en general, para su difusión responsable.

Este trabajo tiene como finalidad aportar la orientación sobre la propagación clonal de plantas de café por embriogénesis somática y su aplicación en la caficultura.

Jorge Juan Ganoza Roncal, M. Sc.
Jefe del INIA



1.

INTRODUCCIÓN



El café (*Coffea arabica*) es un cultivo de importancia agronómica, económica y social en el Perú. Abarca alrededor del 6 % del territorio agrícola (Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI], 2013). más de 200 000 cafetaleros se concentran en las regiones de Junín, San Martín, Cajamarca, Cusco, Huánuco y Pasco, representando el 91 % de los productores y área cultivable (INEI, 2013; Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo [PNUD], 2017); además, es uno de los principales productos de agroexportación. Sin embargo, el bajo nivel tecnológico de manejo agronómico, los daños por plagas como la roya amarilla, el cambio climático y la necesidad de renovación de los cafetales no permiten tener altos rendimientos.

Teniendo en cuenta la necesidad de disponer de métodos de propagación clonal masiva de genotipos selectos de café, se recurre a la biotecnología, mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, para estandarizar protocolos de propagación y de esta manera contar con material vegetal de buena calidad fitosanitaria, agronómica y organoléptica, en menor espacio, tiempo, y en cualquier estación del año.

Una de las vías de regeneración de plantas *in vitro* es la embriogénesis somática, que es el proceso que involucra la formación de embriones a partir de células somáticas de la planta, sin que haya ocurrido la fecundación. A partir de esta premisa es que se puede clonar genotipos de interés (Freire-Seijo, 2003).

El éxito de la embriogénesis somática depende de varios factores, tales como: especie, explante, medios de cultivo, reguladores de crecimiento, condiciones de incubación, entre otros; los cuales deben ser evaluados y estandarizados para obtener un protocolo eficiente.

En el presente manual se describe el procedimiento de embriogénesis somática a partir de explantes foliares de café de las variedades Catuaí, Catimor y Costa Rica 95, basándose en las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del INIA Sede Central (Sánchez et al., 2019) y en el protocolo del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza [CATIE] (Aguilar et al., 2018).



2.

FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA



Para la micropropagación de café mediante embriogénesis somática se requiere cumplir las siguientes fases:

FASE 0. ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA MADRE

Esta fase es conocida también como acondicionamiento de la planta stock, y se realiza en cámara climática, invernadero o casa malla (Figura 1).



Figura 1. Plantas madre de café mantenidas bajo condiciones climáticas controladas

Las plantas madre son aquellas plantas que serán la fuente de explantes y son de interés debido a su calidad de grano, producción, tolerancia a plagas o alguna otra característica que se quiere mantener en las futuras generaciones.

Estas plantas deben mantenerse en estado vegetativo con la finalidad de tener hojas jóvenes disponibles en cualquier momento que se requiera y durante varios años. Para lograrlo, las principales actividades de manejo agronómico consisten en realizar podas de renovación, fertilización para crecimiento vegetativo, riego y control fitosanitario.

El sustrato debe ser inerte, estéril y de buena retención de humedad, como el Premix #8 u otro que esté disponible en la zona. Las podas, para la producción de nuevos brotes vegetativos, se realizan de manera constante previa etapa de floración y cuando ya no se observan nuevas hojas jóvenes. Los nutrientes se aplican en el sustrato al hacer el trasplante definitivo, con fertilizantes de lenta liberación, y en el agua de riego cada quince días. El riego ligero y continuo se realiza de acuerdo a los requerimientos hídricos de la planta. El control fitosanitario se efectúa previa evaluación de las plantas, con labores culturales (poda, lavado de plantas) y con productos químicos.

FASE 1. INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS

Durante esta etapa se logra el establecimiento *in vitro* al observarse la formación de callo de cicatrización, seguido de la inducción a callos embriogénicos, previa desinfección superficial de las hojas.

Se colectan hojas jóvenes del tercio superior de plantas madre mantenidas en condiciones de invernadero o casa malla, de mínimo seis meses de edad. Las muestras son llevadas al laboratorio, donde son lavadas con detergente comercial y enjuagadas con abundante agua de grifo. Luego, se remojan en fungicida benomilo (0.2 % p/v) durante una hora y, finalmente, se enjuagan.

La desinfección superficial de las hojas se realiza en condiciones estériles de cámara de flujo laminar, según el protocolo establecido por Sánchez et al. (2019), siendo el siguiente:

1. Remojar las muestras en una solución de NaClO (2 %), más tres gotas de polisorbato 20 durante 5 minutos.
2. Enjuagar tres a cuatro veces con agua destilada estéril.

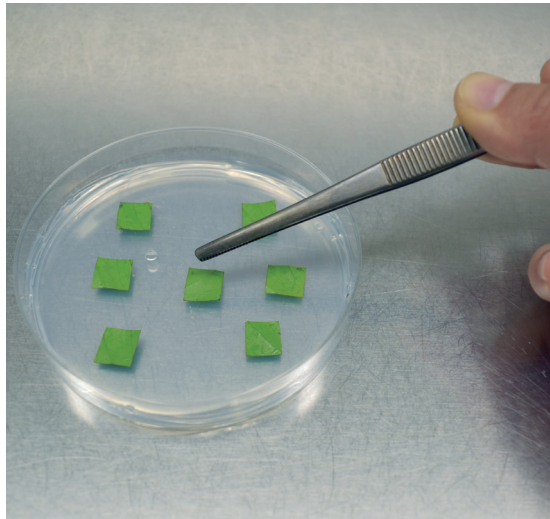
Después de la desinfección superficial, seccionar las hojas usando pinza y bisturí, y descartar la nervadura central y los bordes para obtener explantes cuadrados de 1 cm², aproximadamente. Luego, se procede a sembrar las secciones foliares en una placa petri (Figura 2) que contiene el medio de cultivo sólido para la inducción de callos embriogénicos (Anexo 1).



Lavado de hojas en detergente



Remojo en benomilo



Siembra en medio de inducción de calogénesis



Disección de hoja



Desinfección superficial

Figura 2. Proceso de desinfección de hojas y siembra de explantes de café

Finalmente, los explantes sembrados en placas petri se incuban en cámara climática o ambiente de incubación a 26 ± 1 °C, 70 % de humedad relativa y en condiciones de oscuridad (Figura 3).

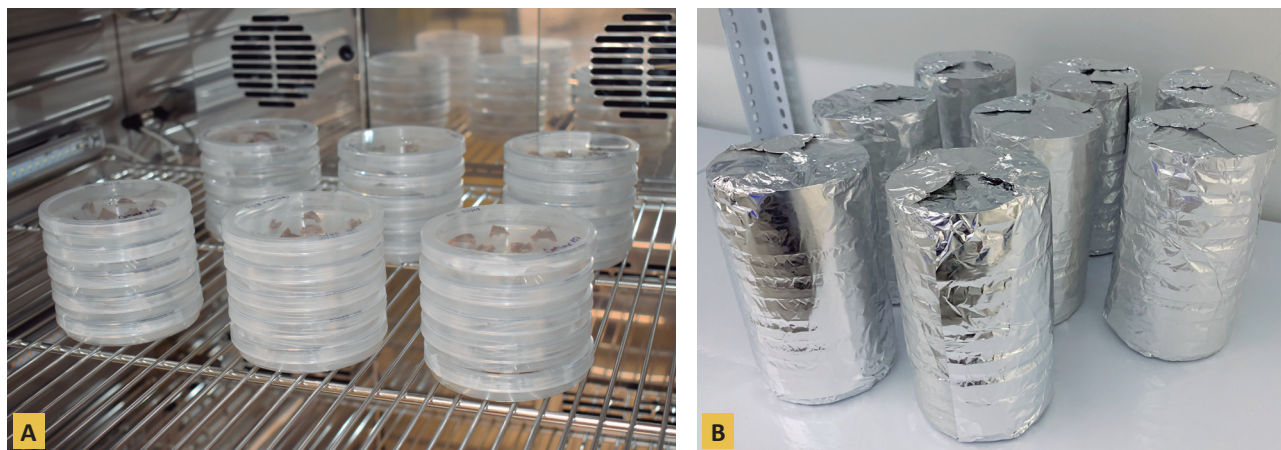


Figura 3. Incubación de placas con secciones foliares, en condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad relativa, en cámara climática (A) y en ambiente de incubación (B)

A las cuatro semanas, se observará callos de cicatrización en los bordes de las secciones foliares (Figura 4).



Figura 4. Explantes foliares con presencia de callo de cicatrización

FASE 2. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En esta fase se busca la diferenciación de los callos, previamente formados, a callos embriogénicos.

Los explantes con presencia de callos de cicatrización deben subcultivarse a uno de los dos medios de inducción de embriogénesis somática (Anexo 2 y Anexo 3).

Las condiciones de incubación deben ser 26 ± 1 °C, 70 % humedad relativa y luz indirecta con fotoperiodo de 12 horas (Figura 5).

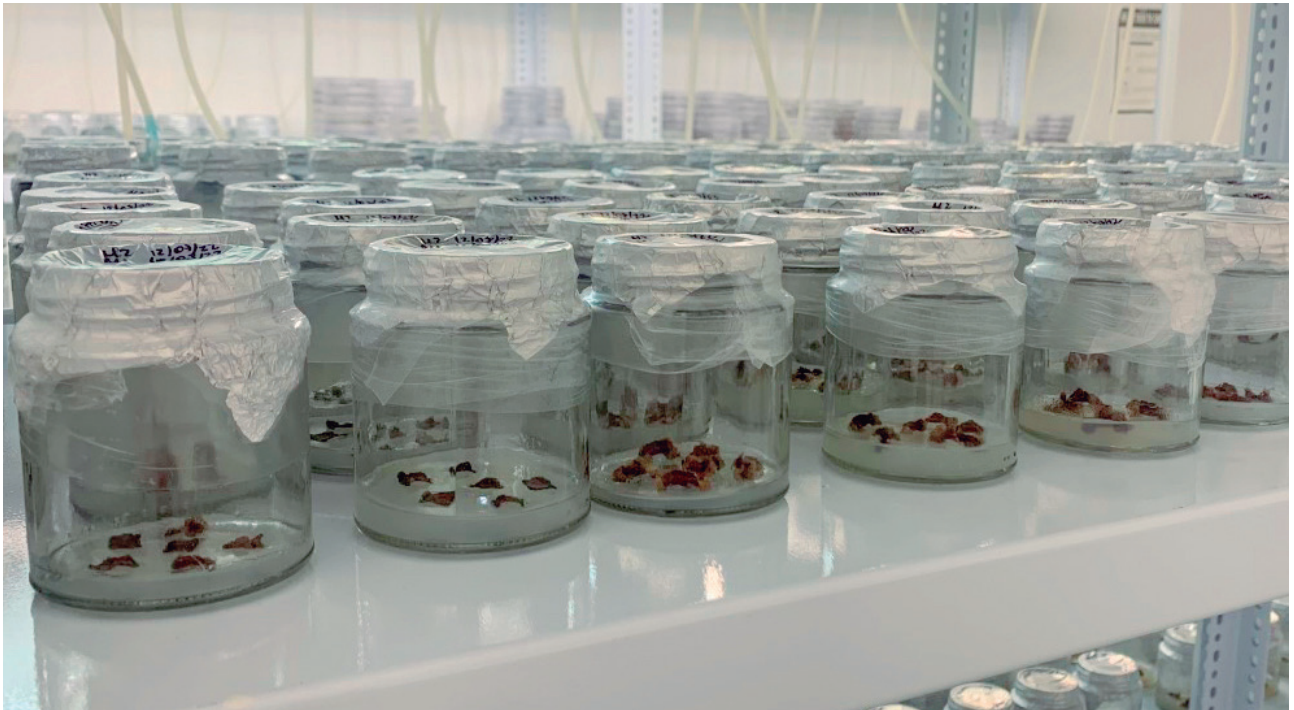


Figura 5. Explantes con callos de cicatrización bajo condiciones de incubación y en medio de cultivo para inducción de embriogénesis somática

Se observará los primeros callos embriogénicos a partir de los ocho a doce meses de iniciado el subcultivo (Figura 6). Esto dependerá del genotipo o variedad.



Figura 6. Explantes foliares con presencia de callos embriogénicos

FASE 3. REGENERACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Para que ocurra la regeneración, es preciso que los callos embriogénicos se desarrollen a masas embriogénicas donde se observan embriones globulares, acorazonados y torpedos (Figura 7).

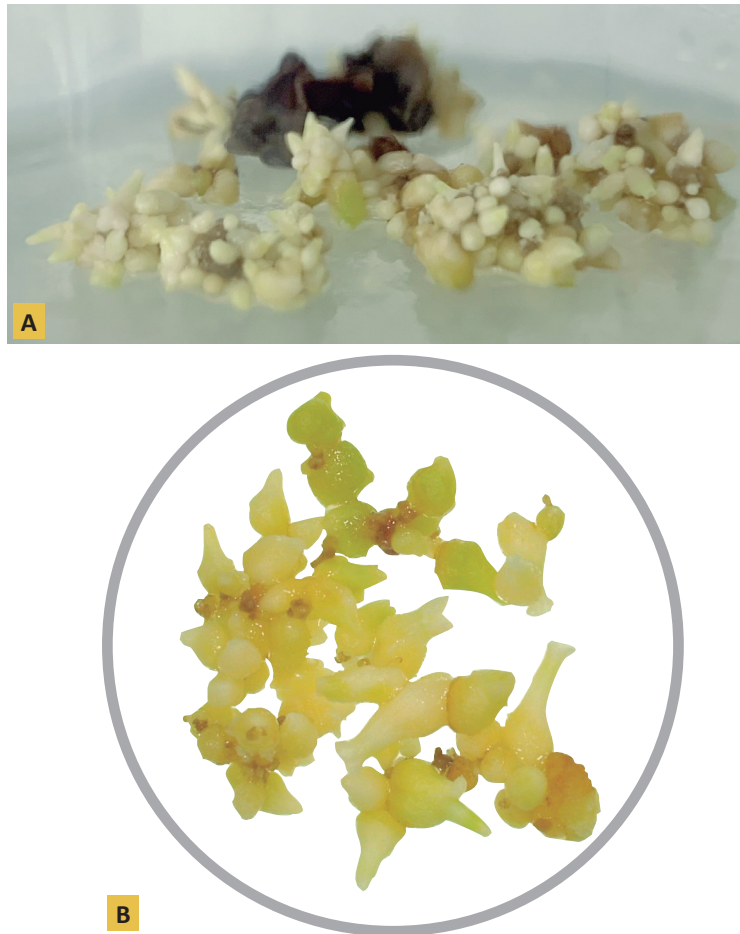


Figura 7. Masas embriogénicas con embriones en estadio globular, acorazonado y torpedo: (A) vista en frasco y (B) vista en estereoscopio

Las masas embriogénicas se deben subcultivar a frascos o placas petri conteniendo medio de cultivo para regeneración (Anexo 4). Luego, incubar a 26 ± 1 °C, 70 % humedad relativa y fotoperiodo de 12 horas.

Los embriones somáticos deben permanecer en este medio hasta el desarrollo a embriones en estado cotiledonal.

FASE 4. GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Subcultivar los embriones somáticos en estado cotiledonal a medio de cultivo para la germinación (Anexo 5) e incubar a 26 ± 1 °C, 70 % humedad relativa y fotoperiodo de 12 horas de luz indirecta.

Esta fase se realiza en medio semisólido, líquido o en sistema de inmersión temporal RITA® (Figura 8).



Figura 8. Germinación de embriones en: (A) medio semisólido, (B) medio líquido y (C) sistema de inmersión temporal RITA®

Los embriones somáticos en estado cotiledonal se mantienen entre 3 a 4 meses, tiempo en el cual se podrá observar primero la emergencia del par de hojas cotiledonales y luego la radícula (Figura 9).



Figura 9. Plántulas regeneradas en sistema de inmersión temporal RITA®

FASE 5 ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS

Esta etapa es crucial en la micropropagación de plantas, puesto que permitirá determinar el porcentaje de plantas logradas y disponibles para vivero. Corresponde a la transición de las plántulas desde condiciones de laboratorio a condiciones de vivero. Se requiere tener máximo cuidado no solo en la manipulación de las plántulas para su siembra a sustrato, sino principalmente en controlar las condiciones de alta humedad relativa, la cual debe disminuirse progresivamente y mantener un fondo de calor, el cual se logra a través de la luz emitida por fluorescentes que deberán estar programados a un temporizador.

Las plántulas, que tengan al menos un par de hojas verdaderas y raíces desarrolladas, se deben extraer de los tubos de ensayo o frascos que las contienen y lavarlas con agua de grifo hasta eliminar completamente el medio de cultivo. Luego, dejarlas remojando en solución de benomilo 0.2 % (p/v) durante 1 h (Figura 10).

Transcurrido el tiempo en solución fungicida, proceder a sembrar las plántulas en pastillas de turba comprimida, las cuales deben haberse hidratado dos horas antes (Figura 10).

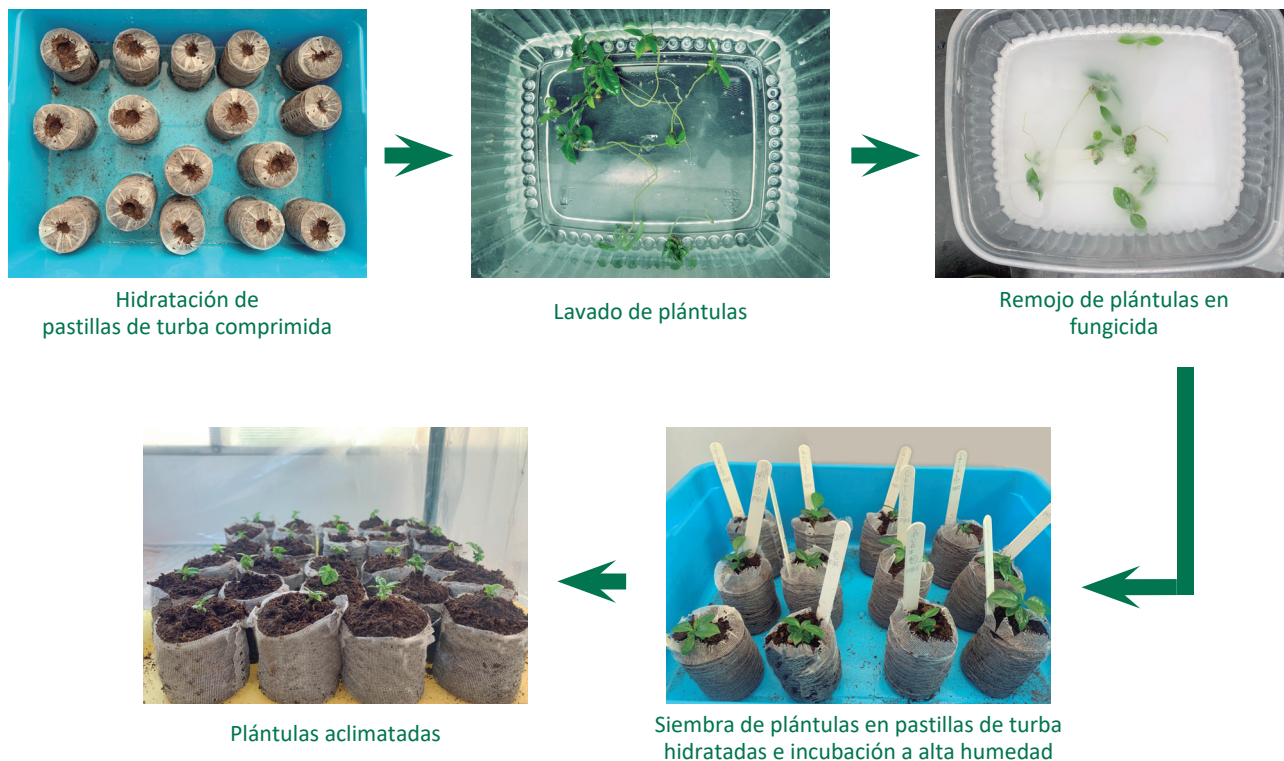


Figura 10. Procedimiento de aclimatación de plántulas de café regeneradas por embriogénesis somática

Una vez sembradas las plántulas, proceder a colocarlas en un estante acondicionado para aclimatación, en el cual se debe tener alta humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas de luz y temperatura de 26 ± 1 °C, aproximadamente. En este estante permanecerán —al menos— dos meses, que es el periodo de aclimatación de las plántulas de café a condiciones *ex vitro*.

Al terminar esta etapa, las plántulas están listas para su trasplante a bolsas o macetas y pasar a mantenimiento en condiciones de vivero, o para establecer el jardín clonal (Figura 11).



Figura 11. Plantas de café aclimatadas



3.

GLOSARIO



Cultivo *in vitro*: técnica mediante la cual se cultivan órganos, tejidos o se propagan plántulas, contenidas en tubos o frascos, en condiciones asépticas de laboratorio y bajo condiciones controladas. La expresión latina *in vitro* se traduce al español como “en vidrio”, y se refiere a los tubos o frascos que contienen a los explantes.

Embrión cigótico: embrión formado a partir de la fecundación o unión de los gametos femenino y masculino.

Embrión somático: embrión formado a partir de células somáticas de la planta, en la cual no ha ocurrido la fecundación.

Explante: órgano o tejido de la planta a partir del cual se inicia el cultivo *in vitro*.

Planta madre: planta élite donadora de explantes.

Plántulas: plantas obtenidas por cultivo de tejidos vegetales.

Subcultivar: acción de trasladar un explante o embrión de un envase que lo contiene a otro, con medio de cultivo fresco, de igual o diferente composición.



4.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Aguilar, M. E., Ortiz, J. L., Mesén, F., Jiménez, L. D., & Altmann, F. (2018). Cafe Arabica *Coffea arabica* L. In S. M. Jain & P. K. Gupta (Eds.) *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants* (Forestry Sciences, vol. 85, pp. 39-62). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-79087-9_3
- Freire-Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195-209. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263/html>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática [INEI]. (2013). *IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Resultados definitivos*. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). <https://sinia.minam.gob.pe/download/file/fid/39753>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo [PNUD]. (2017). *Línea de base del sector café en el Perú*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). <https://camcafeperu.com.pe/admin/recursos/publicaciones/Linea-base-del-sector-cafe-en-Peru.pdf>
- Sánchez, K., Cabrera, R., & Jiménez, J. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259-265. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>



5.

ANEXOS



ANEXO 1
MEDIO DE CULTIVO PARA INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS
 (Aguilar et al., 2018)

Componente	Concentración
Sales Murashige y Skoog (1962)	MS/2
Tiamina.HCl	10 mg/L
Glicina	1 mg/L
Acido nicotínico	1 mg/L
Piridoxina.HCl	1 mg/L
Mio-inositol	100 mg/L
Caseína hidrolizada	100 mg/L
Extracto de malta	400 mg/L
2,4-D	0.5 mg/L
AIB	1 mg/L
2-iP	2 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L

ANEXO 2
MEDIO DE CULTIVO PARA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
 (Aguilar et al., 2018)

Componente	Concentración
Sales MS	MS/2
Tiamina.HCl	20 mg/L
Glicina	20 mg/L
Mio-inositol	200 mg/L
Caseína hidrolizada	200 mg/L
Extracto de malta	800 mg/L
Sulfato de adenina	60 mg/L
2,4-D	1 mg/L
BAP	4 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L

ANEXO 3
MEDIO DE CULTIVO PARA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA
 (Sánchez et al., 2019)

Componente	Concentración
Sales Murashige y Skoog (1962)	MS/2
Tiamina.HCl	1 mg/L
Piridoxina.HCl	1 mg/L
Mio-inositol	100 mg/L
Acido nicotínico	1 mg/L
2,4-D	0.5 mg/L
Kinetina	1.5 mg/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L
Sacarosa	30 g/L
Agar	7 g/L

ANEXO 4
MEDIO DE CULTIVO PARA REGENERACIÓN
 (Aguilar et al., 2018)

Componente	Concentración (ml/L)
Sales MS	MS/2
Tiamina.HCl	10 mg/L
Glicina	2 mg/L
Acido nicotínico	1 mg/L
Piridoxina.HCl	1 mg/L
Mio-inositol	200 mg/L
Caseína hidrolizada	400 mg/L
Extracto de malta	400 mg/L
Sulfato de adenina	40 mg/L
BAP	4 mg/L
Sacarosa	40 g/L
Agar	7 g/L

ANEXO 5
MEDIO DE CULTIVO PARA GERMINACIÓN
 (Aguilar et al., 2018)

Componente	Concentración
Sales Murashige y Skoog (1962)	MS/2
Vitaminas de Morel	5 mg/L
BAP	0.3 mg/L
Sacarosa	40 g/L
Agar	7 g/L

ANEXO 6
COMPOSICIÓN DE MEDIO MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Compuesto	Fórmula	Concentración (mg/L)
Macronutrientes		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650
Nitrato de potasio	KNO_3	1900
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	170
Micronutrientes		
Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de cobre dihidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Na Fe-EDTA		
EDTA disódico	Na_2EDTA	37.36
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80





Instituto Nacional de Innovación Agraria







Instituto Nacional de Innovación Agraria

Av. La Molina 1981, La Molina
(51 1) 240-2100 / 240-2350
www.gob.pe/inia



ISBN: 978-9972-44-111-0



9 789972 441110