

Genética y mejoramiento

Influencia del Vitrofurul en la esterilización de medios de cultivos en la fase de formación de callos para la propagación *in vitro* de *Coffea arabica* L.¹

Nosleiby Ortiz-Gómez*, Marta Turiño-Peña*, Yusdel Ferrás-Negrín* e Islien Meneses-Zamora*

Resumen

En los medios de cultivos empleados en la generación de plantas in vitro es imprescindible el proceso de esterilización. El objetivo de la investigación fue evaluar la influencia del Vitrofurul en la esterilización de medios de cultivo en la fase de formación de callos en la propagación in vitro de 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. Se evaluó la contaminación, oxidación, formación de los callos, supervivencia, coloración, consistencia, peso fresco y masa seca, con el empleo de la esterilización de medios de cultivos semisólidos para la formación de callos con el empleo de Vitrofurul y se comparó con el método físico por calor húmedo (autoclave). La comparación de valores de las variables se realizó mediante una prueba no paramétrica de Mann Whitney y la prueba paramétrica de Tukey, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza utilizando el paquete estadístico InfoStat versión 1.0 de 2012. El Vitrofurul se puede emplear en la esterilización de medios de cultivos semisólidos para la formación de callos del descendiente F1 de Coffea arabica L. a dosis de 116 mg/L, redujo la contaminación, aumentó la obtención de callos de mejor consistencia (friables), coloración (blanco cremoso) y la supervivencia de los callos.

Palabras clave: explantes, café, coloración, consistencia, micropropagación.

Abstract

In the crop medium used in the generation of plants in vitro is essential the sterilization process. The objective of the research was to evaluate the influence of Vitrofurul in the sterilization of crop medium in the phase of callus formation in the in vitro propagation of F1 descendant of Coffea arabica L. It was carried out in the plant biotechnology laboratory of the Estación Experimental Agro-Forestal of Jibacoa, Villa Clara province, Cuba. The contamination, oxidation, callus formation, survival, coloration, consistency, fresh weight and dry mass were evaluated using semi-solid crop medium sterilization for callus formation using Vitrofurul and compared with Physical method by wet heat (auto key). The comparison of values of the variables was done by a non-parametric Mann Whitney test and the Tukey parametric test after checking the assumptions of normality and variance heterogeneity using the statistical package InfoStat version 1.0 of 2012. Vitrofurul can be used in The sterilization of semi-solid crop medium for the formation of calluses of F1 descendant of Coffea arabica L. at a dose of 116 mg/L, reduced the contamination, increased the obtainment of callus of better consistency (friable), coloration (creamy white) and the survival.

Key words: explants, coffee, coloration, consistency, micropropagation.

¹ Recibido: 13/7/2017

Aprobado: 20/10/2017

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

Introducción

El cultivo de células y tejidos vegetales desempeña un papel importante en la biotecnología agrícola. La embriogénesis somática como método de regeneración de plantas se ha logrado en un gran número de familias y especies, utilizándose para estudios básicos de fisiología vegetal y en aplicaciones más prácticas como la micropropagación y la transformación genética (Barbón y col., 2014).

La reproducción del café por medio de cultivo de tejidos es una técnica de importancia para el mejoramiento genético debido a las múltiples herramientas disponibles en el desarrollo de nuevos métodos de selección, reproducción y propagación (Echeverría, Baquero y Rodríguez, 2014).

En los medios de cultivo empleados en la generación de plantas *in vitro* es imprescindible el proceso de esterilización, con el cual se obtiene un sustrato libre de microorganismos para la posterior regeneración de plantas. Se emplean diferentes métodos de esterilización; entre estos, el método químico, que tiene como principal problema para su uso el efecto tóxico que provoca a los órganos, tejidos y células vegetales.

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

El Vitrofur consiste en una dispersión sólida en polietilenglicol 6000 (PEG 6000) del ingrediente farmacéutico activo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) al 30 % obtenida por el método de fusión. La dispersión sólida permite la disminución del tamaño de partículas del ingrediente farmacéutico activo hasta el nivel molecular utilizando el PEG 6000 como portador soluble en agua, lo que garantiza una vía adecuada para la incorporación de este al medio de cultivo (Silveira y col., 2010).

El ingrediente farmacéutico activo G-1 es un producto derivado de los furfuralos de la caña de azúcar (Pérez y col., 1998).

El Vitrofur, motivado por sus ventajas, es utilizado en el mercado nacional y extranjero con patentes registradas en Estados Unidos, México, Brasil y en toda la comunidad europea. La estrategia seguida para la concepción y aseguramiento del G-1, principio activo del Vitrofur, fue reconocida con la Medalla de Oro de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI)

en 2001. Esto implica el uso extendido y reconocido del Vitrofur en un buen número de laboratorios dedicados al cultivo de vitroplantas (Linares y Marrero, 2016).

Scholz *et al.* (2013) plantean que el Vitrofur sustituye el proceso de esterilización por autoclave. Con un frasco de 6,0 g es posible preparar 50 L de medio de cultivo. Reduce el consumo de agente gelificante en un 35 %, aumenta el coeficiente de multiplicación entre 0,3 y 0,5, la productividad, mejora las condiciones de trabajo y un considerable ahorro de energía eléctrica.

El Vitrofur se utiliza en la esterilización de medios de cultivos en especies como plátanos, bananos, caña, papa, eucalipto, piña, ajo, cebolla, cítricos y cerezos, en los que se aprecia la efectividad del producto (Silveira y col., 2010). En el cultivo *in vitro* del cafeto no se evidencian estudios donde se muestre el efecto de este producto en la esterilización de medios de cultivo en la fase de formación de callos. El trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar la influencia del Vitrofur en la esterilización de medios de cultivo en la fase de formación de callos para la propagación *in vitro* de descendientes F1 de *Coffea arabica* L.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, en el municipio de Manicaragua, provincia de Villa Clara, Cuba, en el período comprendido de noviembre de 2016 a marzo de 2017.

El material vegetal empleado fue un descendiente F1 obtenido mediante el cruzamiento de la variedad Caturra rojo con cafetos silvestres (Lacerra y col., 2012). Se colectaron los segundos pares de hojas ubicadas en las ramas plagiotrópicas del tercio medio de la planta del extremo terminal y se seleccionaron las que no presentaron deformaciones ni afectaciones por plagas y enfermedades.

A la planta donadora donde se seleccionaron las hojas se le realizaron actividades agrotécnicas, manteniéndolas en un óptimo estado vegetativo y fitosanitario.

En el laboratorio de biotecnología se lavaron individualmente las hojas en agua con detergente comercial y se enjuagaron con agua limpia. Posteriormente, en el área aséptica se descontaminaron con hipoclorito de sodio. Se seleccionaron explantes de 1,0 cm² aproximadamente de las hojas que no estuvieran dañados por el hipoclorito de sodio y no formaran parte de los bordes

y las nervaduras. Se colocaron por tratamiento 255 explantes, ubicados con el haz en contacto con el medio de cultivo.

Se utilizó un medio de cultivo para formación de callos, esterilizado de dos formas diferentes para conformar dos tratamientos:

1. Esterilización química con Vitrofurul.
2. Esterilización física por calor húmedo (autoclave) (tratamiento control).

El Vitrofurul fue aplicado en una concentración de 116 mg/L, según la dosis recomendada por el fabricante (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 agitándolo vigorosamente para lograr una homogeneización total y evitar la sedimentación del producto.

La esterilización física se desarrolló en una autoclave a 121 °C por 20 min, según González, Santana y López (2001).

Se efectuaron evaluaciones a los 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 90 días de colocados los explantes en el medio de cultivo y se evaluaron las variables siguientes:

- Contaminación.
- Oxidación.
- Formación de los callos.

A los 90 días se evaluaron de los callos formados:

- Supervivencia.
- Peso fresco.
- Peso seco.
- Coloración.
- Consistencia.

Los porcentajes contaminación, oxidación y formación de los callos se determinó mediante observaciones visuales.

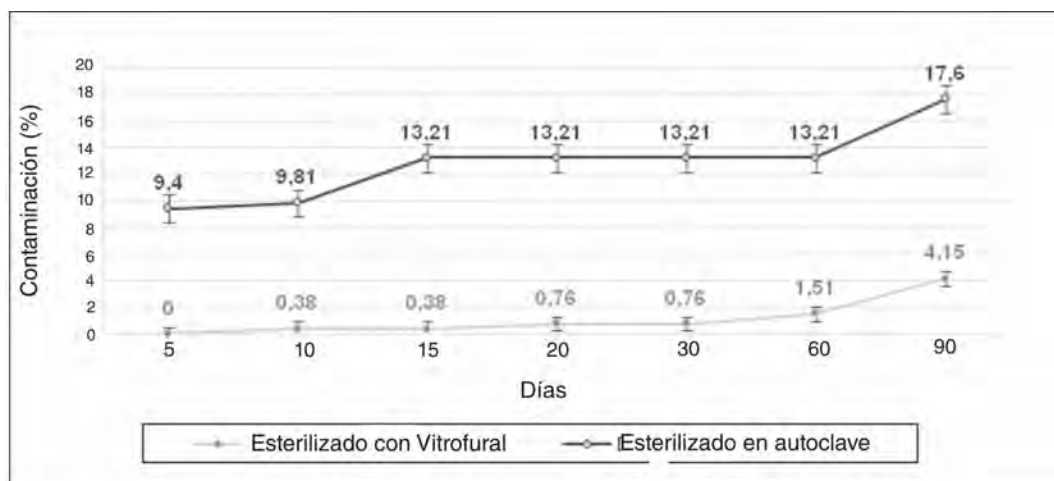
El peso fresco y el peso seco se determinaron con una balanza analítica Radwad de 0,1 mg de precisión. El último se obtuvo en una estufa hasta alcanzar peso constante.

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

La comparación de valores de las variables evaluadas se realizó mediante una prueba no paramétrica de Mann Whitney y la prueba paramétrica de Tukey previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza, utilizando el paquete estadística versión 1.0 (InfoStat, 2012).

Resultados y discusión

El empleo del Vitrofurul produjo un efecto en la disminución de la contaminación microbiana (*Fig. 1*). En todas las evaluaciones realizadas redujo la contaminación microbiana con diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento control.



*** Valores con letras desiguales en la misma fila difieren según prueba de Tukey para $p < 0,05$.

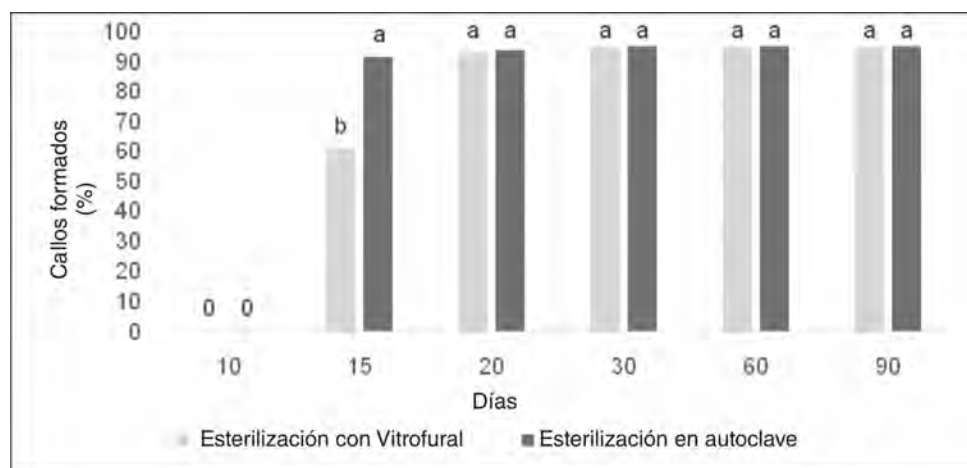
Fig. 1. Explantes contaminados (%) en los diferentes tratamientos evaluados.

La reducción de la contaminación pudiera estar dada por estar activo el Vitrofurul en el medio de cultivo en el momento de manipular los frascos para colocar los explantes, lo que no permitió el desarrollo de contaminantes, que pudieran provenir de los explantes o del propio proceso de manipulación de los frascos, mostrado en la evaluación realizada. Estos resultados corroboran lo planteado por Quintana y col. (2006), los cuales refieren que el Vitrofurul es uno de los esterilizantes químicos usados con éxito para el control de contaminantes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales porque tiene un potente efecto en el control de la contaminación, reporta valores inferiores al 2,5 % de contaminación en la propagación *in vitro* de *Vigna luteola* SC-123 y *Macroptilium atropurpureum* SE-72, con una concentración de Vitrofurul 116 mg/L (35 mg/L de principio activo).

A los 30 días de establecidos los tratamientos se observaron explantes que no formaron callos y posteriormente murieron, tornando una coloración oscura y apariencia seca, con valores inferiores al 5,5 % del total de

los explantes evaluados, sin existir diferencia estadística significativa entre los tratamientos. En la oxidación de los explantes no incidió el método de esterilización utilizado. Corroboran lo planteado Silveira y col. (2010), que al emplear 116 mg/L de Vitrofurul equivalentes a 35 mg/L del ingrediente farmacéutico activo, es la concentración recomendada para la propagación de plantas *in vitro*, sin reportarse intoxicaciones, demostrado en plantas de papa, plátano, banano y caña de azúcar, evidenciándose la ventaja que representa la utilización del producto respecto al método tradicional de esterilización por autoclave.

A los 15 días el proceso de formación de callos en medio de cultivo esterilizado por autoclave superó en 30,8 % al empleo del Vitrofurul con diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Fig. 2). La demora en el tratamiento químico pudo estar dado al emplear el Vitrofurul en una concentración 116 mg/L. Quiala (2000) refirió que el empleo del Vitrofurul con concentraciones por encima de 20 mg/L produjo una disminución en la germinación de embriones somáticos de caña de azúcar.

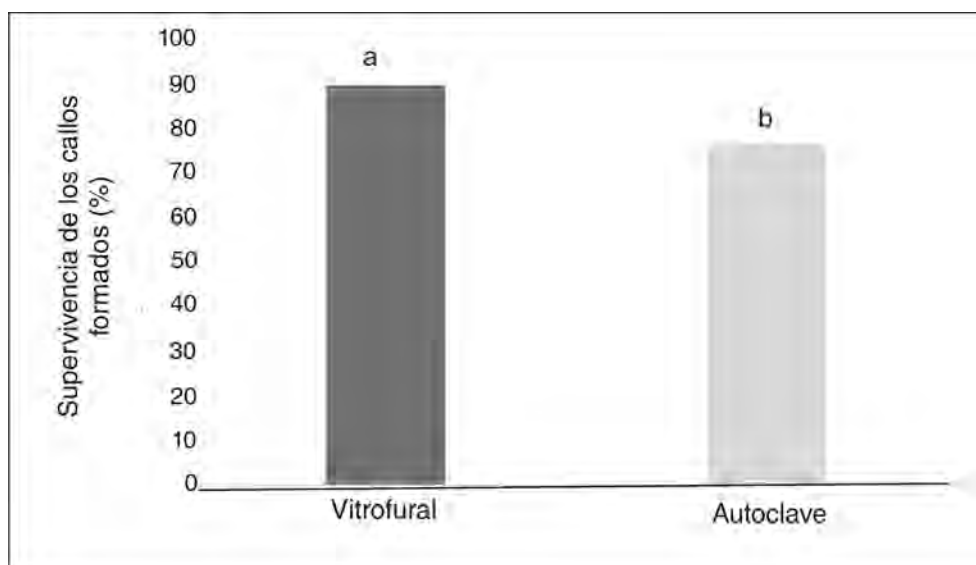


**Barras con letras distintas sus valores difieren según la prueba de Tukey ($p < 0,01$).

Fig. 2. Callos formados (%) con el empleo de los dos métodos de esterilización de medios de cultivo.

A los 30 días concluyó el proceso de iniciación de la formación de callos en los tratamientos evaluados. Con Vitrofurul formaron callos el 94,5 % de los explantes, y el 95 % con el empleo de la autoclave.

La utilización del Vitrofurul influyó en la supervivencia de los explantes: se alcanzaron resultados superiores con diferencia estadística significativa con respecto al empleo de la autoclave en la esterilización del medio de cultivo (Fig. 3).



**Barras con letras distintas sus valores difieren según la prueba de Tukey ($p < 0,01$).

Fig. 3. Supervivencia de los callos formados (%) a los 90 días en los diferentes métodos de esterilización.

Con la utilización del Vitrofurul la supervivencia fue del 90,35 % de callos formados, superior al alcanzado con el empleo de la autoclave en el 12,95 %, se evidenció la efectividad del empleo del Vitrofurul en la esterilización de medios de cultivo semisólidos para la formación de callos de café. Silveira y col. (2010) plantearon que el Vitrofurul es efectivo en la esterilización de los medios de cultivo utilizados en la micropropagación de plantas (plátanos, bananos, papa y otros), aumenta el coeficiente de multiplicación de los explantes con rela-

ción al coeficiente de multiplicación por el método tradicional.

Los métodos de esterilización influyeron sobre la coloración y consistencia de los callos formados (Tabla 1). Con el empleo del método químico se apreció una coloración blanco cremosa en el 80,2 % de los callos, y el 19,8 % de color carmelita claro, superior a los resultados alcanzados al emplear la autoclave donde el porcentaje de callos blancos cremosos fue menor en el 3,6 %, y la de callos de color carmelita claro fue mayor en el 3,6 %.

Tabla 1. Coloración y consistencia de los callos en los diferentes tratamientos evaluados

Tratamientos	Coloración del callo	Consistencia
Esterilización con empleo de Vitrofurul	80,2 % Blanco cremoso 19,8 % Carmelita claro	100 % Friable
Esterilización con empleo de la autoclave	76,6 % Blanco cremoso 23,4 % Carmelita claro	93,4 % Friable 6,6 % Esponjoso

Se apreció que la consistencia de los callos varió con el empleo de los diferentes métodos de esterilización. Con el empleo del Vitrofurul se obtuvo el 100 % de los callos friables por su apariencia seca y compacta, mientras que el tratamiento donde se empleó la esterilización mediante autoclave presentó el 6,6 % de los callos con características no deseadas. Los rasgos más adecuados de los callos de café-

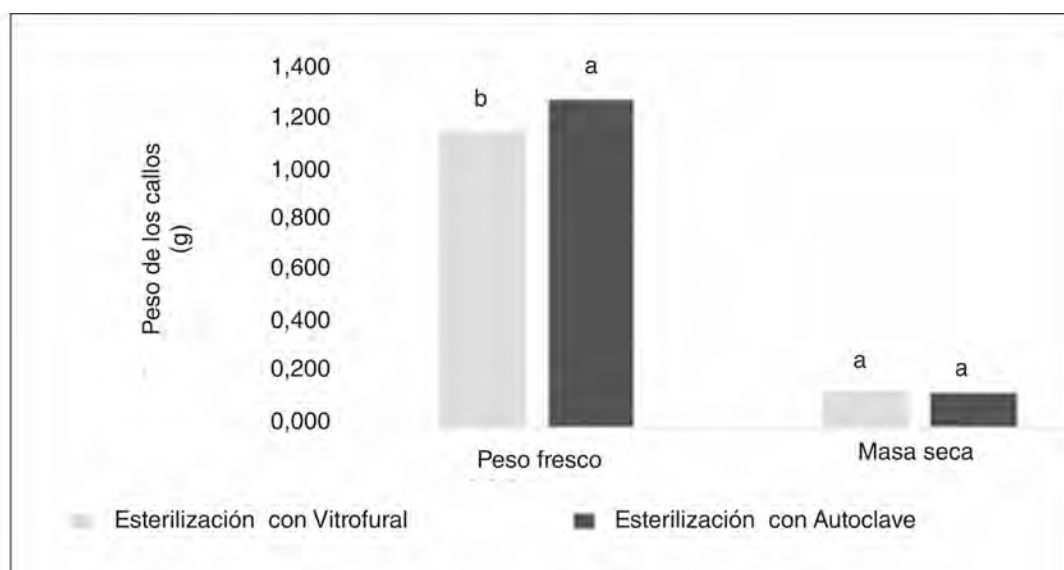
to consisten en la presentación de su coloración blanco cremosa y consistencia friable, y en el método de esterilización con Vitrofurul se alcanzaron los mejores resultados, lo que puede estar dado por el no empleo de la autoclave, lo que suprime el efecto negativo del calor sobre el medio de cultivo, aumentando la estabilidad de sus componentes, para facilitar así mayor aprovechamiento de los nutrientes.

González, Santana y López (2001) plantearon que los callos de cafetos formados *in vitro*, que presentan una consistencia friable y una coloración blanca cremosa, son características que permiten seleccionar explantes de mayor calidad con potencial de alta capacidad embriogénica.

Quiala y col. (2002) se refieren al efecto negativo de la autoclave sobre la estabilidad química de los ingredientes de los medios de cultivo, y señalan como efectos más comunes la degradación de los azúcares, aminoácidos, reducción de la calidad de los agentes gelificantes, así como la disminución del pH.

Agramonte y col. (1997) plantearon que el Vitrofurul ejerce un efecto positivo en el medio de cultivo, que puede estar ocasionado por la influencia del grupo nitro que presenta este compuesto.

Los callos cultivados en el medio de cultivo esterilizados en autoclave presentaron un mayor peso fresco con diferencia estadística significativa con respecto a los callos cultivados en el medio que contenía Vitrofurul, debido a la mayor presencia de callos con consistencia esponjosa y por ende mayor contenido de agua (Fig. 4).



**Barras con valores con letras desiguales difieren estadísticamente según la prueba no paramétrica de Mann Whitney para $p < 0,05$.

Fig. 4. Peso seco y peso fresco (gramos) de los callos en los diferentes métodos de esterilización.

El peso seco de los callos no difirió significativamente entre los tratamientos, pero existió una tendencia a ser superior en los callos cultivados con presencia de Vitrofurul, causado por tener mayor consistencia. Ello pudo estar causado por existir una mejor disponibilidad de los nutrientes en el medio de cultivo esterilizado con Vitrofurul. Según Silveira y col. (2010), el Vitrofurul no altera los componentes del medio de cultivo, lo que sí ocurre al utilizar la autoclave por ser sometidos al calor y la presión.

Conclusiones

- El Vitrofurul se puede emplear en la esterilización de medios de cultivos semisólidos para la formación de

callos del descendiente F1 de *Coffea arabia* L. a dosis de 116 mg/L.

- El empleo del Vitrofurul en la esterilización de medios de cultivos semisólidos para la formación de callos de *Coffea arabia* L. redujo la contaminación, aumentó la obtención de callos de mejor consistencia (friables), coloración (blanco cremosa) y la supervivencia de los callos formados.

Bibliografía

Agramonte, D.; Jiménez, F. A.; Pérez, M.; Gutiérrez, O.; Ramírez, D.; Pérez, J.; Alvarado, Y.; Castañedo, N.; Díaz, G.; Martín, E. L.; Salazar, E. y R. Machado: Em-

- pleo de sustancias de acción antimicrobianas en la esterilización de los medios de cultivo en la micropropagación *in vitro* de la papa (*Solanum tuberosum* L.). En: *Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas BIOVEG'97 Libro de Resúmenes*. Ciego de Ávila, Cuba. p. 121, 1997.
- Barbón, R.; Hien, Nguyen; Alina Capote; Feria de, M.; Elisa Quiala y Anabel Pérez: Efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en Sistemas de Inmersión Temporal RITA. *Biotecnología Vegetal*, 14 (2): 91 - 97, 2014.
- 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 Vitrofurul. ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46 (2): 38-41, 2012.
- Echeverría, F.; Barquero, M. y D. Rodríguez: Estudio del desarrollo radical en almácigo de híbridos F1 de café obtenido por cultivo de tejidos. *Agronomía Costarricense*, 38 (1): 67-74, 2014.
- 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.
- Linares, O. y O. Marrero: Evaluación de la ecotoxicidad de residuos agarizados con Vitrofurul en diferentes biomodelos experimentales. En: *Primer Taller Científico Nacional de Gestión de Riesgo*. Universidad de Sancti Spíritus José Martí Pérez, 2016.
- Pérez, J. N.: *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. En: Empleo de sustancias químicas para la esterilización de los medios de cultivos (Pérez, J. N.; Jiménez, E. y D. Agramonte), 400 pp., t. 1, Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, 1998.
- Quiala, Elisa: "Encapsulación de embriones somáticos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido)" [Inédito], tesis de candidatura. Universidad Central de las Villas Marta Abreu. Santa Clara, Cuba, 2000.
- Quiala, Elisa; Jiménez, E.; Feria de, M.; Yelenys Alvarado; Maité Chávez; Agramonte, D.; Daymí Ramírez; Mayra Acosta; Nayvi Pérez y Alina Capote: Empleo del Vitrofurul en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. Híbrido var. Cuba. *Biotecnología Vegetal*, 2(4):87- 51, 2002.
- Quintana, Maribel; Nápoles, J. A.; Beatriz Salas; Lisbet Ulloa; Yaldreis 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. Estación Sancti Spíritus, 2006.
- Silveira, Enrique A.; Castañedo, N. R.; Amalia M. Calvo; Raquel Hernández y M. A. Cabrera: Vitrofurul 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.
- Scholz, Therese; Carina. L. Heyl; Bernardi, D.; Zimmermann, S.; Lars, Kattner, and C. D. Klein: Chemical, biochemical and microbiological properties of a brominated nitrovinyl-furan with broad-spectrum antibacterial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21: 795-804, 2013.