

# Protocole d'acclimatation de plantules de caféiers produites *in vitro*

Etienne H.<sup>1</sup>, Solano W.<sup>2</sup>, Pereira A.<sup>2</sup>, Bertrand B.<sup>3</sup>, Berthouly M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP, c/o Catie/Promecafe, AP 11, 7170 Turrialba, Costa Rica

<sup>2</sup> Catie/Promecafe, AP 11, 7170 Turrialba, Costa Rica

<sup>3</sup> CIRAD-CP, c/o Cicafe/Promecafe, AP 6742, 1000 San Jose, Costa Rica

<sup>4</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

**C**e protocole convient pour des vitroplants obtenus par microbouturage ou par embryogenèse somatique. La technique a été mise au point pour un réseau d'essais et convient pour acclimater jusqu'à 30 000 plants produits en conditions de recherche. Le protocole comporte trois étapes : préparation du plant (12-24 h), acclimatation (trois mois), pépinière (cinq à six mois).

## Préparation du plant

Le vitroplant retiré du récipient de culture *in vitro* a environ quatre à cinq paires de feuilles s'il est issu de microbouture et deux à trois s'il est issu d'embryon somatique. Pour le premier, il faut éliminer les feuilles de la base afin de ne lui laisser que deux à trois paires de feuilles (photo 1). Pour favoriser la formation des racines, la base du plant ainsi « déshabillé » est placée pendant 15 à 24 h, de préférence une nuit, dans une solution d'enracinement (photo 2). Les plants issus d'embryogenèse somatique ayant deux ou trois paires de feuilles peuvent être plantés directement, sans préparation, car ils possèdent déjà un méristème racinaire.

Pour éviter les températures élevées, les vitroplants sont repiqués tôt le matin, dans un substrat stérile formé de trois parts de terre, une de sable et deux de pulpe de café décomposée. La stérilisation du terreau peut être faite par une méthode chimique (PCNB, vitavax,...) ou thermique (stérilisateur chauffant électrique ou autoclave). Dès que la plantule est mise en terre, on tasse bien le sol autour (photo 3).

## Acclimatation

Les quatre premières semaines de cette phase, qui dure trois mois, sont les plus délicates. En effet, le vitroplant venant d'un milieu aseptisé où température, lumière et humidité élevée sont contrôlées, est très fragile. Cette plantule qui photosynthétise peu, ou pas du tout, et ne possède pas de racines, est l'objet de soins intensifs pendant cette période. Les précautions suivantes doivent être prises :

- protéger la plante de la pluie et de l'excès de lumière ;
- maintenir une température constante (21-25° C) et une humidité élevée pour éviter le dessèchement.

## Contrôle de l'humidité et solutions nutritives

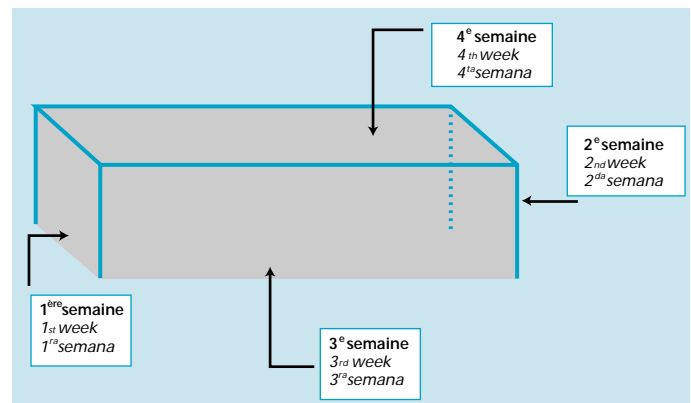
### Soins à apporter

Pour maintenir une humidité élevée pendant le premier mois, deux à trois arrosages

par jour à l'intérieur du tunnel (avec une pompe portable bien propre par exemple) sont nécessaires, l'un vers 7 h am et l'autre à 4 h pm et, éventuellement, un arrosage à midi sur le plastique pour réduire la température interne. Après cette période, le maintien du sol humide sera suffisant.

Le système racinaire des plants issus d'embryons somatiques se développe après 10 à 15 jours. Chez les microboutures, les racines commencent à sortir approximativement 15 à 22 jours après la plantation. Pendant cette période, les plants vivent sur leurs réserves ; si un léger jaunissement se manifeste, une solution nutritive peut leur être appliquée, par exemple un milieu liquide contenant les sels de Murashige et Skoog à moitié dissous (MS/2), ou tout fertilisant foliaire bien dilué (Bayfolan, 2,5 ml/l). Chaque semaine on relève un côté du tunnel en commençant par les petits côtés, ensuite les grands et, à la fin du mois, tout le plastique est éliminé (figure 1). Les plants sont

**Figure 1.** Augmentation progressive de l'aération du tunnel au cours de l'acclimatation des vitroplants de caféier. / Steady increase in air flow in the tunnel during coffee *in vitro* plantlet acclimatization. Aumento progresivo de la aireación del túnel durante la aclimatación de las plántulas de cafeto.



prêts pour supporter une humidité plus faible et une température plus élevée.

### Système d'arrosage

Il faut éviter d'arroser avec un tuyau car la distribution de l'eau n'est pas homogène et la prolifération de champignons est favorisée car il soulève la terre et la projette sur les feuilles. L'arrosage par « brumisation » lui est très supérieur : taille réduite des gouttes, équilibre hydrique des plantes, maintien d'un important degré d'humidité de l'air et d'une température plus faible.

Un système d'arrosage automatique type « brumisation » (photos 4, 5) est le plus recommandé, si on en a les moyens. Il limite le travail et arrose de façon uniforme. Ce dernier avantage évite l'apparition d'une hétérogénéité dans le développement des plantes qui persistera encore longtemps après la plantation. L'arrosage par brumisation peut être utilisé dans toutes les étapes de croissance du vitroplant. Les micro-asperseurs du début sont remplacés par d'autres à plus fort débit lorsque le plant a grandi. La combinaison tunnel / brumisation donne les meilleurs résultats, c'est-à-dire de meilleurs taux d'acclimatation et de croissance, en obtenant des plants plus sains et vigoureux. La fréquence d'arrosage

varie : elle doit être suffisante pour maintenir humides le sol et les feuilles, surtout le premier mois d'acclimatation ; ensuite il est nécessaire de réduire la fréquence et d'augmenter l'aération du tunnel pour fortifier les plantes.

Si on ne peut installer un système de brumisation automatisé, on peut utiliser une nébulisation manuelle avec une pompe portable à aspersion fine. Les premières semaines d'acclimatation, les plantules n'ayant pas encore de racines pour s'ancrer, elles risqueraient de sortir du substrat si un arrosage au tuyau était utilisé.

### Infrastructures

Pour une production expérimentale, nous recommandons les deux types de tunnel suivants :

#### Tunnel avec brumisation sous toile noire

Ce système de mini-serre, conçu spécialement pour l'acclimatation des vitroplants, est composé d'une structure de tube en PVC de 2,5 pouces de diamètre d'une hauteur d'environ 1,8 m et d'une largeur de 90 cm (figure 2). Cette structure, recouverte d'un plastique semi-transparent (photo 5) maintient une forte humidité dans le tunnel. A l'intérieur, on peut installer un système d'arrosage par micro-asperseurs donnant

un arrosage fin et homogène. Les pieds en ciment renforcent l'ancrage du tunnel au sol et, par-là même, sa résistance au vent. Les bacs reposent sur des plots de ciment, ce qui limite le contact avec le sol mouillé et réduit les maladies causées par les champignons. La pente du toit doit être importante pour éviter l'accumulation d'eau qui pourrait déformer la structure. Même si, peu à peu, les côtés du tunnel sont ouverts pour augmenter l'aération, le toit en plastique est maintenu durant les quatre mois de la phase d'acclimatation pour protéger les vitroplants de la pluie et contrôler l'arrosage. La radiation solaire doit être réduite jusqu'à environ 30 % en plaçant une toile noire à environ 50 cm au dessus du tunnel (photo 6). Cette mini-serre a donné de bons résultats car les plants poussent rapidement, de manière vigoureuse, sans avoir d'attaques de maladies ou de ravageurs (photos 5, 7).

#### Tunnel sous toit en dur

Le tunnel installé sous un toit est une assez bonne alternative. Les plants ont poussé vigoureux et sains (photo 8) en comparaison de plants se développant directement sous toile noire sans être abrités de la pluie (photo 9). Pour obtenir un éclairage adapté, les lames de zinc du toit sont alternées avec des lames de plastique semi-transparent. L'intensité de la lumière doit être d'environ 30 % de la lumière naturelle.

#### Type de récipient

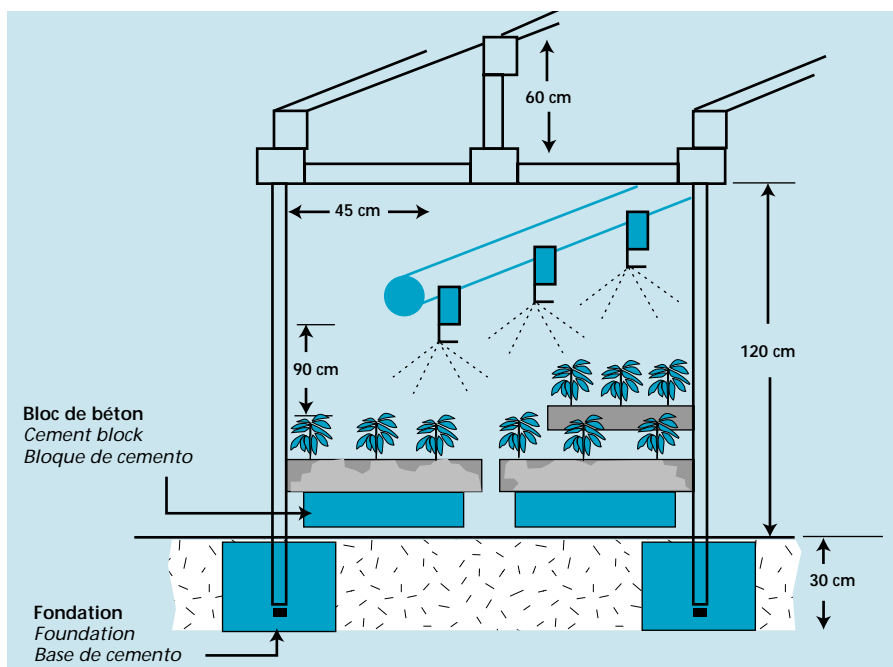
L'acclimatation peut être réalisée en sacs plastiques utilisables jusqu'à la plantation ou en bac pendant 4 mois suivis d'un transfert en sac, ou en pleine terre, pour la phase pépinière.

#### Sac plastique

Avec le sac (photo 8) le plant reste dans le même récipient depuis l'acclimatation jusqu'à la plantation au champ, ce qui ne perturbe pas sa croissance par déformation du système racinaire lors des transplantations. Il a pour inconvénient de nécessiter la stérilisation d'un volume de substrat plus important que les bacs et surtout d'utiliser au départ plus d'espace, 65 plantes par m<sup>2</sup> au lieu de 200, imposant l'installation d'une grande surface équipée du système tunnel avec arrosage par brumisation (*mist*).

#### Bac

C'est l'option à choisir s'il y a difficulté à stériliser le substrat ou si la place pour l'aire d'acclimatation équipée de tunnel avec *mist* est limitée. Sur un petit espace,



**Figure 2.** Structure en PVC du tunnel d'acclimatation de vitroplants de caféier. Ce tunnel est équipé d'une rampe de micro-asperseurs assurant un arrosage fin et homogène par brumisation. Son toit possède une forte pente destinée à éviter l'accumulation d'eau et les risques de déformation de la structure. / PVC structure of the coffee in vitro plantlet acclimatization tunnel. The tunnel is fitted with a micro-sprinkler system that ensures a fine, uniform mist. The roof slopes steeply to prevent water collecting and bending the structure. / Estructura de PVC del túnel de aclimatación de plántulas de cafeto. Este túnel está provisto de una barra de microaspersores que aseguran un riego fino y homogéneo por nebulización. Su techo posee una fuerte pendiente cuyo objeto es evitar la acumulación de agua y los riesgos de deformación de la estructura.

une grande quantité de plants peut être obtenue (photo 5). Le volume de substrat à stériliser est moindre et le bac facilite les manipulations et les échanges de plants. Mais au bout de 3 à 4 mois il faut transférer les plants, soit en sacs soit dans une pépinière (plantée en pleine terre) près de la plantation définitive (photos 7, 10).

#### Contrôle de l'éclaircissement

Tout comme pour l'humidité ambiante, l'endurcissement des vitroplants vis-à-vis de l'éclaircissement sera très progressif. Au début, pendant l'acclimatation, la lumière reçue doit être de 25 à 30 % de la lumière solaire. Au moment de la plantation, elle doit être de 100 %. Pour éviter l'apparition de brûlures sur les feuilles (photo 11), le passage de 30 % à 100 % d'éclaircissement doit être progressif en utilisant différents systèmes d'ombrage (toile noire, feuilles de bananier, feuilles de palmier).

### Passage en pépinière

#### Plants élevés en bacs

Pour éviter que les plants sortent nus du bac, il faut les extraire à l'aide d'un petit pieu (photo 10). Pour faciliter la sortie de

la motte, il est recommandé d'arrêter l'arrosage des plants deux ou trois jours avant la replantation. Si la plante ne vient pas avec sa motte ou avec une bonne quantité de terre, il faut tailler la racine.

Si on a fait le choix pour la phase pépinière d'un transfert en pleine terre plutôt qu'en sac plastique, les plants doivent être repiqués à 20 cm entre plants et lignes sur des plates-bandes d'1 m de large et 20 cm de hauteur (photos 12, 13). Lors du repiquage, il faut appliquer un fertilisant (10-30-10) et un nématicide. Il est important de réaliser ce travail le matin pour que les plantes souffrent le moins possible. Les trous dans lesquels vont être mises les plantes doivent être suffisamment grands pour que la racine ne subisse pas de déformations (photo 12). Lorsque les plants auront une taille suffisante pour être transférés au champ (photo 13), environ huit à dix mois après la sortie de l'*in vitro*, ils devront être retirés du sol avec une pelle en conservant leur motte de terre.

#### Plants élevés en sacs

Cette pépinière demande moins de préparation que celle en pleine terre. L'application de fertilisants et l'arrosage devront être plus rigoureux à cause du faible volume de

terre en sac. A l'inverse, la manipulation au moment de la plantation sera plus facile et le stress sur les plantes plus limité.

### Conclusions

Avec ce protocole, nous avons obtenu (photo 14), sur plusieurs milliers de vitroplants, des taux de reprise en acclimatation allant de 93 à 98 %, pour des volumes restant à l'échelle recherche. Le développement d'une technique de micropropagation de masse d'hybrides F1 d'Arabica à des fins commerciales en Amérique centrale nous impose, à tous les stades du procédé, de tenir compte des coûts de production et de rechercher des simplifications techniques. Les recherches actuelles sont donc orientées vers une acclimatation massive, c'est-à-dire permettant le sevrage à coût réduit de plusieurs centaines de milliers de vitroplants. ■

## Coffee *in vitro* plantlet acclimatization protocol

Etienne H.<sup>1</sup>, Solano W.<sup>2</sup>, Pereira A.<sup>2</sup>, Bertrand B.<sup>3</sup>, Berthouly M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP, c/o Catie/Promecafe, AP 11, 7170 Turrialba, Costa Rica

<sup>2</sup> Catie/Promecafe, AP 11, 7170 Turrialba, Costa Rica

<sup>3</sup> CIRAD-CP, c/o Cicafe/Promecafe, AP 6742, 1000 San Jose, Costa Rica

<sup>4</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

This protocol is applicable to *in vitro* plantlets produced by microcutting or somatic embryogenesis. The technique was developed for a trial network and is suitable for acclimatizing up to 30,000 plantlets produced under laboratory conditions. The protocol includes three stages: plantlet preparation (12-24 h), acclimatization (three months), nursery (five to six months).

#### Plantlet preparation

On removal from the *in vitro* culture container, the plantlet has around four to five pairs of leaves if it was produced by microcutting and two to three if produced by somatic embryogenesis. On the first type, the bottom leaves should be removed, leaving just two to three pairs (photo 1). To foster root formation, the base of the "stripped" plantlet is placed for

15 to 24 h, preferably overnight, in a rooting solution (photo 2). Plantlets produced by somatic embryogenesis with two or three pairs of leaves can be planted directly, with no prior preparation, as they already have a root meristem.

To avoid high temperatures, the *in vitro* plantlets are transferred early in the morning to a sterile substrate comprising three parts soil to one part sand and two parts decomposed coffee pulp. The substrate can be sterilized chemically (PCNB, vitavax, etc.) or by heat (electric heat sterilizer or autoclave). Once the plantlet has been pricked out, the soil around it is tamped down (photo 3).

#### Acclimatization

The first four weeks of this phase, which lasts three months, are the most critical. In fact, the

*in vitro* plantlets, taken from an aseptic environment where temperature, light and high relative humidity were controlled, are extremely fragile. The plantlets photosynthesize very little, if at all, and do not have roots, hence they require intensive care during this stage. The following precautions should be taken:

- protect the plants from the rain and from bright light;
- maintain a constant temperature (21-25°C) and high relative humidity to prevent the plants drying out.

Controlling relative humidity and nutritive solutions

#### Precautions

To maintain high relative humidity during the first month, the plants are watered two or three times a day inside the tunnel (for example with

a clean portable pump), once at around 7:00 am and once at 4:00 pm, perhaps watering the plastic at midday to reduce the inside temperature. After this stage, it is sufficient to keep the soil moist.

The root system of plants produced by somatic embryogenesis develops after about ten to 15 days. On microcuttings, the roots begin to emerge around 15 to 22 days after planting. During this period, the plants live off their reserves; if they begin to turn yellow, a nutritive solution can be applied, for instance a liquid medium containing semi-dissolved Murashige and Skoog's mineral salts (MS/2) or any well diluted leaf fertilizer (Bayfolan, 2.5 ml/l). Each week, one side of the tunnel is lifted, beginning with the short and then the long sides, eventually removing all the sides after a month (figure 1). The plants can then withstand lower relative humidity and higher temperatures.

#### **Watering system**

It is important not to water with a hose, as the water is not evenly distributed and facilitates fungus development as it splashes soil onto the leaves. "Misting" is much better: the droplets are smaller, the water is evenly distributed to the plants and a high relative humidity and lower temperature are maintained.

An automatic misting type system (photos 4, 5) is recommended, if economically feasible, since it reduces the workload and waters evenly. This latter aspect prevents heterogeneous plantlet development, which persists well beyond field planting. Misting can be used at every stage of plantlet growth. The micro-sprayers used initially can be replaced with others with a higher flow rate once the plants have grown. The tunnel/misting combination gives the best results, i.e; the best acclimatization and growth rates, and ensures healthier, more vigorous plants. The watering frequency varies: it should keep the soil and the leaves moist, particularly during the first month of acclimatization; the frequency is subsequently reduced and the air flow through the tunnel increased to harden the plants.

If it is not possible to install an automatic misting system, manual fogging with a fine spray portable pump can be used, but during the first weeks of acclimatization, the plantlets do not yet have any roots to anchor them and could therefore be washed out of the substrate if a hose were used.

#### **Infrastructures**

For experimental production, we recommend the following two types of tunnel:

##### **Tunnel with misting under black canvas**

This mini-greenhouse system, designed specially for *in vitro* plantlet acclimatization, comprises a

2.5-inch diameter plastic tubular structure around 1.8 m high and 90 cm wide (figure 2). The structure is covered with translucent plastic (photo 5) to maintain a high relative humidity in the tunnel. A micro-sprayer system can be installed in the tunnel to ensure fine, homogeneous watering. The concrete supports anchor the tunnel to the ground and strengthen its wind resistance. The trays are also placed on concrete blocks to reduce contact with the damp ground and fungus development. The roof of the tunnel should slope steeply to prevent water collecting and bending the structure. Even if the sides of the tunnel are gradually opened to increase air flow, the plastic roof is kept for all four months of the acclimatization phase to protect the *in vitro* plantlets from the rain and control the amount of water they receive. Solar radiation is reduced to around 30% by installing black canvas around 50 cm above the tunnel (photo 6). This mini-greenhouse gives good results, since the plants grow rapidly and vigorously and do not suffer from pest or disease attacks (photos 5, 7).

##### **Tunnel under a rigid roof**

Installing a tunnel under a roof is a good alternative. When we tested it, the plants grew to be vigorous and healthy (photo 8) compared with plants grown directly under black canvas with no protection from the rain (photo 9). To ensure appropriate lighting, the zinc sheets on the roof are alternated with translucent plastic sheets. Light intensity should be around 30% of natural light.

#### **Type of container**

Acclimatization can be carried out in polybags right up to planting, or in trays for four months before transfer to polybags, or in open soil for the nursery phase.

##### **Polybags**

With bags (photo 8), the plants remain in the same container from acclimatization up to field planting, which avoids disrupting growth due to root system deformation during transfer. The drawback is that a larger quantity of substrate has to be sterilized than when using trays and that it takes more space (65 plants per m<sup>2</sup> rather than 200), which means that a large area has to be set aside for a tunnel with a misting system.

##### **Trays**

This is the option to choose if it is difficult to sterilize the substrate or if there is limited room to install a tunnel plus misting system. Large numbers of plants can be produced in a small space (photo 5). Less substrate has to be sterilized and trays facilitate handling and plant exchanges. However, the plants have to be transferred after three to four months, either to polybags or to the nursery (open soil) near the final planting site (photos 7, 10).

#### **Controlling lighting**

As with the relative humidity, *in vitro* plantlet hardening with respect to light will be very gradual. Initially, during acclimatization, the light received should be 25 to 30% of natural sunlight. By the time of planting, it should be 100%. To prevent the leaves being scorched (photo 11), the shift from 30 to 100% of natural light should be gradual, using different shading devices (black canvas, banana leaves, palm leaves).

#### **Transfer to the nursery**

##### **Plants reared in trays**

To avoid taking the plants out of the trays with bare roots, a small stick should be used (photo 10). To facilitate the removal of the ball of earth, the plants should be watered two or three days before transfer. If the plant does not have a ball or at least a reasonable amount of earth on the root, the root should be cut.

If the choice for the nursery phase is transfer to open soil rather than to polybags, the plants should be planted 20 cm apart with 20 cm between rows, in beds 1 m wide and 20 cm high (photos 12, 13). A fertilizer (10-30-10) and a nematicide should be applied. It is important to carry out this operation in the morning so that the plants suffer as little as possible. The planting holes should be sufficiently large not to deform the root (photo 12). Once the plants are large enough for transfer to the field (photo 13), around eight to ten months after leaving *in vitro* culture, they should be dug up, keeping a ball of earth around the roots.

##### **Plants reared in polybags**

This type of nursery calls for less preparation than open soil nurseries. Fertilizer applications and watering have to be more stringent, given the small amount of soil in the bag. However, handling at the time of planting will be easier and the plants will suffer less stress.

#### **Conclusions**

With this protocol, we obtained (photo 4) a striking rate for the acclimatization phase of 93 to 98% with several thousand *in vitro* plantlets, on a research scale. Developing a commercial F1 Arabica hybrid mass micropropagation technique in Central America means taking account of production costs and seeking technical simplifications at every stage of the procedure. The current research is therefore geared towards mass acclimatization, i.e. low-cost weaning of several hundred thousand *in vitro* plantlets. ■



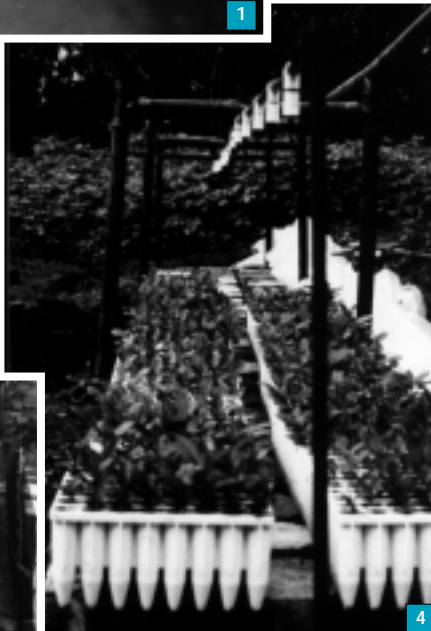
1



2



3



4



5



6



7

H. Etienne

**Photo 1.** Préparation d'une microbouture en vue de l'acclimatation. / *Preparing a microcutting for acclimatization.* / Preparación de un microinjerto con miras a acclimatarlo.

**Photo 2.** Trempage de la tige des microboutures dans une solution auxinique pour induire la formation d'un système racinaire. / *Soaking the stem of a microcutting in an auxin solution to induce root system formation.* / Remojo del tallo de los microinjertos en una solución auxínica para inducir la formación de un sistema radicular.

**Photo 3.** Plantation du vitroplant dans un terreau préalablement stérilisé. / *Planting an in vitro plantlet in a sterilized substrate.* / Plantación de la plántula clonal en un mantillo previamente esterilizado.

**Photo 4.** Vue de la structure en PVC du tunnel d'acclimatation de vitroplants équipé d'une rampe de micro-asperseurs. / *View of the PVC structure of an in vitro plantlet acclimatization tunnel fitted with a micro-sprinkler system.* / Vista de la estructura de PVC del túnel de acclimatación de plántulas clonales provisto de una barra de microaspersores.

**Photo 5.** Bacs de vitroplants de caféiers en cours d'acclimatation dans un tunnel équipé d'un système d'arrosage par brumisation. / *Trays of coffee in vitro plantlets being acclimatized in a tunnel fitted with a misting system.* / Macetas de plántulas clonales de café pendiente de acclimatación en un túnel provisto de un sistema de riego por nebulización.

**Photo 6.** Tunnel d'acclimatation placé sous l'ombrage d'une toile noire. / *Acclimatization tunnel under a black canvas shade.* / Túnel de acclimatación colocado bajo la sombra de un zarán.

**Photo 7.** Vitroplants de caféiers acclimatés (4 mois) extraits des bacs en vue d'un transfert en pépinière en pleine terre. / *Acclimatized coffee in vitro plantlets (four months) removed from trays for transfer to an open soil nursery.* / Plántulas clonales de café acclimatadas (4 meses) extraídas de las macetas con miras a un transplante en vivero en tierra.



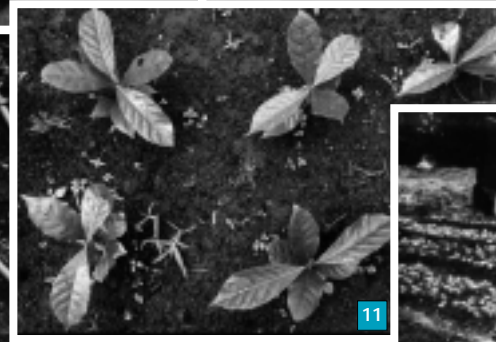
8

ACLIMATACION BAJO  
TECHO

9

ACLIMATACION BAJO  
ZARAN

10



11



12



13



14

H. Etienne

**Photo 8.** Vitroplants de caféiers après 5 mois de développement sous toit. / *Coffee in vitro plantlets after five months' development under a roof.* / Plántulas clonales de café al cabo de 5 meses de desarrollo bajo techo.

**Photo 9.** Vitroplants de caféiers après 5 mois de développement sous toile noire. / *Coffee in vitro plantlets after five months' development under a black canvas shade.* / Plántulas clonales de café al cabo de 5 meses de desarrollo bajo zarán.

**Photo 10.** Extraction des vitroplants acclimatés hors des bacs d'acclimatation. / *Removing acclimatized coffee in vitro plantlets from acclimatization trays.* / Extracción de las plántulas acclimatadas fuera de las macetas de acclimatación.

**Photo 11.** Aspect des brûlures sur les feuilles causées par un passage trop rapide au plein soleil. / *Scorch marks on leaves caused by an abrupt shift to full sunlight.* / Aspecto de las quemaduras en las hojas provocadas por un transplante demasiado rápido a pleno sol.

**Photo 12.** Plantation d'une pépinière de vitroplants d'embryons somatiques et de microboutures en pleine terre. / *Planting an open-soil nursery with somatic embryos and microcuttings.* / Siembra de un vivero de plántulas clonales de embriones somáticos y de microinjertos en tierra.

**Photo 13.** Aspect d'une bande de vitroplants après plantation en pépinière (4 mois après la sortie de l'*in vitro*). / *Bed of in vitro plantlets after planting in the nursery (four months after leaving in vitro culture).* / Aspecto de una cama de plántulas después de la siembra en vivero (4 meses después de la salida del *in vitro*).

**Photo 14.** Aspect d'une pépinière de vitroplants de caféiers Arabica 9 mois après la sortie de l'*in vitro*. / *An Arabica in vitro plantlet nursery nine months after leaving in vitro culture.* / Aspecto de un vivero de plántulas de cafeto Arabica 9 meses después de la salida del *in vitro*.

# Protocolo de aclimatación de plántulas de cafetos producidas *in vitro*

Etienne H.<sup>1</sup>, Solano W.<sup>2</sup>, Pereira A.<sup>2</sup>, Bertrand B.<sup>3</sup>, Berthouly M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP, c/o Catie/Promecafe, AP 11, 7170 Turrialba, Costa Rica

<sup>2</sup> Catie/Promecafe, AP 11, 7170 Turrialba, Costa Rica

<sup>3</sup> CIRAD-CP, c/o Cicafe/Promecafe, AP 6742, 1000 San Jose, Costa Rica

<sup>4</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia

Este protocolo es apropiado para plántulas clonales conseguidas mediante microinjerto o mediante embriogénesis somática. La técnica fue desarrollada para una red de ensayos y conviene para aclimatar hasta 30.000 plantas producidas en condiciones de investigación. El protocolo incluye 3 pasos: preparación de la planta (12-24 h), aclimatación (tres meses), vivero (cinco a seis meses).

## Preparación de la planta

La plántula clonal sacada del recipiente de cultivo *in vitro* tiene unas 4 a 5 pares de hojas si oriunda de microinjerto y 2 a 3 si proviene de embrión somático. Para el primero, se merece eliminar las hojas de la base a fin de no dejarle más que dos a tres pares de hojas (foto 1). Para favorecer la formación de las raíces, se coloca la base de la planta así “desvestida” durante 15 a 24 h, preferentemente una noche, en una solución de enraizamiento (foto 2). Las plantas procedentes de embriogénesis somática que tienen dos o tres pares de hojas pueden sembrarse directamente, sin preparación, puesto que poseen ya un meristemo radicular.

Para evitar las temperaturas altas, las plántulas clonales se transplantan temprano por la mañana, en un sustrato estéril formado por tres partes de tierra, una de arena y dos de broza de pulpa de café. La esterilización del mantillo puede realizarse por método químico (PCNB, vitavax...) o térmico (esterilizador calentador eléctrico o autoclave). Tan pronto como se coloca la plántula en tierra, se apisona bien el suelo alrededor (foto 3).

## Aclimatación

Las cuatro primeras semanas de esta fase, que dura tres meses, son las más primorosas. En efecto, es muy frágil la plántula clonal, que viene de un medio asepticado donde se controlan temperatura, luz y humedad alta. Esta plántula que fotosintetiza poco, o nada, y no posee raíces, es objeto de cuidados intensivos durante este período. Deben tomarse las siguientes precauciones:

- proteger la planta de la lluvia y del exceso de luz;
- mantener una temperatura constante (21-25° C) y una humedad alta para evitar la desecación.

Control de la humedad y soluciones nutritivas

### Cuidados que prestar

Para mantener una humedad elevada durante el primer mes, se requieren dos a tres riegos diarios dentro del túnel (con una bomba portátil bien limpia por ejemplo), uno a eso de las 7 h am y el otro a las 4 h pm y, eventualmente, un riego a mediodía sobre el plástico para reducir la temperatura interna. Después de este período, bastará con mantener el suelo húmedo.

Al cabo de 10 a 15 días, se desarrolla el sistema radicular de las plantas procedentes de embriones somáticos. En los microinjertos, las raíces empiezan a salir aproximativamente 15 a 22 días después de la siembra. Durante este tiempo, las plantas viven de sus reservas; en caso de manifestarse un ligero amarillamiento, se les puede aplicar una solución nutritiva, por ejemplo un medio líquido que contiene los sales de Murashige y Skoog medio disueltos (MS/2), o cualquier fertilizante foliar bien diluido (Bayfolan, 2,5 ml/l). Cada semana se levanta un lado del túnel empezando por los pequeños lados, y luego los grandes y, al fin del mes, se elimina todo el plástico (figura 1). Las plantas están listas para aguantar una humedad más baja y una temperatura más alta.

### Sistema de riego

Es preciso procurar no regar con una manguera puesto que la distribución del agua no resulta homogénea y facilita la proliferación de hongos dado que levanta la tierra y la proyecta en las hojas. El riego por “nebulización” lo supera con creces: tamaño reducido de las gotas, equilibrio hídrico de las plantas, mantenimiento de un importante grado de humedad del aire y de una temperatura más baja.

Un sistema de riego automático tipo “nebulización” (fotos 4, 5) es el que más se recomienda, en caso de tener recursos. Limita el labor y riega uniformemente. Esta última ventaja evita que aparezca una heterogeneidad en el desarrollo de las plantas que persistirá aún mucho tiempo después de la siembra. El riego por nebulización puede utilizarse en todas las fases de crecimiento de la plántula clonal. Una vez que la planta haya crecido, se reemplazan los microaspersores del principio por otros de caudal más potente. La combinación túnel/nebulización da los mejores resultados, a saber

mejores tasas de aclimatación y de crecimiento, al obtener plantas más sanas y vigorosas. La frecuencia de riego varía: debe mantener húmedo el suelo y las hojas, sobre todo el primer mes de aclimatación; y luego se vuelve necesario reducir la frecuencia e incrementar la aeración del túnel para fortificar las plantas.

En caso de no poder instalar un sistema de nebulización automatizada, se puede utilizar una nebulización manual con una bomba portátil de aspersión fina. En las primeras semanas de aclimatación, las plántulas que no tienen aún raíces para arraigarse, podrían salirse del sustrato en caso de utilizar el riego con manguera.

## Infraestructuras

Para una producción experimental, recomendamos los dos tipos de túnel siguientes:

### Túnel con nebulización bajo zarán

Este sistema de miniinvernadero, concebido especialmente para la aclimatación de las plántulas clonales, está compuesto de una estructura de tubo de PVC de 2,5 pulgadas de diámetro de una altura de unos 1,8 m y de una longitud de 90 cm (figura 2). Esta estructura, recubierta de un plástico semitransparente (foto 5) mantiene una fuerte humedad dentro del túnel. Al interior, se puede instalar un sistema de riego por microaspersores que proporcionan un riego fino y homogéneo. Los pies de cemento refuerzan el anclaje del túnel en el suelo y, asimismo, su resistencia al viento. Las macetas se apoyan en travesaños de cemento, lo que limita el contacto con el suelo mojado y reduce las enfermedades causadas por los hongos. La pendiente del techo debe ser importante para evitar la acumulación de agua que podría deformar la estructura. Inclusive si se abren poco a poco los lados del túnel para aumentar la aireación, el techo de plástico se mantiene durante los cuatro meses de la fase de aclimatación para proteger las plántulas clonales de la lluvia y controlar el riego. La radiación solar debe reducirse hasta aproximadamente el 30% al colocar un zarán a unos 50 cm por encima del túnel (foto 6). Este miniinvernadero dio buenos resultados puesto que las plantas crecen rápida y vigorosamente, sin sufrir ataque de enfermedades o de plagas (fotos 5, 7).

**Túnel bajo techo sólido**

El túnel instalado bajo un techo es una bastante buena alternativa. Las plantas crecieron vigorosas y sanas (foto 8) en comparación con plantas que se desarrollan directamente bajo zarán sin abrigarse de la lluvia (foto 9). Para conseguir una luz adaptada, se alternan las láminas de zinc del techo con láminas de plástico semitransparente. La intensidad de la luz debe ser de aproximadamente el 30% de la luz natural.

**Tipo de recipiente**

Se puede realizar la aclimatación en bolsas de plástico utilizables hasta la siembra o en maceta durante 4 meses, y luego una transferencia en bolsa, o en tierra para la fase vivero.

**Bolsa de plástico**

Con la bolsa (foto 8) la planta se queda en el mismo recipiente desde la aclimatación hasta la siembra en el campo, lo que, al transplantarlas, no perturba su crecimiento por deformación del sistema radicular. Su inconveniente es que necesita la esterilización de un volumen de sustrato más importante que las macetas y sobre todo que utiliza al principio más espacio, 65 plantas por m<sup>2</sup> en lugar de 200, lo que impone la instalación de una gran superficie provista del sistema de túnel con riego por nebulización (*mist*).

**Maceta**

Es la opción por elegir en caso de encontrar dificultad en esterilizar el sustrato o en caso de que el espacio se halle limitado para el área de aclimatación provista de túnel con *mist*. En un espacio limitado, se puede lograr una gran cantidad de plantas (foto 5). El volumen de sustrato por esterilizar es menor y la maceta

facilita las manipulaciones y los intercambios de plantas. Pero al cabo de 3 a 4 meses es preciso transplantar las plantas, ya sea en bolsas ya sea en un vivero (sembrado en tierra) cerca de la plantación definitiva (fotos 7, 10).

**Control de la luz**

Igual que para la humedad ambiente, las plántulas clonales se irán acostumbrando progresivamente a la luz. Al inicio, durante la aclimatación, la luz recibida debe ser del 25 al 30% de la luz solar. En el momento de la siembra, debe ser del 100%. Para evitar la aparición de quemaduras en las hojas (foto 11), se tiene que pasar progresivamente del 30% de luz al 100%, al utilizar diferentes sistemas de sombra (zarán, hojas de banano, hojas de palmera)

**Transplante al vivero****Plantas criadas en macetas**

Para evitar que las plantas salgan nudas de la maceta, se merece extraerlas ayudándose con una pequeña estaca (foto 10). Para facilitar la salida del terrón de tierra, se recomienda interrumpir el riego de las plantas, dos o tres días antes del transplante. Si la planta no viene con su terrón de tierra o con una buena cantidad de tierra, es preciso cortar la raíz.

En caso de seleccionar para la fase vivero un transplante en tierra más bien que en bolsa de plástico, las plantas deben transplantarse a 20 cm entre plantas e hileras en platabandas de 1 m de largo y 20 cm de altura (fotos 12, 13). Al transplantarlas, es preciso aplicar un fertilizante (10-30-10) y un nematicida. Es importante

realizar este labor por la mañana para que las plantas padezcan lo menos posible. Los hoyos en los cuales se van a instalar las plantas deben ser lo suficientemente grandes para que la raíz no sufra deformaciones (foto 12). Cuando las plantas tendrán un tamaño suficiente para ser transplantadas en el campo (foto 13), aproximadamente ocho a diez meses después de la salida del *in vitro*, se tendrán que retirar del suelo con una pala al conservarles su terrón de tierra.

**Plantas criadas en bolsas**

Este vivero requiere menos preparación que el de tierra. La aplicación de fertilizantes y el riego tendrán que ser más rigurosos debido a su bajo volumen de tierra en bolsa. Al contrario, la manipulación en el momento de la siembra resultará más fácil y el estrés en las plantas más limitado.

**Conclusiones**

Aplicando este protocolo, hemos conseguido (foto 14), en varios millares de plántulas clonales, tasas de enraizamiento en aclimatación yendo del 93 al 98%, a saber para volúmenes que se quedan dentro de una escala de investigación. El desarrollo de una técnica de micropropagación de masa de híbridos F1 de Arabica con fines comerciales en América central nos impone, en todas las fases del procedimiento, tomar en cuenta los costos de producción y buscar simplificaciones técnicas. Las investigaciones actuales se orientan por lo tanto hacia una aclimatación masiva, ya sea que permite cambiar el sustrato a costo reducido para varias centenas de millares de plántulas clonales.■