

Genética y mejoramiento

Influencia de concentraciones de Vitrofuroral en la esterilización de medios de cultivos en la propagación *in vitro* de *Coffea arabica* L.¹

Nosleiby Ortiz-Gómez*, Yusdel Ferrás-Negrín*, Elsa Vicet-González* y Noel Bermúdez-Ramírez*

Resumen

La investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la influencia de diferentes concentraciones de Vitrofuroral en la esterilización de medios de cultivo en la propagación *in vitro* del descendiente F1 de *Coffea arabica* L. Se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, provincia de Villa Clara, Cuba, en 2017. Se estudiaron diferentes concentraciones (60 mg • L⁻¹, 80 mg • L⁻¹, 100 mg • L⁻¹ y 116 mg • L⁻¹ como control) de Vitrofuroral en la esterilización de medios de cultivos semisólidos para la formación de callos. Se evaluó la contaminación, oxidación, explantes con calogénesis, masa seca y fresca, y la consistencia de los explantes, realizando la comparación de sus valores mediante la prueba de Tukey y Kruskal Wallis con previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza utilizando el paquete estadístico InfoStat, 2012 versión 1.0. Las concentraciones de Vitrofuroral influyeron en la esterilización de medios de cultivo en la fase de formación de callos para la propagación *in vitro* del descendiente F1 de *Coffea arabica* L. La concentración de 80 mg • L⁻¹ resultó ser la más económica sin diferir de las concentraciones superiores en la contaminación de los explantes. Las concentraciones de Vitrofuroral no influyeron en la inducción de calogénesis y en la consistencia de los explantes; sin embargo, con 80 y 60 mg • L⁻¹ se aumentó significativamente la masa seca de los callos.

Palabras clave: café, consistencia, contaminación, explantes, friable.

Abstract

The investigation was developed with the objective of evaluating the influence of different Vitrofuroral concentrations in the sterilization of cultivations medium in the propagation *in vitro* descendant's F1 of *Coffea arabica* L. It was carried out in the vegetable biotechnology laboratory of the Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, Villa Clara province, Cuba, in the 2017 year. Different Vitrofuroral concentrations were studied (60 mg • L⁻¹, 80 mg • L⁻¹, 100 mg • L⁻¹ and 116 mg • L⁻¹ as control) in the sterilization of cultivations medium semisolids for the calluses formation. The contamination, oxidation, explants was evaluated with call genesis, dry and fresh mass, and the consistency of the explants, carrying out the comparison of its values by means of the test of Tukey and Kruskal Wallis with previous confirmation of the suppositions of normality and variance homogeneity using the statistical package InfoStat, 2012 version 1.0. The Vitrofuroral concentrations of influenced in the sterilization of cultivations medium in the phase of calluses formation for the *in vitro* propagation of the descendant's F1 of *Coffea arabica* L. The concentration of 80 mg • L⁻¹ turned out to be the most economic without differing of the superior concentrations in the contamination of the explants. The Vitrofuroral concentrations didn't influence in the call genesis induction and in the consistency of the explants; however, with 80 and 60 mg • L⁻¹ was increased the dry mass of the calluses significantly.

Key words: coffee, consistency, contamination, explants, friable.

¹ Recibido: 10/5/2018

Aprobado: 14/3/2019

* Estación Experimental Agro-Forestal de Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara, Cuba. nosly@jibacoa.inaf.co.cu

Introducción

El café constituye la segunda mercancía comercializada en el mundo después del petróleo (Fernández *et al.*, 2010). En las plantaciones cafetaleras cubanas el 23 % rinden 0,34 t/ha⁻¹, siendo el envejecimiento una de las causas principales de los bajos rendimientos de los volúmenes productivos. Para revertir esta problemática se implementa un programa de desarrollo que prevé transformar las plantaciones para elevar los rendimientos y los volúmenes de productivos (Sánchez y col., 2012).

La embriogénesis somática tiene un gran potencial para la multiplicación rápida y en gran escala de variedades seleccionadas en una amplia gama de especies económicamente importantes, incluyendo el cultivo del café (Etienne *et al.*, 2016); permite la regeneración de plántulas a gran escala utilizando fragmentos de hojas como material inicial (Rezende *et al.*, 2016).

Para la regeneración de plantas por técnicas biotecnológicas es esencial la esterilización de medios de cultivos, mediante el cual se obtiene un sustrato libre de microorganismos. Se pueden emplear diferentes métodos de esterilización; dentro de estos, el método químico, el cual presenta como principal problema para su uso el efecto tóxico que provocan a los órganos, tejidos y células vegetales.

La planta de producción del Centro de Bioactivos Químicos de Villa Clara produce Vitrofur, el que se emplea como aditivo para los medios de cultivo en la producción de vitroplantas (Díaz y col., 2012).

El Vitrofur es derivado de plantas de caña de azúcar, que se ha utilizado en la industria médica y cultivo de tejidos vegetales. El ingrediente activo es 1-(5-bromo-2-IL)-2-bromo-a-nitroeteno G-1, siendo efectivo para bacterias y hongos, puede usarse en el medio de cultivo sin ningún efecto tóxico sobre el tejido vegetal. Estas características lo convierte en una alternativa atractiva en la regeneración de plantas *in vitro* (Escalona *et al.*, 2010).

El Vitrofur sustituye el proceso de esterilización por autoclave, reduce el consumo de agente gelificante en un 35 %, aumenta el coeficiente de multiplicación entre 0,3 y 0,5, la productividad y mejora las condiciones de trabajo y un considerable ahorro de energía eléctrica (Scholz *et al.*, 2013).

El Vitrofur se ha utilizado en la esterilización de medios de cultivos para la propagación *in vitro* de especies como plátanos, bananos, caña, papa, eucalipto,

piña, ajo, cebolla, cítricos y cerezos, en los que se ha demostrado su efectividad. La concentración recomendada para su uso en la esterilización de medios de cultivos para la regeneración de plantas *in vitro* es de 116 mg • L⁻¹ (Silveira y col., 2010).

En la esterilización de medios de cultivos empleados para la fase de formación de callos de café no se evidencian estudios donde se muestre la efectividad de este producto con el empleo de concentraciones inferiores a la recomendada para otras especies. La investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la influencia de diferentes concentraciones de Vitrofur en la esterilización de medios de cultivo en la fase de formación de callos para la propagación *in vitro* de híbridos F1 de *Coffea arabica* L.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, localizado en el municipio de Manicaragua, provincia de Villa Clara, Cuba, durante el período comprendido de enero a mayo de 2017.

El material vegetal utilizado para la propagación *in vitro* fue un descendiente F1, del cruzamiento de la variedad Caturra rojo con cafetos silvestres (Lacerra y col., 2012). Se les realizaron actividades agrotécnicas manteniéndolas en un óptimo estado vegetativo y fitosanitario. Se colectaron de estas los segundos pares de hojas ubicadas en las ramas plagiotrópicas del tercio medio, y se seleccionaron las que no presentaban afectaciones por plagas, enfermedades ni deformaciones.

Las hojas colectadas se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología, se lavaron individualmente en agua con detergente comercial y se enjuagaron con agua limpia. Seguidamente en el área aséptica se desinfectaron con hipoclorito de sodio según la metodología propuesta por Ortiz y col. (2017). Se seleccionaron de las hojas desinfectadas explantes de 1,0 cm² aproximadamente, desechando las que estuvieran dañadas por el hipoclorito de sodio, los bordes y las nervaduras de estas. Se ubicaron con el haz en contacto con el medio de cultivo.

Se utilizó un medio de cultivo para formación de callos de café, se esterilizó con diferentes concentraciones de Vitrofur con los que se conformaron los siguientes tratamientos:

1. Vitrofuroral al 60 mg • L⁻¹
2. Vitrofuroral al 80 mg • L⁻¹
3. Vitrofuroral al 100 mg • L⁻¹
4. Vitrofuroral al 116 mg • L⁻¹ (recomendada por el fabricante para la esterilización de medios de cultivos para el cultivo *in vitro* de plantas (Silveira y col., 2010).

El esterilizante químico se incorporó a una porción del medio de cultivo cuando tuvo una temperatura aproximada entre 80-85 °C y se incorporó al resto del mismo agitando vigorosamente para lograr una homogeneización total y evitar la sedimentación del producto.

Se utilizaron por tratamiento 115 explantes, los que se colocaron en el medio de cultivo y permanecieron por 90 días a la oscuridad, a una temperatura de ± 25 °C. Se evaluaron las variables siguientes:

1. Contaminación (%) (5 y 90 días).
2. Explantes oxidados (%) (15, 20, 30 y 90 días).
3. Explantes con callogénesis (%) (15, 20, 30 y 90 días).

A los 90 días se les evaluó a los callos formados.

1. Masa seca (g).
2. Consistencia (%).

Para determinar los porcentos de oxidación, contaminación y de explantes con callogénesis se realizó por la metodología propuesta por López *et al.* (2011).

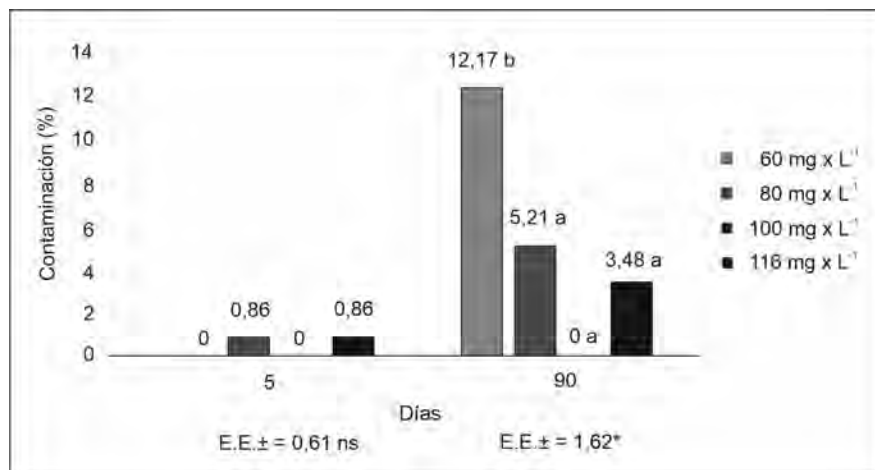
El peso fresco y el peso seco se determinaron mediante una balanza analítica Radwad de 0,1 mg de precisión. El peso seco se obtuvo en una estufa hasta alcanzar peso constante.

Se empleó la metodología utilizada por González, Santana y López (2001) para evaluar la consistencia.

La comparación de valores de la contaminación, explantes oxidados, porcentaje de explantes con callogénesis y la consistencia se realizó mediante la prueba de Tukey; la masa fresca y seca mediante prueba de Kruskal Wallis con previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza utilizando el paquete estadístico versión 1.0 (InfoStat, 2012).

Resultados y discusión

La contaminación que se observó en el medio de cultivo y en los explantes en todo el proceso de formación de callo fue causada por hongos. La utilización de distintas concentraciones del Vitrofuroral en el medio de cultivo produjo efecto diferenciado en la contaminación microbiana (Fig. 1).



*Valores con letras diferentes difieren según la prueba de Tukey para $p < 0,05$;

^{ns} No significativo para $p < 0,05$.

Fig. 1. Influencia de las concentraciones de Vitrofuroral en la contaminación de explantes (%).

En la evaluación realizada a los cinco días se observó que la aparición de agentes contaminantes en los diferentes tratamientos se obtuvieron resultados similares; a

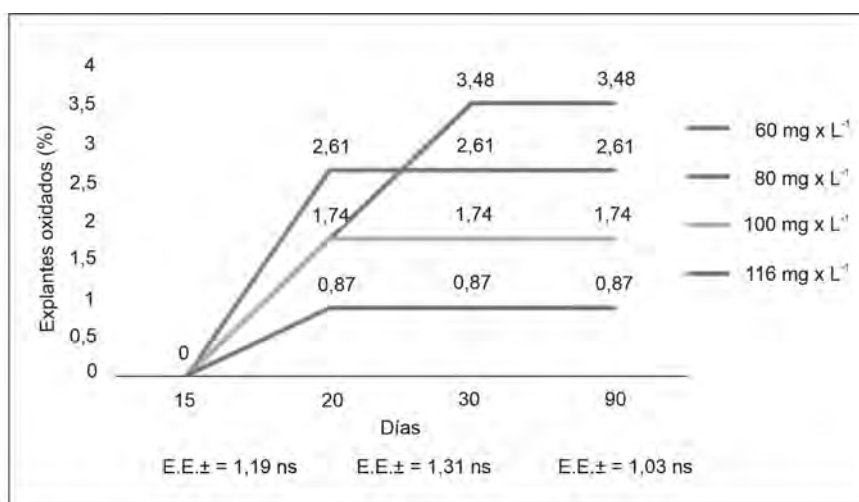
los 90 días se apreció que la concentración de 60 mg • L⁻¹ aumentó la aparición de contaminación con diferencia estadística significativa con respecto a los demás tratamientos.

Se demostró que se puede emplear el Vitrofuroral a concentraciones inferiores a $116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en la esterilización de medios de cultivo para formación de callos de cafetos, con el empleo de $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ se obtienen resultados similares a esta concentración recomendada.

Ortiz y col. (2018) plantearon que el Vitrofuroral es efectivo en la esterilización de medios de cultivos semisólidos para la formación de callos de cafeto, donde reporta un 4,15 % de contaminación en una concentración de $116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Quintana y col. (2006) refirieron que el Vitrofuroral es uno de los esterilizantes químicos usados con éxito

para el control de contaminantes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; con el empleo de concentraciones de $116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de principio activo) informaron valores inferiores al 2,5 % de contaminación en la propagación *in vitro* de *Vigna luteola* SC-123 y *Macroptiliumatro purpureum* SE-72.

A los 20 días de establecidos los explantes en el medio de cultivo se apreció la presencia de algunos necrosados, con una coloración carmelita oscuro. Estos daños se dejaron de observar en los restantes a partir de los treinta días (Fig. 2).



^{ns} No significativo según prueba de Tukey para $p < 0,05$.

Fig. 2. Explantes oxidados (%) en los diferentes tratamientos evaluados.

Las concentraciones de Vitrofuroral empleadas no influyeron significativamente en la oxidación de los explantes, los cuales no superaron el 3,48 % en los diferentes tratamientos evaluados. Estas muertes pudieran estar asociadas a la acción de productos utilizados en el proceso de desinfección al que se sometieron las hojas de café. Silveira y col. (2010) plantearon que con concentraciones de $116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no se reportaron intoxicaciones en estudios realizados en cultivos como papa, plátano, banano y caña de azúcar.

Orlikowska *et al.* (2015), en estudios realizados en diferentes especies como anthurium, mora, chrysanthemum, hosta, fresa y frambuesa con diferentes concentraciones de Vitrofuroral ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del ingrediente farmacéutico activo), apreciaron que nunca fue completamente fitotóxico; puede afectar o estimular el desarrollo de las plantas *in vitro*

en dependencia de las concentraciones del producto y el genotipo en estudio. Plantearon que el empleo de biosidas, incluso los que se recomiendan para cultivos de tejidos vegetales, puede ser tóxico para algunos genotipos de plantas, pueden inhibir el crecimiento y desarrollo de brotes y raíces, y reducir la eficiencia de micropropagación, en la esterilización de medios de cultivos para regeneración de diferentes genotipos de plantas *in vitro*, por lo que debe ir precedido de experimentos para establecer una concentración segura para un uso posterior del producto.

Los explantes colocados en los diferentes tratamientos presentaron la misma capacidad de formación de callos; se observó la iniciación del proceso de callogénesis en la evaluación realizada a los 15 días y concluyó a los 30 días sin diferencia significativa entre los tratamientos en las diferentes evaluaciones realizadas (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia de las concentraciones de Vitrofuroral en las diferentes evaluaciones realizadas en los callos con callogénesis (%)

Tratamientos	Días		
	15	20	30
60 (mg • L ⁻¹)	84,3	95,4	95,4
80 (mg • L ⁻¹)	87,8	96,3	96,3
100 (mg • L ⁻¹)	86,0	94,8	98,1
116 (mg • L ⁻¹)	89,5	95,4	98,1
ES	1,99 ns	1,75 ns	1,41 ns
CV (%)	10,96	8,79	6,92

^{ns} No significativo según prueba de Tukey para $p < 0,05$.

Las concentraciones de Vitrofuroral empleadas no influyeron en el proceso de callogénesis, no se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se observó que los tratamientos con mayor concentración de Vitrofuroral (100 y 116 mg • L⁻¹) obtuvieron las menores medias en el porcentaje de explantes que concluyeron el proceso de iniciación de callogénesis, la cual se apreció que concluyó en la evaluación realizada a los 30 días.

Ortiz y col. (2018) afirman que el Vitrofuroral no afecta el proceso de formación de callos en el cultivo del café en concentraciones de 116 mg • L⁻¹, aunque observaron que retarda en los primeros 30 días el proceso de iniciación.

Se evidencia que el esterilizador químico empleado no afecta el proceso de formación de callos en concentraciones iguales o inferiores a 116 mg • L⁻¹.

Silveira y col. (2010) plantearon que en la esterilización de los medios de cultivo el Vitrofuroral es efectivo y puede ser empleado en la micropropagación de plantas (plátanos, bananos, papa y otros), y se logra aumentar el coeficiente de multiplicación de los explantes con su utilización.

Las diferentes concentraciones de Vitrofuroral empleadas no incidieron significativamente en la consistencia de los callos formados (Tabla 2).

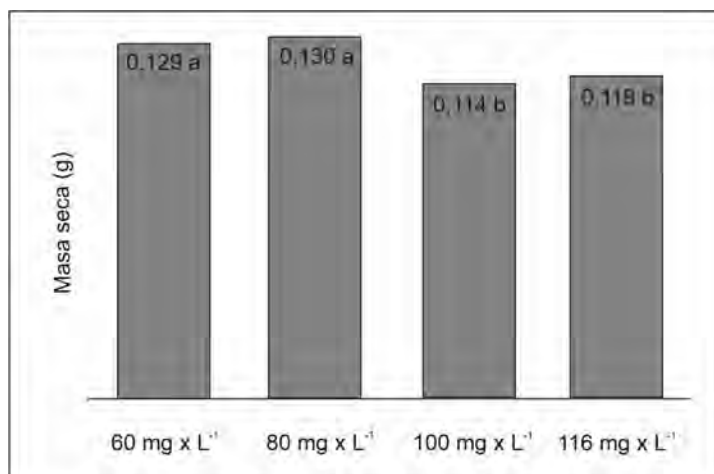
Tabla 2. Consistencia de los callos en los diferentes tratamientos evaluados

Tratamientos	Consistencia
Vitrofuroral al 60 mg • L ⁻¹	93,3 % Friable 6,7 % Esponjoso
Vitrofuroral al 80 mg • L ⁻¹	90,0 % Friable 10,0 % Esponjoso
Vitrofuroral al 100 mg • L ⁻¹	93,3 % Friable 6,7% Esponjoso
Vitrofuroral al 116 mg • L ⁻¹ (Control)	93,3 % Friable 6,7 % Esponjoso

Al emplear las diferentes concentraciones de Vitrofuroral se obtuvo valores superiores al 90 % de callos friables, características las cuales son fundamentales para seleccionar un callo de cafeto para los posteriores procesos *in vitro*. Corrobora lo planteado por González, Santana y López (2001), quienes se refirieron a que los callos de cafetos obtenidos *in vitro* con consistencia friable y una coloración blanca cremosa son

características que permiten seleccionar explantes con posibilidad potencial de alta capacidad embriogénica y de mayor calidad.

Se apreció que las concentraciones de Vitrofuroral empleadas en la esterilización de medios de cultivo semisólidos influyeron en la masa seca de los callos formados, con diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 3).



** Barras con valores con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis para $p < 0,01$.

Fig. 3. Masa seca (g) de los callos en los diferentes tratamientos evaluados.

Con la utilización de concentraciones de $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Vitrofuroral se obtienen callos con mayor masa seca, con diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos.

La masa seca muestra la calidad del callo formado entre otras características. Se apreció que al aumentar la concentración de Vitrofuroral ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $116 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) disminuyó la masa seca. Quiala y col. (2002), en estudios realizados en el cultivo de la caña de azúcar, demostraron que al emplear concentraciones de Vitrofuroral por encima de $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ disminuyó la germinación de embriones somáticos.

Conclusiones

- Las concentraciones de Vitrofuroral influyeron en la esterilización de medios de cultivo en la fase de formación de callos para la propagación *in vitro* del descendiente F1 de *Coffea arabica* L. La concentración de $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ resultó ser la más económica, sin diferir de las concentraciones superiores en la contaminación de los explantes.
- Las concentraciones de Vitrofuroral no influyeron en la inducción de callogénesis y en la consistencia de los explantes; sin embargo, con 80 y $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ se aumentó significativamente la masa seca de los callos.

Bibliografía

- Díaz, Isabel.; Rodríguez, L.; Zenaida Rodríguez y Mirta. E Cuellar: Gestión energética en la producción del ingrediente farmacéutico activo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano y vitrofuroral. ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46 (2): 38-41, 2012.
- Escalona, M.; Fundora, Z.; Aragón, C.; Capote, I.; Castañedo, N.; Pina, D. and J. González: Chemical Sterilization for Propagation of Pineapple Plantlets in Temporary Immersion Bioreactor. *Pineapple News*, 17: 9–14, 2010.
- Etienne, H.; Bertrand, B.; Dechamp, E.; Maurel P.; Georget, F.; Guyot, R y J. C. Breitler: Are genetics and epigenetic instabilities of plant embryogenic cells a fatality? The experience of coffee somatic embryogenesis. *Human Genetics and Embryology*, 6 (136): 5, 2016.
- Fernández, R.; Zoraya De Guglielmo y Andrea Menéndez: Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación*, 71 (34): 57-84, 2010.
- González, María E.; Nancy Santana y Catalina López: Efecto de la composición del medio de cultivo y el genotipo en la inducción de la embriogénesis somática en clones de *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 22 (1):17-21, 2001.
- InfoStat Versión 1.0: Universidad Nacional de Córdoba. Argentina, 2012.

- Lacerra, J.; Ferrer, M.; María Ester González; Yojana Rodríguez y P. Miranda: Selección de híbridos F1 cubanos de café (*Coffea arabica* L.). *Café Cacao*, 11 (2):16-19, 2012.
- López, P.; Iracheta, L.; Marbella Castellanos; Méndez, I.; Aguirre, J. F.; Adriana Gutiérrez; Ma. del Carmen Ojeda y B. R. Pérez: Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *coffea* spp. Cultivados *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2 (5):645-657, 2011.
- Orlikowska, Teresa; Marta Zawadzka.; El bieta Zenkteler and P. Sobiczewski: Influence of the biocides PPMtm and Vitrofuroral on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87 (3): 223-230, 2015.
- Ortiz, N.; Marta Turiño.; Lisandra Jiménez Ferrer; Ferrás, Y.; e I, Meneses: Efecto de diferentes variantes para la desinfección en hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro*. *Café Cacao*, 16 (1): 9-14, 2017.
- Ortiz, N.; Marta Turiño; Ferrás, Y e I, Meneses: Influencia del Vitrofuroral en la esterilización de medios de cultivos en la fase de formación de callos para la propagación *in vitro* de *Coffea arabica* L. *Café Cacao*, 17 (2): 2018.
- Quiala, Elisa; Jiménez, E.; Feria de, M.; Yelenys Alvarado; Maité Chávez; Agramonte, D.; Daymí Ramírez; Mayra Acosta; Nayvi Pérez y Alina Capote: Empleo del Vitrofuroral en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. Híbrido var Cuba. *Bioteología Vegetal*, 2 (4):87- 51, 2002.
- Quintana, Maribel.; Nápoles, J. A.; Beatriz Salas; Lisbet Ulloa; Yaldreisy Galdo y A, Carbonell: Perfeccionamiento en la producción *in vitro* de leguminosas para la alimentación animal. En: *XVI Fórum de Ciencia y Técnica*. Instituto de Ganadería Tropical, Sancti Spíritus, 2006.
- Rezende de, Anna Lygia.; Almendagna, F.; Pasqual, M. y C. E. Siqueira: Acclimatization of coffee (*Coffea racemosa* x *Coffea arabica*) som a clones obtained from temporary immersion bioreactor system (RITA®). *Australian Journal of Crop Science*, 10 (2):169-175, 2016.
- Sánchez, C.; Rivera, R. A.; González, C.; Vicet. E y M. J. Ferrer: Producción de posturas y establecimiento de nuevas plantaciones de cafeto en el macizo Guamu-haya basadas en el uso de especies de abonos verdes. *Café Cacao*, 11 (2) pp 46 – 51, 2012.
- Scholz, C. L.; Heyl, D. B.; Zimmermann, S.; Kattner, L., and C. D. Klein: Chemical, biochemical and microbiological properties of a brominated nitrovinylfuran with broad-spectrum antibacterial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21: 795– 804, 2013.
- Silveira, Enrique A.; Castañedo, N. R.; Amalia M. Calvo; Raquel Hernández y M. A. Cabrera: Vitrofuroral Inhibidor de la contaminación microbiana de medios de cultivo para vitroplantas. [Monografía del Producto]. Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. 28 mayo, 2010.

