

Efecto de mezclas de sustratos en la fase de conversión de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' obtenidas por embriogénesis somática

Raúl Barbon¹, Hien Nguyen Thi², Alina Capote¹, Manuel de Feria¹, Anabel Pérez¹, Leonardo Rivero¹, Michel Leiva², Ortelio Hurtado¹ *Autor para correspondencia

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: raulb@ibp.co.cu

²Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

RESUMEN

El desarrollo de la embriogénesis somática de café (*Coffea* spp.) en medios de cultivo líquido es una alternativa viable para la propagación de esta especie pero se requiere incrementar los porcentajes de conversión en plantas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de sustratos, elaborados con mezclas de humus de lombriz y zeolita, en la fase de conversión de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' obtenidas por embriogénesis somática. Se conformaron cuatro tratamientos (85% humus de lombriz-15% Zeolita, 75% humus de lombriz-25% Zeolita, 65% humus de lombriz-35% Zeolita, 50% humus de lombriz-50% Zeolita) y se evaluó: la altura de las plantas, el número de pares de hojas, longitud de la raíz principal, masa fresca y masa seca. Se alcanzó una alta supervivencia de las plantas procedentes de embriogénesis somática en los diferentes tratamientos, superior al 89.0%. En los sustratos con mayor contenido de humus de lombriz se obtuvieron los mayores valores para las variables evaluadas.

Palabras clave: adaptación *ex vitro*, embrión somático, humus de lombriz, zeolita

Effect of substrates mixtures on conversion phase of *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' plants obtained by somatic embryogenesis

ABSTRACT

The development of somatic embryogenesis of coffee (*Coffea* spp.) in liquid culture medium is a viable alternative for the propagation of this specie, but high conversion rates are required. The aim of this paper was to determine the effect of substrates elaborated with a mixture of natural zeolite and vermicompost on conversion phase of *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' plants obtained by somatic embryogenesis. Four treatments were used (85% vermicompost -15% zeolite, 75% vermicompost -25% zeolite, 65% vermicompost -35% zeolite, 50% vermicompost -50% zeolite). It was evaluated the plant height, pair leaf number, principal root length, fresh weight and dry weight. It was achieved high survival of plants from somatic embryogenesis in the different treatments, over 89.0%. The mixtures with higher content of vermicompost allowed better results in all the variables evaluated.

Keywords: *ex vitro* adaptation, somatic embryo, vermicompost, zeolite

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes a nivel mundial y ocupa el segundo lugar en el comercio internacional, después del petróleo. Como cultivo abarca 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 (FAOSTAT, 2013).

La aplicación de la embriogénesis somática en este cultivo puede contribuir a la multiplicación acelerada de plantas de gran potencial y reducir los costos de producción de posturas (de Rezende *et al.*, 2012).

La embriogénesis somática de café (*Coffea* spp.) es un tema que ocupa a varios laboratorios en todo el mundo. La producción de embriones somáticos en biorreactores, su

germinación en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), la crioconservación y el mejoramiento genético han estado entre las principales temáticas de investigación (Santana-Buzzy *et al.*, 2007).

Desde principios de 1990, se han logrado importantes avances en la implementación comercial de la embriogénesis somática de café en medio de cultivo líquido (Zamarripa *et al.*, 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992; Zamarripa *et al.*, 1993; Van Boxtel y Berthouly, 1996).

Sin embargo, entre los desafíos que impiden la aplicación más amplia de la embriogénesis somática para la propagación clonal y la obtención de plantas de calidad están las bajas tasas de germinación de embriones somáticos y la conversión de las plantas en casa de cultivo y viveros (Afren *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2006). Aunque se ha logrado en café hasta un 65% de conversión de las plantas (Ducos *et al.*, 2007) es dependiente de factores como los sustratos utilizados, el genotipo y las condiciones ambientales.

Los sustratos elaborados a base de humus de lombriz y zeolita se emplean con frecuencia para la aclimatación de plantas *in vitro* de diferentes especies, determinar su efecto en la fase de conversión de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' obtenidas por embriogénesis somática, fue el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron plantas *in vitro* de *C. arabica* cv. 'Caturra rojo' obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos en

sistemas de inmersión temporal tipo RITA según Barbón *et al.* (2014).

Las plantas se seleccionaron de acuerdo con su desarrollo morfológico con las siguientes características: tres pares de hojas, longitud del tallo de 2.0 – 3.0 cm y desarrollo radicular. Las plantas fueron lavadas con agua corriente y posteriormente se colocaron en bandejas de polipropileno negras de 28 alvéolos con una capacidad de 200 cm³ cada uno.

Para determinar el efecto del sustrato se combinaron diferentes proporciones de humus de lombriz y zeolita con las cuales se conformaron cuatro tratamientos (Tabla 1). El tratamiento I con 85% humus de lombriz - 15% zeolita se empleó como control teniendo en cuenta resultados de ensayos preliminares.

La zeolita natural utilizada fue producida por la Empresa GEOMINERA de Villa Clara (Cuba) y el humus de lombriz fue obtenido del Complejo Científico Productivo Biofábrica de Villa Clara (Cuba). Las características físico-químicas de los sustratos utilizados se muestran en la tabla 2.

Las bandejas se ubicaron en casa de cultivo, a una temperatura promedio durante el día de 27± 5°C, humedad relativa del 70% e intensidad luminosa que osciló entre 224 y 457 μmol m⁻² s⁻¹, medida con un luxómetro EXTECH Light meter 401025. Se empleó una malla de color negro para obtener un 70% de sombreo durante los primeros 15 días. Para el riego se utilizó un sistema automatizado por microaspersión y la frecuencia fue de dos minutos de duración cuatro veces al día (9:00, 11:00, 14:00 y 16:00 horas). Se utilizaron 80 plantas por cada tratamiento.

Tabla 1. Mezcla de sustratos utilizados en la conversión de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos en SIT tipo RITA.

Tratamiento	Humus de lombriz (%)	Zeolita natural (%)
I (Control)	85	15
II	75	25
III	65	35
IV	50	50

Tabla 2. Características físico-química de la zeolita natural (Yacimiento Tasajera, Villa Clara) y humus de lombriz (Complejo Científico Productivo Biofábrica, Villa Clara).

Zeolita natural	
Composición química	(%)
Óxido de Silicio (SiO ₂)	70.10
Óxido de Aluminio III (Al ₂ O ₃)	11.20
Óxido de Hierro III (Fe ₂ O ₃)	2.20
Óxido de Hierro II (FeO)	0.30
Óxido de Magnesio (MgO)	0.60
Óxido de Calcio (CaO)	4.50
Óxido de Sodio (Na ₂ O)	1.50
Óxido de Potasio (K ₂ O)	1.30
Pentóxido de difósforo (P ₂ O ₅)	0.07
Agua (H ₂ O)	4.70
Composición mineral	
Clinoptilolita	40.0
Modernita	40.0
Otros (Calcita, cuarzo, feldespato)	20.0
Propiedades físicas	Valor
Tamaño de la partícula	0.01-1.0 mm
Densidad (δ)	0.37 g cm ⁻³
Densidad de la fase sólida (γ)	1.77 g cm ⁻³
Porosidad total (PT)	80.59 % vol.
Humus de lombriz	
Composición química	(%)
Nitrógeno	2.38
Potasio	0.45
Calcio	0.20
Magnesio	2.11
Carbono	21.55
Materia orgánica (%)	37.15
Otras características	Valor
Relación C/N	7.66
Capacidad de absorción de agua	55.44
Densidad aparente	0.48 g cm ⁻³
Conductividad eléctrica	2.60 Ms cm ⁻¹
pH	7.40

La supervivencia, se definió como el número de plantas que sobrevivieron a los 15 días de cultivo. Se evaluó, además, el número de días para la emisión del primer

par de hojas. Se realizaron observaciones de cambios de coloración y necrosis en las plantas y luego de pasar 90 días se midió la altura de las plantas (cm) desde la

base del tallo hasta el ápice y la longitud de la raíz principal (cm). Además, se cuantificó el número de pares de hojas y se determinó la masa fresca y seca de hojas, tallo y raíz por separado.

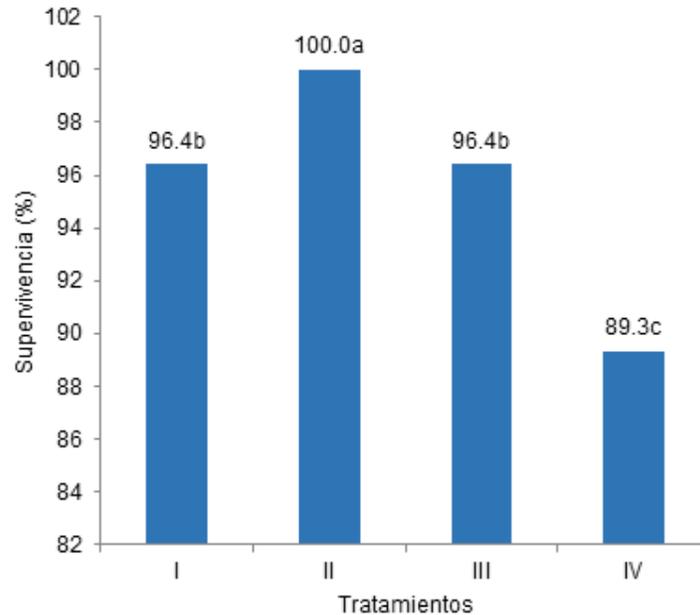
Para la determinación de la masa fresca y seca, se tomaron al azar 15 plantas de cada tratamiento a los 70 y 90 días de cultivo. Se lavaron con agua las raíces para eliminar los restos de sustrato. Se determinó la masa fresca con una balanza analítica (SCALTEC, modelo SPD 54). Posteriormente, para la determinación de masa seca, el material vegetal fue secado en una estufa (MERMERT) a 70°C durante 12 horas y el peso se determinó en una balanza analítica (SCALTEC, modelo SPD 54).

Para el análisis de los datos se utilizaron las pruebas de Kruskal Wallis/ Mann Whitney y la prueba de Bonferroni, previa comprobación del cumplimiento o no de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 18.0 sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que el sustrato a base de humus de lombriz y zeolita en diferentes proporciones tuvo efecto en la supervivencia de las plantas de *C. arabica* cv. 'Caturra rojo' (mayor del 89.0%) en las condiciones de la casa de cultivo. Se demostró que en el tratamiento II (75% humus de lombriz - 25% zeolita) se obtuvo un 100% de supervivencia de las plantas con diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, mientras que en el tratamiento IV (50% humus de lombriz - 50% zeolita) se lograron los valores más bajos (89.3%) (Figura 1). Además, se observaron diferencias en cuanto a la morfología de las plantas (Figura 2).

Se observó que en los tratamientos con mayor contenido de humus de lombriz las plantas presentaron, desde el punto de vista morfológico, una mejor calidad en cuanto a coloración, calidad y uniformidad y no se presentaron daños por necrosis en el área foliar (Figura 3).



Letras desiguales sobre barras indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/ Mann Whitney para $p < 0.05$

Figura 1. Efecto del sustrato a base de humus de lombriz y zeolita sobre la supervivencia de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo', obtenidas por embriogénesis somática, a los 15 días en la fase de conversión. Tratamientos: I. 85% humus-15% zeolita, II. 75% humus-25% zeolita, III. 65% humus-35% zeolita, IV. 50% humus-50% zeolita.

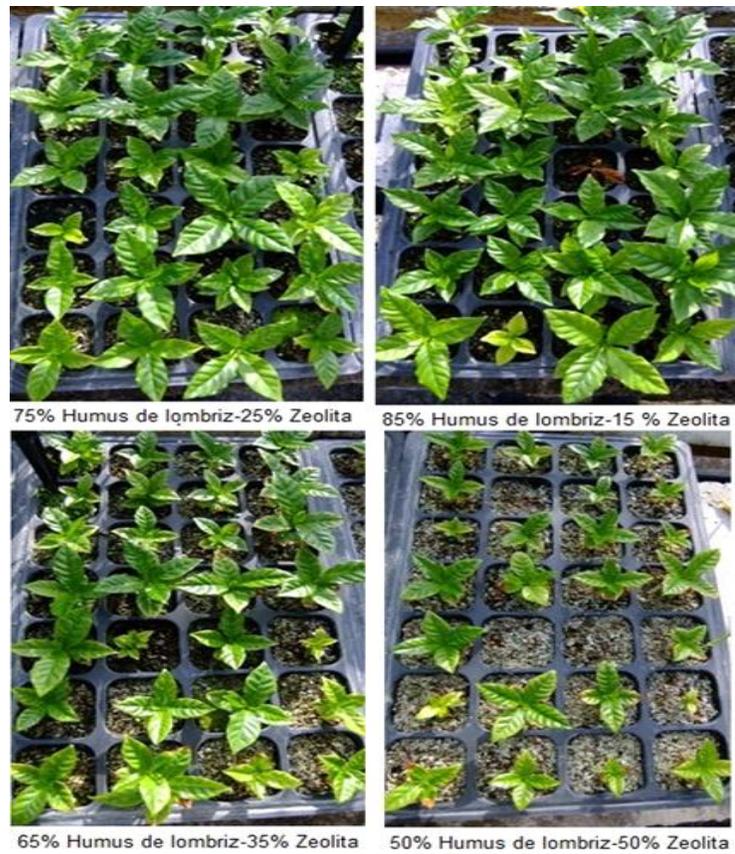


Figura 2. Plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo', obtenidas por embriogénesis somática, a los 90 días de cultivo en sustratos a base de humus de lombriz y zeolita.



Figura 3. Plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en la fase de conversión en diferentes sustratos a base de humus de lombriz y zeolita, a los 90 días de cultivo.

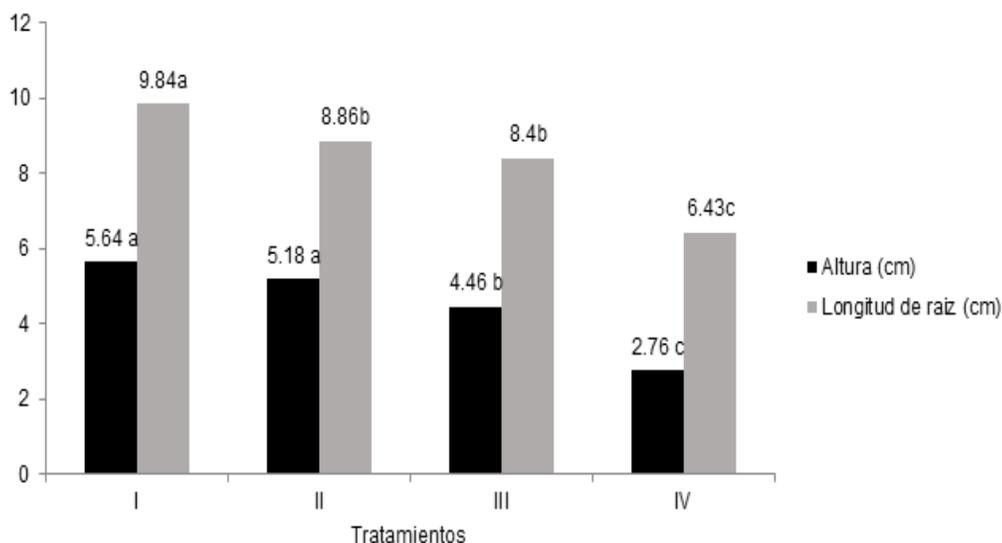
De igual forma, en estos tratamientos el tiempo para emitir un nuevo par de hojas fue significativamente menor. En el tratamiento IV con 50% de humus de lombriz las plantas demoraron más tiempo para emitir el primer par de hojas mientras que en el tratamiento I (85% humus - 15% zeolita) fue donde se obtuvo el mayor número de pares de hojas con respecto a los otros tratamientos con diferencias significativas (Tabla 3).

En cuanto a la altura de las plantas también en los tratamientos I y II obtuvieron los mayores valores y se presentaron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos. De igual forma, con respecto a la influencia en la longitud de la raíz, en el tratamiento I (85% humus de lombriz y 15% zeolita) se obtuvo un mayor crecimiento de la raíz con una longitud de 9.84 cm a los 90 días de cultivo, con diferencias significativa con los otros tratamientos (Figura 4).

Tabla 3. Efecto del sustrato a base de humus de lombriz y zeolita sobre la emisión de hojas nuevas en plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo'.

Tratamiento	Nº de días para emitir el primer par de hojas		Número de pares de hojas nuevas	
	Media	Rango promedio	Media	Rango promedio
85% Humus-15% Zeolita (I)	29.00	52.18 bc	4.89	32.85 a
75% Humus-25% Zeolita (II)	27.50	47.02 c	4.20	21.60 b
65% Humus-35% Zeolita (III)	29.50	56.38 b	3.60	13.60 c
50% Humus-50% Zeolita (IV)	33.77	68.89 a	3.70	13.95 c

Valores con letras desiguales en una misma columna difieren significativamente según prueba de Kruskal Wallis/ Mann Whitney para $p < 0.05$

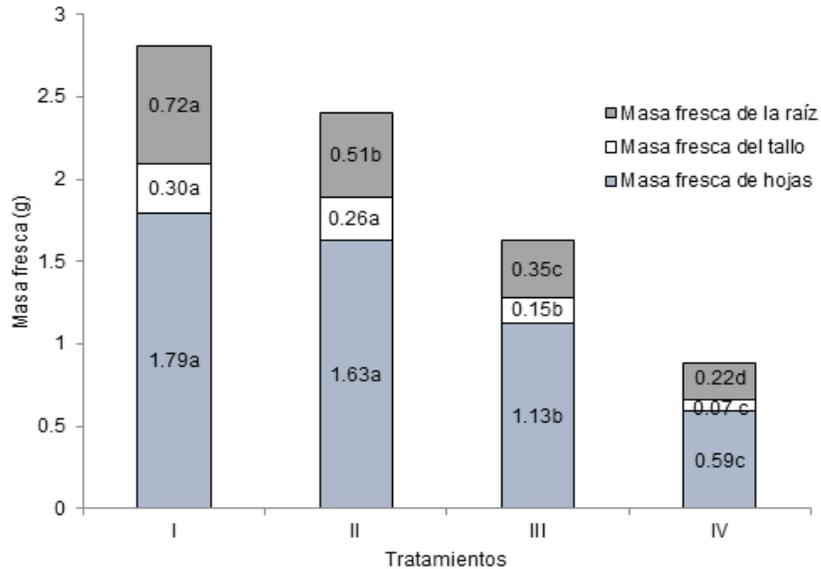


Letras diferentes sobre barras para altura indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0.05$. Letras diferentes sobre barras para longitud de la raíz indican diferencias significativas según la prueba de Bonferroni para $p < 0.05$

Figura 4. Altura de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en diferentes sustrato a base de humus de lombriz y zeolita, obtenidas por embriogénesis somática, en la fase de conversión a los 90 días de cultivo. Tratamientos: I. 85% humus-15% zeolita, II. 75% humus-25% zeolita, III. 65% humus-35% zeolita, IV. 50% humus-50% zeolita.

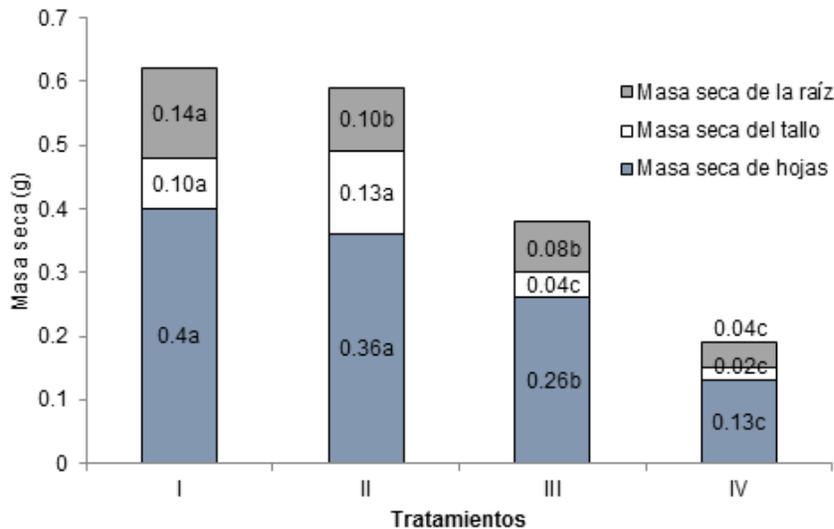
En correspondencia con los resultados anteriores, la masa fresca y la masa seca de las plantas *in vitro* de *C. arabica* cv. 'Caturra rojo' mostraron valores superiores. En los tratamientos I y II se obtuvo el mayor contenido de masa fresca y seca de hojas y del tallo. Sin

embargo, en el tratamiento I los valores de masa fresca y masa seca de la raíz fueron superiores al resto (Figura 5 y 6). En el tratamiento IV se obtuvo la menor masa fresca y masa seca de hojas, tallo y raíz lo cual indica que no tuvo un crecimiento eficiente como los otros tratamientos.



Letras diferentes sobre barras para masa fresca de la raíz indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0.05$. Letras diferentes sobre barras para masa fresca de las hojas y del tallo indican diferencias significativas según la prueba de Bonferroni para $p < 0.05$

Figura 5. Masa fresca de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo', en diferentes sustrato obtenidas por embriogénesis somática, en la fase de conversión a los 90 días de cultivo.



Letras diferentes sobre barras para masa seca de la raíz y el tallo indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0.05$. Letras diferentes sobre barras para masa seca de las hojas indican diferencias significativas según la prueba de Bonferroni para $p < 0.05$

Figura 6. Masa seca de plantas de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo', en diferentes sustrato a base de humus de lombriz y zeolita obtenidas por embriogénesis somática, en la fase de conversión a los 90 días de cultivo.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indicaron la posibilidad del uso de mezclas de sustratos a base de humus de lombriz y zeolita para la fase de conversión en la embriogénesis somática de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' con supervivencia de las plantas superior al 89%.

Para la conversión en café se han empleado sustratos a base de materia orgánica con resultados variables. Por ejemplo, Santana-Buzzy *et al.* (2007) obtuvieron la mayor supervivencia de las plantas *in vitro* de *C. arabica* con un sustrato compuesto por suelo y humus de lombriz (1:1).

Otros investigadores como Etienne *et al.* (2002) lograron con sustratos compuestos por suelo, arena y pulpa de café (2:1:1) un porcentaje de conversión de las plantas de café con valores de 45%; mientras que, Santana - Buzzy *et al.* (2007) obtuvieron los mejores resultados durante la fase de conversión de las plantas de *C. arabica* y *C. canephora* P. con una mezcla de materia orgánica y suelo (1:1) o con una mezcla de musgo de turba, agrolite y suelo (1:1:1). Según Ducos *et al.* (2007), en la fase de conversión de *C. arabica* varía la respuesta de los diferentes cultivares con un rango de conversión de los embriones somáticos a plántulas entre 25% y 67%, con influencia del genotipo.

El crecimiento del café es lento, no obstante, se observó la emisión de nuevas hojas durante el periodo evaluado. Esto es un indicador que las plantas *in vitro* se han adaptado a las condiciones de casa de cultivo. Según Chandra *et al.* (2010) las plantas están aclimatizadas cuando se desarrollan nuevas hojas durante el proceso de crecimiento.

Tanto el humus de lombriz como la zeolita han sido reconocidos por su efecto positivo en la aclimatización de plantas. En este estudio se corroboró el criterio de Henry *et al.* (2002) quienes apuntaron que la elección del tipo de sustrato debe garantizar permeabilidad, elevada capacidad de retención de agua, baja densidad aparente, capacidad de intercambio catiónico, capacidad para mantener constante el pH y mínima velocidad de descomposición; además de servir como soporte. Las combinaciones de sustratos con mayor contenido de humus de lombriz proporcionaron los nutrientes necesarios para garantizar un mayor

crecimiento de las plantas lo cual se evidenció en las variables evaluadas.

Es necesario apuntar que en la literatura científica no siempre se detallan las características morfológicas de los embriones germinados o de las plantas obtenidas de estos que se transfieren a casa de cultivo. Por ello, los resultados en muchos casos no pueden ser comparados.

En este estudio fueron seleccionadas plantas obtenidas a partir de embriones germinados en SIT tipo RITA del cv. 'Caturra rojo' con características morfológicas que permitieran evaluar el efecto de los sustratos elaborados a base de humus de lombriz y zeolita en no más de 90 días. Los resultados sientan las bases para continuar profundizando en las condiciones de cultivo que garanticen que los embriones germinados puedan ser transferidos a la fase de conversión en condiciones *ex vitro* en estadios más tempranos de desarrollo.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que en todos los sustratos evaluados se logró la conversión en plantas de los embriones somáticos germinados. Sin embargo, los mejores resultados morfo-fisiológicos se obtuvieron en los sustratos compuestos por 85% Humus de lombriz-15% Zeolita y 75% Humus de lombriz - 25% Zeolita.

REFERENCIAS

- Afren A, Sobayed M, Kozai T (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabica* somatic embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany* 90: 21 - 29
- Barbón R, Nguyen Thi H, Capote A, de Fera M, Quiala E, Pérez A (2014) Efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 14 (2): 91-97
- Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010) Acclimatization of tissue culture plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett* 32: 1199-1205
- De Rezende J, De Carvalho C, Carolina R, Pasqual M, Batista J (2012) Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. *Acta Scientiarum. Agronomy* Maringá 34(1): 93 - 98

- Ducos, J, Lambot C, Pétiard V (2007) Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. International Journal of Plant Developmental Biology 1(1): 1 - 12
- Etienne H, Anthony F, Dussert S, Fernandez D, Lashermes P, Bertrand B (2002) Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro*. Dev. Biol. Plant 38: 129 – 138
- FAOSTAT (2013) Food and Agriculture Organization of the United Nations Database.[En línea] En: <http://www.apps.fao.org>. Consultado 15 de mayo de 2014
- Henry R, Norma D, Chen J (2002) Progress in ornamental aroid breeding reseach. VIII Int. Aroid Conf. Missouri Bot. Garden, 2002. St. Louis, MO
- Kumar V, Naidu M M, Ravishankar G A (2006) Developments in coffee biotechnology—*in vitro* plant propagation and crop improvement. Plant Cell Tiss Organ Cult (2006) 87:49–65
- Neuenschwander B, Baumann T (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Plant Cell Reports 10: 608 - 612
- Santana - Buzzy N, Rojas - Herrera R, Galaz - Ávalos R, Ku - Cauich J, Mijangos - Cortés J, Gutiérrez-Pacheco L, Adriana C, Quiroz - Figueroa F, Loyola - Vargas V (2007) Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 43: 507–520
- Van - Boxtel J, Berthouly M (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell Tissue Organ Cult 44: 7 - 17
- Zamarripa A (1993) Study and development of somatic embryogenesis in liquid medium of coffee. PhD Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 120p.
- Zamarripa A, Ducos J, Tesserau H, Bollon H, Dufour M, Petiard V (1991) Production d'embryons somatiques de caféierenmilieu liquide. Effets densité d'inoculation et renouvellementdumilieu. Café Cacao Thé 35: 233-244

Recibido: 15-07-2015
Aceptado: 09-10-2015