

EL CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS DE CAFE EN COLOMBIA

MYRIAM DE PEÑA
Investigador Científico, LIQC

Al celebrarse los cincuenta años de existencia del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), se nos brinda la posibilidad de hacer un recuento de lo que ha sido el desarrollo del cultivo de tejidos de café en Colombia y un análisis del papel que deberá tener en el futuro desarrollo de la caficultura colombiana.

LA HISTORIA

Lo que hoy en día se denomina el área de biotecnología vegetal, nació como una idea, la idea de utilizar las técnicas de cultivo de tejidos para el desarrollo de las investigaciones que dentro del marco del proyecto "Lucha contra la roya del cafeto", iniciara el Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y de los Productos Naturales (LIQC), en el año de 1977. Este proyecto se realizó inicialmente con el apoyo de la Sociedad Alemana de Cooperación Técnica, GTZ, entre 1977 y 1982. El principal objetivo de este proyecto era el estudiar a nivel bioquímico, los mecanismos de defensa del cafeto contra la roya (21).

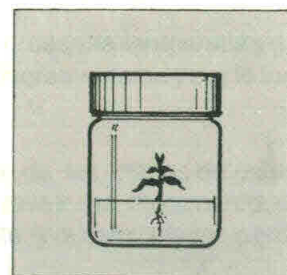
Lo que en ese entonces se denominó "Grupo de Bioquímica Especial" estaba constituido, fundamentalmente, por estudiantes de postgrado, que debían desarrollar sus trabajos de investigación dentro de los objetivos del proyecto y como requisito académico, para optar al título de magister en ciencias, en diferentes universidades.

Aunque en otros cultivos la literatura disponible sobre el uso del cultivo de células y tejidos "in vitro" como herramienta para el mejoramiento genético, los estudios fisiológicos y bioquímicos, la propagación clonal, etc. era abundante, en el caso del café, apenas se publicaban los primeros reportes sobre la regeneración "in vitro" de plantas de café por embriogénesis somática, así como algunos trabajos sobre la utilización de cultivos celulares para la producción de algunos compuestos químicos como la cafeína y el ácido clorogénico.

Con base en esta información se decidió, por parte de la dirección del LIQC, que uno de los trabajos de tesis debería estar enfocado al desarrollo de esta técnica y a explorar su utilización en el estudio de los mecanismos de defensa del cafeto, para así convertirla en una herramienta o sistema experimental útil en las investigaciones del grupo de Bioquímica Especial.

Fue así como el primer trabajo realizado en este campo fue la producción de callos y de cultivos celulares de diferentes genotipos de café, que sirvieran para cumplir con este objetivo.

Los resultados obtenidos en estas investigaciones dieron la base para los futuros desarrollos en otras áreas del cultivo de células y tejidos de café "in vitro"



como la embriogénesis somática, y continúan siendo el eje de la mayoría de las investigaciones que actualmente se realizan, principalmente en el LIQC.

En 1980, en colaboración con el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), inició CENICAFE trabajos en este campo, con el propósito de utilizar estas técnicas en el mejoramiento genético, la fisiología y la patología del café. La primera investigación fue en el área del cultivo de meristemas.

Vale la pena destacar que estas investigaciones se iniciaron en Colombia en momentos en que casi nada, o muy poco se hacía en este campo con relación a otros cultivos. Algunos investigadores, principalmente profesores universitarios, se empezaban a preocupar por su aplicación en especies como plátano, banano, caña de azúcar y algunas especies ornamentales.

El CIAT, que hoy puede considerarse líder en diversas áreas del cultivo de tejidos vegetales, aún no iniciaba sus trabajos en yuca. Esto coloca a la Federación Nacional de Cafeteros como entidad pionera en el desarrollo de esta área en Colombia, no sólo para el café, sino que con su ejemplo ha estimulado a otras instituciones para que se interesen en explorar este campo.

LAS REALIZACIONES

Los primeros trabajos, tal como se planteó, consistieron en la obtención de callos a partir de segmentos foliares (13, 25) y, posteriormente, su utilización en la producción de cultivos de células en suspensión. Aunque con estos trabajos se cumplía con el objetivo inicial de desarrollar un sistema que permitiera el estudio, a nivel celular, de los eventos bioquímicos involucrados en los mecanismos de defensa del cafeto, la idea de que si se quería utilizar todo el potencial que esta técnica ofrecía era necesario contar con sistemas de regeneración, condujo a la decisión de ampliar estos trabajos al campo de la regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática (3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 17, 19, 23, 24, 26).

Como resultado, se logró la producción "in vitro" de plantas, las cuales fueron trasladadas a CENICAFE para su siembra en sitio definitivo, después de realizar los ensayos necesarios para lograr su adaptación bajo condiciones de fitotrón y de umbráculo (15, 16). Este material se evaluó en cuanto a su comportamiento agronómico, características citológicas y patrones proteicos, comparándolo con plantas de la misma variedad propagadas por semilla, sin que se encontraran diferencias significativas en el material analizado (15, 16, 18).

Paralelamente, se iniciaron investigaciones sobre la inducción y producción de compuestos tipo fitoalexina, utilizando para ello los cultivos celulares y filtrados del cultivo de hongos fitopatogénicos, llegándose hasta la producción de sustancias con capacidad fungitóxica, trabajo éste que se continúa en la actualidad, con el fin de identificar dichas sustancias (19, 27). En CENICAFE se han desarrollado trabajos tendientes a establecer métodos para la propagación masiva de genotipos especiales y la conservación de germoplasma, tales como el cultivo de meristemas y la propagación por microestacas. Estas investigaciones han permitido la aplicación de estas técnicas para la multiplicación de diversos genotipos de café (6, 8, 9).

Los trabajos realizados en CENICAFE sobre el rescate de embriones para la recuperación de híbridos interspecíficos han permitido la obtención de unas 3.800 plantas híbridas, las cuales se encuentran actualmente en proceso de adaptación (8).

También se iniciaron investigaciones en el aislamiento y cultivo de protoplastos, como etapa fundamental para futuros desarrollos en el campo del mejoramiento genético, a través de la hibridación somática y de la ingeniería genética. Se ha logrado el desarrollo de un método para el aislamiento y cultivo de protoplastos, a partir de segmentos foliares en Alemania y de cultivos celulares, en el LIQC, hasta la formación de microcolonias (1, 2, 11).

En la actualidad se adelantan, tanto en CENICAFE como en el LIQC nuevas investigaciones basadas en los resultados obtenidos previamente, las cuales están relacionadas con estudios sobre micropropagación de genotipos sobresalientes, variación somaclonal, selección "in vitro", fisiología del parasitismo, recuperación de híbridos interespecíficos y estudios fisiológicos.

Los resultados logrados hasta el momento, así como los que se piensa obtener de las nuevas investigaciones, serán la base para iniciar una nueva etapa que conduzca a la aplicación de estos conocimientos a la producción de nuevas variedades que respondan a las expectativas del caficultor, en cuanto a su productividad, adaptación, resistencia a plagas y/o enfermedades y a su mayor aprovechamiento de los nutrientes del suelo.

EL FUTURO

Se habla mucho actualmente sobre las posibilidades de la biotecnología en diversos campos de la ciencia como la salud humana, la industria y la agricultura; sobre el impacto que tendrá como herramienta en

la investigación y en la obtención de nuevos productos como vacunas, drogas, instrumentos de diagnóstico, plantas mejoradas, metabolitos secundarios, etc.

La biotecnología podría definirse, de una manera simple, como el uso de los sistemas biológicos para la producción de bienes y servicios. En el caso de la biotecnología vegetal, ésta se fundamenta en el uso de las técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales y de ADN recombinante, las cuales a su vez se han originado en los avances de la biología celular, con el desarrollo de métodos para la regeneración de plantas, a partir de células aisladas y protoplastos y la producción de plantas haploides durante los años 70. Esto permitió la producción, en el año 1975, de una nueva variedad de arroz en China y de tabaco en Japón, así como la de una nueva variedad de repollo a través de la fusión de protoplastos, en 1986, también en el Japón (20).

Más recientemente, con los avances de la biología molecular en el estudio de los ácidos nucleicos y de las enzimas que permiten su duplicación, reparación o modificación, se ha logrado la introducción y expresión de un gen en una célula vegetal, en el año de 1983, en los Estados Unidos.

En América Latina, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú, ha trabajado en la producción de una proteína rica en aminoácidos esenciales, para lo cual se construyó una molécula de ADN sintética que fué introducida en células de papa a través de las técnicas de ADN recombinante (5).

En Colombia, el CIAT trabaja en la producción de nuevas variedades de arroz, mediante el uso de los haploides y la selección de variantes somaclonales, e inicia trabajos de ingeniería genética en frijol y yuca (21).

Sin embargo, a pesar de estos logros, las actuales aplicaciones exitosas de la biotecnología solamente provienen del uso de las técnicas de cultivo de tejidos, en áreas tales como la propagación clonal, la producción de material libre de virus, el rescate de híbridos interespecíficos, la selección "in vitro" de mutantes, la producción de plantas haploides y la obtención de metabolitos secundarios. Por otra parte se considera que, para poder utilizar todo el potencial de la biotecnología, las necesidades inmediatas de investigación están en el desarrollo de protocolos de regeneración eficientes; los estudios sobre la estabilidad genética y su control; la caracterización y clonación de genes agrónomicamente importantes; el desarrollo de sistemas eficientes de transformación y en la capacitación del personal que deberá conducir estas investigaciones.

La Federación Nacional de Cafeteros, conciente de la importancia que el desarrollo de esta área tendrá para el mejoramiento del café y de otras especies, ha venido apoyando las investigaciones que se realizan tanto en el LIQC como en CENICAFE.

Con base en la experiencia ganada, se ha considerado necesario estructurar un Programa de Biotecnología Vegetal que permita un mejor aprovechamiento, tanto de este conocimiento como de los recursos humanos, de infraestructura y financieros que posee y que responda a las necesidades actuales y futuras del gremio cafetero.

Estas consideraciones nos llevan a preguntarnos cuál debería ser el futuro del desarrollo de la biotecnología vegetal en café y cuáles los requerimientos para convertirla en un área que contribuya a su mejoramiento y, finalmente, a una mejor calidad de la vida de nuestros caficultores.

Para empezar, debemos hacer un análisis amplio de lo que tenemos actualmente y de lo que nos falta para poder trabajar a fondo en el área de la biotecnología. Este análisis deberá conducir a la definición de unas metas y objetivos claros así como de las acciones que tendremos que emprender para lograrlos.

Creemos que este programa deberá plantearse como objetivo general el de seleccionar, adaptar, generar y aplicar las técnicas de cultivo de células y tejidos e ingeniería genética que sean más relevantes para la solución de problemas que no puedan ser resueltos por los métodos convencionales y/o que incrementen la eficiencia de éstos. En este punto, vale la pena hacer la observación de que los nuevos métodos biotecnológicos no reemplazarán los métodos convencionales de mejoramiento genético, sólo los complementarán y ampliarán sus posibilidades.

Para el cumplimiento de este objetivo, que a su vez deberá llevar al logro de la meta de producir plantas mejoradas, se pueden plantear dos estrategias: una, contempla el desarrollo y aplicación de las técnicas de cultivo de células y tejidos que, por sí mismas, contribuyan al mejoramiento del café, tales como: la producción y selección de variantes somaclonales, el cultivo de anteras y granos de polen para la obtención de haploides, los cultivos celulares para la selección de mutantes, el aislamiento y cultivo de protoplastos para la hibridación somática y el rescate de embriones en la recuperación de híbridos interespecíficos.

La segunda estrategia incluiría la utilización de las técnicas de ADN recombinantes y otras, para la obten-

ción de plantas transformadas a través de la ingeniería genética. Algunos de estos métodos son: la transformación mediada por plásmidos, la microinyección y la electroporación. Esto requerirá de investigaciones básicas en bioquímica, fisiología, genética y biología molecular del café, las cuales permitan llegar a la identificación y conocimiento de los genes responsables de las características agronómicas que se desee modificar; el desarrollo de métodos para su secuenciación, aislamiento y clonación; la identificación y desarrollo de sistemas que permitan evaluar esta transferencia, su expresión y estabilidad.

Todo lo anterior implicará el trabajo coordinado de un equipo interdisciplinario de investigadores altamente capacitados y la integración de estos trabajos dentro de programas generales de investigación, así como de los recursos financieros y de infraestructura adecuados.

Sabemos que, aunque ya hemos logrado algo, es mucho lo que queda por hacer. Es probable que ninguno de nosotros sea el primero que logre producir la primera planta de café transformada pero estoy segura de que sí somos los que, con nuestro trabajo, estamos poniendo las bases para que algún día esto sea posible. Por lo tanto, debemos continuar esta tarea con responsabilidad y seriedad. Parte de esta responsabilidad está en formar la nueva generación de investigadores, para que ellos puedan hacer uso inteligente de esta nueva tecnología, analizándola críticamente en cuanto a su potencial, pero también en cuanto a sus limitaciones. Creemos que tenemos ante nosotros un campo fascinante, que nos brinda muchas oportunidades y que el desafío estará en saber utilizar lo bueno de él y descartar lo que no nos sirva.

Las personas que fundaron CENICAFE, hace cincuenta años, jamás imaginaron el impacto que esa decisión tendría para el futuro de la caficultura y del país, pero lo hicieron seguros de que la investigación era la única forma de garantizarle un porvenir al cultivo del café.

Hoy, nuestra responsabilidad es continuar investigando, para que los logros alcanzados se multipliquen. Para ello, contamos con el apoyo de un gremio que cree que invertir en investigación vale la pena y que siempre se ha preocupado por el recurso más valioso: el humano. Esto nos ha permitido el que hoy nos hayamos reunido a reflexionar sobre los resultados y las perspectivas de la biotecnología en café.

Finalmente espero que lo expuesto anteriormente, lo cual no pretende ser un análisis exhaustivo de lo que deberá ser el desarrollo de la biotecnología, haya contribuido con algunos elementos de juicio que sirvan para

orientar la tarea de convertir esta idea en una realidad con futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACUÑA Z., R.; PACHECO de P., M. Isolation and culture of coffee protoplasts from cell suspension cultures of *Coffea arabica* v. Caturra. In: INTERNATIONAL Congress of Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá (Colombia), September 21-25, 1987. Abstracts. p. 34-35.
2. ACUÑA Z., R. Aislamiento y cultivo de protoplastos de café a partir de células en suspensión de *Coffea arabica* L. var. Caturra. Bogotá (Colombia), Pontificia Universidad Javeriana. 1987. 98 p. (Tesis MSc. Biología).
3. APONTE DE LONDOÑO, M.E.; ROCA P., W; RODRIGUEZ, J. Cultivo de meristemas de café. *Cenicafé* (Colombia) 32(3):106-111. 1981.
4. CADENA G., G.; PACHECO de P., M. Actividades de investigación en Biotecnología de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. In: SEMINARIO Internacional sobre políticas y experiencias en sectores económicos de tecnología avanzada en América Latina y Colombia. Manizales (Colombia. 9-12 de octubre, 1988. Chinchiná (Colombia), CENICAFE, 1988. 6 p.
5. DESTEFANO-BELTRAN, L.; NAGPALA, P.; YANG, M-S.; ESPINOSA, N.O.; DODS, J.H.; ROCA, W.M.; JAYNES, J.M. Genetic Engineering of Crop Plants for Improved Nutritional Value and Enhanced Disease Resistance. In: SEMINARIO Andino de Biotecnología, 2. Cali (Colombia), octubre 5-7, 5p.
6. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J. Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo "in vitro". *Cenicafé* (Colombia), 37(4):119-133. 1986.
7. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J. El cultivo "in vitro" de células y tejidos del cafeto. *Cenicafé* (Colombia). 37(4):135-146. 1986.
8. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J.; ARCILA P., M.I. Avances en cultivo de tejidos en café. *Encuentro de Ingenieros Agrónomos*, 4.
9. LONDOÑO R., L.C.; OROZCO C., F.J. Recientes avances en cultivo de tejidos en *Cenicafé*. *Encuentro de Ingenieros Agrónomos*, 5. Concurso

- Técnico 1988, Alberto Machado. Melgar (Colombia), agosto 12-15. 1988. Resúmenes. p. 43-54.
10. OROZCO C. F.J.; LONDOÑO R., L.C.; GONZALEZ, M.T.; MARULANDA, M.L. Aplicaciones del cultivo de tejidos en el mejoramiento genético del café. In: COLLOQUE Scientifique International sur le café, 13. Paipa (Colombia), 21-25 de agosto, 1989. Resúmenes. p. 130.
 11. OROZCO C., F.J.; SCHIEDER, O. Aislamiento y cultivo de protoplastos a partir de hojas de café. *Cenicafé* (Colombia) 33(4):129-136. 1982.
 12. PACHETTI, P. de. Cultivo in vitro de anteras de *Coffea arabica* variedad Caturra. Bogotá (Colombia), Pontificia Universidad Javeriana. 64 p. (Tesis MSc. Biología).
 13. PACHECO de P., M. Obtención de células de café in vitro. Bogotá (Colombia), Pontificia Universidad Javeriana, 1979. 44 p. (Tesis MSc. Microbiología).
 14. PACHECO de P., M. Regeneración de plantas in vitro del género *Coffea*. Bogotá (Colombia), FEDERACAFE-LIQC, 1981. 30 p. (Mecanografiado).
 15. PACHECO de P., M. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. In: SIMPOSIO sobre ferrugens do Cafeeiro. Oeiras (Portugal), 17-20 de octubre, 1983. Comunicacoes. Oeiras (Portugal). Centro de Investigacao das Ferrugens do Cafeeiro, 1984. p. 495-512.
 16. PACHECO de P., M.; SERNA, H.L. de. Adaptación de plantas de *Coffea arabica* variedad Mundo Novo, obtenidas por embriogénesis somática a cultivo bajo condiciones de campo. *Cenicafé* (Colombia). 35(3):66-76.
 17. PACHECO de P., M. El cultivo de tejidos de café en la Federación Nacional de Cafeteros. LIQC. REUNION Latinoamericana sobre cultivo de Tejidos Vegetales. Caracas (Venezuela), 1985. 14p. (Mimeografiado).
 18. PACHECO de P., M.; ACUÑA Z., R. Stability of coffee plants regenerated in vitro: field and laboratory studies. International Congress of Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá (Colombia), september 21-25. 1987. Abstracts. p. 25-26.
 19. PACHECO de P., M.; RODRIGUEZ, H.; ACUÑA Z., R. VELASQUEZ, E.; MORENO, G.E. Cell suspension cultures of coffee for somatic embryogenesis, protoplast isolation and phytoalexin elicitation studies. In: XII ASIC. Montreux. Summary of papers in Agronomy: 65.
 20. PETIARD, V.; DESHAYES, A. In: NESTEC. Nestle Research neros 1986-87. Vevey (Suiza), NESTEC, 1987. p. 7-17.
 21. QUIJANO RICO, M. Scientific Research programe of LIQC on the socalled coffee rust disease. In: Seminar of Coffee Rust control. Paipa (Colombia). 1979. Eschborn (Alemania), GTZ, 1979. p. 306-310.
 22. ROCA, W.M. Experiencia del CIAT en la aplicación de la Biotecnología a la Agricultura Tropical. In: SEMINARIO Internacional sobre políticas y experiencias en sectores económicos de tecnología avanzada en América Latina y Colombia. Manizales (Colombia) 9-12 de octubre. 5 p.
 23. RODRIGUEZ, H.; PACHECO de P., M. Obtención de embriones somáticos in vitro de Caturra y F1 de Caturra x Híbrido de Timor. In: CONGRESO Nacional de Ciencias Biológicas, 20. Memorias.
 24. RODRIGUEZ, H.; PACHECO de P., M. Somatic embryogenesis from callus in cell suspension cultures of *Coffea* spp. International Congress of Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá (Colombia), september 21-25, 1987. Abstracts. p. 35.
 25. SIEVERS, S.; ABLANQUE, E.; BAUTISTA, E.; CHAPARRO, F.; GUTIERREZ, J.; HAVERKAMP, J.; MORENO, E.; PACHECO de P., M.; POSADA, E.; ROJAS, M.L.; SPETTEL, B.; ZAMUDIO, V.; QUIJANO R., M. Relationship between genetics and chemistry in the system *Coffea* spp. *Hemileia vastatrix*. In: COLLOQUE Scientifique International sur le cafe, 9. Londres (Inglaterra), 16-20 juin 1980. Paris (Francia), ASIC, 1980. p. 671-680.
 26. SIEVERS, S. et al. Kaffeerostbekaempfung in Kolumbien:; 43 Deutsche Pflanzenschutzagung (Alemania), Hamburgo (Poster).
 27. VELASQUEZ, E.; MORENO G., E.; GOMEZ, V. de; PACHECO de P., M. Induction of antifungal compounds in cell suspension cultures of coffee. International Congress of Plant Tissue Culture Tropical Species. Bogotá (Colombia), september 21-25. 1987. Abstracts. p. 50.