

ARTICLES ORIGINAUX

OORSPRONKELIJKE ARTIKELS

ORIGINAL ARTICLES

ARTICULOS ORIGINALES

Agua residual y complementada como sustituto del medio de cultivo "in vitro" de embriones de café



R.A. Ramos*, Mireya Cabrera*, Maria Esther Gonzalez*, S. Landazury**, F. Girón** & Yunis Mederos***

Keywords: Coffee- Wastewater- Embryos

Resumen

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de la Empresa Provincial de Recursos Hidráulicos (Hidroeconomía) de Santiago de Cuba y en el Laboratorio de Genética de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao Tercer Frente, Santiago de Cuba en el período comprendido entre febrero y junio de 1998. El cultivo "in vitro" de embriones de *Coffea arabica* L. var. 'Catuai Rojo' se realizó con el objetivo de sustituir el medio de cultivo empleado tradicionalmente por el agua residual del Combinado Cárnico de Santiago de Cuba, sola y complementada con leche de coco y nitrato de amonio. Se determinaron los componentes químicos, principales, presentes en los sustratos utilizados. Se evaluaron dos índices morfológicos de las plantas (longitud del vástago y de la raíz) a los 19; 27; 36 y 44 días después de la siembra. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos mediante un análisis de varianza, mostrando mejor comportamiento los medios con agua residual complementada con 500 y 1000 mg.l⁻¹ de nitrato de amonio.

Summary

Alone and Complemented Wastewater as a Substitute in an "in vitro" Culture Media of Coffee Embryos

This work was carried out in Provincial Enterprise from Hydraulical Resources of Santiago de Cuba and a Genetic Laboratory from Central Research Station of Coffee and Cacao, Tercer Frente, Santiago de Cuba province, from February to June of 1998 period. The "in vitro" culture of *Coffea arabica* L. 'Catuai Rojo' var. embryos was made as substitute the traditionally culture media using wastewater of Neat Enterprise of Santiago de Cuba as alone and mixed form with coconut milk and ammonium nitrate. Main chemical components were analysed at 19, 27, 36 and 44 days after culturing, the stem and root length were evaluated. The statistical analysis showed a significative difference between treatments. The best behaviour culture media were wastewater complemented with 500 mg.l⁻¹ or 1000 mg.l⁻¹ of ammonium nitrate.

Introducción

La demanda de productos agrícolas y forestales se incrementa dramáticamente. Entre las alternativas de solución a este importante problema se incluyen la obtención de variedades más productivas, precoces con resistencia a enfermedades y la ampliación de la frontera agrícola, entre otras. Estas dos alternativas, sin embargo presentan limitaciones, aún cuando se reconoce la gran contribución del mejoramiento genético en los últimos 50 años, las posibilidades de ganancias netas son cada vez menores y por otro lado, existen limitaciones debido a la competencia entre las áreas destinadas a la agricultura y la urbanización con la destinada a la conservación de la diversidad biológica (10). Otra alternativa viable es la técnica de cultivo "in vitro", la cual es una de las vías para obtener plantas resis-

tentes a enfermedades ecológicas, salinidad, sequedad y de altos rendimientos agrícolas (8). El café es el cultivo perenne de mayor superficie cultivada en las regiones tropicales (2) y donde las técnicas de cultivo "in vitro" han tenido resultados favorables. En el cultivo del café se han realizado numerosos trabajos y en la actualidad se cuenta con varias metodologías para el establecimiento y micropropagación de materiales deseados (12). Para el desarrollo de los explantes se utilizan medios de cultivos básicos, como el de Dutcher y Powell (4); Murashige y Skoog (9) y Schenk and Hildebrandt (15); suplementados con quelato de hierro, cisteína, sacarosa y agar, generalmente estos medios de cultivo se suplementan con sustancias reguladoras de crecimiento y otras sustancias (7, 14). Por la importan-

* Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao- Cruce de Los Baños, Tercer Frente, Santiago de Cuba, CP 92 700 Cuba.
E-mail . cbust@ecicc.ciges.inf.cu

** Universidad de Oriente

*** Delegación Provincial del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio ambiente

Recibido el 04. 11. 99 y aceptado para publicación el 20. 02. 01

cia que tiene la aplicación del cultivo "in vitro" de embriones de café en el mejoramiento genético y conociendo que las sales que se utilizan en la preparación de los medios de cultivo son de alto costo, se realizó el trabajo con el objetivo de sustituir el medio empleado según la metodología tradicional por el agua residual del Combinado Cárnico sola y suplementada con leche de coco y nitrato de amonio.

Materiales y métodos

En el Laboratorio de la Empresa Provincial de Recursos Hidráulicos (Hidroeconomía) de Santiago de Cuba se analizaron los elementos principales presentes en el agua residual procedente de la laguna de oxidación del Combinado Cárnico así como también en la leche de coco; sustratos que se utilizaron para la preparación de los distintos medios de cultivo. En el Laboratorio de Genética de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, Tercer Frente, provincia de Santiago de Cuba se desarrolló la parte experimental del trabajo en el período comprendido entre febrero y junio de 1998. Los medios de cultivo basados en el agua residual se prepararon adicionando las cantidades indicadas en la Tabla 1. Se utilizó como testigo el tratamiento 1, que contiene por cada litro, 100 ml de la solución de macronutrientes Schenk y Hildebrant, 50 ml de la solución de micronutrientes de Dutcher y Powell, complementada con 5 ml de quelato de hierro, 10 ml de solución intermedia, 5 ml de vitamina Morrell y Wetmore y 50 ml de agua de coco.

Tabla 1
Composición de los medios de cultivo preparados con el residual

Tratamiento	Leche de Coco (ml)	NH ₄ NO ₃ (mg)	H ₂ O residual (ml)
1 (testigo)	-	-	-
2	-	-	Csp 1 litro
3	-	100	Csp 1 litro
4	10	-	Csp 1 litro
5	-	50	Csp 1 litro
6	10	110	Csp 1 litro
7	-	110	Csp 1 litro
8	-	55	Csp 1 litro
9	-	165	Csp 1 litro
10	-	500	Csp 1 litro
11	-	1000	Csp 1 litro
12	-	2000	Csp 1 litro
13	10	100	Csp 1 litro

Antes de añadir el agente solidificante (agar) se adicionaron 30 g.l⁻¹ de sacarosa, se filtró y se ajustó el pH a 5,6 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Los medios distribuidos a razón de 15 ml por tubo, se sellaron con tapones de algodón y papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se sembraron embriones procedentes de semillas normales de *Coffea arabica* L. variedad 'Catuai Rojo' con buen estado fitosanitario y adecuada viabilidad, desinfectadas con formol (3 ml en 200 ml de agua destilada). Para facilitar la extracción del embrión se sumergieron las semillas durante 72 horas en solución de ácido bórico

al 5%. Posteriormente se sumergieron las semillas durante 30 minutos en peróxido de hidrógeno al 3%. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada y estéril. Se sumergieron las semillas en agua hasta la extracción del embrión. Se evaluó la longitud del vástago y de la raíz a los 19; 27; 36 y 44 días posteriores a las siembras. Se evaluaron 10 plantas por tratamiento en un diseño completamente al azar. Se aplicó un análisis de varianza clasificación simple y un Test de Duncan para determinar el orden de mérito.

Resultados y discusión

En el agua residual las concentraciones de los elementos esenciales (nitrógeno, fósforo y potasio) se encuentran por debajo de las de los medios basales (Tabla 2) lo que hace necesaria la adición de sustratos que contengan estos elementos para el correcto desarrollo de los embriones. Al evaluar esta agua residual (1, 7), durante los años 1996 y 1997 también se encontraron concentraciones de N, P, K y Ca inferiores a las presentes en los medios basales Murashige y Skoog (9), Schenk y Hildebrant (15) y White (17). Con estos resultados se confirma la estabilidad de estos elementos durante tres años en el agua residual.

Tabla 2
Composición de tres medios basales, la leche de coco y el agua residual (mg.l⁻¹)

Elementos	MS	SH	White	Agua residual	Leche de coco
Na	5	0,13	65	253	4,14
K	790	946,75	65	23,74	42,9
P	39	88,67	2,8	0,44	1,238
S	55	60,21	142	3,44	25,41
Ca	160	54,52	48	24	12,0
Mg	36	37,44	70	55,2	2,4
+Cl	284	48,32	31	385,4	39,05
Fe	5,61	-	0,35	0,17	0,275
N	825	182,54	45	0,02	0,884
Mn	5,5	10,93	1,6	0,01	0,005
B	1,0	1,04	0,26	0,13	0,05

MS - Murashige y Skoog
SH - Schenk y Hildebrant

Los embriones crecieron en los medios preparados con agua residual, agar y sacarosa (Tratamiento 2), sin embargo desarrollaron hojas de color verde menos intenso comparado al testigo. La disminución de la intensidad del color verde de las hojas, probablemente es consecuencia de la baja concentración de nitrógeno. El cultivo "in vitro" de segmentos nodales de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en medio Murashige y Skoog diluido a un octavo (1/8 MS) mostró brotes con signos de clorosis (9).

El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades en los medios de cultivo por su importancia en el metabolismo celular, fotosíntesis y respiración (6). El déficit de este elemento en el vegetal se reconoce por la pérdida del color verde típico de las hojas (5, 16). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la longitud del vástago ($P < 0,05$). Muestran una tendencia

general a tener mayor longitud del vástago los tratamientos 9; 10 y 11 que se mantuvieron entre los mejores durante todo el período de evaluación. Los tratamientos 1 y 2 se encontraron entre los de menor longitud del vástago (Figura 1).

A los 44 días la longitud del vástago osciló entre valores de 0,25 y 0,95 cm (Figura 2). Se demuestra que el uso de hormonas naturales es innecesario para lograr un aumento de la longitud del embrión, resultado similar obtuvieron otros autores quienes señalan que el embrión presenta una estructura bipolar, que potencialmente está preparado para efectuar la división, el alargamiento y la diferenciación, permitiendo el desarrollo progresivo de la raíz y brotes axilares de las plantas (13).

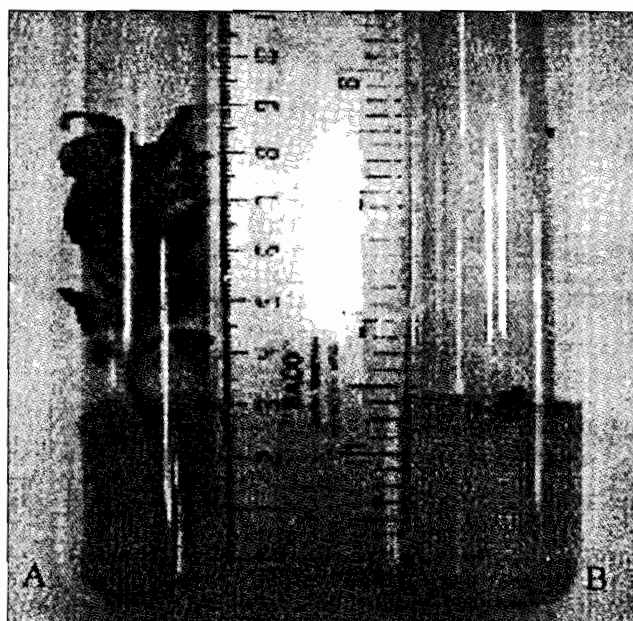


Figura 1: Explantes cultivados a partir de embriones de café en medio tradicional
A - planta con tres meses de edad.
B - embrión con 19 días de cultivo.

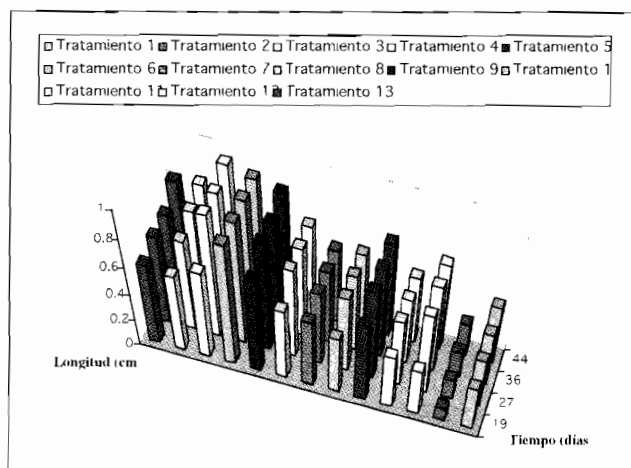


Figura 2: Comportamiento de la longitud del vástago (cm)

La longitud de la raíz a los 19 días de la siembra mostró diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento 11 fue el de mayor respuesta a los 19 y 27 días. A los 44 días de la siembra presentaron mayor longitud de la raíz los tratamientos 10 y 11, que no difirieron entre sí, el tratamiento 10 se diferenció de los demás. Seis tratamientos que no difirieron del testigo presentaron los menores valores de longitud de raíz, entre ellos el tratamiento 2 (Tabla 3). Los resultados de los tratamientos 10 y 11 superan los obtenidos por otros autores (Cruz de la y col, (3) y Martínez y col, (8)) para este cultivo cuando utilizaron otros medios como el Murashige y Skoog modificado (4, 8).

Tabla 3
Longitud de la raíz (cm)

Tratamiento	19 días	27 días	36 días	44 días
1	0,04 d	0,05 d	0,05 e	0,05 d
2	0,35 cd	0,45 cd	0,60 de	0,68 d
3	0,55 cd	0,65 cd	0,65 de	0,65 d
4	0,20 d	0,30 cd	0,30 e	0,30 d
5	1,67 bc	2,37 b	3,10 bc	3,40 bc
6	0,33 d	0,40 cd	0,50 e	0,50 d
7	0,55 cd	0,60 cd	0,60 de	0,65 d
8	1,63 bc	2,10 b	2,53 cd	2,80 c
9	1,80 b	2,20 b	2,65 bcd	2,85 c
10	1,60 bc	1,60 bc	4,70 a	5,50 a
11	2,80 a	3,85 a	4,25 ab	4,55 ab
12	1,73 b	2,50 b	2,47 cd	2,57 c
13	0,35 cd	0,75 cd	0,75 de	0,80 d
ES	0,1246	0,1592	0,2134	0,2009
CV (%)	37,68	36,73	37,90	32,65

Letras iguales en una misma columna no difieren según Duncan para $P < 0,05$

Conclusiones

Se obtuvo una mayor longitud de vástago y raíces en los medios de cultivo preparados con agua residual complementada con 500 y 1000 mg.l⁻¹ de nitrato de amonio.

Es posible sustituir el medio de cultivo "in vitro" tradicional de embriones de café.

Bibliografía

1. Alvarez R., Ramón R., Landazury S. & Girón F., 1997. Evaluación del efecto de diferentes sustratos en el cultivo "in vitro" de tejidos de café (embriogénesis y formación de callos). Informe Final para Tesis en Opción al Título de Licenciado en Química. Fondo de Manuscritos ECICC, 48 p.
2. Céspedes O., 1992. Clasificación de genotipos de *Coffea arabica* L. mediante el análisis de componentes principales. Trabajo de Diploma (Ingeniero Agrónomo). Facultad de Agronomía (ISCAB). 25 p.
3. Cruz de la G., Estrada J., Orozco V., Labrada Miriam; Infante Zucel & Martínez Leticia, 1990. Metodología de micropropagación e identificación de variedades de café. Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", 39 p.
4. Dutcher R. & Powell L.E., 1972. Culture of apple shoots from buds *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97, 511-514.
5. Kolmans E. & Vásquez D., 1999. Manual de agricultura ecológica. La Habana: Grupo Agricultura Orgánica ACTAF. 149 p.
6. López P. Cristina, 1990. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. En: Fundamentos Teóricos Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales.—Roma: FAO, 112 p.
7. Machado P.G., Landazury S., Girón F. & Ramos R., 1996. Agua residual del Combinado Cárnico en Santiago de Cuba. Informe Sobre Traba de Curso. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Departamento de Química. Universidad de Oriente, 46 p.
8. Martínez F., Cabrera Mireya, I. García Rosa & Rosales O., 1989. Establecimiento de una metodología de propagación "in vitro". Santiago de Cuba. Documentación Técnica. ECICC, 12 p.
9. Murashige T. & Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473- 497.
10. Ramírez Ninosca, 1989. Cultivo de tejidos. Pueblo y Educación, La Habana.
11. Rey H.Y. Burtink O.J., Sansberro & Mroginski L.A., 1991. Medios de Cultivo para el establecimiento "in vitro" de explantes de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Turrialba* 41(3): 306-310.
12. Rosell C.A., 1990. Introducción. En: Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma: FAO. 42 p.
13. Santana Nancy, 1989. Efectos de algunos componentes del medio de cultivo sobre embriones de café (*Coffea arabica* L.) cultivado "in vitro". *Cultivos tropicales*, 11, 53-60.
14. Santana Nancy, 1998. Establecimiento de una metodología para la producción de la semilla artificial del café (*Coffea* sp.). Informe Anual Proyecto. INCA-CICY, La Habana.
15. Schenk R.U. & Hildebrandt A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50, 199-204.
16. Thomazello R., Alves de Toledo J. & Gil E., 1988. Guia para identificação dos defeciências menerais, toxidez, destúrbios fisiológicos, pragas e doenças do cafeeiro. Campinas: IBC-GERCA, 81 p.
17. White P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells, Ed. 2, The Ronald Press company. New York.
18. Zok S.P., 1991. Dublín. Multiplication végétative "in vitro" par culture d' apex chez *Coffea arabica* L. Action de solutions minérales et de régulateurs de croissance. *Café Cacao Thé*, 35, 245-256.

R. A. Ramos (Cuba). Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Master en Biotecnología. Investigador Aspirante. *Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao- Cruce de Los Baños, Tercer Frente, Santiago de Cuba, CP 92 700 Cuba. E-mail: cbust@ecicc.ciges.inf.cu

Mireya Cabrera Ochoa (Cuba). Ingeniero Agrónomo. Investigador Auxiliar. *Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao- Cruce de Los Baños, Tercer Frente, Santiago de Cuba, CP 92 700 Cuba. E-mail: cbust@ecicc.ciges.inf.cu

María Esther González (Cuba). Lic. Microbiología. Master en Biotecnología. Investigador Agradado.

S. Landazury (Cuba). Lic. en Química. Profesor Titular. *Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao- Cruce de Los Baños. Tercer Frente, Santiago de Cuba, CP 92 700 Cuba. E-mail: cbust@ecicc.ciges.inf.cu

F. Girón (Cuba). Lic. en Química. Universidad de Oriente

Yunis Mederos Valdés. Lic. en Biología. Especialista municipal del CITMA. *** Delegación Provincial del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio ambiente