

Influencia de medios de cultivo en la formación de callos *in vitro* de híbridos F1 de *Coffea arabica* L.¹

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

Resumen

Esta investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar la influencia de diferentes medios de cultivo en la formación de callos en la micropropagación de híbridos 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 2016. Se estudiaron medios de cultivos empleados por Barbón (1997), Girón (1998), dos empleados por Hermoso y Menéndez (2000) y el propuesto por González y col. (2005) en la embriogénesis somática en café en la fase de formación de callos. La comparación de medias se realizó con la prueba Kruskal Wallis con previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza, y se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 1.0 del 2012. Los callos que se obtuvieron en el medio de cultivo empleado por Barbón (1997) fueron los que presentaron el peso fresco y la coloración más favorable en la micropropagación del híbrido 80 de Coffea arabica L. En el medio de cultivo empleado por Barbón (1997) y González y col. (2005) se obtuvieron los callos con un 100 % de consistencia friable.

Palabras clave: *callogénesis, embriogénesis somática, coloración, consistencia, micropropagación.*

Abstract

Investigation was developed with the objective of evaluating the influence of different cultivation means in the calli formation in the micro propagation of hybrids F1 of Coffea arabica L. In the laboratory of vegetable biotechnology of the Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, Villa Clara province, Cuba, in the year 2016 was carried out. Means of cultivations were studied used by Barbón (1997), Girón (1998), two used by Beautiful and Menéndez (2000) and the one proposed by González and col. (2005) in the somatic embryogenesis in coffee in the calli formation phase. The comparison of means was carried out with the test Kruskal Wallis with previous confirmation of the suppositions of normality and variance heterogeneity, the statistical program InfoStat version 1.0 the 2012 was used. The calli that were obtained in the means of cultivation used by Barbón (1997) those that presented the fresh weight and the most favorable coloration in the micro propagation of the hybrid one 80 of Coffea arabica L. In the means of cultivation used by Barbón (1997) and González and col. (2005) were obtained the calli with 100 % of friable consistency.

Key words: *callus genesis, somatic embryogenesis, coloration, consistency, micro propagation.*

¹ Recibido: 6/11/2016

Aprobado: 17/11/2016

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

Introducción

El café es uno de los productos agrícolas más importantes del mundo; ocupa el segundo lugar en el comercio internacional después del petróleo. Las plantaciones de cafeto (*Coffea* spp.) abarcan aproximadamente 10,2 millones de hectáreas en más de 80 países, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia y América Latina. Más de 100 millones de personas obtienen sus ingresos directa o indirectamente de las áreas cultivadas de cafeto (ICCO, 2013).

En Cuba el cultivo del cafeto se extiende por las cuatro regiones montañosas del país, con mayor presencia en la región oriental (macizo Nipe-Sagua-Baracoa y Sierra Maestra), en los cuales se produce el 80 % del grano; en la zona central (macizo Guamuhaya) se produce el 14 %, y en la región occidental (macizo Guaniguanico) el 6 % (Carbonell y Fernández, 2012).

Los fitomejoradores trabajan en la selección de nuevos cultivares de cafetos que contribuyan al incremento de la sostenibilidad y la protección de los recursos naturales en la caficultura. La obtención de híbridos F1 ha sido una alternativa para la obtención de plantas altamente productivas, moderadamente resistentes a nemátodos del género *Meloidogyne mayaguensis* Rammah e Hirschmann, que muestran resistencia y/o susceptibilidad a la *Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome. Este híbrido produce el mismo tipo de bebida que la variedad comercial Caturra rojo (Lacerra y col., 2012).

Los híbridos se deben propagar vegetativamente para mantener sus características genéticas. La reproducción del café por medio de cultivo de tejidos ha sido una técnica de importancia para el mejoramiento genético debido a las múltiples herramientas disponibles para el desarrollo de nuevos métodos de selección, reproducción y propagación. Para el cultivo de café los principales estudios se han basado en la obtención de callos o aglomerados de células desdiferenciadas, con capacidad de regenerar tejidos, órganos y sistemas. El desarrollo de técnica de cultivo de tejidos mediante embriogénesis somática representa una gran oportunidad para el desarrollo de nuevas investigaciones y materiales de café (Echeverría, Baquero y Rodríguez, 2014).

Dentro del protocolo de regeneración por embriogénesis somática en *Coffea* spp. existen diferentes etapas o fases. Cada una de estas es regulada por diversos factores que se conjugan e interactúan para que el proceso

se desarrolle. En la fase inicial o de inducción se debe formar un callo compuesto por células con alta capacidad regenerativa. Por ser la fuente inicial de biomasa, se debe buscar una población celular que posea alta tasa multiplicativa, sin perder las características fisiológicas y bioquímicas que permitan su regeneración (González, 2003).

La concentración o ausencia de algunos componentes en los medios de cultivo, como sales minerales, ciertas citoquininas y auxinas, así como el balance entre estos reguladores y otros como antioxidantes y fungicidas, desencadenan respuestas variadas que en muchas ocasiones no son las adecuadas para un proceso de multiplicación masiva eficiente y práctica (López *et al.*, 2010).

Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de diferentes medios de cultivo en la formación de callos para la micropropagación 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, en el municipio de Manicaragua, provincia de Villa Clara, Cuba en 2016.

Se utilizó el híbrido F1, intraespecífico, obtenido mediante el cruzamiento de la variedad Caturra rojo con cafetos silvestres (Lacerra y col., 2012). Se seleccionó una planta madre donde se colectaron las hojas ubicadas en las ramas plagiotrópicas del tercio medio de la planta, se eligieron los segundos pares de hojas desde el extremo de las ramas hacia el tallo que no presentaron deformaciones ni afectaciones por plagas y enfermedades. Se colectaron en horas tempranas de la mañana.

A la planta madre se le realizó las actividades agrotécnicas de forma tal que mantuviera un óptimo estado vegetativo y fitosanitario para posteriormente propagarla con técnicas biotecnológicas. Se realizó tratamiento químico semanal con fungicidas e insecticidas para mantenerlas libres de plagas y enfermedades.

Las hojas de cafeto se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología donde se lavaron individualmente en agua con detergente comercial y posteriormente se enjuagaron con agua limpia. Se introdujeron en el área aséptica donde se procedió a la descontaminación con hipoclorito de sodio.

Se seleccionaron las partes de las hojas que no se dañaron por la acción del hipoclorito de sodio y se desecharon las nervaduras y el borde. Se establecieron 50 explantes de 1 cm² aproximadamente por tratamiento. Estos se colocaron con el envés hacia arriba.

Se estudiaron los medios de cultivos empleados por diferentes autores en la regeneración de plantas de café por embriogénesis somática en la fase de formación de callos:

1. Barbón (1997).
2. Girón (1998).
3. Medio de cultivo M1 propuesto por Hermoso y Menéndez (2000).
4. Medio de cultivo C1 propuesto por Hermoso y Menéndez (2000).
5. González y col. (2005).

Se realizaron evaluación cuantitativas y cualitativas a los 60 días de colocados los explantes en los

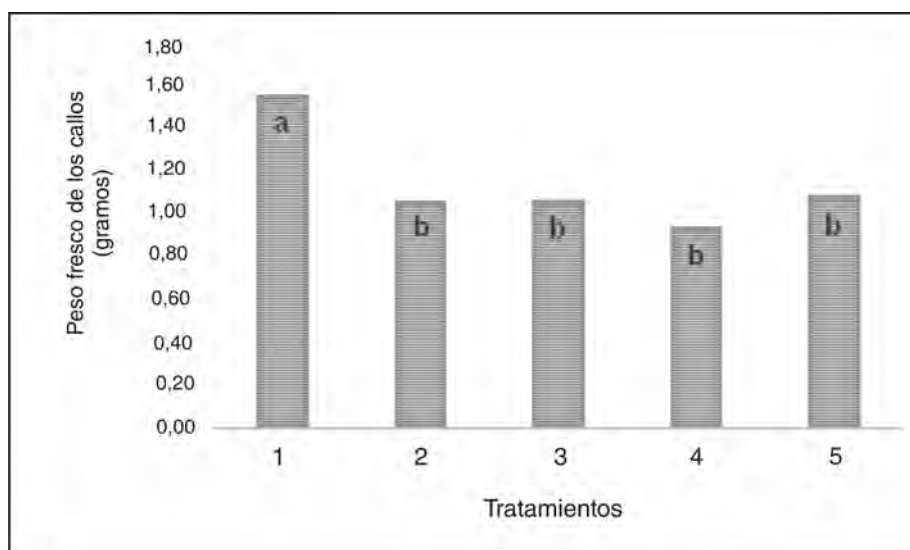
diferentes medios de cultivo. A los callos formados se les evaluaron el peso fresco, coloración y consistencia. Se empleó la metodología utilizada por González, Santana y López (2001) para evaluar la coloración y la consistencia.

El peso fresco se determinó con una balanza analítica Radwad de 0,1 mg de precisión.

Se realizaron los análisis estadísticos con el uso del programa InfoStat versión 1.0 de 2012, mediante la prueba de Kruskal Wallis con previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

Resultados y discusión

La composición de los medios de cultivos produjo un efecto en la inducción de calogénesis. Se apreció que en todos se formaron callos. El mejor resultado se obtuvo en el tratamiento uno, con un peso fresco 1,55 g con diferencia significativa respecto a los demás; el resto no difirieron entre ellos (Fig. 1).



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

Fig. 1. Peso fresco de los callos en los diferentes medios de cultivos.

En los medios se utilizó 2,4-D en combinación con 6-BAP o Kinetina a diferentes concentraciones. La mayor capacidad de calogénesis se obtuvo con la metodología empleada por Barbón (1997), donde las combinaciones hormonales y los demás componentes del medio de cultivo favorecieron el proceso de desdiferenciación celular a partir del tejido vegetal diferenciado y la posterior formación de callos. Se demostró la influencia del medio

de cultivo en la capacidad de inducción de calogénesis en el genotipo en estudio. En el cultivo *in vitro* del café, diferentes autores han obtenidos resultados positivos en la inducción de callos en diferentes genotipos de *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, con diferentes concentraciones hormonales y demás componentes del medio de cultivo. Esto corrobora lo referido por González, Santana y López (2001) cuando plantearon

que el material vegetal cultivado *in vitro*, en respuesta morfogénica en el proceso de formación de callos, existen factores que ejercen una marcada influencia como la composición química del medio de cultivo y las características genéticas del material vegetal a evaluar. López *et al.* (2010) plantean también la marcada influencia de los componentes químicos del medio de cultivo (sales y reguladores del crecimiento) en las diferentes respuestas morfogénicas del material de café cultivado *in vitro*.

En la tabla 1 se observa que los medios de cultivos tuvieron un efecto sobre la coloración de los callos. En el

primer tratamiento se apreció una coloración blanco cremoso al 100 % de los explantes; los demás tratamientos tuvieron otras coloraciones.

La consistencia de los callos varió con el empleo de los diferentes medios de cultivo; el 100 % de los callos evaluados en los tratamientos 1 y 2 tuvieron una consistencia friable por su apariencia seca y compacta, mientras que el resto de los tratamientos presentaron un porcentaje de callos esponjosos. En el tratamiento 1 se obtuvo el 100 % de las características más deseables de los callos: coloración blanco cremoso y consistencia friable (Tabla 1).

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

Tratamientos	Coloración del callo	Consistencia
1	100 % blanco cremoso	Friable
2	70 % blanco cremoso 30 % carmelita claro	Friable
3	100 % carmelita claro	80 % friables 20 % esponjosos
4	20 % carmelita claro 80 % carmelita oscuro	80 % friables 20 % esponjosos
5	40 % carmelita claro 60 % carmelita oscuro	70 % friables 30 % esponjosos

La existencia de los callos blanco cremosos con una textura friable (Fig. 2), plantean González y col. (2005) facilita la selección de explantes de mayor calidad con posibilidad potencial de alta capacidad embriogénica, y que otros autores,

al emplear callos con características semejantes, han logrado establecer eficientes protocolos de regeneración de embriones somáticos en varios genotipos de *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner.

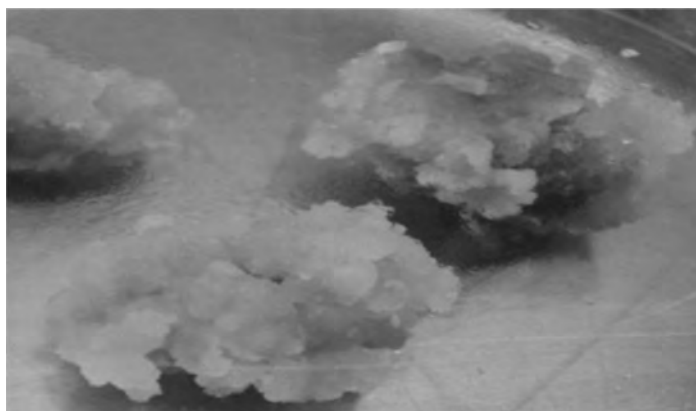


Fig. 2. Callos de *Coffea arabica* L. con coloración blanco cremoso y consistencia friable.

Conclusiones

- Los callos que se obtuvieron en el medio de cultivo empleado por Barbón (1997) fueron los que presentaron el peso fresco y la coloración más favorables en la micropropagación del híbrido 80 de *Coffea arabica* L.
- En el medio de cultivo empleado por Barbón (1997) y González y col. (2005) se obtuvieron los callos con el 100 % de consistencia friable.

Bibliografía

- Barbón, R. R.: "Empleo de suspensiones celulares embriogénicas para la transformación genética de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo) por electroporación" (inédito). Tesis de candidatura, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba, 1997.
- Carbonell, Yurima y L. Fernández: Inventario de moluscos terrestres asociados a las plantaciones de café en la localidad de Jagueyón, El Salvador, Guantánamo, *Café Cacao*, 11(1): 68-70, 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.
- Girón, Ivette Esther: "Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* L. para una producción masal" [inédito]. Tesis de candidatura, CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1998.
- González, María E.; Santana, Nancy 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.
- González, María Esther: Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1): 16-22, 2003.
- González, María Esther; María Margarita Hernández; Mazorra, L. M.; Yohana Rodríguez y Mireya Cabrera: "Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. var. Robusta empleados para la formación de callos, *Biotecnología Vegetal*, 5(2): 121-119, 2005.
- Hermoso, L. y Andrea Menéndez: Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas, *Acta Científica Venezolana*, 51: 90-95, 2000.
- ICO (International Coffee Organization): *Trade Statistics* (en línea) En: http://www.ico.org/trade_statistics.asp. Consultado el 16 de septiembre de 2013.
- InfoStat Versión 1.0: Universidad Nacional de Córdoba. Argentina, 2012.
- Lacerra-Espino, J.; Ferrer, M.; González, María Esther; Rodríguez, Yojana y P. Miranda: Selección de híbridos F1 cubanos de café (*Coffea arabica* L.), *Café Cacao*, 11(2): 16-19, 2012.
- López, P.; Iracheta, L.; Castellanos, Marbella.; Méndez, I.; Sandoval, A.; Aguirre, J.; Ojeda, Ma. Carmen y Adriana Gutiérrez: Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café, *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33 (3): 205-213, 2010.

