



# Revisión bibliográfica CONSERVACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS DE CAFETO (*Coffea* spp.) POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS: UNA ALTERNATIVA PARA SU PRESERVACIÓN

## Review

### Conservation of phylogenetic resources of coffee-tree (*Coffea* spp.) by biotechnological methods: an alternative to its preservation

Yanelis Castilla Valdés<sup>✉</sup>

**ABSTRACT.** At present the rate of loss of the biological diversity worldwide overcomes the happened one in previous periods. The plant species also suffer the effects of the climate change, and need to be suitable to the adaptation. Specifically, the coffee-tree (*Coffea* spp.), genus that groups some of the species from which it is obtained one of the most valued national and international beverage, does not escape to these challenges. For that reason, different strategies have been developed for its *ex-situ* preservation, due to the difficulties that exist in relation with its traditional conservation. To know a bit more about the different biotechnological methods that facilitate the conservation of phylogenetic resources of coffee-tree, from medium to long period, we will go deep into the present article, from a biological point of view.

**RESUMEN.** En la actualidad el ritmo de pérdida de la diversidad biológica a nivel mundial supera el acontecido en períodos anteriores. Las especies vegetales sufren los efectos del cambio climático, por lo que también necesitan estar aptas para adaptarse. Específicamente, el café (*Coffea* spp.), género que agrupa algunas de las especies de las cuales se obtiene una de las bebidas más cotizadas a nivel nacional e internacional, no escapa a este reto. Es por ello que diferentes estrategias para su preservación han sido desarrolladas *ex situ*, a partir de las dificultades que existen en relación con su conservación tradicional. Para conocer más acerca de los diferentes métodos biotecnológicos que facilitan la conservación a mediano y largo plazos de recursos fitogenéticos del café, profundizaremos desde el punto de vista biológico en el presente artículo.

**Key words:** *Coffea* spp., conservation, *in vitro* culture, growth, cryopreservation

**Palabras clave:** *Coffea* spp., conservación, cultivo *in vitro*, crecimiento, crioconservación

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la diversidad biológica se encuentra amenazada a un ritmo nunca antes visto. A nivel global, el cambio climático afecta directamente la supervivencia de numerosas especies de plantas y animales, aunque existen otros factores que también influyen, como la destrucción de hábitats con fines

comerciales. La humanidad se enfrenta al reto de conservar para revertir los daños que le ha infringido al ambiente, y de esta manera perdurar en el tiempo.

Las especies vegetales a partir de las cuales se obtiene una bebida muy consumida a nivel mundial se agrupan en el género *Coffea*. Nos referimos al café, bebida aromática que consumimos en diferentes momentos del día y en ocasiones de diversa índole. El café se obtiene a partir del procesamiento de los frutos del café (*Coffea* sp), conjunto de plantas pertenecientes a la familia Rubiaceae. Este género abarca unas 103 especies, de las cuales las más

utilizadas para la producción del estimulante néctar, son *C. arabica* L., *C. canephora* Pierre y en menor medida, *C. liberica* Bull (1).

Se plantea que todas las especies cultivadas de café son originarias de África y su centro de origen se considera Etiopía. Una de las hipótesis acerca de su expansión global plantea que el fruto de la planta era consumido por esclavos que fueron llevados desde el actual Sudán, hasta Arabia y Yemen, donde fue cultivado probablemente desde antes del siglo XV. Violando medidas de seguridad impuestas para evitar su propagación, viajeros holandeses tomaron semillas de *C. arabica* L. de este lugar y las

Yanelis Castilla Valdés, Aspirante a Investigador del departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera a Tapaste, km 3½, gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32 700.

✉ yanelis@inca.edu.cu

introdujeron en la colonia de Java (Indonesia) (2). Descendientes de una única planta de Indonesia fueron cultivadas en invernaderos y jardines botánicos de París y Ámsterdam a inicios del siglo XVIII, y a partir de entonces fueron distribuidas hacia las colonias europeas de América, donde inicialmente lograron climatizarse unas pocas plantas, que luego mediante la autofertilización continuaron dispersándose por el continente americano, de lo cual se ha derivado la estrecha base genética de esta especie (3).

A partir de su dispersión en América, el café se convirtió en una fuente importante de ingresos en muchos países, e incluso en una tradición donde el manejo y el conocimiento locales, han tenido una gran influencia en la domesticación del género. Las regiones de origen, junto con las variedades tradicionales que crecen en las fincas de los campesinos, representan la última fuente de diversidad genética del café, de la cual depende el futuro de su mejoramiento genético. Sin embargo, la deforestación, la utilización de tierras para otros cultivos o para la construcción y las dificultades económicas, entre otras, amenazan todos estos reservorios de diversidad, con lo cual sobreviene el peligro de erosión significativa de la base genética del género (4).

Por estas razones el café no ha escapado al peligroso vórtice de la desaparición, se calcula que el 70 % de sus especies se encuentran clasificadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) bajo alguna categoría de extinción (5). Por la gran repercusión que tiene este cultivo a nivel biológico, agrícola, comercial y social, entre otros, internacionalmente se realizan urgentes esfuerzos por contribuir a su preservación por diferentes vías. En el presente artículo nos propusimos como objetivo, profundizar en las investigaciones que se llevan a cabo actualmente en el tema de la conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos de café (*Coffea* spp.) mediante métodos biotecnológicos.

## CONSERVACIÓN *In Situ*

Es la conservación de ecosistemas y hábitats naturales y el mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de diferentes especies. En el caso de especies cultivadas o domesticadas también abarca la conservación de los alrededores del lugar donde han desarrollado sus propiedades distintivas. Se considera un proceso de conservación dinámico, ya que las plantas continúan evolucionando con los cambios en el ambiente, por lo que resulta muy favorable para los estudios de genética y evolución. Presenta como inconvenientes que el material vegetal se encuentra vulnerable a desastres naturales y a la devastación humana, además de que no está fácilmente accesible para su uso. Asimismo, requiere de regímenes adecuados de manejo y de elevados niveles de supervisión y monitoreo (4).

La conservación *in situ* incluye la conservación en áreas protegidas, así como en fincas y jardines caseros (4). La mayoría de las regiones de las cuales son originarias las especies de café, pertenecen a países pobres de África, lo cual atenta contra las estrategias de conservación *in situ*. Por ejemplo, en Etiopía, país que agrupa una gran riqueza genética del género, en el año 2002 aun se discutía la posibilidad de establecer tres reservas protegidas, pero por problemas financieros no había sido posible (6).

Por todas estas dificultades es que han surgido otras alternativas de conservación de la biodiversidad, conocidas como conservación *ex situ*.

## CONSERVACIÓN *Ex Situ*

Representa la conservación de los componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural. Implica el muestreo, transferencia y almacenamiento del material vegetal, desde el área de colecta hasta el lugar donde será conservado. Se divide en diferentes técnicas, como: el almacenamiento de semillas, la

conservación en el campo, la conservación *in vitro*, la crioconservación, el almacenamiento de polen y el almacenamiento de ADN (4). A continuación estudiaremos las características de algunas de estas técnicas que han tenido relevancia para la conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos del café.

## ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS DE CAFÉ

El almacenamiento de semillas bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad, resulta un método tradicional empleado para la conservación de diversas especies vegetales. Sin embargo, para el caso del café, por esta vía solo es posible preservar las semillas a corto plazo, debido a que presentan determinadas características que dificultan su almacenamiento por un largo período de tiempo. Las semillas de café fueron inicialmente clasificadas como recalcitrantes; o sea, aquellas semillas sensibles a la desecación y que pierden viabilidad con contenidos de agua relativamente elevados (7). En posteriores estudios se les clasificó como intermedias, ya que las mismas toleran determinado nivel de desecación, pero no sobreviven la desecación total, ni los efectos combinados de la desecación y las bajas temperaturas (8, 9). En la actualidad, a nivel internacional, se utiliza la clasificación de intermedias y se plantea que el mayor impedimento de almacenar semillas con este tipo de fisiología, es la detección del límite hasta el cual pueden ser desecadas y la interacción de la temperatura y el contenido de agua en la supervivencia de la semilla (10).

La mayoría de los estudios sobre el almacenamiento de semillas de café en condiciones controladas de temperatura y humedad, plantean la posibilidad de mantenerlas viables como máximo hasta los dos o tres años del inicio de su almacenamiento. Por ejemplo, en 1979, científicos holandeses encontraron viabilidad en semillas de café almacenadas por

dos años y medio en sacos de polietileno, con 41 % de contenido de humedad y a 15°C (11). En 1995 investigadores cubanos lograron obtener un 89 % de germinación a los nueve meses de almacenar semillas de *C. arabica* cv. Caturra en bolsas de polietileno, a temperatura ambiente y con un contenido de humedad entre el 35 y 40 % (12). Semillas de *C. arabica* L. cv. Catuai amarillo fueron almacenadas en el 2005 por expertos venezolanos en empaques de sisal (fibra obtenida del agave), a una humedad relativa del 78 % y a una temperatura de 20°C, obteniendo a los 10 meses una germinación del 58,1 % (13). En el 2008 científicos brasileños determinaron que semillas de *C. arabica* cv. Catuai IAC 44 con un contenido de humedad del 18,5 % pueden ser almacenadas hasta nueve meses a una temperatura de 7°C, independientemente del tipo de embalaje utilizado (14).

Dada la pobre longevidad de las semillas de café bajo condiciones convencionales de almacenamiento, los recursos fitogenéticos de este género también han sido mantenidos en bancos de germoplasma en el campo.

### CONSERVACIÓN EN CAMPO

La conservación en bancos de germoplasma en el campo es adecuada para especies con semillas intermedias, como el café. Este método permite el acceso rápido a los recursos genéticos y su detallada evaluación (4).

La extensión mundial del cultivo del café contribuyó al establecimiento, en los países productores, de bancos de germoplasma en el campo (4). En la actualidad los mayores bancos de germoplasma de café en campo se encuentran en América Latina (Costa Rica, Colombia y Brasil), África (Costa de Marfil, Camerún, Etiopía, Kenia, Tanzania y Madagascar) y Asia (India e Indonesia). Se reporta que existen unas 21 087 accesiones de café conservadas por este método a nivel mundial (15).

Sin embargo, este tipo de conservación *ex situ* presenta algunos inconvenientes que limitan su eficiencia y amenazan su seguridad. Las plantas se encuentran expuestas a plagas y enfermedades, fenómenos naturales, errores humanos y vandalismo. Su costo de mantenimiento es elevado y por tanto dependiente de decisiones en el orden económico que en ocasiones limitan el nivel de replicación de las accesiones, la calidad del mantenimiento e incluso la supervivencia de las plantas (4). Teniendo en cuenta los problemas inherentes asociados con el mantenimiento de los bancos de germoplasma en el campo, existe una necesidad urgente de desarrollar otros métodos complementarios de conservación (16).

## MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS

### CONSERVACIÓN *IN VITRO*

El cultivo de tejidos o cultivo *in vitro* se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos y células con el empleo de medios nutritivos artificiales (17), conocidos como medios de cultivo. Algunos autores han planteado que las aplicaciones del cultivo *in vitro* se pueden resumir en la mejora por mutagénesis y selección *in vitro*; la obtención de plantas libres de bacterias, hongos y virus; la propagación masiva de plantas; la ingeniería genética y la conservación de germoplasma (18). El cultivo de tejidos ofrece múltiples ventajas al desarrollarse en áreas relativamente pequeñas, lo que facilita la manipulación de las plantas en un tiempo breve, permite manipular las condiciones ambientales, facilita el intercambio de material genético y evita la erosión genética (19). Además, posibilita incrementar el número de individuos existentes *ex situ* y así aliviar la presión de colecta en las poblaciones naturales (20).

La conservación de germoplasma constituye una de las

principales aplicaciones del cultivo *in vitro*. Se emplea principalmente en especies «problemáticas», como las que no producen semillas o tienen semillas recalcitrantes o intermedias, como el café, o incluso para materiales que necesitan ser propagados vegetativamente para mantener algún genotipo en particular (19).

La conservación de germoplasma *in vitro* se logra mediante la reducción en la velocidad de crecimiento de las plantas, para lo cual es necesario alterar las condiciones óptimas de cultivo. Con este propósito se pueden realizar modificaciones en la composición del medio de cultivo, como por ejemplo: la disminución del contenido mineral, la adición de agentes osmóticos activos y la incorporación de retardadores del crecimiento (21). También se puede modificar el ambiente externo mediante la disminución de la temperatura, variaciones en la disponibilidad de oxígeno y en la intensidad luminosa (22).

Este método es conocido también como crecimiento reducido, crecimiento lento o mínimo crecimiento, pues se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta. Tiene como objetivo incrementar la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos. Por lo tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad con que estos ocurren y así se reduce la frecuencia del subcultivo de las plantas (21). Al final del período de almacenamiento, los cultivos son transferidos a medio fresco y colocados en condiciones óptimas para estimular el recrecimiento antes de comenzar el próximo ciclo de conservación (22).

En diversos cultivos han sido utilizadas exitosamente las diferentes técnicas de los métodos de mínimo crecimiento para la conservación a mediano plazo de germoplasma vegetal. Por ejemplo, en el cultivo *in vitro* de brotes de chayote (*Sechium edule*) se modificó el medio de cultivo con la adición de elevadas concentraciones de sacarosa y ácido

acetil salicílico, y se realizó la disminución de la temperatura, con la consecuente disminución del crecimiento de las plantas hasta los seis meses de almacenamiento (23). En el clon Caraqueño de ñame (*Dioscorea alata*), se realizó la disminución de las sales del medio de cultivo, unido a la adición de manitol y BAP (bencil-aminopurina), y se logró la conservación de vitroplantas a partir de segmentos nodales durante nueve y doce meses con altos porcentajes de supervivencia (24). Para la conservación *in vitro* de embriones cigóticos de cocotero (*Cocos nucifera* L.) se realizó la adición de diferentes concentraciones de sacarosa al medio de cultivo, lo cual permitió obtener elevados porcentajes de supervivencia a los 18 meses, utilizando sacarosa 60 g.L<sup>-1</sup> (25).

En el café han sido utilizados diversos tipos de explantes y diferentes métodos para lograr la conservación a mediano plazo, entre ellos los más comunes han sido la variación de la temperatura y las modificaciones en la composición del medio de cultivo, como se estudiará a continuación.

#### DISMINUCIÓN DEL CONTENIDO DE OXÍGENO Y LA TEMPERATURA

Los efectos de la hipoxia y de diferentes temperaturas sobre la conservación *in vitro* de brotes de *C. arabica* L. cv. Mokka de Tahiti fueron estudiados por investigadores franceses de la Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (ORSTOM) en 1991. Luego de la obtención de los brotes en condiciones *in vitro*, estos fueron puestos durante cuatro meses a 27, 21, 12 y 4°C de temperatura en atmósfera normal de cultivo o en hipoxia mediante la inmersión en un lecho de parafina. A la menor temperatura, la mortalidad fue total en todas las condiciones. Para las otras temperaturas, se obtuvo una buena supervivencia, excepto con los brotes de hojas recubiertos de parafina almacenados a 27°C. Comparados

con los controles no recubiertos, la supervivencia y el desarrollo de los brotes axilares en condiciones de hipoxia, luego del período de almacenamiento, se vieron drásticamente reducidos debido a la reducción en los niveles de oxígeno (26).

Otra investigación dirigida a la disminución de la disponibilidad de oxígeno de los explantes de café, fue realizada por un investigador de la Universidad Ain Shams de Egipto, en el año 2003. En este caso, se realizó la encapsulación de yemas apicales y axilares de *C. arabica* en alginato de sodio al 5 % y se les almacenó a temperaturas de 15, 20 y 25°C en diferentes medios de cultivo. La temperatura más efectiva para la conservación de las yemas fue de 20°C y el medio de cultivo que permitió disminuir el crecimiento de las mismas por un mayor período de tiempo (12 meses), fue el que contenía las sales de MS al 50 %, con sacarosa 1 % y ácido abscísico (ABA) 10 mg.L<sup>-1</sup>. En cambio, la temperatura menos recomendable fue 25°C ya que las yemas germinaron durante el almacenamiento y mostraron bajos porcentajes de conversión en plántulas (27).

#### MODIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE CULTIVO

Entre las primeras aproximaciones a este tema se puede mencionar la preservación de germoplasma de *Coffea arabica* L. mediante el cultivo *in vitro* de brotes obtenidos a partir de meristemos apicales de las vitroplantas, técnica desarrollada en 1981 por investigadores del National Research Council, de Canadá. Cuando los meristemos del café fueron cultivados en medio Murashige-Skoog (MS) (28) suplementado con 6-benciladenina (BA) o zeatina a las concentraciones de 5 o 10 µM, se obtuvieron múltiples brotes, mientras que a menores niveles de estas hormonas (0,1 o 1 µM), se obtuvieron brotes únicos. La regeneración de las raíces solo fue posible al cultivar los brotes diferenciados en un medio

MS al 50 % libre de sacarosa y suplementado con ácido indol-butírico (AIB) 1 µM, lo cual facilitó el almacenamiento de las plantas. A través de esta técnica fue posible mantener las plantas regeneradas sin subcultivo periódico por dos años, a una temperatura de 26°C, y algunas de ellas fueron exitosamente climatizadas (29).

En cuatro especies de café: *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica* y *C. racemosa* fue comparado el efecto de la citoquinina 6-benciladenina (BA) a las concentraciones de 1,3 y 4,4 µM en la supervivencia, el crecimiento y la producción de brotes axilares sembrados en medio MS. La investigación, llevada a cabo en el ORSTOM en 1991, determinó que luego de seis meses de almacenamiento la concentración de BA no influyó en el porcentaje de supervivencia (95 %), independientemente del tratamiento empleado. El mantenimiento de los brotes en un medio con BA 1,3 µM aseguró una significativa reducción en el crecimiento, lo cual permitió una considerable ampliación en los intervalos entre subcultivos y a la misma vez, suficiente desarrollo de los brotes para asegurar la multiplicación en la siguiente transferencia a medio fresco. Los genotipos estudiados fueron almacenados por cinco años en un medio conteniendo BA 1,3 µM con subcultivos cada seis meses (30).

Estudios liderados en 1999 por el Central Coffee Research Institute, de la India, desarrollaron un método para la conservación de embriones cigóticos de *C. arabica* L. cv. Catimor con el empleo de ácido abscísico (ABA) en el medio de cultivo. Los embriones cigóticos inmaduros fueron cultivados en medio MS suplementado con ABA a las concentraciones de 0,4; 3,8; 18,9; 37,8 y 75,6 µM y preservados en placas Petri a la oscuridad y a una temperatura de 25°C por un período de hasta dos años. A intervalos de seis meses fueron tomados algunos embriones con el objetivo de evaluar su viabilidad mediante la germinación en medio

MS con ácido naftalén-acético (ANA) 0,5 y ABA 4,4  $\mu\text{M}$ . Como resultados, en el medio de conservación carente de ABA o con bajas concentraciones (0,4  $\mu\text{M}$ ), los embriones germinaron pero mostraron mayor mortalidad a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. En contraste, los embriones incrementaron su dormancia a concentraciones crecientes de ABA y se obtuvo un 74,2 % de supervivencia a los dos años en medio suplementado con ABA 18,9 o 37,8  $\mu\text{M}$ . Los resultados sugieren que los embriones pueden ser preservados con poca pérdida de viabilidad en presencia de ABA aun a temperatura ambiente (25°C) hasta dos años sin subcultivo (31).

#### **MODIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO EN EL MEDIO DE CULTIVO Y DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA**

En Francia, en 1992 investigadores del ORSTOM analizaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de dos temperaturas, sobre la supervivencia de las plantas tres accesiones de *C. arabica* L. (cv. Caturra amarillo, cv. Mokka de Tahiti y el híbrido interespecífico Arabusta (*C. arabica* L. x *C. canephora*)). Concentraciones de sacarosa 5 g.L<sup>-1</sup> y 20 g.L<sup>-1</sup> y temperaturas de 20 y 27°C fueron comparadas en el cultivo *in vitro*. Después de seis meses de almacenamiento, la supervivencia de los esquejes a 20°C fue mayor que a 27°C si la concentración de sacarosa en el medio de cultivo fue reducida a 0 o 5 g.L<sup>-1</sup>. Sin embargo, la supervivencia fue mayor a sacarosa 20 g.L<sup>-1</sup> y no existió diferencia entre los porcentajes de supervivencia a 20 y 27°C. De manera general, para las tres accesiones se determinó que pueden ser conservadas por un año a 20°C en un medio que contenga al menos sacarosa 20 g.L<sup>-1</sup> (32).

Estos resultados fueron confirmados en 1993 por otros autores del ORSTOM (33), quienes además mostraron que la supervivencia de brotes de *C. canephora* decrece linealmente con la reducción de la

temperatura, aun cuando son conservados en un medio con sacarosa 20 g.L<sup>-1</sup>, ya que luego de cinco meses de almacenamiento, el 25 % de los brotes sobrevivieron a 12°C; el 75 % a 17°C y el 90 % a 27°C. La elevada sensibilidad al frío de *C. canephora* en comparación con *C. arabica* fue estudiada a partir de la evolución de dos marcadores bioquímicos en brotes de *C. canephora* almacenados a bajas temperaturas, como la disminución en la concentración de prolina y el aumento en la concentración de malondialdehído, evidenciando daños a la integridad estructural de las membranas.

#### **ADICIÓN DE REGULADORES OSMÓTICOS DEL CRECIMIENTO Y DISMINUCIÓN DE LA TEMPERATURA**

Una investigación más reciente realizada por investigadores cubanos del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) en el 2007, señala la factibilidad de la conservación de plantas de *C. arabica* y *C. canephora* por un período de seis meses en medio MS al 50 %, suplementado con sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup>, manitol al 40 % y a una temperatura de refrigeración de 9°C. Además, la recuperación del material vegetal se realizó en un medio de cultivo suplementado con un extracto auxínico de origen bacteriano obtenido a partir de *Bulholderia cepacia*, denominado CB1, a la concentración de 0,9 mg.L<sup>-1</sup>, que permitió obtener porcentajes de recuperación entre el 95 y el 97 % y estimular el desarrollo de las plantas previamente sometidas al proceso de conservación. La aclimatización de las plantas también resultó favorecida con el empleo de este biopreparado tanto en estado sólido como líquido, lográndose un significativo nivel de desarrollo vegetal. Adicionalmente, fue evaluado el comportamiento de la estabilidad y la variabilidad genética de las plantas conservadas y recuperadas en relación con las plantas donantes, mediante estudios bioquímicos y moleculares, que demostraron que se mantuvo la

estabilidad genética de las mismas (34).

#### **CRIOCONSERVACIÓN**

En el presente, la crioconservación constituye la única manera segura y sostenible de conservación a largo plazo de recursos genéticos. Este método consiste, básicamente, en el almacenamiento del material vegetal a temperaturas ultra-bajas, obtenidas con el empleo del nitrógeno líquido (-196°C). A esta temperatura, todas las divisiones celulares y procesos metabólicos están detenidos. El material vegetal puede ser conservado teóricamente por un período ilimitado de tiempo. Además, los cultivos son mantenidos en un reducido espacio, protegidos de la contaminación y con pocos requerimientos de mantenimiento (35).

Las células de la mayoría de los explantes utilizados en la crioconservación poseen elevadas cantidades de agua, por lo que son muy sensibles al daño por congelación. Debido a esto, deben ser deshidratadas artificialmente para protegerlas del daño ocasionado por la cristalización o formación de hielo intracelular (36). La deshidratación se puede realizar de forma física (corriente de aire de la cabina de flujo laminar, estufa, sílica-gel, soluciones saturadas salinas), de forma química (sustancias crioprotectoras) o ambas.

En la crioconservación son reconocidos dos grupos de métodos: el método clásico, basado en la congelación programada y los métodos basados en la vitrificación, con congelación rápida. Las técnicas empleadas y los mecanismos físicos en los que se basan, son diferentes en los métodos de crioconservación clásicos, en relación con los nuevos métodos de crioconservación (35).

#### **PROCEDIMIENTOS BASADOS EN EL MÉTODO CLÁSICO DE CRIOCONSERVACIÓN**

Las técnicas relacionadas con el método clásico de crioconservación se basan en la

congelación lenta de las muestras hasta una temperatura de pre-congelación definida, seguida por la inmersión rápida en nitrógeno líquido. Mediante la disminución de la temperatura a un ritmo relativamente lento ( $0,5-2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), los cristales de hielo se forman en la solución extracelular y el agua es removida desde el interior celular, favoreciendo la deshidratación y evitando el daño por formación de hielo intracelular (22).

Los procedimientos basados en el método clásico incluyen de manera general los siguientes pasos sucesivos: pre-crecimiento de las muestras, crioprotección, congelación lenta, inmersión rápida en nitrógeno líquido, almacenamiento, recalentamiento rápido y recuperación. Se considera que estas técnicas son operacionalmente complejas ya que conllevan el uso de un congelador programable, equipo sofisticado y de costosa adquisición (35).

Las técnicas clásicas de crioconservación han sido mayormente aplicadas con éxito a sistemas de cultivos indiferenciados, como los callos y suspensiones celulares. En el caso de los explantes diferenciados, estas técnicas pueden ser empleadas para la congelación de ápices de especies tolerantes al frío (22).

#### PROCEDIMIENTOS BASADOS EN EL MÉTODO DE VITRIFICACIÓN

Este método se basa en la congelación ultra-rápida del material vegetal, para lograr que los solutos intracelulares formen una estructura cristalina amorfa (vítreo) y evitar los problemas causados por la formación de hielo intracelular (36). La deshidratación de las células se lleva a cabo antes de la congelación, por la exposición de las muestras a soluciones crioprotectoras altamente concentradas o por la deshidratación física, seguida de congelación rápida (22).

De manera general, se pueden distinguir ocho técnicas basadas en la vitrificación: encapsulación-

deshidratación, vitrificación *per se*, encapsulación-vitrificación, deshidratación, precrecimiento, precrecimiento-deshidratación, gota-congelación y gota-vitrificación (35). Una característica común a todas estas técnicas es que el paso crítico es el de deshidratación y no el de congelación, como en los procedimientos clásicos. De esta manera, si los explantes a crioconservar pueden ser desecados hasta contenidos de agua suficientemente bajos, con poca o ninguna pérdida de supervivencia en comparación con los controles, entonces lo más probable es obtener elevados niveles de supervivencia luego de la crioconservación (22).

La vitrificación ofrece determinadas ventajas prácticas en comparación con las técnicas clásicas de crioconservación, ya que resulta más apropiada para explantes que contienen células diferenciadas y resulta menos compleja que los procedimientos clásicos pues permite evitar el uso de un congelador programable (22).

#### CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES DE CAFETO

Diversas especies de café han sido objeto de estudio ante la crioconservación con el empleo de diferentes explantes y metodologías. Por ejemplo, en 1995 científicos del ORSTOM aislaron segmentos nodales de *C. racemosa* y *C. sessiliflora*, de plantas obtenidas *in vitro*, y los colocaron en medio de cultivo para la inducción del crecimiento de brotes axilares. Luego de tres semanas fueron extraídos los ápices, que fueron encapsulados en alginato al 3 %. Estos ápices encapsulados fueron pretratados en medio líquido con elevadas concentraciones de sacarosa por diferentes períodos de tiempo, parcialmente deshidratados en la cabina de flujo laminar e introducidos en nitrógeno líquido. Los ápices de *C. sessiliflora* requirieron entre tres y diez días de precrecimiento en medio líquido con sacarosa 0,75 M para

lograr la supervivencia en la crioconservación, mientras los de *C. racemosa* requirieron un progresivo incremento en la concentración de sacarosa desde 0,5 a 1 M. Los mayores porcentajes de supervivencia fueron del 27 % para *C. racemosa* y del 38 % para *C. sessiliflora* (37).

#### CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS Y CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE CAFETO

Los tejidos embriogénicos y embriones somáticos de café en diferentes estadios, también han sido explantes utilizados en los diferentes métodos de crioconservación. Por ejemplo, embriones somáticos de *C. arabica* fueron crioconservados en el ORSTOM en 1988, utilizando el método clásico. Los embriones, en estadio globular, fueron cultivados en un medio enriquecido con sacarosa 0,75 M por 24 horas y pretratados en medio líquido conteniendo esta misma concentración de sacarosa y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %, por dos horas. Entonces fueron congelados de manera lenta ( $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  en un equipo de congelación programable, antes de sumergirlos en nitrógeno líquido. El máximo porcentaje de recuperación de los embriones crioconservados se obtuvo a las 17 semanas (50 %), mediante un proceso de embriogénesis secundaria. Los embriones adventicios obtenidos fueron diferenciados *in vitro* y se desarrollaron en plántulas normales (38).

Investigadores de dos universidades sudafricanas, en 1995 consiguieron obtener la regeneración directa de embriones somáticos de *C. arabica*, utilizando de manera combinada el efecto de las soluciones crioprotectoras y la deshidratación parcial. A los embriones en estadios de corazón y torpedo, se les realizó un pretratamiento en glicerol 5 % con sacarosa 5 % por 15 min, seguido de una solución crioprotectora más concentrada (glicerol 10 % con sacarosa 10 %) por el mismo tiempo. Luego los embriones fueron desecados en la cabina de flujo

laminar durante una hora y sumergidos en nitrógeno líquido. De manera general, para los embriones somáticos de ambos estadios de desarrollo se obtuvieron resultados similares; el porcentaje de los que desarrollaron normalmente en plantas con cotiledones a las ocho semanas de cultivo fue del 70 %.

Estas plantas fueron transferidas al suelo y aclimatizadas satisfactoriamente (39).

En 1995 se realizaron los primeros estudios en el INCA, sobre la crioconservación de callos embriogénicos de *C. arabica* mediante el método clásico. Los callos fueron colocados en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa (0,1; 0,3; 0,5 y 0,75 M) y fueron introducidos en un baño a 0°C con la adición de DMSO al 5 % durante una hora. Luego fueron transferidos a un congelador programable, donde se les disminuyó la temperatura a un ritmo de 0,5°C.min<sup>-1</sup> hasta los -40°C y fueron introducidos en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó la recuperación de los callos en un medio de cultivo con concentraciones decrecientes de sacarosa. Como resultados se obtuvo que para la crioconservación de los callos embriogénicos, las mezclas de DMSO 5 % + 0,5 M y DMSO 5 % + sacarosa 0,75 M fueron las que permitieron mayores porcentajes de supervivencia, con 66,9 y 66,8 %, respectivamente, aunque el crecimiento de los callos fue evaluado como muy lento (40).

Para *C. canephora* también ha sido posible realizar la crioconservación de embriones somáticos. Este método, desarrollado por estudiosos de un centro de investigación de Nestlé en 1994, se basó en un tratamiento de adaptación de los tejidos embriogénicos, que consistió en cultivarlos por 12 semanas en un medio con altas concentraciones de sacarosa y ABA. Al obtener los embriones somáticos en estadio de torpedo, se les sometió a un período de desecación bajo 75 % de humedad relativa a 24°C por siete días. Luego

de una congelación rápida, el 64 % de los embriones crioconservados se desarrollaron en plántulas, lo que permite afirmar que la sacarosa probablemente tiene influencia en la tolerancia a la desecación y en el estrés por congelación. Además, el ABA es reconocido como un componente importante en la adaptación de las plantas a los diferentes estrés. Según los autores, estos resultados sugieren que el comportamiento de los embriones somáticos se asemeja al de los embriones cigóticos maduros en lo concerniente a su habilidad para tolerar la crioconservación (41).

En 1994 investigadores japoneses obtuvieron el crecimiento directo de embriones somáticos de *C. canephora* en estadios de corazón y torpedo, a través del método de encapsulación-deshidratación. Luego de un pretratamiento en medio de cultivo con concentraciones crecientes de sacarosa (de 0,3 a 0,8 M), los embriones somáticos fueron encapsulados en alginato, cultivados por 24 h en medio líquido con sacarosa 0,5 M, deshidratados hasta el 13 % de contenido de humedad y rápidamente sumergidos en nitrógeno líquido. Bajo estas condiciones, el 63 % de los embriones permanecieron vivos y la mitad de ellos se desarrollaron en plántulas completas (42).

#### **CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE CAFETO**

Embriones cigóticos de *Coffea liberica* han sido crioconservados exitosamente a partir del método de deshidratación-congelación. El estudio, liderado en 1992 por científicos de la Universidad Kebangsaan de Malasia, abarcó primeramente la desinfección de las semillas y luego la extracción de los embriones, proceso bastante laborioso debido a la dureza del endospermo y al pequeño tamaño de los mismos. La desecación de los embriones se realizó en la cabina de flujo laminar en un período entre 30 y 50 minutos, y la congelación se realizó

mediante la inmersión rápida en nitrógeno líquido. Los embriones fueron sembrados en medio de recuperación y la viabilidad fue evaluada a partir de su desarrollo en plántulas normales (formación de raíz y brote). Bajo estas condiciones, se obtuvo una recuperación de entre el 83-86 % de los embriones a un contenido de humedad entre el 25-20 % (43).

En una investigación realizada en 1992 en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), de Costa Rica, fue estudiada la crioconservación de embriones cigóticos de cafeto extraídos de frutos en tres estadios de maduración, basándose en la coloración de la piel: verde, amarilla y roja. De semillas de las especies *C. arabica*, *C. canephora* y el híbrido Arabusta (*C. arabica* x *C. canephora* cv. Robusta) fueron obtenidos los embriones cigóticos, que fueron deshidratados bajo el aire estéril de la cabina de flujo laminar por períodos de tiempo entre cero y dos horas y fueron sumergidos rápidamente en el nitrógeno líquido. La recuperación se realizó mediante la siembra *in vitro* de los embriones cigóticos. Para *C. arabica* los mejores resultados (95 % de supervivencia) se obtuvieron con los frutos amarillos a las 0,5 horas de desecación, con un contenido de humedad del 16,4 %. Estas mismas condiciones fueron tomadas para la crioconservación de *C. canephora* y Arabusta, alcanzándose un 41,6 % y 83,6 % de supervivencia, respectivamente. Fue posible incrementar la recuperación de los embriones con la adición de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) al medio de cultivo (44).

La crioconservación de embriones cigóticos de *C. arabica* también fue estudiada por investigadores del INCA en 1996. Para la crioconservación de los embriones cigóticos, primeramente se efectuó la deshidratación en la cabina de aire del flujo laminar entre 0 y 2½ horas, a intervalos de 30 minutos. La congelación se realizó por la inmersión directa de los embriones en el nitrógeno líquido, y la recuperación se efectuó a partir de

la siembra *in vitro* de los mismos. La germinación de los embriones sin congelación (control) osciló entre 68,6 y 19 %, observándose que a medida que disminuyó el contenido de humedad, disminuyó la germinación. Sin embargo, cuando se realizó la congelación directa de los embriones, solamente se obtuvo un 3,3 % de germinación cuando la humedad de estos era del 25,5 %, por lo que se recomendó conservar la semilla completa y luego realizar la extracción del embrión (45).

Nuevas perspectivas se abren en el tema de la crioconservación de embriones cigóticos de *C. canephora*. Investigadores cubanos del INCA, en colaboración con expertos franceses del Institute de Recherche pour le Développement (IRD), lograron obtener determinados valores de supervivencia de embriones crioconservados por el método de vitrificación con soluciones de vitrificación (Plant Vitrification Solution, PVS2 y PVS3). Utilizando el pretratamiento con PVS2 entre 30 y 60 minutos, la supervivencia varió del 7 al 30 %; mientras que con el pretratamiento en PVS3 entre 20 y 60 minutos, sobrevivieron entre el 30 y el 66 % de los embriones. Estos resultados, aunque preliminares, se consideran promisorios para Cuba debido a las facilidades que ofrece la vitrificación *per se* a los laboratorios de recursos limitados (46).

### **CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE CAFETO**

Otro de los explantes estudiados en *C. liberica* por los investigadores malayos fueron las semillas. Su crioconservación resultó satisfactoria, a partir de la desecación en estufa a 30°C de cero a ocho horas y la inmersión directa en nitrógeno líquido. Luego del recalentamiento en Baño María a 40°C, las semillas fueron colocadas en arena para su germinación. Para las semillas crioconservadas se obtuvieron porcentajes de germinación del 53 % (con endocarpo) y el 30 % (sin endocarpo) para contenidos de

humedad entre el 14 y el 17 %, mientras que de los controles de desecación germinó el 63 % (con endocarpo) y el 53 % (sin endocarpo) (43).

Los primeros intentos por crioconservar semillas de *C. arabica* fueron realizados en 1983 por científicos norteamericanos y no tuvieron éxito. Las semillas no sobrevivieron la inmersión en nitrógeno líquido aunque fueron desecadas hasta el contenido de humedad umbral (contenido de humedad por debajo del cual el agua de las mismas permanece no congelable) (47).

Entre las tentativas por crioconservar semillas de *C. arabica* por diferentes vías, se pueden citar también las de investigadores del INCA en 1995 (40). El método empleado fue el de deshidratación-congelación, mediante dos procedimientos diferentes: desecación en el flujo laminar o desecación en la estufa. Para la desecación en la cabina de flujo laminar, las semillas fueron colocadas en la corriente de aire por un período entre cero y siete horas, y luego fueron introducidas directamente en nitrógeno líquido. Para la desecación en estufa, las semillas fueron deshidratadas a 37°C entre 0 y 26 horas y fueron congeladas en nitrógeno líquido. En ambos casos la descongelación fue realizada en la corriente de aire del flujo laminar por uno o dos minutos.

Como resultado, la deshidratación en flujo laminar no permitió obtener germinación de las semillas luego de la crioconservación ya que a las siete horas aun conservaban una humedad entre el 41 y el 49 %, la cual resulta demasiado elevada para este proceso. La deshidratación en estufa y sin congelación de las semillas (control) permitió obtener hasta un 38 % de germinación a las 26 horas, con un porcentaje de humedad del 9 %; sin embargo, luego de la congelación en nitrógeno líquido las semillas no germinaron a ningún contenido de humedad. En relación con esto hay que señalar que los autores recomendaron el uso de embriones

cigóticos como explantes para lograr una metodología adecuada de crioconservación de este material.

Sin embargo, teniendo en cuenta que el procedimiento de recalentamiento utilizado fue el de descongelación en la corriente de aire del flujo laminar, esto pudo haber influido en la germinación de las semillas, ya que la mayoría de los autores sugieren hacerlo en Baño María y de manera rápida, para evitar la reformación de hielo intracelular (48; 35).

Como una variante de este método de deshidratación en la estufa, los mismos autores (45) realizaron la crioconservación de semillas de *C. arabica* y luego procedieron a la extracción de los embriones cigóticos. En este caso, cuando los valores de humedad alcanzaron un 8,5 y 9,8 %, se obtuvo una supervivencia del 9,1 y 2 % de los embriones, respectivamente. Comparando estos resultados con los obtenidos anteriormente por los mismos autores, se aprecia que la extracción y cultivo del embrión cigótico independientemente de la semilla, permitió que el tejido se recuperara mejor de la congelación y que el embrión se mantuviera aislado del medio tóxico que producen los fenoles segregados por la semilla íntegra. Por todo ello se consideró que pudiera resultar más factible conservar la semilla completa puesto que el porcentaje de germinación de los embriones extraídos luego de la congelación fue mayor (9,1 %) que el de los embriones congelados directamente (3,3 %) (40).

En especies silvestres de café cultivadas han sido realizados otros estudios sobre la crioconservación de semillas, en los cuales experimentos preliminares han mostrado que la supervivencia para *C. arabica* puede lograrse utilizando una congelación lenta y controlada, mientras otras especies pueden soportar un congelamiento rápido tras la deshidratación parcial (48). En el ORSTOM, en 1997, semillas de *C. arabica* fueron desecadas hasta un contenido de humedad de 0,2 g H<sub>2</sub>O.g<sup>-1</sup> ms (gramos de agua por

gramos de masa seca) mediante su colocación por tres semanas bajo un 78 % de humedad relativa, obtenido con el empleo de una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La temperatura de las semillas fue disminuida hasta 0°C, -20°C, -50°C o -100°C a razón de 1°C.min<sup>-1</sup> y seguidamente fueron sumergidas en nitrógeno líquido. La supervivencia fue evaluada *in vitro* tanto en las semillas luego de crioconservadas, como en los embriones cigóticos extraídos de estas. El mayor porcentaje de germinación (70 %) fue obtenido luego de pre-congelar las semillas hasta 50°C y de ellas, el 30 % desarrollaron plántulas normales luego de cuatro meses de cultivo. Esta metodología representa una opción simple y complementaria para aquellos laboratorios que no presentan facilidades para el cultivo *in vitro*, siempre y cuando cuenten con el uso de un congelador programable. En cambio, para los embriones extraídos luego de la crioconservación de las semillas, se obtuvo un porcentaje de germinación del 97 % cuando las mismas fueron sumergidas directamente en nitrógeno líquido, luego de la deshidratación y sin pre-congelación. Además, todos los embriones viables desarrollaron plántulas normales luego de dos meses de cultivo. Este protocolo resulta favorable para aquellos laboratorios que no cuentan con el empleo de un congelador programable y permite evitar muchos de los problemas encontrados con la crioconservación tradicional de embriones cigóticos, como por ejemplo, permite el procesamiento de grandes cantidades de semillas al mismo tiempo y las condiciones asépticas para la extracción de los embriones solo son requeridas luego de la congelación de las semillas.

El porcentaje de plántulas normales desarrolladas a partir de las semillas en la metodología de deshidratación-precongelación-congelación fue del 30 % (48). Sin embargo, este valor es posible incrementarlo hasta el 74 % si luego del recalentamiento de las semillas,

se realiza la rehidratación controlada de las mismas mediante un tratamiento de seis semanas de acondicionamiento osmótico en una solución de polietilenglicol (PEG) de -1,25 MPa (49). Esta metodología ha sido aplicada a partir de 2000 a las semillas de más de 100 accesiones de caféto (*C. arabica*) conservadas en el criobanco del CATIE, con resultados satisfactorios (49, 50).

Otras investigaciones llevadas a cabo en el IRD en el año 2001, señalan que entre las plantas de nueve especies de caféto en las que se estudió el efecto de la exposición a temperaturas ultra-bajas en la viabilidad de semillas desecadas a varios contenidos de humedad, es posible distinguir tres grupos de especies según la supervivencia. En el primer grupo se agrupan *C. brevipes*, *C. liberica*, *C. stenophylla* y *C. canephora*, que son especies en las que no se obtuvo germinación luego de la inmersión en nitrógeno líquido debido a daños en el endospermo. El segundo grupo reúne aquellas especies en las que la recuperación fue muy baja o nula luego de la congelación rápida y solo moderada después de la congelación lenta (*C. eugenioides* y *C. arabica*). El tercer grupo está determinado por las especies *C. pseudozanguebariae*, *C. racemosa* y *C. sessiliflora*, caracterizadas por elevados porcentajes de supervivencia de las semillas luego de ambos tipos de congelación (51).

Estudios más recientes corroboran las dificultades de crioconservar directamente semillas de *C. canephora*; sin embargo, plantean la posibilidad de obtener supervivencia de embriones cigóticos de esta especie extraídos luego de la crioconservación de las semillas a dos ritmos de congelación, lenta o rápida, por lo que resulta prometedor continuar con estas investigaciones\*.

\*Yanelis Castilla. Informe de los resultados de los experimentos desarrollados en el IRD, financiados por una beca de la Embajada de Francia en La Habana. 2009.

## CONCLUSIONES

Diversas formas de conservación *ex situ* han sido utilizadas para el mantenimiento de los recursos fitogenéticos del caféto. El almacenamiento de semillas en condiciones de baja temperatura y humedad relativa generalmente permite un período de conservación de hasta dos años, debido a la pérdida de viabilidad de las semillas. La conservación en campo sí posibilita la conservación por un tiempo más prolongado, pero en cambio necesita numerosos recursos económicos y humanos para su mantenimiento. Es por ello que las investigaciones más actuales se dirigen hacia los métodos de conservación *in vitro* y crioconservación, por ser los que permiten preservar el germoplasma de caféto a mediano y largo plazos, con el empleo moderado de recursos. No obstante, en este tema permanecen numerosos aspectos por investigar; por ejemplo, el efecto de reguladores del crecimiento no tradicionales y el efecto de la disminución de la intensidad luminosa sobre el desarrollo de las plantas de caféto en los métodos de crecimiento lento.

En los métodos de crioconservación existen las metas de lograr la supervivencia de embriones cigóticos de *C. canephora* por diferentes técnicas y de manera general, incrementar la supervivencia de las distintas especies ante los requerimientos de la congelación.

La conservación de recursos fitogenéticos de un país debe estar orientada en función de los recursos disponibles y del plazo por el cual se desee preservar el germoplasma. Si es por un corto plazo, será conveniente establecer bancos de semillas; si es por un mediano plazo, se recomienda la conservación en campo y la conservación *in vitro*; y si se desea conservar por un largo período, lo más adecuado es emplear los métodos de crioconservación. Por todas las ventajas e insuficiencias que presenta cada método, se considera que lo óptimo es utilizar varios que se complementen en este empeño.

## REFERENCIAS

1. Davies, A. P.; Govaerts, R.; Bridson, D. M. y Stoffelen, P. *An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae)*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2006, vol. 152, p. 465-512.
2. Wellman, F. L. Coffee. Botany, cultivation and utilization. *World Crops Book*, 1961. 488 p.
3. Anthony, F.; Combes, M. C.; Astorga, C.; Bertrand, B.; Graziosi, G. y Lashermes, P. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, vol. 104, p. 894-900.
4. Engelmann, F. y Dulloo, E. M. Introduction. En: F. Engelmann, M. E. Dulloo, C. Astorga, S. Dussert y F. Anthony. *Conserving coffee genetic resources*. Roma : Biodiversity International, 2007. p. 1-11.
5. Davis, A. P. y Gole, T. W. Wild coffee species-diversity, use, and conservation. *Coffee and Cocoa International*, 2011, vol. 37, no. 6, p. 24-27.
6. Gole, T. W.; Denich, M.; Teketay, D. y Vlek, P. L. G. Human impacts on the *Coffea arabica* genepool in Ethiopia and the need for its *in situ* conservation. En: J.M.M. Engels, V. Ramanatha, A.H.D. Brown y M.T. Jackson. *Managing plant genetic diversity*. IPGRI. 2002. p. 237-248.
7. Roberts, E. H.; King, M. W. y Ellis, R. H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. En: J. H. W. Holden y J. T. Williams. *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*. London : George Allen and Unwin, 1984. p. 38-52.
8. Hong, T. D. y Ellis, R. H. Optimum air-dry seed storage environments for Arabica coffee. *Seed, Science and Technology*, 1992, vol. 20, p. 547-560.
9. Dussert S.; Chabrilange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F. y Hamon, S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. *Cryo-Letters*, 1997, vol. 18, p. 269-276.
10. Eira, M. T. S.; Amaral da Silva, E. A.; De Castro, R.; Dussert, S.; Walters, Ch.; Derek, J. y Hilhorst, H. W. M. Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 18, no. 1, p. 149-163.
11. Voosen, H. A. M. Methods for preserving the viability of coffee seed in storage. *Seed Science and Technology*, 1979, vol. 7, p. 65-74.
12. Soto, F.; Echevarría, I. y Rodríguez, P. Estudio sobre la conservación de semillas de cafeto (*C. arabica* L. var. Caturra). *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 1, p. 33-36.
13. Arizaleta, M.; Montilla, J. y Pares, J. Efecto del almacenamiento de las semillas de cafeto (*Coffea arabica* L. var. Catuai amarillo) sobre la emergencia. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 2005, vol. 22, no. 3, p. 205-213.
14. Fontes R.; Fontes, E.; Cecon, P. R. y Sofiatti, V. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despolpado e não despolpado. *Revista Brasileira de Sementes*, 2008, vol. 30, no. 3, p. 71-78.
15. Anthony, F.; Dussert, S. y Dulloo, E. M. Coffee genetic resources. En: F. Engelmann, M.E. Dulloo, C. Astorga, S. Dussert y F. Anthony. *Conserving coffee genetic resources*. Roma: Bioversity International, 2007. p. 12-22.
16. Etienne, H.; Anthony, F.; Dussert, S.; Fernández, D.; Lashermes, P. y Bertrand, B. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2002, vol. 38, p. 129-138.
17. Jiménez, E. A. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: J. N. Pérez Ponce. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 13-24.
18. Jiménez, E. A. Cultivo de ápices y meristemas. En: J.N. Pérez Ponce. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 45-56.
19. Theilade, I. y Petri, L. Conservation of tropical trees *ex situ* through storage and use. Guidelines and technical notes No. 65. Denmark: Danida Forest Seed Centre, 2003. 15 p.
20. González-Benito, M. E. y Martín, C. *In vitro* preservation of spanish biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2011, vol. 47, p. 46-54.
21. García-Águila, L.; de Fera, M. y Acosta, K. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal*, 2007, vol. 7, no. 2, p. 67-79.
22. Engelmann, F. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 812, p. 63-82.
23. Alvarenga, S.; Abdelnour, A. y Villalobos, V. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). *Agronomía Mesoamericana*, 2007, vol. 18, no. 1, p. 65-73.
24. Borges, M.; Alarcón, Y.; Malaurie, B.; Hernández, Y. y Silva J. J. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (Dioscoreaceae). *Revista Peruana de Biología*, 2009, vol. 16, no. 2, p. 203-208.
25. Borges, M.; Malaurie, B.; Portales, S. y Calzadillas, D. Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2008, vol. 10, no. 2, p. 111-119.
26. Jouve, L.; Engelmann, F. y Charrier, A. Effets de l'hypoxie et de la température sur la conservation *in vitro* de pousses feuillées de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, 1991, vol. 35, no. 3, p. 205-210.
27. Hassan, A. Slow growth storage of encapsulated germplasm of *Coffea arabica* L. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2003, vol. 5, no. 4, p. 517-520.
28. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
29. Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. *Plant Science Letters*, 1981, vol. 22, p. 301-307.
30. Bertrand-Desbrunais, A.; Noirot, M. y Charrier, A. Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 1: Influence of low concentrations of 6-benzyladenine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1991, vol. 27, p. 333-339.

31. Madhava, M. y Sreenath, H. L. *In Vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, vol. 55, p. 227-230.
32. Bertrand-Desbrunais, A.; Noirot, M. y Charrier, A. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) 2: Influences of reduced concentrations of sucrose and low temperature. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, vol. 31, p. 105-110.
33. Jouve, L.; Engelmann, F.; Noirot, M. y Charrier, A. Evaluation of biochemical markers (sugar, praline, malonaldehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. *Plant Science*, 1993, vol. 91, p. 109-116.
34. González, M. E.; Castilla, Y.; Hernández, M. M. y Hernández, A. Factibilidad del cultivo *in vitro* en la conservación de recursos fitogenéticos de café. *Revista Agrotecnia de Cuba*, 2007, vol. 31, p. 4-7.
35. Engelmann, F. Cryopreservation of zygotic embryos. En: T. Thorpe y E. Yeung. *Zygotic embryo culture protocols. Methods in Molecular Biology Series*. Humana Press : Totowa, NJ, 2010.
36. Sakai, A. y Engelmann, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *Cryo-Letters*, 2007, vol. 28, p. 151-172.
37. Mari, S.; Engelmann, F.; Chabrillange, N.; Huet, C. y Michaux-Ferriere, N. Histocytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *Cryo-Letters*, 1994, vol. 16, p. 289-298.
38. Bertrand-Desbrunais, A.; Fabre, J.; Engelmann, F.; Dereudre, J. y Charrier, A. Reprise de l'embryogenèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier (*Coffea arabica* L.) après leur congélation dans l'azote liquide. *Académie des Sciences Paris*, 1988, vol. 307, p. 795-801.
39. Mycock, D. J.; Wesley-Smith, J. y Berjak, P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. *Annals of Botany*, 1995, vol. 75, p. 331-336.
40. Martínez, M.; González-Arao, M. T.; Urra, C.; Rojas, R. y Cuba, M. Estudios preliminares sobre la criopreservación de callos embriogénicos y semilla botánica de *Coffea arabica* variedad 9722. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 3, p. 74-76.
41. Tessereau, H.; Florin, B.; Meschine, M. C.; Thierry, C. y Pétiard, V. Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. *Annals of Botany*, 1994, vol. 74, p. 547-555.
42. Hatanaka, T.; Yasuda, T.; Yamagushi, T. y Sakai, A. Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid nitrogen. *Cryo-Letters*, 1994, vol. 15, p. 47-52.
43. Normah, M. N. y Vengadasalam, M. Effects of moisture content on cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos. *Cryo-Letters*, 1992, vol. 13, p. 199-208.
44. Abdelnour-Esquivel, A.; Villalobos, V. y Engelmann, F. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Letters*, 1992, vol. 13, p. 297-302.
45. Martínez, M.; González-Arao, M. T.; Urra, C.; Rojas, R.; Cuba, M. y García, D. Estudios preliminares para la criopreservación de embriones cigóticos de *Coffea arabica* variedad 9722. *Cultivos Tropicales*, 1996, vol. 17, no. 1, p. 79-81.
46. Castilla, Y.; Dussert, S.; González, M. E. y Engelmann, F. Criopreservación de embriones cigóticos de *Coffea canephora* mediante vitrificación: primeras aproximaciones. En: *Memorias del VIII Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal, Bioveg 2011* (2-6 de mayo, Ciego de Ávila, Cuba). ISBN: 978-959-16-1286-1.
47. Becwar, M. R.; Stanwood, P. C. y Leonhardt, K. W. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation tolerant and desiccation sensitive seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1983, vol. 108, no. 4, p. 613-618.
48. Dussert, S.; Chabrillange, N.; Engelmann, F.; Anthony, F. y Hamon, S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica*) seeds: importance of the precooling temperature. *Cryo-Letters*, 1997, vol. 18, p. 269-276.
49. Dussert, S.; Chabrillange, N.; Vásquez, N.; Engelmann, F.; Anthony, F.; Guyot, A. y Hamon, S. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*C. arabica* L.) seeds. *Cryo-Letters*, 2000, vol. 21, p. 47-52.
50. Vásquez, N.; Salazar, K.; Anthony, F.; Chabrillange, N.; Engelmann, F. y Dussert, S. Variability in response of seeds to liquid nitrogen exposure in wild coffee (*Coffea arabica* L.). *Seed Science & Technology*, 2005, vol. 33, p. 293-301.
51. Dussert, S.; Chabrillange, N.; Rocquelin, G.; Engelmann, F.; López, M. y Hamon, S. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) to ultra-low temperature in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. *Physiologia Plantarum*, 2001, vol. 112, p. 495-504.

Recibido: 8 de noviembre de 2011

Aceptado: 30 de abril de 2012

### ¿Cómo citar?

Castilla Valdés, Yanelis. Conservación de recursos fitogenéticos de café (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. *Cultivos Tropicales*, 2012, vol. 33, no. 4, p. 29-39. ISSN 1819-4087