

Efecto de diferentes variantes para la desinfección en hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro*¹

Nosleiby Ortiz-Gómez,* Marta Turiño-Peña* y Lisandra Jiménez-Ferrer*

Resumen

La contaminación microbiana es una de las limitantes para el cultivo *in vitro* del café a partir de explantes provenientes de plantas cultivadas en el campo. Esta investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto de distintas variantes para la desinfección en hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro*. Se desarrolló en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, provincia de Villa Clara, Cuba, durante julio de 2015. Se estudiaron 16 tratamientos resultantes de la combinación de la concentración de hipoclorito de sodio (1,5 %; 2 %; 2,5 % y 3 %) y el tiempo (15 min, 20 min, 25 min y 30 min). Para la comparación de medias se realizó la prueba Kruskal Wallis con previa comprobación de los supuestos de normalidad de varianza. Se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 1.0, 2012. Las mejores variantes para la desinfección de hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro* resultaron ser las combinaciones del hipoclorito de sodio al 1,5 % en 15 y 20 min, 2 % en 15 min, 2,5 % en 15 min y 3 % en 15 min.

Palabras clave: biotecnología, explantes, hipoclorito de sodio, *in vitro*.

Abstract

The microbial contamination is one of the obstacles for the cultivation *in vitro* of the coffee starting from explants coming from plants cultivated in the field. This investigation was developed with the objective of evaluating the effect of different variants for the disinfection in leaves in the *Coffea arabica* L. for the establishment *in vitro*. It was developed in the laboratory of vegetable biotechnology of the Agriculture-forest Experimental Station Jibacoa, Villa Clara province, Cuba, during the month of July of the 2015 year. 16 treatment were studied resulting of the combination of the factors, of the combination of the concentration of hypochlorite of sodium were proven (1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 %) and the time (15 minutes, 20 minutes, 25 minutes and 30 minutes). For the comparison of halves was carried out the test Kruskal Wallis with previous confirmation of the suppositions of normality, the statistical program InfoStat version was used 1.0, 2012. The best variants for the disinfection of leaves of *Coffea arabica* L. in the establishment *in vitro*, turned out to be the combinations from the hypochlorite of sodium to 1.5 % in 15 and 20 minutes, 2 % in 15 minutes, 2.5 % in 15 minutes and 3 % in 15 minutes.

Key words: Biotechnology, explants, hypochlorite of sodium, *in vitro*.

¹ Recibido: 8/2/2016

Aprobado: 19/5/2016

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

Introducción

El cafeto, por constituir un cultivo perenne, tiene como principal inconveniente para su propagación por métodos tradicionales que conlleva muchos años para multiplicar un material genético con interés para la agricultura (Feria y col., 2005).

Su multiplicación a través del cultivo *in vitro* es una alternativa para la producción masiva y rápida de plantas, generar variedades nuevas y mejoradas, resistentes a extremos ambientales, a plagas y enfermedades, con bajo nivel de cafeína y maduración de frutos uniformes, puede ser una herramienta útil para acelerar los programas de propagación masiva de plantas y el mejoramiento genético (Barra y Mogollón, 2007).

La contaminación microbiana es una de las limitantes para el cultivo *in vitro* del cafeto a partir de explantes provenientes de plantas cultivadas en el campo. La presencia de microorganismos durante la fase de establecimiento de especies leñosas es un serio problema que afecta su multiplicación por esta técnica. En ello el explante inicial constituye la fuente principal de contaminantes, propiciado quizás por las características anatómicas de estos cultivos, tales como la presencia de cera y estípulas en los tallos que permite la acumulación de agentes contaminantes. Existen tres ubicaciones donde se encuentra la contaminación microbiana en plantas de cafeto: en la superficie del tejido, bajo las estípulas y en el sistema vascular (Cruz y col., 2003).

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana. Los microorganismos provocan pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos de producción o de investigación. En las zonas tropicales, si no se tiene en cuenta, este problema puede alcanzar proporciones incalculables porque las condiciones climáticas favorecen el desarrollo y multiplicación de los microorganismos (Beltrán y Mesa, 2014).

Dentro de las sustancias utilizadas en la desinfección de material vegetal se encuentra el hipoclorito de sodio (NaClO), el hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol (C₂H₅OH) y bicloruro de mercurio (HgCl₂); pero constituye el hipoclorito de sodio el compuesto usado con más frecuencia por varios investigadores, con buenos resultados para la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal, a concentraciones y tiempos diferentes. Este producto

es efectivo, económico y de fácil adquisición (Borges y col., 2004).

Las concentraciones de hipoclorito de sodio empleadas y el tiempo de desinfección presentan como inconveniente que si no se utilizan en los rangos correctos se producen pérdidas considerables de hojas o partes de estas en el proceso de desinfección, pérdidas por contaminación y muerte en el proceso de establecimiento *in vitro*. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de distintas variantes para la desinfección en hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro*.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Científico Tecnológica de Base (UCTB) Jibacoa, ubicada a 340 msnm, en el municipio de Manicaragua, provincia de Villa Clara, Cuba. El estudio se llevó a cabo durante julio de 2015.

Se utilizó el híbrido F₁, intraespecífico, 434 (H-434), obtenido mediante el cruzamiento del cv. Villalobos con cafés silvestres (Lacerra y col., 2012). Se seleccionó la planta madre de mejor estado fitosanitario, colectando las hojas ubicadas en las ramas plagiotrópicas del tercio medio de la planta (los terceros pares a partir del extremo de las ramas), que no presentaran deformaciones ni daños y se colectaron en horas tempranas de la mañana.

Como actividades agrotécnicas realizadas a las plantas madres se les aplicó un tratamiento químico semanal con seis meses de antelación para el control de plagas y enfermedades, así como la fertilización. Además, se les realizaron deshierres, riegos y se mantuvieron libres de arvenses.

Para la descontaminación, las hojas de cafetos se lavaron individualmente en agua con detergente y se enjuagaron con agua limpia en el laboratorio de biotecnología. Se introdujeron en el área aséptica donde se procedió a la descontaminación con el hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones, combinado con diferentes tiempos de aplicación. Las hojas se colocaron en envases donde se les adicionó el hipoclorito de sodio a la concentración deseada, de forma tal que todas quedarán cubiertas. Se colocaron en una zaranda a 105 r.p.m., donde se mantuvieron en agitación en los tiempos deseados. En el flujo laminar se procedió a enjuagar las hojas en agua destilada con cisteína, al concluir el tiempo de descontaminación; posteriormente se colocaron los tratamientos en envases sin agua y tapados.

Para la siembra de los explantes se utilizó como medio de cultivo el propuesto por Sondahl y Sharp, 1977. Para la gelificación se utilizó Agar E a una concentración de $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, se esterilizó por 15 min en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura y $1,2 \text{ kg/cm}$. Él fue ajustado a 5,8 con el uso de HCl y/o NaOH, previo a la esterilización. Luego se cortaron los explantes de 1 cm^2 aproximadamente y se sembraron 50 por tratamiento a razón de cinco por frasco. Se seleccionaron de las partes de las hojas que no se dañaron por la acción del hipoclorito de sodio.

Los tratamientos empleados resultaron de la combinación de varias concentraciones de hipoclorito de sodio y diferentes tiempos de descontaminación:

1. 15 min con el 1,5 % de hipoclorito de sodio.
2. 15 min con el 2 % de hipoclorito de sodio
3. 15 min con el 2,5 % de hipoclorito de sodio
4. 15 min con el 3 % de hipoclorito de sodio
5. 20 min con el 1,5 % de hipoclorito de sodio
6. 20 min con el 2 % de hipoclorito de sodio
7. 20 min con el 2,5 % de hipoclorito de sodio (control)
8. 20 min con el 3 % de hipoclorito de sodio
9. 25 min con el 1,5 % de hipoclorito de sodio 25 min con el 2 % de hipoclorito de sodio
10. 25 min con el 2,5 % de hipoclorito de sodio
11. 25 min con el 3 % de hipoclorito de sodio

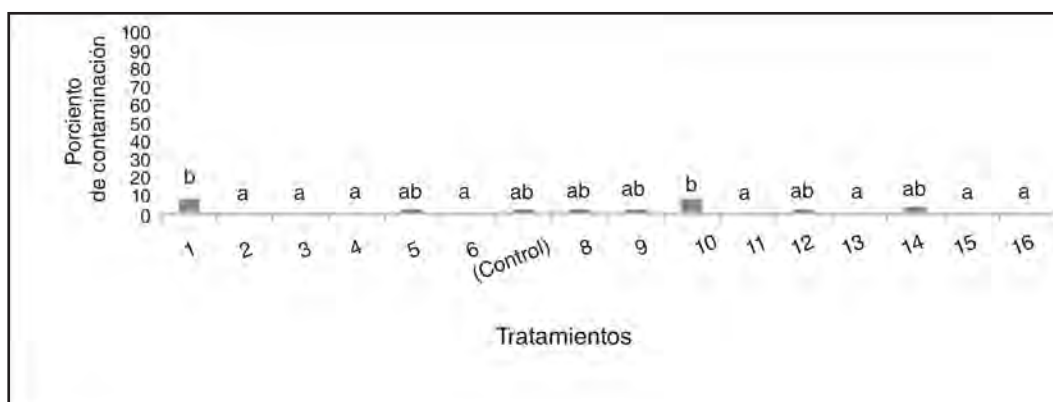
12. 30 min con el 1,5 % de hipoclorito de sodio
13. 30 min con el 2 % de hipoclorito de sodio
14. 30 min con el 2,5 % de hipoclorito de sodio
15. 30 min con el 3 % de hipoclorito de sodio

La evaluación se realizó a las 120 horas de sembrados los explantes en el medio de cultivo para formación de callos. Se evaluaron las variables siguientes: viabilidad, contaminados y muertos.

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

Resultados y discusión

Referente a la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección sobre el porcentaje de contaminación de los explantes, se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Los tratamientos 2, 3, 4, 6, 11, 13, 15 y 16 no presentaron contaminación. Estos a su vez no mostrando diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos 5, 7, 8, 9, 12 y 14. El mayor desarrollo de microorganismos (hongos) se observó en los tratamientos 1 y 10, aunque los valores no rebasaron el 10 % y no difirieron estadísticamente con los tratamientos 5, 7, 8, 9, 12 y 14 (Fig. 1).



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

Fig. 1. Influencia de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección sobre el porcentaje de contaminación de los explantes.

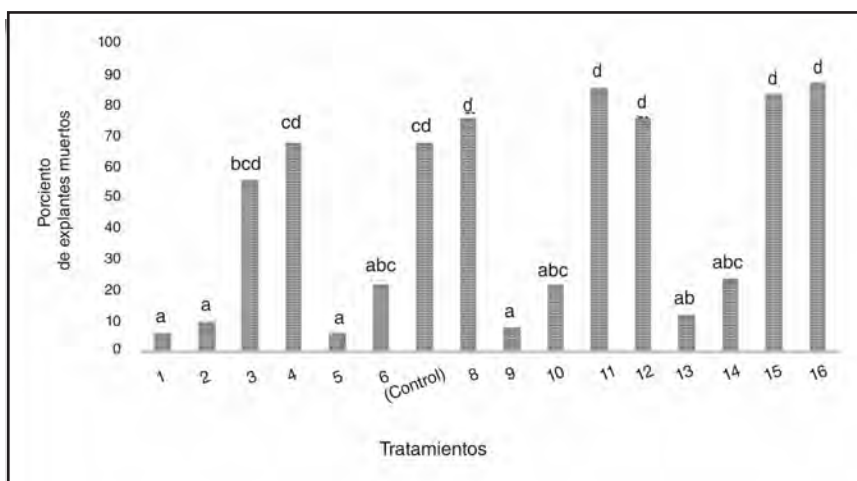
Fundamental para lograr estos resultados es la atención a las plantas madres o donantes, las cuales proporcionarán el material vegetativo para su posterior multiplicación

in vitro. Refiere Jiménez-Terry y col. (2007) la necesidad de aplicar un plan de defensa fitosanitario con fungicidas, a plantas leñosas antes del establecimiento *in vitro* como

una vía eficiente para disminuir la contaminación fúngica y aumentar la supervivencia, durante el ciclo de crecimiento de las plantas donadoras.

Respecto a los explantes muertos, hubo diferencia estadística entre los tratamientos. A medida que se aumentó la combinación de la concentración de hipoclorito

de sodio y el tiempo, incrementaron el número de explantes muertos. En los tratamientos 1, 2, 5 y 9 murieron menos explantes y se obtuvieron las mejores medias con diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, incluyendo el tratamiento control, y no difiriendo con los tratamientos 6, 10, 13 y 14 (Fig. 2).



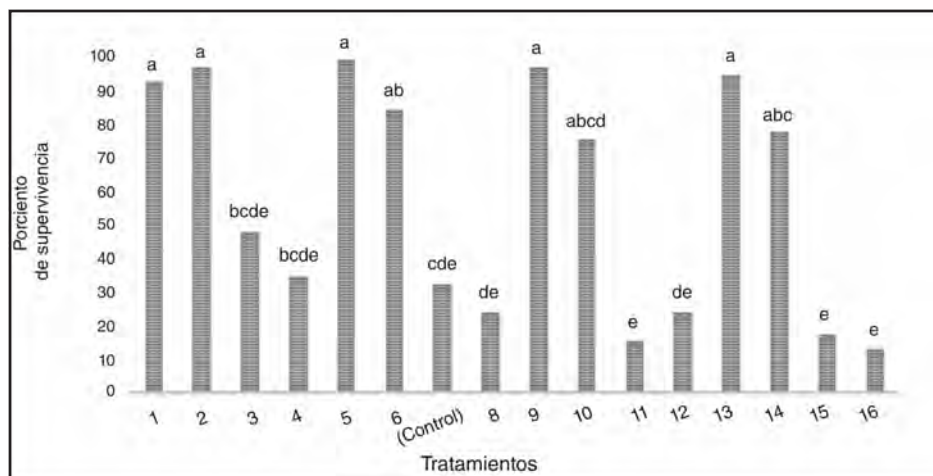
Barras con letras distintas, sus valores difieren según la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,01$).

Fig. 2. Influencia de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección sobre el porcentaje de muerte de los explantes.

Los explantes muertos presentaron una necrosis continua de sus tejidos desde el borde hacia el centro, la cual condujo de manera paulatina a la muerte de los mismos. Esto podría estar dado principalmente por el efecto fitotóxico del hipoclorito de sodio sobre el material vegetal que ocasiona la muerte. Estos resultados corroboran lo planteado por Borges y col. (2004), quienes explican que el hipoclorito de sodio ejerce un efecto fitotóxico en distintas concentraciones (1,0; 2,0 y 3,0 %) por un tiempo de 20 min sobre el material vegetal que ocasiona la muerte del mismo. Jiménez-Terry y col. (2007) plantearon que en la desinfección de explantes de *Cedrela odorata* L. la concentración del 2 % produjo necrosis de los explantes; asimismo ocurrió con el tiempo de desinfección que afectó la brotación y produjo necrosis a los 10 y 15 min de exposición con NaClO al 2 %. López-Gómez *et al.* (2011) plantean que la mayor susceptibilidad de los explantes al hipoclorito de sodio está asociado al catión Na⁺, el cual corresponde a un ion no esencial en la mayor parte de los tejidos vegetales, y que es altamente tóxico en una gran variedad de plantas.

El empleo de la concentración de hipoclorito de sodio al 1,5 % en 15 min, al 1,5 % en 20 min, al 2 % en 15 min, al 2,5 % en 15 min y al 3 % en 15 min logró un aumento significativo de la supervivencia de los explantes superior al 86 %, mostrando diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos con la excepción del 6, 10 y 14 que alcanzaron una supervivencia superior al 70 % (Fig. 3).

Esto puede deberse a que el material vegetal empleado se expuso a menor concentración de hipoclorito de sodio, disminuyendo las afectaciones por necrosis y la posterior muerte de los explantes. Los resultados coinciden con los descritos por varios autores (López-Gómez *et al.*, 2011). La desinfección de explantes foliares provenientes de café aplicando una solución al 3 % de hipoclorito de sodio durante 15 min en genotipos del género *Coffea* spp. ha dado buenos resultados en estudios sobre embriogénesis somática. Ayub y Nisio (2003) aplicaron un método de desinfección en explantes de hojas jóvenes de *Coffea arabica* L. cultivar IAPAR 59, híbrido de Sarchimor, que consistió en la inmersión de las hojas en alcohol al 70 % por 40 s, seguida de una inmersión en solución de NaClO al 2 % y Tween 80 al 1 % por 15 min.



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

Fig. 3. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y el tiempo de desinfección sobre la supervivencia de los explantes.

Las mejores medias se obtuvieron al utilizar el hipoclorito de sodio al 1,5 % en 15 y 20 min, al 2 % en 15 min, al 2,5 % en 15 min y al 3 % en 15 min. Se logró una supervivencia de los explantes superior al 86 %, donde se disminuyó el número de muertos por la acción del hipoclorito de sodio, que provocó las mayores pérdidas de los explantes.

Conclusiones

- Las mejores variantes para la desinfección de hojas de *Coffea arabica* L. en el establecimiento *in vitro* resultaron ser las combinaciones del hipoclorito de sodio al 1,5 % en 15 y 20 min, al 2 % en 15 min, al 2,5 % en 15 min y al 3 % en 15 min.

Bibliografía

- Ayub, R. A. y G. A. Nisio: Embriogenese somática em genótipos de café (*Coffea arabica* L.) écitocinina dependente. UEPG Ci Exatas Terra, Ponta Grossa. 9:25-30, 2003.
- Barra, A. G. y N. J. Mogollón: Aclimatación de vitropiantas de *Etilingera hemisphaerica* 'Red Tulip' Rev. Fav. Agron., (LUZ). 24 Supl. 1: 32-38, 2007.
- Beltrán, Diana Marcela y N. Mesa: El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Arriba perutihemesley*). Revista Colombiana de Biotecnología, 16 (1):203-209, 2014.
- Borges, M.; E, Estrada.; Idelisa Pérez y S. Meneses: Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo

in vitro de *Dioscoreaalata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología, 1(2):127-131,2009.

- Borges, M.; Ros, C.; Yaritza Castellanos; Milanes, S. y R. Velásquez: Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. Biotecnología Vegetal, 4 (4):237-242,2004.
- Cruz, Mileidy; Mayra Acosta; Alina Capote; Leyva, M. y Yelenys Alvarado: Efecto del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de callos de café. Biotecnología Vegetal, 3(2):111-113, 2003.
- Feria, M. de; Jiménez, E.; Barbón, R.; Alina Capote; Maité Chávez y Elisa Quiala: Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Cati-mor 9722 obtenidos en agitador orbital. Biotecnología Vegetal, 5(2): 95-101, 2005.
- InfoStat Versión 1.0: Universidad Nacional de Córdoba. Argentina, 2012.
- Jiménez-Terry, F.; Barbón, R.; Mariana La O; Martha Pérez; Collado, R.; Mayra Acosta-Suárez; Yelenys Alvarado-Capó y D. Agramonte: Efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. Biotecnología Vegetal, 7(1): 45-51, 2007.
- Lacerra-Espino, J.; Ferrer, M.; María Ester González; Yojana Rodriguez y P. Miranda: Selección de híbridos F1 cubanos de café (*Coffea arabica* L.). Café Cacao, 11(2):16-19, 2012.

López-Gómez, P.; Iracheta-Donjuan, R.; Marbella Castellanos-Juárez; Menéndez-López, I.; Aguirre-Medina, J.; Adriana Gutiérrez-Díez; Ma del Carmen Ojeda-Sacarias y B. Pérez-Pérez: Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos elites de *Coffea* spp. cul-

tivados *in vitro*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(5):645-657, 2011.

Sondhal, M. y W. Sharp: High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zflanzenphysiol*, 94:101-108, 1977.

Injerto de caña sobre patrón decapitado en plantaciones establecidas

Alternativa desarrollada por la Estación Experimental de Tercer Frente con la finalidad de obtener mayores rendimientos en la producción de café (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner). Alarga la vida útil de plantaciones envejecidas, se utilizan clones altamente productivos para lograr mejores rendimientos en la producción, y se mantienen las características genotípicas y fenotípicas de la planta madre para la propagación de material selecto.



Injerto logrado



Proceso de injerto



Plantación injertada



Atenciones culturales