

Semejanza entre el crecimiento en vivero de cafetos (*Coffea arabica* L.) obtenidos por embriogénesis somática y por semillas

Similarity between nursery growth of coffee plants (*Coffea arabica* L.) obtained by somatic embryogenesis and by seeds

Luis Hermoso Gallardo¹, Lourdes Suárez-Villasmil², Hervé Etienne^{3,4}, Benoît Bertrand^{3,4}, Dominique Barry-Etienne⁵, Andrea Menéndez-Yuffá^{1*}

Resumen

Introducción: La etapa de aclimatación es limitante para la propagación industrial del café (*Coffea arabica* L.) por embriogénesis somática. **Objetivo:** Comparar el crecimiento en vivero de vitroplantas de café obtenidas por embriogénesis somática con el de plantas de semillas. **Metodología:** Las vitroplantas fueron aclimatadas y las semillas puestas a germinar en distintos sustratos, transfiriéndolas a un vivero, donde se midió durante 9 meses la altura y el largo y ancho de las hojas. **Resultados:** El crecimiento en área foliar, largo y ancho de las hojas, así como su tasa, fue similar entre las vitroplantas y las plantas de semillas; la mayor parte del período de medición, las plantas de semilla fueron escasamente mayores que las vitroplantas en altura, largo, ancho y área foliar, igualándose al final de la etapa de vivero (diferencia no significativa de 0 cm en largo, 0 cm en ancho y 0,1 cm² en área foliar), excepto que al final de la evaluación, las plantas de semilla, fueron 1 cm más altas (significativamente $p < 0,05$) que las vitroplantas. **Conclusión:** El crecimiento de las vitroplantas es equivalente al de plantas de semilla en las medidas foliares, y la mayor altura en las plantas de semilla al final de las mediciones es poco relevante por ser pequeña y porque ambos tipos de plantas presentaban una morfología vigorosa al final del estudio. Este trabajo aporta además ecuaciones lineales que relacionan el largo y ancho de la hoja con su área foliar, permitiendo estimar este último parámetro por un método no destructivo.

Palabras clave: Aclimatación, Área foliar, Embriogénesis somática, Endurecimiento, Somaclón, Vitroplantas.

Abstract

Introduction: The acclimatization stage is limiting to the industrial propagation of coffee (*Coffea arabica* L.) by somatic embryogenesis. **Objective:** To compare the growth in the nursery of coffee vitroplants obtained by somatic embryogenesis with that of plants from seeds. **Methodology:** Vitroplants were acclimatized and seeds germinated in different substrates; plants were transferred to the nursery, where the length and width of leaves and the plants height were measured for 9 months. **Results:** Growth in leaf area, length, width and growth rate were similar between vitroplants and plants from seeds; during most of the measurement period, height, length, width and leaf area were barely higher in seed plants than vitroplants, reaching the same values at the end of nursery stage (non-significant difference of 0 cm in length, 0 cm in width and 0.1 cm² in leaf area) except that, at the end of the evaluation, seed plants were 1 cm (significantly $p < 0.05$) higher than vitroplants. **Conclusion:** Vitroplant growth is equivalent to that of seed plants in leaf variables, and the higher height in plants from seeds at the end

¹ Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. e-mail: luishermoso59@hotmail.com

* Autor de correspondencia andrea.menendez@ciens.ucv.ve

² Laboratorio de Ecología de Plantas Acuáticas, Laboratorio de Ecología de la Vegetación, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. e-mail: suarez.lourdes@gmail.com

³ Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unit Mix Research-Interaction Plant Micro-organisms Environment (UMR IPME), F-34398, Montpellier, France. e-mail: herve.etienne@cirad.fr benoit.bertrand@cirad.fr

⁴ Interaction Plant Micro-organisms Environment (IPME), Univ Montpellier, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), CIRAD, Montpellier, France.

⁵ Société MYCEA, SupAgro, Montpellier 34000, France. e-mail: dominique.barry@mycea.fr

Fecha recepción: Abril 30, 2017

Fecha aprobación: Marzo 23, 2018

Editor Asociado: Valois-Cuesta H

of the measurements is of little relevance because it was small, and both types of plants presented a vigorous morphology. Additionally, this work provides linear equations that relate the length and width of the leaves with leaf area, allowing to estimate the latter parameter by a non-destructive method.

Keywords: Acclimatization, Leaf area, Hardening, Somaclone, Somatic embryogenesis, Vitroplants.

Introducción

La embriogénesis somática, es un método que permite llevar a cabo eficientemente la propagación clonal masiva de plantas; en café (*Coffea arabica* L.) su utilización tiene especial interés en el caso de híbridos y plantas élite. Pese a que en 1970, Staritsky reportó por primera vez la regeneración *in vitro* de café por embriogénesis somática, hay pocos estudios que refieran su aclimatación y crecimiento en vivero, constituyendo hoy en día una etapa limitante para su aprovechamiento a nivel industrial (Chandra *et al.* 2010, Kumar y Rao 2012). Una revisión de Campos *et al.* (2017) indica que el costo efectividad del uso de la embriogénesis somática para la propagación comercial del café, aún es insatisfactoria, sobre todo por la gran pérdida de plantas durante la aclimatación y porque las plantas regeneradas presentan diferencias en su desarrollo en la etapa de vivero. Entre los estudios que reportan el crecimiento en vivero de vitroplantas de café, cabe destacar el de Peña y Buitrago (1984) con plantas de café *C. arabica* var. Mundo Novo obtenidas por embriogénesis somática, donde se determinó que después de 27 semanas de aclimatación en un fitotrón y crecimiento en vivero, las plantas alcanzaron una altura de 30 cm (tamaño en el que usualmente son trasladadas a condiciones de campo); las plantas mostraron un crecimiento normal comparable al de plantas obtenidas por semilla, a diferencia del presente estudio; en la investigación antes citada, no se evaluó paralelamente el crecimiento en vivero de plantas obtenidas por semilla; luego, Barry-Etienne *et al.* (2002b) compararon la calidad y características morfológicas y fisiológicas de plantas de café derivadas de embriones somáticos obtenidos en biorreactores y germinados *in vitro*, con plantas de embriones somáticos (i.e. somaclones) sembrados directamente en un sustrato hortícola, resultando que este último método produjo rápidamente plantas vi-

gorosas. En otra investigación, Barry-Etienne *et al.* (2002a) encontraron que la variabilidad morfológica de una población de embriones somáticos producidos en un biorreactor afecta fuertemente la regeneración y desarrollo de plantas en el vivero. En estudios más recientes, Menéndez-Yuffá *et al.* (2010), compararon el desarrollo y calidad en vivero de plantas de *C. arabica* obtenidas por embriogénesis somática en biorreactores con plantas de semilla, encontrando que las vitroplantas alcanzaron una altura de 30 cm al mismo tiempo (21 semanas) que las plantas de semilla, siendo los somaclones más vigorosos que las plantas de semilla. Es de hacer notar, que a diferencia de varios reportes previos con vitroplantas de embriones somáticos diferenciados en biorreactores, en la presente investigación se estudiaron vitroplantas obtenidas por la germinación de embriones somáticos de café diferenciados y germinados en medios semi-sólidos. El crecimiento de las plantas en vivero se evaluó mediante la medición de su altura y el largo y ancho de la hoja; Karimi *et al.* (2009) destacan la importancia de medir o estimar el crecimiento de las hojas para comprender las respuestas de una planta a distintos tratamientos experimentales. Considerando que la aclimatación y desarrollo en vivero de vitroplantas de café obtenidas por embriogénesis somática, son limitantes para la aplicación de este método en la propagación masiva de café a nivel industrial, el objetivo principal de esta investigación fue comparar el crecimiento en vivero de vitroplantas de café (*C. arabica* L.) obtenidas por embriogénesis somática, con el de plantas de semilla.

Metodología

Material vegetal. El material vegetal utilizado fue plantas de café (*Coffea arabica* L.) del cultivar Catimor (originado por retrocruces sucesivos de *C. arabica* cv. Caturra roja con el Híbrido de Timor) obtenidas por el método de embriogénesis somática bajo las condiciones reportadas por Menéndez-Yuffá y García (1996) y semillas del mismo cultivar producidas por métodos tradicionales en la Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo” de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Aclimatación en propagador. En el experimento de aclimatación se utilizaron plantas obtenidas por germinación *in vitro* de embriones somáticos (de-

nominadas de ahora en adelante vitroplantas), que tenían una altura promedio entre 4 y 5 cm, poseían 4-5 pares de hojas y buen desarrollo radicular. Antes de transferir las plantas a los envases con los sustratos, estas fueron lavadas exhaustivamente para eliminar restos de agar y medio de cultivo. Doce plantas fueron sembradas en cada uno de siguientes cuatro sustratos: arena, turba, aserrín de coco-arena [1:1], y arena-turba [1:1], y se incubaron en propagadores con 65% de humedad relativa y $0,91 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo fotónico (DFF). Las semillas fueron sembradas en los mismos sustratos y condiciones ambientales. Durante esta etapa se determinó la supervivencia de las plantas de embriones somáticos y la germinación de semillas en los diferentes sustratos.

Etapa de vivero. Cuando las vitroplantas tenían 10 cm de altura y 5-6 pares de hojas (2 meses después del trasplante), todas las plantas sobrevivientes del mejor sustrato de aclimatación fueron transferidas a bolsas de polietileno con suelo constituido por tierra abonada mezclada con turba (1:1). Plantas de semilla del mejor sustrato de germinación que presentaban 10 cm de altura y 3-4 pares de hojas, fueron trasplantadas con el procedimiento ya descrito para las plantas de embriones somáticos. Ambos tipos de plantas fueron cultivadas en los viveros del Instituto de Biología Experimental-UCV, que presentaban una DFF de $7,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 56 % de humedad relativa. Las plantas fueron mantenidas en estas condiciones durante nueve meses.

Medidas de crecimiento. La comparación del crecimiento de las plantas se hizo a partir del momento en que las vitroplantas y las plantas de semilla alcanzaron tamaños similares en altura y fueron transferidas al vivero, momento a partir del cual, se midió mensualmente hasta el noveno mes, la altura de las plantas, el ancho y el largo de la hoja más grande.

Análisis de datos

Estimación del área foliar. Para establecer la función de cálculo del área foliar se utilizó una muestra de $N=14$ hojas de *C. arabica* L. de tamaños variables a las que le fue medida la superficie (cm^2), largo y ancho, mediante un escáner HP ScanJet, 6100C/T y el programa WinRHIZO V3.9 software (Instrument Regent, Montreal, Quebec, Canadá). Estos valores de área foliar fueron correlacionados con el largo y ancho

de las hojas mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Daniel 2002).

Además, se compararon las mediciones del área foliar con modelos que la estiman a partir del largo y/o ancho. Los modelos empleados fueron ecuaciones de regresión lineal (Daniel 2002) generadas a partir de los datos, y el modelo exponencial propuesto por Antunes *et al.* (2008).

Crecimiento. La significancia en las variaciones de la altura, largo, ancho y área foliar de las vitroplantas y plantas de semilla fue evaluada con una prueba t de Student (Daniel 2002). La prueba de Levene (Daniel 2002) fue empleada para evaluar la igualdad de varianzas, y en aquellos casos donde no se cumplió, se aplicó la prueba t de Student con la corrección de los grados de libertad (Daniel 2002).

El crecimiento fue estimado como la pendiente de las regresiones entre la altura, largo, ancho y área foliar vs. tiempo, que cuantifica en promedio, el aumento de estas variables por mes. La comparación de las pendientes (tasas de crecimiento) entre ambos métodos (plantas de embriones somáticos y de semillas) fue realizada a través de un análisis de la covarianza o ANCOVA (Snedecor y Cochran 1980, Pérez-López 2005), que toma como hipótesis nula que ambas pendientes son estadísticamente similares.

Relación largo/ancho de las hojas. La relación entre el largo y ancho de las hojas fue ajustada a una ecuación lineal mediante un procedimiento de regresión lineal simple (Daniel 2002) con el propósito de comparar si las plantas derivadas de embriones somáticos y de semillas presentan igual tasa de aumento del ancho y del largo de sus hojas. Al igual que para el crecimiento, la comparación entre las pendientes de la relación largo/ancho de las hojas, fue hecha con un ANCOVA. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa PAST v3.15 (Hammer *et al.* 2001).

Resultados

Aclimatación en propagador. La Figura 1 muestra las plantas de café originadas por germinación de embriones somáticos, denominadas de ahora en adelante vitroplantas, y las plantas de semillas, en distintas etapas del proceso de aclimatación. En la Figura 1A se pueden observar vitroplantas y plantas de semillas al inicio de la etapa de aclimatación en

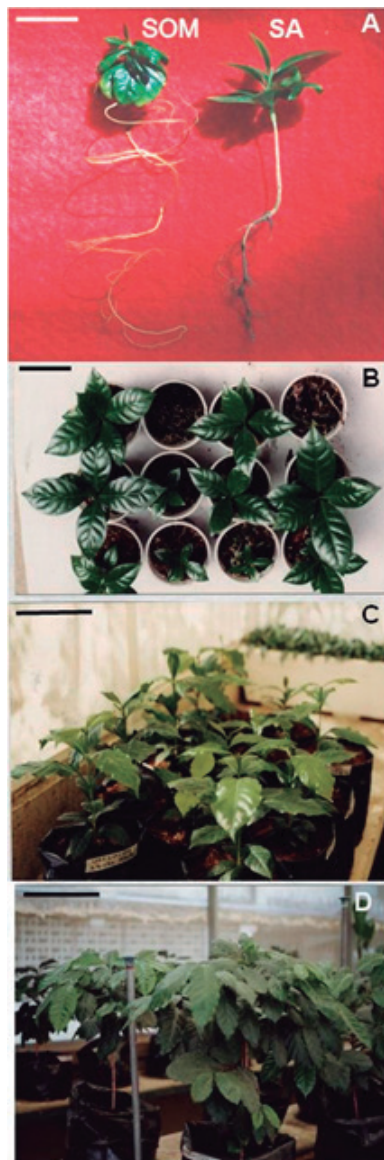


Figura 1. Plantas de café de embriones somáticos y de semillas en diferentes etapas del proceso de aclimatación. **A.** Plántulas de café obtenidas por embriogénesis somática (SOM) y por germinación de semillas (SA) en el momento de ser colocadas en los propagadores para la aclimatación (barra de la escala = 4 cm); **B.** Plántulas SOM en sustrato 2 (turba) justo antes de ser transferidas al vivero (barra de la escala=2,5 cm); **C.** Plantas de café SOM y SA después de 3 meses en etapa de vivero (barra de la escala=7 cm); **D.** Plantas de café SOM y SA después de 9 meses en etapa de vivero, en primer plano las plantas SA (barra de la escala=23 cm).

los propagadores. La Figura 1B muestra las vitroplantas aclimatadas en turba dos meses después de ser colocadas en los propagadores; en dicho sustrato se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia de

las vitroplantas (83%) y germinación de semillas (67%). Los demás sustratos ensayados, produjeron valores notoriamente inferiores de supervivencia para ambos tipos de plantas, en arena-turba un 8% de las vitroplantas y 42% plantas de semilla; en aserrín de coco-arena sobrevivieron 17% de las plantas independientemente de su origen, y en arena germinaron 25% de las semillas y no sobrevivió ninguna vitroplanta.

Modelos de estimación del área foliar. Para estimar la superficie foliar de manera no destructiva, se determinaron las relaciones entre el largo, ancho y área de la hoja, encontrando que hubo una correlación (r de Pearson) de 0,98 para largo de hojas y 0,95 para el ancho, con el área de las hojas. Estas correlaciones fueron altas y significativas ($p < 0,00001$, $N=14$), lo que evidencia la asociación lineal entre ambas variables. Al aplicar un modelo lineal para predecir el área en función de estas variables, se obtuvo un porcentaje de indeterminación de 4,2% para el largo y 10,5% para el ancho en la estimación del área de las hojas.

Si se extrae previamente el logaritmo natural (Ln) a las variables, las correlaciones aumentan (largo: $r=0,99$ y ancho: $r=0,99$), lo que reduce el porcentaje de indeterminación en la predicción del área de las hojas a partir del largo (1,6%) y el ancho de la hoja (1,4%). Por lo tanto, si bien el largo mantiene inicialmente una mayor correlación con el área, al transformar con los logaritmos naturales, se logra una predicción con muy poco porcentaje de error en ambos casos. La función $\text{Ln}_{\text{Área}} = 0,3512 + 2,0623 * \text{Ln}_{\text{Largo}}$ permite estimar el área de las hojas ($r=0,9919$; $p < 0,00001$) así como también la función $\text{Ln}_{\text{Área}} = 1,6330 + 19274 * \text{Ln}_{\text{Ancho}}$ ($r=0,9933$; $p < 0,00001$).

Crecimiento en vivero. La evaluación comparativa de crecimiento (altura, ancho, largo y área foliar) entre las vitroplantas y plantas de semillas cultivadas en las mismas condiciones, fue realizada desde el momento en que las plantas fueron transferidas de los propagadores al vivero. En la Figura 1B, se muestran plantas de embriones somáticos aclimatadas en la etapa de transferencia al vivero; en la misma figura se muestran vitroplantas y plantas de semilla en las etapas de tres meses (Figura 1C) y 9 meses (Figura 1D) de crecimiento en vivero.

En la Tabla 1 se resumen los resultados de las diferencias de medias entre vitroplantas y plantas de semillas, así como su significación estadística para el crecimiento en altura, ancho de hoja, largo de hoja y

Tabla 1. Resumen de comparación de medias en las variables que estiman el crecimiento (altura de la planta, largo, ancho y área foliar) en plantas de embriones somáticos y de semillas

Tiempo meses	Diferencia promedio (SOM-SA)							
	Altura cm	Sig.	Largo cm	Sig.	Ancho cm	Sig.	Área (cm ²)	Sig.
1	-0,3	*	-0,7	*	0,0	NS	-1,3	NS
2	-0,5	*	-0,7	*	-0,2	*	-5,1	*
3	-1,1	*	-0,5	*	-0,6	*	-12,7	*
4	0,1	NS	-0,5	*	-0,3	*	-8,7	*
5	-1,1	*	-0,9	*	-0,5	*	-19,8	*
6	-1,9	*	-0,7	*	-0,6	*	-23,1	*
7	-1,0	*	-1,0	*	-0,9	*	-38,3	*
8	0,5	*	-0,8	*	-0,3	*	-19,5	*
9	-1,0	*	0,0	NS	0,0	NS	0,1	NS

SOM = plantas de embriones somáticos, SA = plantas de semillas
sig= significancia, *Diferencia significativa con $p < 0,05$; NS= Diferencia no significativa

área foliar. Con excepción del mes 4, la altura de las plantas fue significativamente mayor para las plantas de semillas desde el inicio hasta el final del ensayo (Tabla 1), observándose que al finalizar la medición en el mes 9, las mismas fueron 1 cm mayores en altura que las vitroplantas ($p < 0,01$). Hasta el mes 8, el largo, ancho y área de las hojas fueron mayores en las plantas de semilla, sin embargo, en el mes 9 al finalizar la etapa de crecimiento en vivero, no se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento alcanzado por ambos tipos de hojas.

Respecto a las velocidades de crecimiento, la altura de las plantas de embriones somáticos y de las plantas de semillas se incrementó en forma lineal desde el mes 1 hasta el mes 9 (Figura 2A), mientras que el ancho, largo y área de la hoja mostraron un comportamiento lineal aproximadamente los 8 primeros meses, por lo que el cálculo de las velocidades de crecimiento fue realizado hasta el octavo mes, donde la hoja alcanzó su tamaño máximo (Figuras 2B, 2C y 2D). El área foliar tuvo una fase de crecimiento más lenta en los primeros cuatro meses para ambos tipos de plantas (vitroplantas y semillas); luego, ambas mostraron un crecimiento lineal hasta el mes 7, y finalmente el crecimiento se estabilizó en el mes 8, llegando a no tener diferencias significativas en área foliar entre plantas de embriones somáticos para el mes 9 (Tabla 1). Durante los 9 meses de evaluación,

la tasa de crecimiento no difirió significativamente para las medidas de altura, largo, ancho y área foliar (Tabla 2).

Relación largo/ancho de las hojas. Los coeficientes de correlación entre el ancho y largo de las hojas fueron altos y significativos para las vitroplantas ($r=0,969$, $p < 0,000$) y plantas de semillas ($r=0,985$, $p < 0,000$). La relación entre el largo y ancho para las hojas de las plantas, definidas por ecuaciones lineales es: $\text{Largo} = 2,661 * \text{Ancho} - 2,528$ con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,938$ ($p < 0,000$) para las vitroplantas y $\text{Largo} = 2,705 * \text{Ancho} - 3,005$ con $R^2 = 0,985$ ($p < 0,000$) para las de semillas. La forma de las hojas, estimada a través de la relación entre el largo y ancho de las hojas, produjo rectas con pendientes similares (vitroplantas=2,82; semillas=2,75), que no difirieron estadísticamente ($p = 0,4824$).

Discusión

Aclimatación en propagador. Es conocido que la etapa de aclimatación en propagadores es una fase crítica para las plantas propagadas *in vitro*. En la presente investigación, se logró 83% de supervivencia de las plantas; este porcentaje es alto comparado con los valores entre 50 y 70% de conversión a plantas que reportan Barry-Etienne *et al.* (2002b) para embriones somáticos de *C. arabica* L. germinados *in vitro* y *ex*

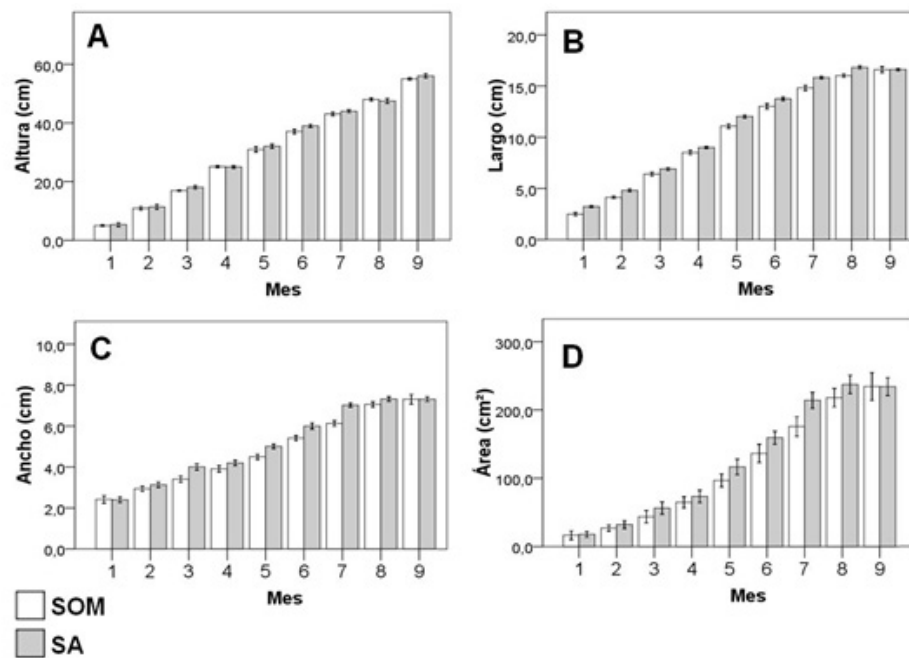


Figura 2. Crecimiento de plantas de embriones somáticos (SOM) y de semillas (SA). **A.** Altura, **B.** Largo, **C.** Ancho, **D.** Área foliar. Las barras de error se extienden ± 2 desviación estándar.

vitro, y 60% de vitroplantas de embriones somáticos de café arábico var. Mundo Novo observado por Peña y Buitrago de Serna (1984). En otras especies, Mehta y Subramanian (2005) obtuvieron 98% de supervivencia en vitroplantas de *Asparagus adscendens*, Homhuan *et al.* (2008) lograron solo 60% para plantas de embriones somáticos de *Carica papaya* aclimatadas en arena. Como se puede observar en la reseña anterior, las cifras de supervivencia de vitroplantas en etapa de aclimatación, son muy variables tanto para la misma especie como para otras, y es difícil atribuirlo a alguna condición en particular, porque hay mucha variabilidad en factores tales como la variedad o la especie, el sustrato de siembra y las condiciones de cultivo *in vitro* y *ex vitro*.

En la presente investigación, se observó que el sustrato con 100% de turba resultó en una mejor supervivencia de las vitroplantas y semillas germinadas; sus principales características son, que en el mismo predomina el componente orgánico que debe significar un buen aporte de nutrientes, y además es un sustrato que permite una buena aireación; estas propiedades coinciden con los estudios de Costa de Rezende *et al.* (2008), quienes trabajaron en la determinación de condiciones para la aclimatación

y desarrollo de plantas de *C. arabica* obtenidas por embriogénesis somática directa, encontrando que se requiere una buena capacidad de drenaje, espacio para aireación y fertilización.

La supervivencia de las plantas obtenidas por embriogénesis somática (83%) en turba, fue mayor que la germinación de semillas (67%), que se utilizaron como sistema de comparación en las etapas posteriores de crecimiento; sin embargo, no es posible comparar los procesos a este nivel, debido a que fisiológicamente son etapas diferentes, porque para la aclimatación se utilizaron embriones somáticos que ya habían germinado *in vitro*, en cambio, en el caso de las semillas, la germinación ocurrió por la ruta biológica natural.

Modelos de estimación del área foliar. En la Tabla 3 se presentan los resultados de estimar el área de la hoja con las ecuaciones lineales determinadas en el presente estudio a partir del largo de la hoja (modelo 1), el ancho de la hoja (modelo 2) o con el modelo exponencial (modelo 3) propuesto por Antunes *et al.* (2008). En estos resultados se observa que, con los modelos lineales, se obtuvo una diferencia mucho menor en relación con el área real que la determinada con el modelo exponencial, que subestimó el área de

Tabla 2. Comparación de las velocidades de crecimiento para la altura de las plantas, ancho, largo y área foliar entre para plantas de embriones somáticos y plantas de semillas

Variable	Tratamiento	Media	Comparación punto medio		Pendiente	Comparación pendiente	
			p	sig.		p	sig.
Altura (cm)	SOM	30,2	0,000	*	6,26	0,640	NS
	SA	30,9			6,29		
Largo (cm)	SOM	10,3	0,000	*	1,89	0,658	NS
	SA	11,0			1,87		
Ancho (cm)	SOM	4,8	0,000	*	0,65	0,301	NS
	SA	5,2			0,67		
Área (cm ²)	SOM	112,6	0,000	*	29,67	0,056	NS
	SA	126,9			31,39		

SOM = plantas de embriones somáticos, SA = plantas de semillas

sig=significancia, *=Diferencia significativa con $p < 0,05$; NS= Diferencia no significativa

la hoja.

El modelo exponencial de Antunes *et al.* (2008) presenta precisión y exactitud para la estimación del área foliar independientemente del tamaño de la hoja, y proporciona estimaciones exactas y poco sesgadas sobre todo cuando el cociente entre el largo y ancho de la hoja (largo/ancho) alcanza valores entre 2 y 3. Sin embargo, aunque las hojas utilizadas en el presente estudio para registrar el área mediante escaneo, tuvieron coeficientes largo/ancho entre 1,9 y 2,8 (Tabla 3), este modelo siempre subestimó el área de las hojas, lo que produjo resultados sesgados y menos exactos que los modelos lineales obtenidos por regresión simple. Este resultado indica, que puede haber otras características en la forma que no se reflejan en las dimensiones largo o ancho, y que podrían determinar las diferencias entre los resultados obtenidos por Antunes *et al.* (2008) y los de este trabajo. Asimismo, considerando que en el trabajo citado antes utilizaron un tamaño de muestra muy superior al empleado en el presente trabajo, es recomendable continuar evaluando modelos que relacionen el área foliar con variables morfométricas, sin descartar el uso de modelos de regresión lineal como herramienta simple y exacta para la estimación no destructiva del área foliar con las medidas del largo o ancho de la hoja.

La regresión lineal múltiple también fue explorada para relacionar simultáneamente el largo y ancho con el área foliar, pero no generó un modelo que in-

cluyera las dos variables, sino que descartó el ancho porque lo consideró redundante con el largo, porque la estimación del área no mejoró significativamente con la inclusión del ancho.

La estimación de área de la hoja mediante las ecuaciones de regresión lineal utilizando el largo o el ancho de las hojas, produjo resultados más exactos y menos sesgados que las estimaciones basadas en el modelo exponencial de Antunes *et al.* (2008) donde se considera el largo y ancho de las hojas (Figura 3). Tomando en cuenta lo anterior, se utilizó el promedio

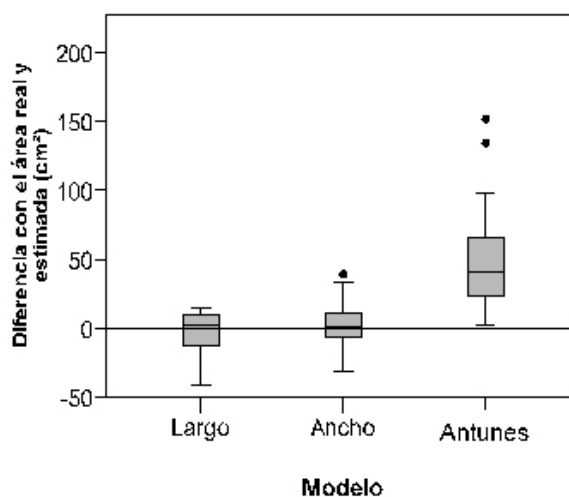


Figura 3. Comparación de áreas de las hojas estimadas con modelos lineales generados en el presente trabajo y con el modelo exponencial de Antunes *et al.* (2008).

Tabla 3. Crecimiento (largo, ancho, área foliar) en vivero y comparación entre las estimaciones de área foliar con ecuaciones lineales determinadas en el presente estudio (modelos 1 y 2) y con modelo exponencial (3) propuesto por Antunes *et al.* (2008)

Hoja N°	Largo (cm)	Ancho (cm)	Área real (cm²)	Área estimada 1 (cm²)	Diferencia con área real (cm²)	Área estimada 2 (cm²)	Diferencia con área real (cm²)	Área estimada 3 (cm²)	Diferencia con área real (cm²)
1	20	7,8	307,7	340,4	-32,7	268,3	39,3	109,8	197,9
2	18,2	6,8	238,8	279,6	-40,8	206	32,9	86,8	152
3	15,4	6,5	204,3	197,1	7,1	188,8	15,4	69,8	134,4
4	13,3	6,3	156,5	145,6	10,9	177,8	-21,3	58,3	98,2
5	10,5	5,5	105,7	90,4	15,3	136,8	-31,1	40,2	65,5
6	11,3	4,1	89,4	104,3	-14,9	77,7	11,7	32,1	57,3
7	8,5	3,9	64,5	58	6,5	70,5	-6,1	22,8	41,6
8	9,3	3,4	57	69,9	-12,9	54,1	2,9	21,8	35,2
9	8,6	4	70	60	10	74,1	-4,1	23,8	46,1
10	6,7	3,5	46,2	35,6	10,6	57,3	-11,1	16,1	30,1
11	6,2	2,6	34,4	30,6	3,8	32,3	2,1	11,1	23,3
12	5	1,8	18,7	19,8	-1,1	15,9	2,8	6,2	12,5
13	3,9	1,5	11,6	11,8	-0,2	11,2	0,5	4	7,7
14	2,8	1	4,8	5,9	-1,1	5,1	-0,4	1,9	2,9
Promedio	10	4,2	100,7	103,5	-2,8	98,3	2,4	36	64,6

*N=14 hojas Modelo 1. Ecuación lineal a partir del largo de la hoja: $\ln(\text{área}) = -0,3512 + 2,0623 * \ln(\text{largo})$ ($r^2 = 0,9838$)

Modelo 2. Ecuación lineal a partir del ancho de la hoja: $\ln(\text{área}) = 1,633 + 1,9274 * \ln(\text{ancho})$ ($r^2 = 0,9866$)

Modelo 3. Ecuación exponencial propuesto por Antunes *et al.* (2008): $\text{área} = 0,6626 * (\text{largo} * \text{ancho})^{1,0116}$ ($r^2 = 0,996$)

de las áreas calculadas con las ecuaciones de regresión lineal para el largo y para el ancho.

Crecimiento en vivero. En la etapa de vivero, el crecimiento en altura para las vitroplantas y plantas de semillas mostró una tendencia lineal durante los 9 meses de medición, a diferencia de lo reportado por Menéndez-Yuffá *et al.* (2010), donde se documenta una fase de retraso o crecimiento más lento en las primeras 6 semanas, lo cual, es posible que haya ocurrido en los propagadores usados en el presente estudio y por ello no se detectó en el vivero. En la presente investigación, durante los primeros cinco meses de crecimiento en vivero, las plantas de semilla presentaron una altura mayor que las vitroplantas, sin embargo, en la semana 21, ambos tipos de plantas alcanzaron en promedio la misma altura de 30 cm, coincidiendo con el reporte de Menéndez-Yuffá *et al.* (2010). Esto difiere de los resultados obtenidos por Peña y Buitrago de Serna (1984), donde las plantas de *C. arabica* var. Mundo Novo, obtenidas por embriogénesis somática alcanzan la altura de 30 cm después de permanecer 27 semanas en un fitotrón y en el umbrá-

culo; sin embargo, hay que tomar en cuenta que la diferencia puede deberse a que, de estas 27 semanas, 11 transcurrieron en un fitotrón; por otra parte, en esta investigación no se determinó paralelamente el crecimiento de plantas de semilla. Resultados similares a los de la presente investigación, fueron obtenidos por Maximova *et al.* (2008), quienes observaron que plantas de *Theobroma cacao* L. creciendo en campo eran ligeramente más altas cuando provenían de semillas que cuando procedían de embriones somáticos.

En el párrafo anterior, se evidencia que hay similitudes y diferencias entre los resultados de esta investigación y los reportados por Menéndez-Yuffá *et al.* (2010); en ambos casos se trabajó con sistemas similares en genotipo y también en el origen de las plantas, porque se compararon plantas obtenidas por embriogénesis somática y por semilla; sin embargo, algunas diferencias en el sistema empleado, podrían haber originado las discrepancias en ciertos resultados. A diferencia de la presente investigación, en el citado reporte, la embriogénesis somática se llevó a cabo en sistemas de inmersión temporal y la germinación ocurrió *ex vitro*; en cambio las plantas empleadas en este estudio provienen de un proceso de embriogénesis somática desarrollado completamente en medios semi-sólidos y por germinación *in vitro*. Investigaciones previas de Barry-Etienne *et al.* (2002b) determinaron que las diferencias morfológicas entre embriones somáticos de café obtenidos por el mismo método y diferencias en el método de germinación (*in vitro* o *ex vitro*) producen diferencias en el crecimiento de las plantas, por lo tanto, hay evidencias de que las variaciones en el sistema experimental utilizado pueden producir resultados diferentes en crecimiento y desarrollo. Al respecto, Valero-Aracama *et al.* (2007) demostraron que el crecimiento y supervivencia *ex vitro* de los genotipos de avena marina (*Uniola paniculata* L.), con diferentes capacidades de aclimatación, puede ser mejorado optimizando las condiciones de cultivo.

Debido a que se obtuvo un alto valor para el coeficiente de correlación ($r=0,969$ y $r=0,985$ para vitroplantas y plantas con semillas, respectivamente) entre el ancho y largo de las hojas que fue válida para ambos tratamientos, se consideró que el ancho y el largo tienen una relación que puede definirse muy bien a partir de una recta con forma $Y=bX+a$, donde Y es el largo de las hojas, X es el ancho, b la

pendiente y a un valor constante. Si se comparan las pendientes de estas rectas, se puede determinar en cuánto se incrementa el largo de las hojas cuando el ancho se incrementa en una unidad (en este caso, centímetros). Para plantas provenientes de embriones somáticos, un aumento en un cm en el ancho de la hoja, se tradujo en promedio en un aumento de 2,661 cm en la altura, mientras que para las de semilla, se produjo un crecimiento levemente mayor (2,707cm), lo que pudiera sugerir que las plantas cultivadas por germinación de semillas eran ligeramente más alargadas. Sin embargo, esta diferencia es mínima y no significativa, por lo tanto, utilizando la relación largo/ancho como indicador de la forma, se estimó que la forma de las hojas fue equivalente para ambos tipos de plantas (vitroplantas y semillas).

En casi todas las mediciones se encontró homogeneidad de varianza; en los pocos casos donde difería, era en una magnitud pequeña (datos no mostrados), lo cual indica que los niveles de variación en las medidas de ambas poblaciones (vitroplantas y de semillas) fueron bajos, siendo este dato un indicador de que la población que proviene de cultivo *in vitro*, no presentó mayor variación en el crecimiento que la población que proviene de semillas; en este sentido los resultados difieren de los presentados por Menéndez-Yuffá *et al.* (2010), donde se determinó que los somaclones tuvieron un crecimiento más heterogéneo que las plantas de semilla.

Para determinar si hubo diferencias en la cinética del crecimiento, se realizaron cálculos de la pendiente en cada mes y para los 9 meses de crecimiento. En ninguna de las variables, el crecimiento de las plantas de semilla fue más rápido que las plantas de embriones somáticos, y el crecimiento en altura no se estabilizó, situación que era de esperarse, porque las plantas de café requieren más tiempo de crecimiento y su trasplante al campo para alcanzar su altura máxima.

Al observar los gráficos de ancho y largo de hojas, se puede notar que las plantas de semilla presentan valores mayores que las vitroplantas hasta el mes 8 y que luego se estabilizan; este comportamiento era previsible, porque en los primeros meses, las hojas de plantas de embriones somáticos aún tenían características de miniaturización provenientes del cultivo *in vitro*, situación que se supera durante la aclimatación y adaptación a tierra; si su desarrollo es adecuado ellas deberían alcanzar por lo menos valores iguales al de

las plantas de semilla, situación que se logró en el mes 9. El crecimiento en área de las hojas en la presente investigación sigue la misma tendencia explicada para el largo y ancho de las hojas, porque el área foliar es proporcional al largo y ancho de las hojas.

Conclusiones

El método de trasplante a suelo, utilizando turba como sustrato de siembra en vivero, resultó apropiado para la aclimatación de las vitroplantas.

La presente investigación, aporta evidencias que muestran que en la etapa de vivero, las plantas de embriones somáticos tienen un desarrollo equivalente al de las plantas de semilla, que se refleja en las mediciones de crecimiento (altura, largo y ancho de la hoja, área foliar y la tasa de crecimiento de estos parámetros), forma de la hoja, y también en su vigor, siendo este un resultado importante para el desarrollo industrial de los procesos de propagación por embriogénesis somática en café.

Como un aporte adicional de la presente investigación, se proponen dos ecuaciones de regresión lineal que permiten estimar el área de la hoja de manera no destructiva, una a partir del largo $\ln(\text{área}) = -0,3512 + 2,0623 * \ln(\text{largo})$ ($r^2 = 0,9838$) de la hoja, y otra a partir del ancho de la hoja $\ln(\text{área}) = 1,633 + 1,9274 * \ln(\text{ancho})$ ($r^2 = 0,9866$); ambas ecuaciones ofrecen una estimación del área con poco error.

Agradecimientos

A la Universidad Central de Venezuela (UCV) por el apoyo académico. Al personal de la Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo” de la Facultad de Agronomía, UCV, por suministrar las plantas y semillas de café. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la UCV por el financiamiento para del proyecto N° 03-33-5127-2003. Al doctor Christophe Jourdan por su apoyo durante el escaneo de las hojas de café. Al grupo de trabajo de redacción de un trabajo científico y al Prof. Nelson Ramírez por las valiosas sugerencias durante la redacción del manuscrito.

Literatura citada

- Antunes WC, Pompelli MF, Carretero DM, DaMatta FM. 2008. Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Ann Appl Biol.* 153 (1): 33-40. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1744-7348.2008.00235.x>
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Schlönvoigt A, Etienne H. 2002a. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 68 (2):153-62. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1013874221569>
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H. 2002b. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated in vitro or ex vitro: morphological, mineral and water characteristics. *Ann Bot.* 90 (1): 77-85. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12125775>
- Campos NA, Paris B, Carpentier SC. 2017. Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Front Plant Sci.* 8:1-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28871271>
- Costa de Rezende J, Ferreira EA, Pasqual M, Villa F, Botelho CE, Pereira de Carvalho S. 2008. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffee Sci.* 3 (1): 30-7. Disponible en: <http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/70/0>
- Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett.* 32 (9): 1199-205. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455074>
- Daniel WW. 2002. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud.* 4ª ed. Atlanta: Georgia State University. Disponible en: https://www.academia.edu/17988752/Bioestadística_Base_para_el_analisis_de_las_ciencias_de_la_salud
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron.* 4 (1): 1-9. Disponible en: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Homhuan S, Kijwijan B, Wagnsomnuk P, Bodhipadma K, Leung, DWM. 2008. Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. *Sci Asia* 34: 347-52. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.505.7612&rep=rep1&type=pdf>
- Karimi S, Tavallali V, Rahemi M, Rostami AA, Vaezpour M. 2009. Estimation of leaf growth on the basis of measurements of leaf lengths and widths, choosing pistachio seedlings as model. *Aust J Basic Appl Sci.* 3 (2): 1070-5. Disponible en: <https://bit.ly/2APIsjz>

- Kumar K, Rao U. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in ex vitro conditions. A review. *J Ornament Horticult Plants*. 2 (4): 271-83.
- Maximova SN, Young A, Pishak S, Guiltinan MJ. 2008. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 44 (6): 487-93. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-008-9130-5>
- Mehta SR, Subramanian RB. 2005. Direct in vitro propagation of *Asparagus adscendens* Roxb. *Plant Tissue Cult*. 15 (1): 25-32. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.535.3482&rep=rep1&type=pdf>
- Menéndez-Yuffá A, García de García E. 1996. *Coffea* species (Coffee). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Trees IV, vol. 35. Bajaj YPS (ed.). Springer Verlag; pp. 95-119. Disponible en: <https://bit.ly/2AO6afU>
- Menéndez-Yuffá A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H. 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult*. 102 (3): 297-307. Disponible en: http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=556398
- Peña M, Buitrago de Serna HL. 1984. Adaptación de plantas de *Coffea arabica* var. Mundo Novo obtenidas por embriogénesis somática a cultivo bajo condiciones de campo. *Cenicafé* 35 (3): 66-76.
- Pérez-López C. 2005. *Métodos estadísticos avanzados con SPSS*. México DF: Editorial Thomson; 792 pp.
- Snedecor GW, Cochran WG. 1980. *Statistical methods*. 7ª ed. Iowa City: Iowa State University Press; 507 pp.
- Staritsky G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot Neerl*. 19: 509-14.
- Valero-Aracama C, Wilson SB, Kane ME, Philman NL. 2007. Influence of in vitro growth conditions on in vitro and ex vitro photosynthetic rates of easy- and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 43 (3): 237-46. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-006-9014-5>