

Evaluación del efecto de un biopreparado de origen bacteriano en el cultivo *in vitro* del cafeto (*Coffea canephora* P.).

Assessing the *in vitro* effect of a bacterial biopreparation on coffee trees (*Coffea canephora* P.)

María Esther González Vega*, Annia Hernández Rodríguez*, Ramón Ramos Navas**

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones del compuesto bacteriano CB-1 sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de tres clones seleccionados de cafeto, var. Robusta, así como valorar la posible sustitución de la auxina AIA en el medio de cultivo establecido para la multiplicación del cafeto, donde se realizaron ensayos durante la fase de aclimatización de las vitroplantas. Se estudiaron diferentes tratamientos. Como testigo se empleó el medio de multiplicación establecido convencionalmente, mientras que los otros tres tratamientos consistieron en sustituir el AIA del medio por el CB-1 a diferentes concentraciones (0.5; 1.0 y 2.0 mg.L⁻¹). Durante la aclimatización, se estudió el efecto del biopreparado (sólido y líquido), a través de la exposición del sistema radical de las plántulas a una concentración de 20 mg/L del compuesto por 30 minutos. Se evaluaron las variables: número de explantes vivos, altura de la vitroplanta (cm), número de brotes, número de pares de hojas, porcentaje de plantas enraizadas y contenido de proteínas totales y fenoles (mg/g tejido). Como resultado se detectaron variaciones en la respuesta de los clones estudiados, así como en los indicadores evaluados, obteniéndose mayor capacidad de respuesta en el clon M-229 y con concentraciones de 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ de CB-1. Se obtuvo mayor efectividad con el CB-1 en estado líquido durante la aclimatización de las vitroplantas. Se demostró la factibilidad del empleo del nuevo biopreparado en la estimulación del crecimiento vegetal.

Palabras clave: Robusta, clones, microestacas, ácido indolacético, aclimatización.

ABSTRACT

This study was carried out at the Cuban National Institute of Agricultural Sciences to evaluate the effect of several bacterial compound BC-1 concentrations on the growth and *in vitro* development of three selected coffee tree clones (*Robusta* variety), as well as to evaluate the possible substitution of AIA auxin in coffee tree propagation culture medium. Testing was done during vitroplant acclimation. Different treatments were studied; conventionally established propagation medium was used as a check, whilst the other three treatments consisted of substituting AIA from the medium for the CB-1 compound in several concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹). The biopreparation's (liquid and solid) effect was studied during acclimation by exposing plants' root systems to a 20 mg/L compound concentration for 30 minutes. Variables evaluated were: number of living explants, vitroplant height (cm), number of shoots, number of leaf pairs, percentage of rooted plants and total protein and phenol content (tissue mg/g). Variations were detected in the response of those clones studied, as well as in that of those indicators evaluated, the best results being obtained with the M-229 clone at 0.5 mg/L BC-1 concentration. The greatest effect was obtained with the liquid biopreparation during vitroplant acclimation phase. This new biopreparation's use in vegetable growth stimulation was shown to be feasible.

Key words: Robusta, clone, microstake, indolacetic acid, acclimatisation.

* M. Sc. Investigador agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. E-mail: esther@inca.edu.cu; marylagoOO@yahoo.com

** M. Sc. Investigador agregado de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao.

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas de mayor importancia en el mercado internacional (FAO, 1996). Dentro de éste, la variedad Robusta, especie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner no sólo es importante por la potencialidad productiva que ha alcanzado, que representa rendimientos medios entre 1.5 y 2.0 t.ha⁻¹ de café comercial, sino entre otras cosas, por la manifestación de resistencia o tolerancia a ciertas plagas y enfermedades, su resistencia a la sequía, su rusticidad y por la posibilidad que ofrece de propiciar híbridos de interés entre ésta y las variedades de *Coffea arábica* (López *et al.*, 1993).

En este cultivo los métodos tradicionales de mejora no han sido muy eficientes, sobre todo por el largo período que lleva obtener una variedad (15-20 años) (Carvalho, 1988); también por la autoincompatibilidad de algunas especies, así como por la baja calidad de las semillas. Sin embargo, los últimos avances de la biotecnología vegetal han posibilitado la multiplicación masiva de clones seleccionados, la obtención de plantas haploides, la producción de genes de importancia agronómica relacionados con la resistencia al estrés biótico y abiótico, entre otras (Paillard, 1996; Montes, 1997).

Uno de los elementos esenciales y más costosos empleados en la propagación *in vitro* del cafeto y otros cultivos de interés agrícola, lo constituyen los reguladores del crecimiento vegetal; es por ello que trabajar con biopreparados de origen bacteriano, sin incluir la célula como tal, brinda magníficas posibilidades para su utilización como estimulador del crecimiento vegetal (Dileep Dubet, 1992; Hernández *et al.*, 1998; Hebbar, 1998; Maurhofer, 1992). En tal sentido, Gould (1990) y Hernández (1998) destacan que algunos de estos compuestos de origen bacteriano tienen la particularidad de estimular el crecimiento vegetal aun en concentraciones inferiores a las convencionalmente empleadas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado y considerando las ventajas del uso de sustancias biorreguladoras en el desarrollo de explantes *in vitro* se realizó el presente estudio, con la finalidad de sustituir fitohormonas como las auxinas (AIA) en medios de cultivo establecidos, por el compuesto bacteriano CB-1, así como comprobar su efecto en el desarrollo de vitroplantas de cafeto durante la fase de

aclimatización, como posible alternativa para disminuir los costos en el proceso de multiplicación por métodos biotecnológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas ubicado en el municipio de San José de las Lajas, provincia de La Habana, Cuba. Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron vitroplantas portadoras de tres a cinco pares de hojas verdaderas y de ocho semanas de edad, obtenidas por embriogénesis somática, provenientes de tres clones de la variedad Robusta, especie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (M-229, K-234 y M-28), de la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao, municipio Tercer Frente, provincia Santiago de Cuba. Las microestacas nodales se obtuvieron seccionando las plántulas en esquejes de 1 cm de longitud; todos los propágulos conservaron sus hojas enteras o cortadas a la mitad de su longitud cuando resultaron muy grandes.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el CB-1, un biopreparado obtenido a partir de metabolitos activos de origen bacteriano (*Burkholderia cepacia*), en el cual no se incluyen las células activas. Entre sus componentes se destacan las hormonas (auxinas, citoquininas), los sideróforos y alcaloides quiniolosidínicos de naturaleza antibiótica (Ortiz, 2001). Este biopreparado tiene registro de marca (Rizobac®) y está en trámite la solicitud de patente. Los explantes fueron inoculados en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 10 mL del medio de cultivo, cuya composición general se relaciona en la tabla 1. Estos cultivos se sometieron a un fotoperíodo de 12 horas, una intensidad lumínica de 1000 luxes y una temperatura de 27± 1°C.

Como testigo se empleó el medio establecido para la siembra de microesquejes de cafeto (De la Cruz *et al.*, 1990); como sustituto del Ácido Indol Acético (AIA) se utilizó el CB-1, en dosis de 0.5, 1.0 y 2.0 mg.L⁻¹.

Se sembraron 30 explantes por tratamiento (clones/dosis de CB-1) y se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

Se evaluaron el número de brotes y el número de pares de hojas (H) a los 70 días de realizada la siembra,

y a los 90 días se evaluó el número de explantes vivos (V), altura de la vitroplanta (cm) y porcentaje de plantas enraizadas.

Se calculó el coeficiente de multiplicación usando la expresión HA/.

Para estudiar el efecto del biopreparado CB-1 durante la fase de aclimatización, las vitroplantas de los clones en estudio de 5-7 pares de hojas verdaderas, aptas para ser llevadas a condiciones *ex vitro* fueron tratadas con el compuesto en forma líquida y sólida. Como soporte se utilizó la turba molinada, tamizada y estéril; la concentración en este caso fue de 20 mg.L⁻¹ y el tratamiento se realizó a través de la inmersión del sistema radical por un período de 30 minutos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios precedentes. Se utilizaron 30 plantas por tratamiento bajo un diseño completamente aleatorizado. En todas las variantes estudiadas el sustrato utilizado en el llenado de las bolsas fue el recomendado en el Instructivo Técnico del Café (Minagri, 1987).

En esta etapa, se evaluaron a los 90 días de cultivo las variables altura de la planta (cm), número de pares de hojas, proteínas totales y contenido de fenoles (g/g de tejido) según Hernández (1998).

Para conocer las posibles afectaciones genéticas del material regenerado a través del cultivo de microesquejes de *Coffea canephora* variedad Robusta, mediante la aplicación del CB-1, se tomaron muestras en diferentes estadios de desarrollo del material evaluado, o sea se seleccionaron muestras de hojas de plantas donantes de campo, vitroplantas obtenidas a partir de las microestacas nodales a los 90 días de cultivo y plántulas a los 90 días de realizar el pase a condiciones de aclimatización, a las mismas se les determinó la actividad de dos sistemas enzimáticos: Peroxidasas (PER) y Esterasas (EST), así como proteínas totales. Para ello se prepararon extractos a

Tabla 1. Composición química de los medios de cultivo

Componentes	Unidades de medida	Ttos			
		MT	M-1	M-2	M-3
Macronutrientes SH	mL	100	100	100	100
Solución Fe-Na ₂ EDTA	mL	5	5	5	5
Micronutrientes DP	mL	50	50	50	50
Vitaminas de Morel y Wetmore	mL	5	5	5	5
Cisteína-HCl	mg.L ⁻¹	25	25	25	25
Caseína-hidrolizada	mg.L ⁻¹	50	50	50	50
AIA	g.L ⁻¹	2	-	-	-
BAP	mg.L ⁻¹	2	2	2	2
Sacarosa	g.L ⁻¹	25	25	25	25
Gelrite	g.L ⁻¹	2	2	2	2
CB-1	mg.L ⁻¹	-	0.5	1.0	2.0
pH	-	5.6	5.6	5.6	5.6

SH- Schenk e Hildebrandt (1972).
 Dutcher y Powell (1972).
 MT- Testigo.
 M1- CB-1 (0.5 mg.L⁻¹).
 M2- CB-1 (1.0 mg.L⁻¹).
 M3- CB-1 (2.0 mg.L⁻¹).

partir de muestras de 1 g de tejido y se homogeneizaron en frío con buffer Tris-HCl, SDS 4%, glicerol 20%, 2 mercaptoethanol 20% a pH 6.8. Luego se centrifugó a 300g por 10 min a 60 °C y se realizaron las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos en geles de polia-crilamida y para las proteínas totales el sistema SDS-PAGE (Laemmli, 1970), con concentraciones del 13,5 % y del 5% para los geles separador y concentrador respectivamente, aplicando 25 µL de muestra (1 µg/µL) por pocillo.

El tiempo de corrida estuvo determinado por el desplazamiento de la banda de Kolrhauch hasta aproximadamente 6 cm del inicio. En todos los casos se utilizó una intensidad de corriente constante de 25 mA para isoenzimas y proteínas totales, en una cámara de electroforesis vertical Mithy Small II de Pharmacia Biotech.

Tabla 2. Métodos de tinción utilizados para las isoenzimas y proteínas totales.

Tipo de enzima	Sistema enzimático	Método de tinción
Hidrolasas	EST	Iglesias, 1986
Oxidoreductasa	PER	Iglesias, 1986
Proteínas totales	-	Laemmli, 1970

Luego de realizada la separación, se efectuaron las tinciones específicas para la caracterización en los sistemas PER y EST (tabla 2). Las proteínas totales se tiñeron con azul de Coomassie, según la metodología propuesta por Pharmacia Biotech (1997).

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó un análisis de varianza bifactorial, y donde hubo diferencias significativas se usó la prueba de Duncan al 5% para determinar el orden de mérito de las medias. Para el procesamiento de los datos del número de brotes y pares de hojas, se realizó la transformación de éstos a través de la fórmula $(X + 0.5)^{1/2}$.

En la valoración económica de la sustitución del AIA por el CB-1 se utilizó la siguiente información:

Compuesto	Dosis (mg.L ⁻¹)	Costo.L ⁻¹	
		MN	MLC
AIA	1.0	-	0.05
AIA	2.0	-	0.11
CB-1	1.0	0.02	-
CB-1	2.0	0.04	-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 3 se presentan los valores medios de la altura de las vitroplantas obtenidas en cada uno de los tratamientos evaluados. Como resulta apreciable, fueron registradas diferencias significativas en los clones en función de la variante de medio de cultivo estudiado.

Tabla 3. Altura de las vitroplantas (cm) a los 90 días de cultivadas.

Tratamientos	Clones		
	M-229	K-234	M-28
MT	3.09 e	2.50 f	1.86 g
M-1	5.53 a	5.00 b	3.67 d
M-2	4.90 bc	4.50 c	3.70 d
M-3	3.30 de	2.93 ef	2.50 f
ES		0.16	
CV (%)		17.59	

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente ($\alpha = 5\%$).

Se observó que los medios M-1 y M-2 que contenían 2.0 mg.L⁻¹ de BAP y 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ de CB-1, respectivamente, fueron los de mejor resultado con valores medios entre 4.50 y 5.53 cm de altura de la vitroplanta para los clones M-229 y K-234, seguidos por el clon M-28 (3.67 - 3.70 cm) para estos mismos medios, que aunque difiere significativamente de los clones anteriores, supera notablemente al testigo (tabla 3), donde sólo se obtuvieron vitroplantas entre 1.86 y 3.09 cm de altura para los tres clones en estudio. De forma general se pudo observar que existió una mayor capacidad de respuesta a la altura de la vitroplanta en los clones M-229 y K-234, lo que pudiera estar dado por una mayor plasticidad de estos genotipos ante la presencia en el producto de una concentración adecuada de AIA, la cual es suficiente para tener un influencia directa en la estimulación del crecimiento vegetal (Velásquez, 1999). En estudios precedentes ha sido demostrado que los reguladores del crecimiento en pequeñas concentraciones, incluso inferiores a las presentes en este biopreparado, influyen positivamente sobre el metabolismo de las plantas.

El clon M-229 en presencia del medio M-1 mostró mayor valor promedio de brotes (2.18), difiriendo significativamente del resto de los tratamientos estudiados (tabla 4). Resultados similares fueron obtenidos por González *et al.* (1998), al evaluar el comportamiento de los brotes en el cultivo de *Coffea arabica* var. Catuai en presencia de BAP y AIA, obteniendo 1.95 brotes promedio como máximo valor. En este caso, los valores más bajos se alcanzaron con el medio MT, compuesto por 2.0 mg.L⁻¹ de BAP y 1.0 mg.L⁻¹ de AIA, para los tres clones evaluados. Los explantes procedentes del clon M-28 inoculados en las tres variantes de medios mostraron un bajo potencial para la formación de nuevos brotes, siendo 1.6 brotes por explante el valor más alto alcanzado y resultando este material el de menor capacidad de respuesta para la variable evaluada.

Con respecto al valor promedio de pares de hojas, se pudo observar que los medios suplementados con el CB-1 en dosis de 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ favorecieron notablemente a este indicador para los clones M-229 y K-234, donde se obtuvieron valores de 1.72 y 1.70 pares de hojas, respectivamente. Sin embargo, para el clon M-28 este efecto se manifestó con el medio M-3 (2.0 mg.L⁻¹ de CB-1) donde se alcanzaron valores de 1.90 pares de hojas (tabla 4). Esta variable también depende del genotipo y de las condiciones del medio

Tabla 4. Efecto de la composición del medio de cultivo en el número promedio de brotes y pares de hojas (a los 70 días de cultivo).

Tratamiento	Número de brotes			Pares de hojas		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
MT	1.26 d	1.30 d	1.26 d	1.58 de	1.70 d	1.56 e
M-1	2.18 a	1.54 c	1.60 c	1.88 b	2.08 a	1.70 cd
M-2	1.86 b	1.56 c	1.30 d	1.72 c	1.70 cd	1.70 cd
M-3	1.56 c	1.84 b	1.38 d	1.74 c	1.70 cd	1.90 b
ES		0.39			0.03	
CV (%)		9.96			8.83	

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente ($\alpha=5\%$).

de cultivo, lo que se constata al analizar de forma individual cada uno de los clones.

La inclusión de 0.5 mg.L⁻¹ de CB-1 en el medio de cultivo permitió obtener el mayor valor del coeficiente de multiplicación (11.7) en el clon M-229, siendo ésta la dosis más baja de CB-1 empleada en el experimento e inferior a la dosis de AIA utilizada en el medio testigo (1.0 mg.L⁻¹), con la que sólo se alcanzaron valores comprendidos entre 2.0 y 2.8 de este indicador. Es válido destacar que en la medida que se incrementaron las dosis de CB-1 en el medio de cultivo (1.0 y 2.0 mg.L⁻¹), los valores para el coeficiente de multiplicación fueron más bajos, oscilando entre 7.0 y 2.8, respectivamente, como se puede apreciar en la tabla 4. En tal sentido, Zok y Dublin (1991) obtuvieron valores que no rebasaron el 9.5 en el cultivo de *Coffea arabica* L, empleando dosis mucho más elevadas de AIA y BAP; sin embargo, González *et al.* (1998), destacan que en estudios realizados en la variedad Catuai, dentro de esta misma especie, se obtuvo un mejor comportamiento para los valores de coeficiente de multiplicación cuando se aplicaron dosis de AIA igual a 0.05 mg.L⁻¹ y concentraciones muy elevadas de BAP (8 mg.L⁻¹), lo que permite inferir que durante el proceso de micropropagación del cafeto, este indicador se ve

favorecido por dosis bajas de auxinas o de los compuestos análogos de las mismas, aspecto de significativa importancia en los trabajos de multiplicación acelerada, donde el objetivo fundamental es la obtención de altas tasas de multiplicación del cultivo tipo (Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996).

El empleo de CB-1 en el medio de cultivo no tuvo un efecto marcado sobre el porcentaje de

plantas enraizadas en el clon M-229 (tabla 6); sin embargo, para el K-234 se obtuvieron los mayores valores con 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ (95.1 y 93.6 %, respectivamente). En el clon M-28 se detectó un comportamiento diferenciado en función de la dosis de CB-1 utilizada y exhibiendo valores inferiores al resto de los tratamientos, los que oscilaron entre 51.0 y 87.8%.

Los niveles obtenidos para la variable altura de la planta, durante la fase de aclimatación, difieren significativamente para los clones en estudio, dependiendo de la forma de aplicación del biopreparado (tabla 7).

Se observó que el CB-1 en estado líquido resultó ser más efectivo, permitiendo obtener valores de 14.5 y 14.2 cm de altura de la planta para los clones M-229 y K-234, respectivamente. Sin embargo, el valor obtenido para el clon M-28 no supera los 11.4 cm, difiriendo significativamente del comportamiento de los clones anteriores. Es preciso destacar que aunque el tratamiento con el biopreparado en estado sólido arrojó resultados inferiores a los obtenidos con el líquido (10.5 - 13.1 cm), éstos superan en gran medida a los alcanzados con el tratamiento testigo para los clones

Tabla 5. Influencia del CB-1 en el coeficiente de multiplicación (a los 90 días de cultivo).

Tratamientos	Explantos vivos (V)			Total de pares de hojas (H)			Coef. multiplicación (H/V)			
	M-229	K-234	M-28	M-29	K-234	M-229	M-28	K-234	M-28	
MT	11	14	10	22	40	2.0	20	2.8	2.0	
M-1	12	15	14	140	98	11.7	70	7.0	5.0	
M-2	13	14	14	91	70	7.0	40	6.5	4.4	
M-3	14	7	7	73	49	5.2	31	5.0	2.8	

Tabla 6. Efecto del CB-1 en el porcentaje de plantas enraizadas (90 días de cultivo).

Tratamientos	Clones		
	M-229	K-234	M-28
MT	93.8 ab	91.0 b	53.9 e
M-1	92.3 ab	92.7 ab	69.9 d
M-2	91.5 b	95.1 a	87.8 c
M-3	90.9 b	93.6 ab	51.0 f
ES	0.89		
CV (%)	4.14		

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente ($\alpha = 5\%$).

M-229 y M-28. Estos resultados coinciden con reportes realizados en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus sp.*) al analizar la variable altura de la planta, empleando este compuesto como estimulador del crecimiento vegetal (Toledo, 2001).

De forma general se pudo observar que existió una respuesta favorable a la variable número de pares de hojas en los clones M-229 y K-234, al comparar los valores obtenidos para los tratamientos en estudio, evidenciándose la relación entre el genotipo y la forma de aplicación del compuesto sobre el proceso de formación de nuevos pares de hojas, importante indicador morfológico del desarrollo y crecimiento de las plantas. Así mismo, se han reportado en cultivares de trigo (*Triticum vulgaris*) diferencias notables entre plantas tratadas y no tratadas con este biopreparado para algunas variables estudiadas y relacionadas con el crecimiento vegetal.

La determinación de proteínas totales en las plántulas evaluadas corrobora que es una variable que varía con la aplicación del biopreparado (tabla 8). Como resultado, además se pudo observar que para los tres

clones en estudio el estado líquido indujo niveles proteicos elevados, que oscilaron entre 4.35 y 4.39 mg/g de tejido, los cuales difieren significativamente de los valores obtenidos con el tratamiento control y con el CB-1 en estado sólido, coincidiendo estos resultados con los reportados para otros clones de la variedad Robusta.

El tratamiento de las plántulas con el biopreparado líquido induce altos niveles en el contenido de fenoles, los que oscilan entre 13.0 y 14.7 mg/g de tejido, superando considerablemente los resultados obtenidos en las plantas que no fueron tratadas. Sin embargo, los resultados alcanzados para los tres clones en estudio tratados con el biopreparado sólido fueron muy bajos (4.78 - 76.60 mg/g de tejido), lo que nos hace inferir que si bien ha sido demostrado el efecto benéfico de este producto sobre varios indicadores relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, para que se manifieste su acción en mayor grado debe aplicarse en estado líquido. Al parecer, con esta forma se garantiza una distribución homogénea de sus componentes y se viabiliza la absorción por parte del sistema radical, lo que a su vez incide en la obtención de una planta más vigorosa y determinado grado de bioprotección. Es válido señalar que las plántulas tratadas con el biopreparado en ambas formas en estudio no presentaron afectaciones por los fitopatógenos del cultivo. Algunos autores señalan la relación de los compuestos fenólicos con la inducción de resistencia en planta (Ortiz, 2001).

En las muestras estudiadas se observaron siete sitios de actividad EST tanto para las plantas donantes como las regenerantes, obteniéndose tres bandas de mayor intensidad de movilidad electroforética de 0.487, 0.525 y 0.725. La expresión selectiva de un mayor número de isoenzimas EST corroboran el importante papel de éstas en la fotosíntesis de las plantas, su

Tabla 7. Comportamiento de algunos indicadores morfológicos durante aclimatización.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)			Número de pares de hojas		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
Control	11.2 c	13.9 ab	9.30 e	5.60 b	5.18 b	4.31 d
B.L	14.5 a	14.2 a	11.4 c	6.91 a	6.79 a	5.49 bc
B.S	13.1 b	13.2 b	10.5 d	5.19 c	5.20 c	5.38 bc
E.S x (±)		0.89 **			0.25 ***	

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha = 5\%$).

Tabla 8. Comportamiento de indicadores morfofisiológicos durante la aclimatización.

Tratamientos	Proteínas totales (mg/g tejido)			Fenoles (mg/g tejido)		
	M-229	4.27	M-28	M-229	K-234	M-28
Control	3.32 c	4.39	2.18 d	12.0 c	11.1 c	10.9 d
B.L	4.35 a	4.10 b	4.37 a	14.7 a	13.8 ab	13.0 b
B.S	4.10 b	4.10 b	3.14 c	6.60 e	5.41 f	4.78 g
E.S x (±)		0.72 **			0.82**	

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha = 5\%$).

estabilidad en la expresión enzimática las convierte en una herramienta muy útil en estudios genéticos, por lo que también se recomiendan para caracterizar las diferentes etapas de desarrollo en plantas (Florida, 1999).

La actividad de las isoenzimas PER se caracterizó por presentar seis sitios de acción, los cuales estuvieron presentes en las muestras de plantas donantes y vitroplantas regeneradas, pudiéndose destacar la presencia distintiva de una banda de mayor intensidad de movilidad electroforética de 0.432. Al parecer, el grado de polimorfismo de PER está relacionado con el tipo de tejido, debido a funciones específicas de las mismas, éste es uno de los sistemas más estudiados en diversos cultivos, por ser uno de los más polimórficos, por la estabilidad y reproducibilidad de las bandas (Saare *et al.*, 2000).

Estas isoenzimas catalizan la oxidación de sustratos tales como fenoles, aminas, leucocolorantes y de ciertos grupos heterocíclicos como el indol; además, actúan en la biosíntesis de los componentes de la pared celular, así como en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular y la resistencia a factores adversos tanto bióticos como abióticos (Iglesias, 1995; Alcázar, 1995).

Estos aspectos evidencian la factibilidad del empleo del CB-1, al propiciar la obtención de plántulas de gran crecimiento y desarrollo, y por tanto la disminución en el período de aviveramiento y en los insumos, constituyendo una alternativa viable.

Para preparar un litro de medio de cultivo se invierten \$0.11 por concepto de AIA comercial. La sustitución de éste por el compuesto bacteriano CB-1 implica un costo de sólo \$ 0.04, además es activo a concentraciones muy bajas y no se requiere la presencia de otra auxina para que se manifieste su efecto; también permite lograr un desarrollo normal de

la vitroplanta durante la fase *in vitro* favoreciéndola durante la fase *ex vitro*. Para la obtención del mismo sólo se utilizan insumos nacionales, lo que aumenta su ventaja desde el punto de vista económico.

El uso indiscriminado de los productos químicos es una de las principales causas de los grandes trastornos ecológicos en los agroecosistemas, y por ello en los últimos años se ha incrementado el interés en el campo de la microbiología del suelo (Altieri, 1996). En tal sentido, ha sido corroborado el efecto beneficioso del tratamiento con biopreparados de origen bacteriano sobre los índices morfofisiológicos de las plántulas de cafeto, apreciándose un mayor crecimiento y porcentaje de supervivencia en las condiciones de campo, debido a que las rizobacterias tienen la capacidad de colonizar un amplio rango de cultivos y son antagonistas de varios patógenos que se encuentran asociados a las raíces de las plantas. Es preciso destacar los efectos benéficos que la aplicación de estos productos generan en el cuidado y en la protección del medio ambiente.

CONCLUSIONES

El compuesto de origen bacteriano CB-1 influye positivamente sobre el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas permitiendo obtener un alto valor del coeficiente de multiplicación, y significativo ahorro durante la ejecución del proceso.

La auxina AIA, utilizada en el medio de cultivo para la micropropagación de los clones M-229, K-234 y M-28, puede ser sustituida por dosis muy bajas de CB-1, sin afectarse el desarrollo de las vitroplantas.

El clon M-229 mostró mayor capacidad de respuesta para los indicadores evaluados, mientras que el M-28 presenta un comportamiento recalcitrante.

Durante la fase de aclimatización de las plántulas se obtuvo mayor efectividad con el CB-1 en estado líquido para las diferentes variables estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcázar, D. 1995. Peroxidase isozymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*. 94: 736-742.
- Altieri, A. 1996. *Bases agroecológicas para una agricultura sustentable*. Agroecología y agricultura sostenible. 1ed: CLADES, pp. 122-149.
- Berthouly, M., Michaux-Ferriere, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44:169-176.
- Carvalho, A. 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. En: *Coffea agronomy*. London; Elsevier Applied Science, vol. 4: pp. 120-160.
- De la Cruz, G., Estrada, J., Orozco, V., Labrada, M., Infante, Z. y Martínez, L. 1990. *Metodología de micropropagación e identificación de variedades de café*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", 39p.
- Dileep, B. S. and Dubet, M. 1992. Seed bacterization with a fluorescent pseudomonas for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil. Biol. Biochem.* 24(6): 539-542.
- FAO. 1996. La función de la investigación en la seguridad alimentaria y el desarrollo agrícola a nivel mundial. En: *Cumbre Mundial sobre la alimentación*. Documentos técnicos de referencia 2:36.
- Fernández, F., Ortiz, R., Martínez, M., Costales, A. y Llorín, D. 1997. The effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculants on rice (*Oryza sativa*) in different types of soils. *Cultivos Tropicales*. 18 (1), pp. 5-6.
- Florido, M. 1999. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate atendiendo a características morfo-bioquímicas y tolerancia al calor. Tesis de grado (Maestro en Biología Vegetal). Universidad de La Habana. 87 p.
- González, M., Morejón, R. y Portilla, M. 1998. Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo "in vitro" de ápices de *Coffea arabica* L. *Cultivos Tropicales* 19(2): 37-40.
- Gould, D. 1990. Biological control of plant root disease by bacteria. In J. P. Nakas and C. Hagedorn (eds). *Biotechnology of Plant Microbe Interactions*, pp. 278-317.
- Hernández, A., Fernández, A., Hernández, A. 1998. Identificación de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. *Cultivos Tropicales* 19(1): 14-16.
- Hernández, A., Hernández, A. y Heydrich, M. 1998. Estudios fisiológico-bioquímicos con cepas de rizobacterias promisorias para la biofertilización del maíz. *Cultivos Tropicales* 19(1): 5-8.
- Hebaer, K. P. 1998. Suppression of pre- and postemergence damping off in corn by *B. cepacia*. *European Journal of Plant Pathology*. 104(1), pp.29-36.
- Hernández, Annia. 1998. Caracterización de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. Tesis. La Habana. C.U. (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas), 64 p.
- Iglesias, L., González, M. C. 1995. Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*. 16 (1): 64-69.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage J_4 . *Nature* 227:680-685.
- López, Catalina y Cabrera, Mireya. 1993. Informe de etapa. Resultado 01. Desarrollo de estudios de compatibilidad entre clones de *Coffea canephora*. Santiago de Cuba. Centro de documentación ECICC.IOp.
- Maurhofer, M. C. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strains CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*. 82(1), pp. 190-195.

- Ministerio de la Agricultura. 1987. *Instrucciones técnicas para el cultivo del café y el cacao*. Ciudad de La Habana: CIDA, 208 p.
- Montes, S., Ramírez, L., Hernández, M, Santana, N. y Lara, D. 1997. Micropropagación de variedades de clavel *Dianthus carioophyllus* L. y *Dianthus plumarius* L. mediante el cultivo de meristemas. *Cultivos Tropicales* 18(1): 75-81.
- Ortiz, S. 2001. Estudio de las condiciones de crecimiento de *Burkholderia cepacia* 0057 para la producción de sideróforos. Tesis de Maestría. IFAL. Universidad de La Habana. 66 p.
- Paillard, M., Lashermes, P. y Petiard, V. 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor. Appl. Genet.* 93:41-47.
- Pharmacia Biotech. 1997. Manual de Técnicas electroforéticas para cámara de electroforesis Mithi Small II.
- Saare-Sormisnski, K., Preil, W., Knox, P., Lieberei, B. 2000. Arabinogalactan proteins in embryogenic and not-embryocallus cultures of *Euforbia pulchem'ma*. *Physiologia Plantarum.* 108:180-187.
- Santana, N. 1998. Establecimiento de una metodología para la producción de la semilla artificial del café (*Coffea* sp.). Informe Anual Proyecto. La Habana: INCA-CICY.
- Toledo, Yuselín. 2001. Aplicación de un biopreparado de origen bacteriano en beneficio del cultivo del gladiolo (*Gladiolus* sp.). Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. 54 p.
- Velásquez, M. 1999. Estudio de la interacción maíz-*B. cepacia*. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 41 (1), pp17-25.
- Zok, S., Dublín, P. 1991. Multiplication vegetative "in vitro" par culture d' apex chez *Coffea arábica* L. action solutions minerales et de regulateurs de croissance. *Café Cacao The.* 4(35): 245-256.