

# *Coffea canephora* COMO UN SISTEMA MODELO PARA ESTUDIOS BÁSICOS Y BIOTECNOLÓGICOS

Francisco R. Quiroz-Figueroa, Rosa M. Galaz-Ávalos y Víctor M. Loyola-Vargas. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México. CP 97200. vmloyola@cicy.mx

*Palabras clave: embriogénesis somática, Coffea canephora, sistema modelo*

**Introducción.** La embriogénesis somática (ES) es el proceso por el cual las células somáticas son inducidas a generar células embriogénicas, las cuales pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que resultan en la formación de un embrión. Este proceso fue descubierto en los años 50s y se ha visto como una promisorio herramienta para la propagación masiva de la generación F1 de híbridos de cultivares de interés económico y como un modelo para el estudio de la diferenciación celular. Para su estudio la ES ha sido abordada desde diferentes campos como el, fisiológico, celular, bioquímico y molecular; sin embargo, aún se está lejos de describir y entender en su totalidad dicho proceso. La mayor parte de la información disponible ha sido obtenida en cultivos celulares de *Daucus carota* y *Mendicago sativa*, no obstante en diversos casos las conclusiones obtenidas a partir de una especie no pueden ser extrapoladas a otra, por lo que es necesario desarrollar sistemas embriogénicos eficientes en la producción de embriones somáticos que sirvan como sistemas modelos para realizar estudios tanto en el nivel básico como en el biotecnológico.

Entre los diversos factores que afectan el proceso de la embriogénesis somática se tienen la fuente del explante, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento empleados, las condiciones medio ambientales en las cuales se cultivan los explantes, entre las más importantes. La fuente de nitrógeno del medio de cultivo es un factor que modifica de manera importante la respuesta embriogénica de los explantes. En el caso de café se ha determinado que una concentración de nitrógeno de entre 3.75 y 15 mM en el medio de cultivo y una relación de nitrato/amonio de 2:1 ó 1:2 produce las mejores respuestas embriogénicas (1). Otros factores, tales como la adición de salicilatos al medio de cultivo también aumentan la respuesta embriogénica (2).

El café es una planta tropical y produce uno de los productos (café) agrícolas de mayor importancia en el ámbito internacional; tiene un importante valor económico para México como quinto productor a nivel mundial. Esta planta, al igual que las demás plantas cultivadas es atacada por múltiples enfermedades y plagas y sobre todo en México tiene un importante problema de productividad. Se requieren, por lo tanto de nuevas variedades más productivas y que sean resistentes a enfermedades y plagas. Es en esta parte en la que la biotecnología vegetal puede jugar un importante papel.

Se han reportado varios sistemas para la producción de embriones somáticos en *Coffea* spp. Starisky (3) describió por primera vez la obtención de embriones somáticos en *C. canephora*, mientras que Herman y Haas (4) lo hicieron para *C. arabica*. A partir de esas fechas se han desarrollado varios protocolos para la obtención de embriones somáticos de café, entre ellos uno en medio semisólido que muestra una respuesta mucho más rápida que los protocolos previos (5) y en el cual se ha demostrado que el origen de los embriones es unicelular (5). Actualmente, poco se sabe acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares de la inducción de la ES (6-8).

La primera evidencia de la expresión diferencial de genes durante la embriogénesis somática se dio en los años ochenta (7) y actualmente se cuenta con una larga lista de genes cuya expresión varía durante la inducción y desarrollo de los embriones somáticos.

En nuestro grupo hemos estado estudiando un sistema de embriogénesis en café que produce tanto células embriogénicas como no embriogénicas (9) y hemos concluido que la diferencia entre ambos tipos de células proviene de una expresión genética diferencial. Utilizando el despliegue diferencial como herramienta hemos aislado y clonado diversos fragmentos que muestran homología con proteínas tales como: oxigenasa, quitinasa, fosfoglicerato cinasa, ubiquitina proteínas de choque térmico de baja masa molecular, y factores de ADP ribosilación entre otras proteínas identificadas (10). La expresión de algunos de estos genes aumenta durante el proceso de la inducción de la embriogénesis somática, en tanto que la de otros genes disminuye (10). Entre los genes que se encienden durante la inducción del proceso de la embriogénesis somática se encuentra el de una quitinasa (11) la cual no se expresa en los tejidos del embrión y no es inducida en suspensiones celulares no embriogénicas. Los estudios de zimografía muestran que existen por lo menos tres bandas con actividad quitinolítica que también son reguladas el proceso de embriogénesis somática y de herida (11)

El propósito de este trabajo es el de describir un sistema embriogénico en *Coffea canephora* a partir de explantes foliares de plántulas cultivadas *in vitro* y proponerlo como un sistema modelo de plantas tropicales para realizar estudios en los niveles básico y biotecnológico debido a su elevada eficiencia y reproducibilidad en la producción de embriones somáticos.

**Metodología.** Para la inducción de la ES se partió de plántulas cultivadas *in vitro* de *C. canephora* mantenidas en un medio semisólido con las sales del medio de Murashige y Skoog (MS) (5) y suplementadas con ácido naftalén acético (0.54  $\mu$ M) y cinetina (2.32  $\mu$ M). Tres semanas después de la resiembra se toman las hojas y con un sacabocado se obtienen discos foliares (10 mm de diámetro) los cuales son transferidos a un medio líquido con las sales del medio MS y suplementadas con benciladenina (BA, 5  $\mu$ M) para la inducción de la embriogénesis (5). Se ensayaron 3 condiciones de luz.

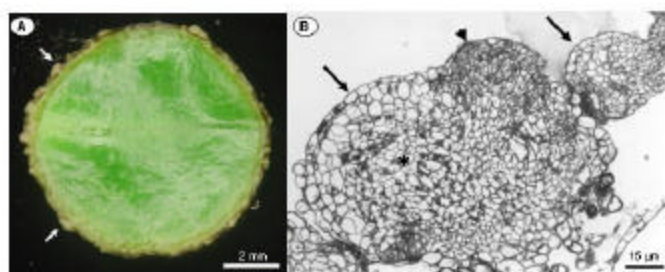


Fig. 1. Explantes foliares de *Coffea canephora* bajo inducción de la embriogénesis somática en la oscuridad. A) explante con estructuras nodulares (flechas). B) Estructuras nodulares (flechas) con cierto grado de organización y zona meristemática (cabeza de flecha). En el centro de los nódulos (\*) se pueden observar células con gránulos de almidón.

**Resultados y discusión.** Durante la inducción de la ES a partir de explantes foliares de *C. canephora* se evaluaron tres condiciones de luz: luz continua, fotoperíodo y oscuridad. La respuesta embriogénica fue dependiente tanto de la cantidad de luz, como de la presencia de BA. En ausencia de BA no se observó la formación embriones en ninguna de las tres condiciones evaluadas, hasta 90 días después de iniciada la inducción. El sistema embriogénico desarrollado fue de tipo directo (Figura 1). Debido a la ausencia de un crecimiento abundante y desorganizado, únicamente se observó el crecimiento de células en el borde del explante como una consecuencia de la respuesta al daño celular. En la mayoría de los casos este crecimiento se inició en la forma de nódulos.

Bajo condiciones de oscuridad los embriones en estadio globular se observaron a partir del día 30 de la inducción con un 68.7% de respuesta embriogénica en los explantes, mientras que para las condiciones de fotoperíodo y luz continua los embriones se observaron a partir del día 45 con un 73.3% y 60% de respuesta de los explantes, respectivamente. Para el día 60, los explantes en la oscuridad, fotoperíodo y luz continua presentaron un 81.2%, 100% y 64.2% de respuesta embriogénica respectivamente (Cuadro 1).

El porcentaje de distribución poblacional de los embriones somáticos en los explantes fue dependiente de la condición de luz (Cuadro 1). En el día 30, bajo condiciones de oscuridad el 100% de los embriones se encuentran en los estadios globular-corazón. Para el día 45, en la oscuridad hay

una transición del 1.9 % de los embriones hacia estadios tardíos del proceso (alargado-cotiledonar). Bajo las condiciones de fotoperíodo y luz continua el 100% de la población de embriones se encuentra en los estadios tempranos del proceso (globular-corazón). Es en el día 60 después de la inducción que se observa un mayor recambio poblacional bajo condiciones de oscuridad, el 87.8% de los embriones se encontraban en los estadios globular-corazón y el 12.2% en los estadios alargado-cotiledonar. Mientras que para este mismo día de evaluación, los embriones inducidos en las condiciones de fotoperíodo y luz continua se encontraban en aproximadamente un 98% en los estadios globular-corazón. En general, el proceso de inducción de la embriogénesis somática en la oscuridad presentó un desplazamiento de 15 días con respecto a las otras dos condiciones ensayadas.

Cuadro 1. Porcentaje de respuesta embriogénica en los explantes foliares de *Coffea canephora* bajo condiciones de oscuridad, fotoperíodo y luz continua

Tiempo de inducción (días)	Condición		
	Oscuridad	Fotoperíodo	Luz continua
30	68.75	0	0
45	86.66	73.33	60
60	81.25	100	64.28

Durante la cuantificación del número de embriones somáticos producidos bajo las tres condiciones utilizadas, se observó que la condición más adecuada para producir el mayor número de embriones somáticos fue la de oscuridad; en el día 60 después de la inducción se observó la formación de aproximadamente 150 embriones por explante, mientras que en la condición de luz continua hubo un abatimiento en el número de embriones por explante, contabilizándose únicamente 25 (Figura 2). El número de embriones somáticos obtenidos en la condición de fotoperíodo presentó un valor intermedio entre los obtenidos en la oscuridad y los obtenidos en luz continua, hasta un promedio de 51 embriones por explante.

En resumen, la condición de oscuridad fue la más favorable para la producción de embriones somáticos. Sin embargo, bajo condiciones de luz continua los embriones presentaron una formación más adecuada de los cotiledones. Debido a esta observación se recomienda que la inducción de la ES se realice bajo condiciones de oscuridad hasta el día 60, a partir de esta fecha los explantes deben ser sembrados y transferidos a luz continua para un desarrollo adecuado de

los estadios tardíos de la embriogénesis y una mayor probabilidad de germinación.

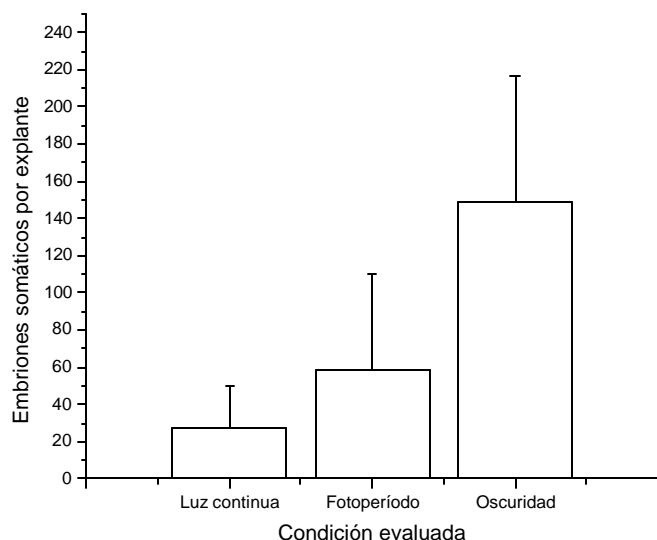


Figura 2. Número de embriones somáticos producidos por explante foliar de *Coffea canephora* bajo diferentes condiciones de luz en el día 60 después de la inducción.

La capacidad para producir embriones morfológicamente bien desarrollados y normales a partir de células somáticas sigue siendo una característica de las plantas (12). Además el desarrollo de los embriones somáticos y zigóticos es muy similar (12). Por consecuencia la ES es una poderosa herramienta como modelo para el estudio del desarrollo embrionario en las plantas.

Desde los primeros reportes de ES en el género *Coffea* (3; 4; 13) se determinó que este proceso en café revistía características muy diferentes a las reportadas en *Daucus carota* y en otras especies. Un aspecto distintivo entre estas especies es el tiempo en que tardan en responder a la inducción de la ES. En el café es un proceso muy largo; por ejemplo, el grupo del Dr. Söndahl determinó que se requiere de un periodo de alrededor de 9 meses para completar el proceso (13). Es posible que la madurez fisiológica y morfológica de los tejidos empleados como explante, así como el hecho de éstos se encuentren sumergidos completamente en el medio de cultivo determine el tiempo de respuesta (14).

**Conclusiones.** Utilizando hojas jóvenes de plantas preacondicionadas con reguladores del crecimiento y cultivadas *in vitro*, hemos reducido el tiempo de respuesta a la ES de *C. canephora* a tan sólo 3 a 4 semanas con 100% de respuestas en los explantes y 150 embriones somáticos por explante.

#### Bibliografía.

1. Fuentes-Cerda, C. F. J., Monforte-González, M., Méndez-Zeel, M., Rojas-Herrera, R. y Loyola-

Vargas, V. M. (2001). Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by the nitrogen source. *Biotechnol. Lett.* 23: 1341-1343.

2. Quiroz-Figueroa, F. R., Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A. y Loyola-Vargas, V. M. (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep.* 20: 679-684.
3. Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neel.* 19: 509-514.
4. Herman, E. B. y Haas, G. J. (1975). Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience.* 10: 588-589.
5. Quiroz-Figueroa, F. R., Fuentes-Cerda, C. F. J., Rojas-Herrera, R. y Loyola-Vargas, V. M. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 20: 1141-1149.
6. Menéndez, A., de Garcia, E. G. y Nieto, M. S. (1994). Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Cattimor. *Plant Cell Rep.* 13: 197-202.
7. Rojas-Herrera, R., Quiroz-Figueroa, F. R., Sánchez-Teyer, F. y Loyola-Vargas, V. M. (2002). Molecular analysis of somatic embryogenesis: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 8: 171-184.
8. Quiroz-Figueroa, F. R. (2003). *Estudio de la embriogénesis somática en Coffea arabica*. Mérida. CICY.
9. Quiroz-Figueroa, F. R., Méndez-Zeel, M., Sánchez-Teyer, F., Rojas-Herrera, R. y Loyola-Vargas, V. M. (2002). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. *J. Plant Physiol.* 159: 1267-1270.
10. Rojas-Herrera, R., Quiroz-Figueroa, F. R., Monforte-González, M., Sánchez-Teyer, F. y Loyola-Vargas, V. M. (2002). Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotechnol.* 21: 43-50.
11. Rojas-Herrera, R. y Loyola-Vargas, V. M. (2002). Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic

embryogenesis and wounding. *Plant Sci.* 163: 705-711.

12. Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. 5: 1411-1423.
13. Söndahl, M. R. y Sharp, W. R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 81: 395-408.
14. Loyola-Vargas, V.M., Fuentes, C., Monforte-González, M., Méndez-Zeel, M., Rojas, R. y Mijangos-Cortés, J. (1999). *Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation*. 18<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le café. Helsinki. ASIC. 302-307.