

COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES GENOTIPOS DE CAFETO FRENTE AL EMPLEO DE UN BIOPREPARADO BACTERIANO EN LA CALLOGÉNESIS

María E. González[✉], Annia Hernández y María M. Hernández

ABSTRACT. With the purpose of improving plant growth under *in vitro* culture, different alternatives have been studied, among which it is necessary to highlight the handling of culture conditions and the application of growth stimulating substances to culture media. The bacterial biopreparation is made up of natural products, generally obtained from promising native strains having a chemical composition of a variable biological activity; but it is still a lot to investigate about the influence of their application on plant growth and development. The present work was carried out with the objective of evaluating the effect of a biopreparation obtained from *Burkholderia cepacia* in culture media on coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) micropropagation. The effect of this bioproduct was determined at the callus regeneration phase through employing an auxinic extract coming from it; therefore, doses were readjusted. Favorable effects were observed for the variables evaluated in the coffee callus from the genotypes studied, when adding to the culture medium concentrations of the biopreparation between 0.7 and 0.9 mg.L⁻¹, reaching better results than the control, which is attributed to the chemical composition of the bioproduct. Results suggest the possibility of using this bioproduct as an auxinic source, to improve the efficiency of micropropagation processes.

Key words: bacteria, culture media, coffee, callus regeneration, *in vitro* culture, plant growth substances

RESUMEN. Con la finalidad de mejorar el crecimiento de las plantas en el cultivo *in vitro*, se han estudiado diferentes alternativas, entre las que se destaca el manejo de las condiciones de cultivo y la aplicación de sustancias estimuladoras del crecimiento a los medios de cultivo. Los biopreparados bacterianos son productos naturales, generalmente obtenidos a partir de cepas nativas promisorias, que poseen una composición química de variada actividad biológica, pero aún queda mucho que investigar sobre la influencia de su aplicación en el crecimiento y desarrollo de las plantas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de un biopreparado obtenido a partir de *Burkholderia cepacia* en los medios de cultivo para la micropropagación del café (*Coffea canephora* var. Robusta). Se determinó el efecto de este bioproducto en la fase de callogénesis a través del empleo de un extracto auxínico procedente de este, para lo cual se realizó un reajuste de dosis. Se observaron efectos favorables para las variables evaluadas en los callos de café de los genotipos estudiados, cuando se añadió al medio de cultivo concentraciones del biopreparado entre 0.7 y 0.9 mg.L⁻¹, alcanzándose resultados superiores al control, lo que se atribuye a la composición química del bioproducto. Los resultados sugieren la posibilidad de utilizar el bioproducto como fuente auxínica, para mejorar la eficiencia en los procesos de micropropagación.

Palabras clave: bacteria, medio de cultivo, café, callogénesis, cultivo *in vitro*, sustancias de crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se realizan numerosas investigaciones para establecer metodologías de micropropagación en diferentes cultivos de interés agrícola, demostrándose la necesidad de desarrollar previamente protocolos de cultivo *in vitro* de células y tejidos para cada especie, los que deben ser efectivos y permitir obtener las plantas

regeneradas a partir de células, tejidos u órganos de la planta en cuestión (1).

En este sentido, la calidad de los medios de cultivo es un factor importante para lograr el éxito en cualquiera de las fases de micropropagación, la cual está relacionada con condiciones como el pH, el estado físico, la concentración de sustancias químicas y su estabilidad. Diferentes sustancias con efecto estimulador del crecimiento y desarrollo general de las plantas *in vitro* son empleadas en la micropropagación (2, 3), donde se ha comprobado que provocan el incremento de la masa fresca de los callos, la tasa de multiplicación de los explantes, la elongación y el crecimiento proporcional del tallo y la emisión de un fuerte sistema radical, entre otros efectos beneficiosos (4).

Dra.C. María E. González; Investigador Auxiliar y Dra.C. María M. Hernández, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveita Postal 1, San José de Las Lajas. La Habana; Dra.C. Annia Hernández, Profesora Asistente del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, calle 25 # 455 entre J e I, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana.

✉ esther@inca.edu.cu

El presente trabajo se realizó considerando lo anteriormente expuesto y que la embriogénesis somática constituye una importante alternativa para mantener colecciones de variedades, regionalizar genotipos promisorios y acortar el ciclo de selección, además de permitir la producción a gran escala de individuos deseados, lo que abre nuevas perspectivas a la multiplicación vegetativa de numerosas especies vegetales, aspecto significativo en el cultivo de *C. canephora* var. Robusta, caracterizada por su autoincompatibilidad. El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto auxínico de un biopreparado bacteriano en medios de cultivo empleados para la calogénesis del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. La especie estudiada fue *Coffea canephora* Pierre ex Froehner var. Robusta. Se utilizaron los genotipos promisorios M-229, K-234 y M-28 del banco de germoplasma de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao. Se emplearon hojas de plantas (fuente de los explantes) establecidas en campo de dos años de edad y pretratadas con el fungicida Benomyl (1.5 g.L⁻¹). La toma de las muestras, desinfección, disección de las hojas y el tamaño de los explantes se realizaron según lo recomendado en las metodologías precedentes (5).

Características y modo de empleo del biopreparado bacteriano. El biopreparado bacteriano utilizado en el presente estudio fue obtenido a partir de metabolitos activos, producidos por una cepa nativa de *Burkholderia cepacia* aislada de la rizosfera del cultivo del maíz y cultivada en el medio Sirope fructosa (Sp) (6). Entre los componentes del biopreparado se destacan las auxinas, el ácido salicílico, los sideróforos y alcaloides quinilosidínicos de naturaleza antibiótica. La efectividad del nuevo biopreparado se evaluó a través del empleo de un extracto auxínico de este, obtenido según protocolo de trabajo descrito en estudios precedentes (7); la concentración utilizada fue de 12 mg.L⁻¹ (8).

Condiciones experimentales. Se utilizaron como medio basal las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (9), suplementado con inositol (100 mg.L⁻¹), vitaminas de Morell (4 mg.L⁻¹), cisteína-HCl (25 mg.L⁻¹) y sacarosa (30 g.L⁻¹). Se empleó como agente gelificante gelrite (2 g.L⁻¹). Los reguladores del crecimiento convencionales o sustitutos de estos fueron adicionados según se describe en cada bioensayo. El pH fue ajustado a 5.7 y la esterilización se realizó en autoclave a 121°C, durante 15 minutos y 1.2 kg.cm⁻². Los explantes fueron cultivados en medio sólido utilizando tubos de cultivo de 15 cm de largo por 2.5 cm de ancho, con tapones de goma, contentivos de 15 mL del medio de cultivo. Los subcultivos se realizaron cada 21 días, tomando como referencia los resultados al evaluar las curvas de crecimiento celular para cada genotipo.

Efectividad del extracto auxínico del biopreparado en la calogénesis. A partir del extracto auxínico, se hicieron

diluciones para obtener las concentraciones a evaluar, en combinación con la citoquinina utilizada en los medios de cultivo convencionales para la especie estudiada; se empleó como testigo el medio de formación de callos MFC-1 con 0.5 y 2.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4- dicloro fenoxiacético) y Kinetina respectivamente (10), considerando los resultados de estudios preliminares.

Para la inducción de la calogénesis se emplearon 120 explantes foliares por tratamiento. Se realizaron tres bioensayos con cinco repeticiones por tratamiento y tres repeticiones de ellos en el tiempo.

● **Bioensayo 1.** Efecto del extracto auxínico del biopreparado como sustituto del ácido 2,4- dicloro fenoxiacético (2,4-D).

Se realizó un análisis empleando cinco concentraciones del extracto auxínico (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.L⁻¹) en sustitución del 2,4-D, combinadas con la kinetina (2.0 mg.L⁻¹), denominándose los medios de cultivo MFB-1, MFB-2, MFB-3, MFB-4 y MFB-5, respectivamente.

A los 25 y 50 días de cultivo, se evaluó la masa fresca del callo (g) en 50 explantes por tratamiento, utilizando para ello una balanza Sartorius de 0.1 mg de precisión. A los 50 días de cultivo, se evaluaron la formación de callos embriogénicos, así como la coloración, consistencia y velocidad de crecimiento del callo, según las escalas 1, 2 y 3, respectivamente:

Escala 1: Coloración del callo

B- Blanco
BC- Blanco cremoso
A- Amarillo
Ca- Carmelita

Escala 2: Consistencia del callo

F- Friable
C- Compacta
E- Esponjosa

Escala 3: Velocidad de crecimiento del callo

L- Lenta (callos formados después de los 30 días y hasta los 40 días)
M- Moderada (callos formados a los 30 días)
R- Rápida (callos formados antes de los 30 días)

● **Bioensayo 2.** Ajuste de las concentraciones del extracto auxínico como sustituto del ácido 2,4- dicloro fenoxiacético (2,4-D).

Para ajustar la concentración del extracto auxínico más efectiva, se establecieron seis niveles de este, que estuvieron comprendidos en el rango de la respuesta más favorable, según el Bioensayo 1 (0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 1.2 mg.L⁻¹), denominándose estos medios MFA-1, MFA-2, MFA-3, MFA-4, MFA-5 y MFA-6, respectivamente.

Se realizaron evaluaciones a los 25, 50 y 120 días de cultivo, atendiendo a los indicadores masa fresca (g) y consistencia del callo, según la escala 2 (Bioensayo 1) en 50 explantes por tratamiento. Además, se evaluó el contenido de proteínas totales (mg.g⁻¹). Para el estudio de este último indicador se tomaron 25 callos por cada tratamiento. Se maceraron en un mortero con sílice a

0°C, luego se le añadió 1 mL de buffer tris-125 Mm, pH 6.8, Na Cl-50 Mm. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos y se tomó el sobrenadante. La cuantificación del contenido de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (11). La lectura de absorbancia de las muestras se realizó a 595 nm en un fotocolorímetro Spekoll 11, para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a partir de una solución de 1 mg.mL⁻¹.

• Bioensayo 3. Efecto del extracto auxínico del biopreparado y los reguladores convencionales en la inducción de callos con estructuras embriogénicas.

Este estudio se realizó con la finalidad de comparar la efectividad del extracto auxínico del biopreparado bacteriano, con respecto a las auxinas convencionales Picloram y 2,4-D en la inducción de callos con características embriogénicas en los tres genotipos de la variedad Robusta. Se utilizaron los medios de formación de callos MFC-1 (Bioensayo 1), MFA-3 (Bioensayo 2) y MFC-3 (1.0 mg.L⁻¹ de Picloram y 2.0 mg.L⁻¹ de Kinetina), inoculándose 100 explantes por tratamiento. La formación de callos con estructuras embriogénicas se evaluó a los 90 días de cultivo en 50 explantes por tratamiento.

Análisis estadísticos. Como punto de partida a todas las variables se les comprobó su normalidad por el método de Shapiro y Will. Los datos originales de las variables expresadas en porcentaje se transformaron mediante la fórmula $\arcsen\sqrt{\%}$. En los experimentos factoriales, a los valores de las diferentes variables se les realizó un análisis de varianza bifactorial, utilizando el procesador estadístico Start (Ver 4.10), considerando los factores descritos en la Tabla I.

Tabla I. Descripción de los factores y niveles para cada bioensayo

Bioensayo	Factor*	Niveles
1	Concentración del biopreparado	0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.L ⁻¹
2	Concentración del biopreparado	0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 y 1.2 mg.L ⁻¹
3	Medio de cultivo	MFC-1, MFA-3 y MFC-3

*El factor genotipo con sus tres niveles (M-229, K-234 y M-28) se mantuvo constante en los tres bioensayos

En los casos en que se observaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 %, para la comparación de las medias, utilizando el programa STATGRAPHICS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los bioensayos 1 y 2 mostraron el efecto positivo del extracto auxínico del biopreparado, observándose respuestas favorables en los indicadores evaluados al emplearse en sustitución del 2,4-D en presencia de la Kinetina.

Se detectaron interacciones significativas entre los factores analizados. En la Tabla II se presentan los valores de masa fresca de los callos, para los genotipos en estudio a los 25 y 50 días de cultivo; no existieron dife-

rencias significativas entre los tratamientos a los 25 días de cultivo, lo que pudiera ser explicado por el crecimiento celular lento que se evidenció durante la etapa inicial del proceso, debido a la fase de adaptación de los explantes a las nuevas condiciones de cultivo, siendo esta fase, de modo general, poco influida por el medio de cultivo (12).

Tabla II. Masa fresca en callos de *C. canephora* var. Robusta obtenidos con el empleo del extracto auxínico del biopreparado (g)

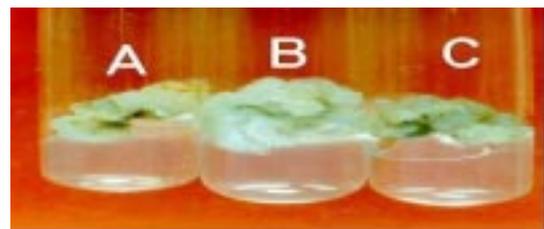
Tratamientos	25 días			50 días		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
MFC-1	0.271	0.264	0.237	0.927 c	0.919 c	0.902 c
MFB-1	0.253	0.252	0.230	0.499 e	0.473 e	0.451 e
MFB-2	0.257	0.213	0.228	2.078 a	2.052 a	1.678 b
MFB-3	0.275	0.266	0.270	1.783 b	1.737 b	1.997 a
MFB-4	0.225	0.229	0.214	0.718 d	0.721 d	0.715 d
MFB-5	0.223	0.227	0.212	0.711 d	0.701 d	0.712 d
ES \bar{x} (\pm)	0.005 ns			0.073**		

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$

** significativo para $p < 0.01$

Sin embargo, al analizar los valores de las medias de los tratamientos a los 50 días de cultivo, se observaron diferencias significativas para los tres genotipos, en dependencia del medio de cultivo, dado por el crecimiento celular intenso que caracterizó a esta fase de cultivo, con una elevada división celular que provocó un incremento significativo en la masa fresca de los callos. Este efecto fue más marcado en los tres genotipos con los medios MFB-2 y MFB-3, alcanzándose valores promedio del peso de la masa calogénica entre 1.737 y 2.078 g, niveles que se diferenciaron significativamente de los alcanzados al utilizar el medio control.

Es de destacar que para los genotipos M-229 y K-234, el efecto más favorable se obtuvo en el medio MFB-2, con 0.5 mg.L⁻¹ del extracto auxínico del biopreparado, difiriendo significativamente de los valores de masa calogénica alcanzados en el medio MFB-3, ambos medios difirieron del control, en el cual la masa fresca osciló entre 0.919-0.927 g para ambos genotipos. En la Figura 1 se aprecia el desarrollo de callos procedentes del genotipo M-229 a los 50 días de cultivo en los medios MFC-1, MFB-2 y MFB-3, observándose un incremento significativo de la masa fresca al ser utilizado el medio MFB-2, seguido por el medio MFB-3, que aunque favoreció el proceso en menor grado, permitió obtener valores superiores a lo observado con el control.



A- Medio MFC-1, B- Medio MFB-2, C-Medio MFB-3

Figura 1. Callos del genotipo M-229 a los 50 días de cultivo con el empleo del biopreparado

Sin embargo, en el genotipo M-28, el incremento de la masa de los callos fue superior en el medio MFB-3 con 1.0 mg.L^{-1} del extracto auxínico, difiriendo de lo observado en el medio con 0.5 mg.L^{-1} del bioproducto (MFB-2), donde el callo creció más lentamente, evidenciándose el comportamiento diferencial de este material en comparación con los otros genotipos, lo que pudiera relacionarse con variaciones en sus requerimientos hormonales.

Las demás variantes de medios de cultivo con el biopreparado, mostraron una tendencia a estimular en menor medida la masa fresca del callo, efecto observado para los tres genotipos, obteniéndose valores que difirieron significativamente de los alcanzados en el medio MFC-1.

Los resultados evidenciaron la relación entre el genotipo y el medio de cultivo, con respecto a la respuesta de los explantes a la disminución o el incremento de la masa fresca del callo. Los genotipos M-229 y K-234 resultaron estimulados en mayor grado con igual dosis del biopreparado (0.5 mg.L^{-1}), demostrándose la efectividad de esta al favorecer el indicador analizado.

Se observó que la variante del medio de cultivo MFB-2 no indujo el mismo efecto en el genotipo M-28; al parecer, este material requirió de un incremento en la dosis para que se expresara en mayor grado y en las condiciones estudiadas, su respuesta a la callogénesis, lo que pudiera ser explicado por las variaciones genéticas que suelen presentarse cuando se emplea la semilla en la propagación de estos genotipos, debido a la autoincompatibilidad que caracteriza a la especie *C. canephora*, que puede ocasionar variabilidad en la respuesta de los genotipos a las diferentes etapas del proceso de embriogénesis somática, haciéndolos diferir marcadamente en su habilidad para responder a la inducción de la callogénesis, debido a la manifestación de cambios genéticos durante la reproducción.

Estos resultados se corresponden con otros que destacaron la existencia de variaciones al evaluar la masa de los callos en genotipos de *C. arabica* (13). Los resultados demuestran la interrelación e influencia de factores como el genotipo y las características del medio en el comportamiento *in vitro* del material cultivado, observándose que la diferencia entre genotipos, ante la respuesta a la embriogénesis, es un fenómeno que se manifiesta independientemente de la especie, aunque el grado de diferenciación está en correspondencia con sus características.

La formación de callos con estructuras embriogénicas presentó un comportamiento similar al descrito para la masa fresca, existiendo interacción significativa entre los factores analizados. En la Figura 2 se presentan los porcentajes de formación de callos para los tres genotipos en estudio a los 50 días de cultivo.

Se observó que los medios MFB-2 y MFB-3 favorecieron el comportamiento de esta variable, obteniéndose valores entre 96.8 y 97.9 % para los genotipos M-229 y K-234, los que difirieron estadísticamente de los alcanzados en el medio MFC-1 (control), donde los porcentajes logrados fueron del 93.0 %. Sin embargo, en el genotipo M-28, al emplear los medios con el extracto auxínico MFB-2

y MFB-3, se lograron porcentajes significativamente inferiores a los obtenidos para los genotipos anteriormente descritos, pero que difirieron de los valores de MFC-1 (87.2 %) para este material, haciéndose notable la respuesta diferenciada de este genotipo ante las variantes de medio de cultivo.

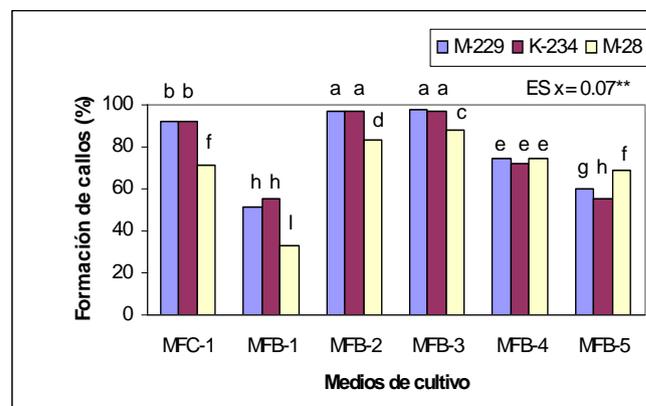


Figura 2. Formación de callos embriogénicos con el extracto auxínico en genotipos *C. canephora* var. Robusta a los 50 días de cultivo

En general, se evidenció un mayor efecto inductor del extracto auxínico del biopreparado en las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg.L^{-1} ; concentraciones superiores a 1.0 mg.L^{-1} deprimieron los porcentajes de callos embriogénicos con respecto al control, lográndose el balance hormonal adecuado para la inducción de callos con estructuras embriogénicas con las concentraciones anteriormente descritas, aspecto favorable ya que el empleo de bajas concentraciones de reguladores del crecimiento contribuye a la estabilidad genética del material vegetal y una buena regeneración de plantas a partir de los callos formados (14).

La formación de callos con estructuras embriogénicas es un indicador importante, por cuanto tiene que ver con la futura respuesta del material cultivado al proceso de embriogénesis somática en general.

Al comparar la respuesta inducida por las diferentes variantes de medios de cultivo contentivos del extracto auxínico, en relación con las variables coloración, velocidad de crecimiento y consistencia de los callos, se obtuvo, en general, la mejor respuesta con el medio MFB-3 para los tres genotipos, resultados que son similares a los alcanzados con el medio control MFC-1 e indicativos del efecto positivo de esta variante de medio de cultivo sobre los indicadores evaluados. La apariencia de los callos varió a partir de los 12 días de cultivo, los que se hicieron más friables con el empleo de los medios MFB-2 y MFB-3 en los genotipos M-229 y K-234, mientras que en el genotipo M-28 los callos adquirieron las características más favorables con los medios MFB-3 y MFB-4, que contenían entre 1.0 y 1.5 mg.L^{-1} del extracto auxínico, mostrando diferencias en cuanto a sus exigencias hormonales para estas variables (Tabla III), coincidiendo este comportamiento con lo observado para otros indicadores en los análisis precedentes.

Tabla III. Características morfológicas en callos de *C. canephora* var. Robusta a los 50 días de cultivo en medio con el extracto auxínico

Medio de cultivo	Coloración			Velocidad de crecimiento			Consistencia		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
MFC-1	BC	BC	C	R	R	R	F	F	F
MFB-1	B	B	B	L	L	L	E	E	E
MFB-2	BC	BC	B	R	L	L	F	F	E
MFB-3	BC	BC	BC	R	R	R	F	F	F
MFB-4	C	C	C	L	L	R	C	C	F
MFB-5	C	C	C	L	L	L	C	C	C

B-Blanco, BC-Blanco cremoso, C-Carmelita, L-Callos formados después de los 30 días y hasta los 40 días, R-Callos formados antes de los 30 días, F-Friable, C-Compacto, E-Esponjoso

Los callos que crecieron en el medio MFB-1 presentaron consistencia esponjosa en los explantes de los tres genotipos, debido posiblemente a la presencia de numerosos espacios intercelulares en la masa callogénica, lo que pudiera estar relacionado con un balance de reguladores del crecimiento no adecuado al emplear esta variante de medio de cultivo.

La velocidad de crecimiento resultó favorecida al emplear el medio MFB-3 (1 mg.L⁻¹ del extracto auxínico), comportamiento análogo al presentado en el medio MFC-1; el genotipo M-229 mostró una respuesta similar al ser cultivado en el medio MFB-2 que contenía 0.5 mg.L⁻¹ del extracto auxínico en sustitución del 2,4-D; sin embargo, en el genotipo M-28 este efecto se logró, además, con MFB-4, lo que pudiera ser explicado por el comportamiento diferencial de este último genotipo, el cual respondió de igual forma a concentraciones más elevadas del extracto auxínico.

En relación con la coloración del callo, se obtuvieron mejores resultados con los medios MFB-2 y MFB-3 y los tres genotipos, predominando el color blanco cremoso, resultado que coincidió con lo observado en el medio MFC-1 para M-229 y K-234, a diferencia de lo obtenido en este medio para el genotipo M-28, donde predominó el color carmelita, comportamiento también observado con dosis del extracto auxínico del biopreparado superior a 1 mg.L⁻¹.

Los resultados favorables alcanzados con respecto a la apariencia del callo con estructura embriogénica, coincidieron con las características de coloración de blanco-cremoso a amarillo y consistencia de semifriable a

friable señaladas para otros materiales de café (5), aspectos que dependen de la especie, el genotipo y las particularidades del medio de cultivo.

Otros han obtenido resultados positivos en relación con los valores de masa fresca y la evaluación de aspectos cualitativos en callos procedentes de explantes de diversos cultivos, al utilizar diferentes compuestos con efecto biorregulador como suplementos o sustitutos de los reguladores del crecimiento convencionales (3, 15, 16), llegando a establecer nuevos y efectivos protocolos de regeneración en especies de interés agrícola. En este mismo sentido, han sido señalados los efectos benéficos obtenidos en la morfogénesis y el crecimiento de vitroplantas de tabaco y papa, al explotar las potencialidades de bacterias de la especie *Methylovorus may*s en relación con la producción de fitohormonas (2).

En la Tabla IV se exponen los niveles de masa fresca de los callos obtenidos para las diferentes variantes estudiadas, al realizar el reajuste de concentraciones del extracto auxínico del biopreparado, existiendo interacción significativa entre los factores analizados.

Se observó un incremento de la masa callogénica en correspondencia con la edad del cultivo, lo que resultó evidente para los tres genotipos. No se obtuvieron diferencias entre los tratamientos a los 25 días de cultivo, atribuible a las causas expuestas para el comportamiento de este indicador en el bioensayo anterior; sin embargo, a los 50 y 120 días de cultivo, las diferencias entre los tratamientos fueron significativas. La concentración de 0.7 mg.L⁻¹ del extracto auxínico (MFA-3) resultó la más adecuada para los tres genotipos, permitiendo obtener valores entre 2.388 y 2.485 g a los 50 días, y entre 2.889 y 2.924 g a los 120 días de cultivo; estos niveles de masa fresca se diferenciaron significativamente de lo alcanzado con el tratamiento control MFC-1. Es de destacar que a los 50 días de cultivo y con el medio MFA-2 en el genotipo M-28, se obtuvieron valores que se diferenciaron de los alcanzados en M-229 y K-234 en las mismas condiciones de cultivo; sin embargo, estos valores difirieron de los obtenidos en el medio control, demostrándose la efectividad de esta variante de medio para el genotipo M-28. A los 120 días no se apreciaron diferencias entre los valores de masa fresca de este genotipo y los restantes para iguales condiciones de cultivo.

Tabla IV. Masa fresca en callos de *C. canephora* var. Robusta a los 25, 50 y 120 días de cultivo en medios con el extracto auxínico del biopreparado (g)

Tratamientos	25 días			50 días			120 días		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
MFC-1	0.260	0.244	0.236	0.941 d	0.950 d	0.915 d	1.953 c	1.949 c	0.939 d
MFA-1	0.254	0.253	0.235	0.671 f	0.665 f	0.657 f	0.852 e	0.849 e	0.841 e
MFA-2	0.259	0.217	0.233	2.071 b	2.058 b	1.783 c	2.347 b	2.335 b	2.323 b
MFA-3	0.278	0.267	0.273	2.485 a	2.457 a	2.388 a	2.913 a	2.924 a	2.889 a
MFA-4	0.270	0.262	0.267	1.795 c	1.744 c	1.898 c	1.954 c	1.943 c	1.995 c
MFA-5	0.271	0.261	0.268	1.797 c	1.743 c	1.897 c	1.951 c	1.940 c	1.991 c
MFA-6	0.224	0.231	0.227	0.717 e	0.715 e	0.713 e	0.943 d	0.937 d	0.915 d
ES \bar{x} (\pm)	0.137 n.s			0.041 **			0.031 **		

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$

** significativo para $p < 0.01$

Con el medio MFA-4, a los 50 días se alcanzaron niveles de masa fresca que difirieron de lo logrado con el control para los tres genotipos; sin embargo, con este mismo medio a los 120 días de cultivo, se obtuvieron valores en los genotipos M-229 y K-234, que no difirieron de lo alcanzado con el medio control, no ocurriendo así en M-28, donde se observó un efecto favorable sobre la masa fresca con esta variante de medio. Las variantes MFA-1 y MFA-6 mostraron tendencia a disminuir los niveles de masa fresca en los callos de los tres genotipos.

Los resultados en relación con la masa de los callos se corresponden con la variación observada en estudios para materiales de diferentes días de cultivo y con el empleo de nuevas sustancias con efecto biorregulador en otros genotipos de cafeto. Así, se informaron valores de masa fresca entre 0.241 y 2.680 g para callos de *C. canephora* cultivados en medios con Pectimorf (12), resultados que fueron superados por los logrados en este estudio con 0.7 mg.L⁻¹ del extracto auxínico del biopreparado.

En la Tabla V se muestran los valores del contenido de proteínas totales en los callos con los distintos tratamientos, otro indicador de importancia en los estudios de factibilidad biológica.

A los 25 días, no existieron diferencias significativas entre el contenido de proteínas; sin embargo, a los 50 días de cultivo, la diferencia a favor del medio MFA-3 se hizo significativa, mostrando un valor superior respecto al resto de las variantes con el empleo del extracto auxínico y al medio control. Estos valores pudieran deberse a la síntesis constante de proteínas, dada la elevada multiplicación y división celular durante esta fase de crecimiento del callo. En callos de 120 días de cultivo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y se obtuvo una disminución considerable de los niveles de proteínas. Esta respuesta pudiera estar asociada a los cambios estructurales, así como a las características del metabolismo y la división celular que tiene lugar durante esta fase del cultivo. Los callos cultivados en las condiciones anteriormente descritas se caracterizaron por presentar textura friable.

En el análisis de la respuesta observada al reajustar la concentración del biopreparado, se evidenció el

favorecimiento del proceso de callogénesis, expresado a través del incremento de la masa fresca, adecuados niveles proteicos y la textura friable de los callos. Estos resultados pudieran ser explicados por la marcada influencia sobre los explantes, de la concentración del extracto auxínico del biopreparado (medio MFA-3) empleada en sustitución del 2,4-D. Al parecer, con esta concentración en combinación con la Kinetina (2.0 mg.L⁻¹), se logró un balance hormonal favorable para la inducción de la embriogénesis somática en los genotipos evaluados.

Los resultados sugieren la posibilidad de utilizar el bioproducto como fuente auxínica, para mejorar la eficiencia en el cultivo *in vitro* de los genotipos de *C. canephora* var. Robusta, con insumos nacionales, ya que este ejerce una mayor acción morfogénica sobre estos materiales, en relación con el 2,4-D. Este aspecto es significativo, ya que se trata de la sustitución del 2,4-D por un biopreparado bacteriano, lo cual posibilita evadir el peligro de aparición de mutantes durante el proceso cuando se emplea 2,4-D, auxina capaz de provocar, en ocasiones, cambios en el material regenerado durante el proceso de morfogénesis de numerosas especies vegetales, por lo que esta pudiera ser una alternativa efectiva en estudios de micropropagación.

Al analizar el efecto del extracto auxínico del biopreparado y los reguladores convencionales en la inducción de callos con estructuras embriogénicas, se detectó interacción significativa (Figura 3).

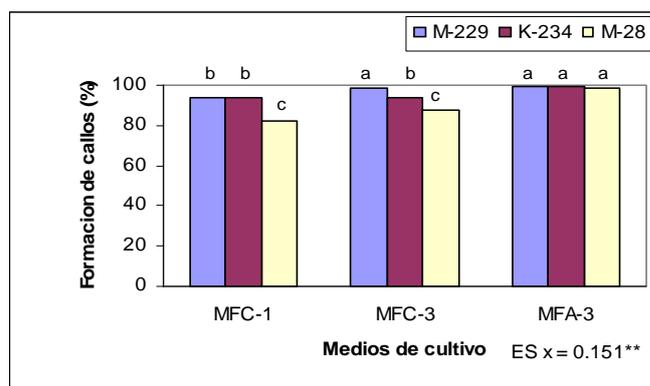


Figura 3. Formación de callos de *C. canephora* var. Robusta en diferentes medios de cultivo

Tabla V. Proteínas totales en callos de *C. canephora* var. Robusta cultivados en medios con el extracto auxínico biopreparado (mg.g⁻¹)

Tratamientos	25 días			50 días			120 días		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
MFC-1	2.312	2.221	2.223	2.568 b	2.567 b	2.209 c	1.310	1.277	1.273
MFA-1	2.311	2.215	2.217	2.201 c	2.198 c	1.741 d	1.309	1.271	1.269
MFA-2	2.315	2.221	2.135	2.711 b	2.743 b	2.174 c	1.315	1.275	1.272
MFA-3	2.329	2.225	2.228	3.997 a	3.681 a	3.607 a	1.398	1.317	1.267
MFA-4	2.328	2.220	2.275	2.705 b	2.718 b	2.693 b	1.331	1.284	1.312
MFA-5	2.326	2.217	2.273	2.701 b	2.715 b	2.690 b	1.327	1.280	1.311
MFA-6	2.247	2.171	2.115	2.195 c	2.189 c	2.185 c	1.307	1.306	1.303
ES \bar{x} (\pm)	0.135 ns			0.012**			0.154 ns		

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente, según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$

** significativo para $p < 0.01$

Se evidenció la mejor respuesta con la combinación del medio MFA-3 y los tres genotipos, alcanzándose valores del 98.7 al 99.3%, resultados que no difirieron de los obtenidos para M-229 en el medio MFC-3 que contenía 1 mg.L⁻¹ de Picloram, dada su mayor respuesta, lo que coincide con el comportamiento mostrado por este material, al ser cultivado en las variantes de medio de cultivo evaluadas en los bioensayos precedentes.

Con las variantes MFC-1 y MFC-3, los genotipos K-234 y M-28 mostraron similar comportamiento, observándose a la vez diferencias significativas en los resultados alcanzados para las combinaciones de cada genotipo y los medios de cultivo referidos, siendo superior la combinación de K-234 y ambos medios.

En general, se demostró que el medio MFA-3 con 0.7 mg.L⁻¹ del extracto auxínico, superó el efecto inductor del resto de los medios e indujo callos embriogénicos con características más favorables en cuanto a textura y color, corroborándose la factibilidad de empleo de esta variante de medio de cultivo para estos genotipos de café.

Este comportamiento pudiera ser explicado por la efectividad de la concentración del biopreparado empleada (0.7 mg.L⁻¹), en sustitución del 2,4-D, la que al parecer, propició un equilibrio hormonal más favorable para la formación de callos con estructuras embriogénicas en los genotipos de *C. canephora* en relación con los demás medios de cultivo, a pesar de que el 2,4-D ha sido utilizado ampliamente para la formación de callos en varias especies como caña santa (*Cymbopogon citratos* Staff) (17) y el propio café (*Coffea* spp.) (18).

Los resultados demuestran que el biopreparado bacteriano en estudio pudiera constituir una importante fuente de auxinas para los trabajos de micropropagación, ya que con su empleo se obtuvieron resultados favorables para algunos de los principales indicadores durante el desarrollo de este proceso, tales como la masa fresca, las características cualitativas del callo y el porcentaje de callos con estructuras embriogénicas, alcanzándose valores superiores a los obtenidos en medios de cultivo con el empleo del 2,4-D y el Picloram, indicativo, además, de que en genotipos de *C. canephora* var. Robusta el extracto auxínico del biopreparado es un inductor de callos con estructuras embriogénicas. Esto constituye un aspecto a considerar, ya que la composición del medio de cultivo, y en especial el tipo y la concentración de regulador o sustituto de este en correspondencia con el genotipo, pueden llegar a determinar las características del proceso embriogénico en un cultivo determinado.

REFERENCIAS

- Machado, J. M. Las plantas transgénicas en el contexto social. *Biología Vegetal*, 2004, vol. 4, no. 2, p. 67-76.
- Kalyaeva, M. A. Methylotrophic bacteria promote *in vitro* growth and morphogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2002, vol. 48, no. 4, p. 514-517.
- Diosdado, E.; González, S. y Cabrera J. C. Pectimorf: nuevo regulador del crecimiento para el cultivo *in vitro* de plantas. IV Taller de medios de cultivo y sus aplicaciones en la identificación y propagación de microorganismos y células (BioMediCult2003). Programas y Resúmenes. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana (4:2003:La Habana). p. 140.
- Jiménez, F.; Kowalski B. y Agramante, D. Efecto de algunos elicitores sobre indicadores morfológicos y fisiológicos en vitroplantas de *Solanum tuberosum* L. para la producción de semilla. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila. 2003. p. 54.
- Santana, N. Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea* sp.). [Tesis de Doctorado, INCA, 1993. 124 p.
- Ortiz, S.; Sánchez, L. y Hernández, A. Influencia de algunos componentes del medio Sirope-fructosa en la producción de metabolitos de *B. cepacia*. Memorias. 2002. CD-ROM. INCA. 4p. ISBN 959-7023-22-9.
- Tien, T. M.; Gaskin, M. H. y Hubbell, D. H. Plant growth substance produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, vol. 37, p. 219-226.
- Hernández, A. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.). [Tesis de Doctorado], Universidad de La Habana, 2002. 97 p.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plants*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
- González, M. Micropropagación de café (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. [Tesis de Doctorado]; INCA. 2004. 97 p.
- Braddford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 12, p. 248-254.
- Cevallos, M. Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café. [Tesis de Doctorado]; INCA, 2000. 186 p.
- Vázquez, N.; Salazar, K.; Solano, W.; Peseira, A.; Bertand, B. y Etienne, H. Embriogénesis de alta frecuencia en híbridos F1 seleccionados de *Coffea arabica* a partir de explantes de hoja: reactividad y eventos histológicos. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO-98. La Habana 1-5 junio. 1992. 516 p.
- Vikrant, T. y Rashid, A. Somatic embryogenesis from mesocotyl and leaf-base segments of *Paspalum scrobiculatum* L. a minor millet. *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant.*, 2003, vol. 39, no. 5, p. 485-489.
- Plana, D.; Álvarez, M.; Florido, M.; Lara, R. y Cabrera, J. C. Actividad biológica del Pectimorf en la morfogénesis del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 1, p. 29-33.
- Kowalski, B.; Jiménez, F.; Jomarrón, I.; Agramante, D. y Coll, F. Efecto de tres análogos de brasinoesteroides sobre caracteres morfológicos y fisiológicos de vitroplantas de papa c.v. Desireé *in vitro* y en invernadero. *Biología Vegetal*, 2003, vol. 3, no. 2, p. 115-118.
- Quiala, E.; Jiménez, E. y Capote, A. Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de *Cymbopogon citratos* (D.C) Staff. *Biología Vegetal*, 2002, vol. 2, no. 3, p. 155-161.
- Feria, M. de; Jiménez, E.; Quiala, E.; Barbón, R. y Capote, A. Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimos 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, vol. 72, p. 1-6.

Recibido: 2 de noviembre de 2006

Aceptado: 12 de julio de 2007