

Efecto de la aplicación de un campo electromagnético sobre el contenido de proteínas solubles y carbohidratos de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. cultivados *in vitro*

Elizabeth Isaac Alemán*, Albys Ferrer Dubois, Yilan Fung Boix *Autor para correspondencia

Departamento de Bioelectromagnetismo. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Apartado 4078. CP 90 400. Santiago de Cuba. Cuba. e-mail: elizabeth@cnea.uo.edu.cu

RESUMEN

Los campos electromagnéticos han sido aplicados para acelerar el crecimiento y germinación de plantas *in vitro* de café, sin embargo aún no queda claro cuáles son los mecanismos que se desarrollan durante la interacción de los campos electromagnéticos y el tejido vegetal. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la aplicación de un campo electromagnético sobre la concentración de proteínas solubles y carbohidratos de embriones cigóticos de café durante la fase de establecimiento *in vitro*. A los tres días de establecidos los embriones se aplicó el tratamiento magnético con nivel de inducción de 2 μ T y frecuencia de 60 Hz durante un tiempo de exposición de 3 minutos. Para ello se empleó un estimulador electromagnético para cultivos *in vitro* BioNaK-03. Como control se emplearon embriones que no recibieron tratamiento electromagnético. A las 6 semanas de cultivo se determinó el contenido de proteínas y carbohidratos. Los resultados mostraron un incremento significativo de las concentraciones de estos compuestos para los embriones tratados. La aplicación de campos electromagnéticos en esta fase de cultivo puede contribuir a mejorar la calidad de las plantas obtenidas de embriones cigóticos de café al modificar el curso de algunos procesos fisiológicos y bioquímicos. Esto conllevaría a un aumento del vigor y aseguraría un mejor desarrollo de la planta en fases posteriores.

Palabras clave: Caturra rojo, café, plantas *in vitro*

ABSTRACT

Electromagnetic fields have been applied to increase plant growth and *in vitro* germination of coffee. Even though it is not clear yet the mechanisms developed during the interaction of electromagnetic fields and plant tissue. This study aimed to determine the effect of applying an electromagnetic field on the concentration of soluble proteins and carbohydrates of coffee zygotic embryos during *in vitro* establishment stage. After three days of embryos establishment the treatment was applied with 2 μ T magnetic induction level and 60 Hz frequency for an exposure time of 3 minutes. An electromagnetic stimulator for *in vitro* cultures BioNaK-03 was used. Embryos free of electromagnetic treatment were used as controls. The content of protein and carbohydrates was determined after 6 weeks of culture. Results showed a significant increase in the concentrations of these compounds in treated embryos. The application of electromagnetic fields at this stage of culture could improve the quality of plants obtained from coffee zygotic embryos by changing the way of some physiological and biochemical processes. This leads to increase the vigour and ensure a better plant development at later stages.

Key words: Caturra rojo, coffee, *in vitro* plants

INTRODUCCIÓN

En busca de otros métodos que contribuyan al éxito de la propagación de especies vegetales el hombre ha llegado a establecer su relación con fenómenos que involucran otras ciencias particulares como es el caso de la física, dentro de la cual el electromagnetismo ha desempeñado un importante papel.

Se conoce, además, que los campos electromagnéticos inducen perturbaciones en

el ambiente circundante y provocan cambios morfológicos y fisiológicos. Existen un número creciente de experimentos que muestran que la exposición a los campos electromagnéticos produce una gran variedad de efectos, entre ellos una acción positiva sobre la estimulación del crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales (Azanza y Del Moral, 1994; Balcavage *et al.*, 1996; Bardasano, 2000).

En la agricultura los campos electromagnéticos han sido aplicados para acelerar la germinación

de las semillas y el crecimiento de las plantas. Los efectos primarios que se producen en el metabolismo por la aplicación del campo magnético se hacen evidentes. Algunos investigadores describen que los efectos metabólicos producidos por las radiaciones magnéticas se manifiestan como procesos tróficos estimuladores y de reparación celular (Azanza y Del Moral, 1994; Bardasano, 2000; Vashisth y Nagarajan, 2008; Ursache *et al.*, 2009).

Sin embargo, aún no queda claro cuáles son los mecanismos que se desarrollan durante la interacción de los campos electromagnéticos y el tejido vegetal, aunque sí se ponen de manifiesto sus efectos en el metabolismo celular.

El café (*Coffea sp.*) es la planta estimulante más difundida en el mundo y constituye uno de los productos comerciales más extendido de las regiones tropicales (Arega, 2006). Además, en Cuba, el café es de consumo habitual por la población y un importante producto exportable, cuya calidad es reconocida internacionalmente (Martínez-González *et al.*, 2007).

El cultivo de plantas de café por vía biotecnológica, puede constituir una alternativa de gran utilidad para la recuperación de más del 75% de la capacidad de germinación de semillas conservadas por más de un año (Berthouly y Michaux-Ferreire, 1996; Martínez-González *et al.*, 2007). Además, es una especie que se ha tomado como modelo ya que permite estudiar diferentes aspectos en las fases del cultivo de tejidos y realizar diversos análisis fisiológicos. En este sentido, podría emplearse para conocer el efecto de los campos electromagnéticos sobre el material vegetal. El objetivo del siguiente trabajo fue determinar el efecto de la aplicación de un campo electromagnético sobre el contenido de proteínas solubles y carbohidratos de embriones cigóticos de café durante la fase del establecimiento *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Se tomaron semillas de *Coffea arabica* L. var. Caturra rojo, en buen estado fitosanitario, a las

cuales se les extrajeron los embriones. Estos se establecieron *in vitro* siguiendo la Metodología de Micropropagación e identificación Bioquímica de variedades de café (*Coffea sp.*) propuesta por De la Cruz y Saborit (1990).

Los embriones cigóticos fueron colocados en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g.l⁻¹ de sacarosa, 6 g.l⁻¹ de agar, 25 mg.l⁻¹ de cisteína, 0.5 μmol de ácido indolacético (AIA), 5 μmol de 6-bencilaminopurina (6-BAP), caseína 0.5 mg.l⁻¹ y el pH se ajustó a 5.6 antes de la esterilización.

Se emplearon tubos de ensayo de 25x150 mm, con 10 ml de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron con luz artificial (54 μmol·m⁻²·s⁻¹) 24 horas, 26 ± 2°C y humedad relativa de 50- 60%, durante 6 semanas.

Aplicación del tratamiento electromagnético

A los tres días de establecidos los embriones se aplicó el tratamiento magnético con nivel de inducción de 2 μT y frecuencia de 60 Hz durante un tiempo de exposición de 3 minutos. Para ello se empleó un estimulador electromagnético para cultivos *in vitro* BioNaK-03 (Dominguez *et al.*, 1996) que posee las siguientes características: onda trapezoidal, conexión de bobinas en paralelo, frecuencia de 60 Hz.

Como control se emplearon embriones que no recibieron tratamiento electromagnético.

Se emplearon 50 embriones por tratamiento y se realizaron tres réplicas para cada tratamiento.

Al transcurrir las 6 semanas después de aplicado el tratamiento se procedió a la obtención del extracto para la determinar el contenido de proteínas solubles y carbohidratos.

Determinación del contenido de proteínas solubles y carbohidratos

Para obtener el extracto crudo se siguió la metodología descrita por Grisson y Pilet (1989). Los segmentos de las plántulas de café obtenidas a partir de los embriones germinados, se maceraron y se utilizó como medio de extracción tampón fosfato 66 mM (pH 6.1) a 4°C y en oscuridad, en proporción 1:2 (5g de embrión/100ml de solución

tampón). Se centrifugó durante 15 minutos a 3 500 rpm. Luego se eliminó el precipitado y el sobrenadante constituyó el extracto crudo que contenía la fracción de proteínas solubles.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y los carbohidratos se determinaron por el método de Fenol- Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956).

Análisis estadístico

El diseño empleado fue Completamente Aleatorizado. Para el análisis de los datos previamente se realizó una transformación, empleando raíz cuadrada de $(x+0.5)$, pues no cumplían una distribución normal, y posteriormente se realizó un ANOVA de Clasificación Simple y una prueba t de Student, para lo cual se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las seis semanas de cultivo se comprobó que los embriones cigóticos de cafeto sometidos a la aplicación del campo electromagnético tuvieron un 85% de germinación mientras que en el tratamiento control se alcanzó 70%. Además, se constató en los primeros, un incremento significativo del contenido de proteínas solubles y carbohidratos (Figura 1).

Durante el período embrionario, existe un incremento del metabolismo celular, pues se están produciendo de forma constante divisiones celulares mitóticas que llevan al crecimiento del embrión, y con ello a la diferenciación de dos zonas: una cotiledónica y otra hipocotiledónica, que darán lugar al futuro desarrollo del vegetal, por lo que en esta etapa la síntesis y degradación tanto de proteínas como de carbohidratos de forma simultánea se incrementa (Taiz y Zeiger, 2006).

Martínez *et al.* (1992), plantearon que durante la exposición a los campos electromagnéticos los canales y poros de la membranas celulares permanecen abiertos por más tiempo. Se produce un incremento en la absorción de nutrientes y en el metabolismo celular y con ello el crecimiento del embrión.

Por otra parte, los campos magnéticos de baja frecuencia (60 Hz) pueden modificar el flujo catiónico a través de las membranas biológicas y alterar el metabolismo celular. Este mecanismo está basado en la premisa de que el flujo iónico transmembrana está regulado por cambios dependientes del voltaje en la conformación de los canales de proteínas y que los procesos que alteran el flujo iónico provocan profundos cambios en el metabolismo de la célula (Azanza y Del Moral, 1994; Bardasano, 2000).

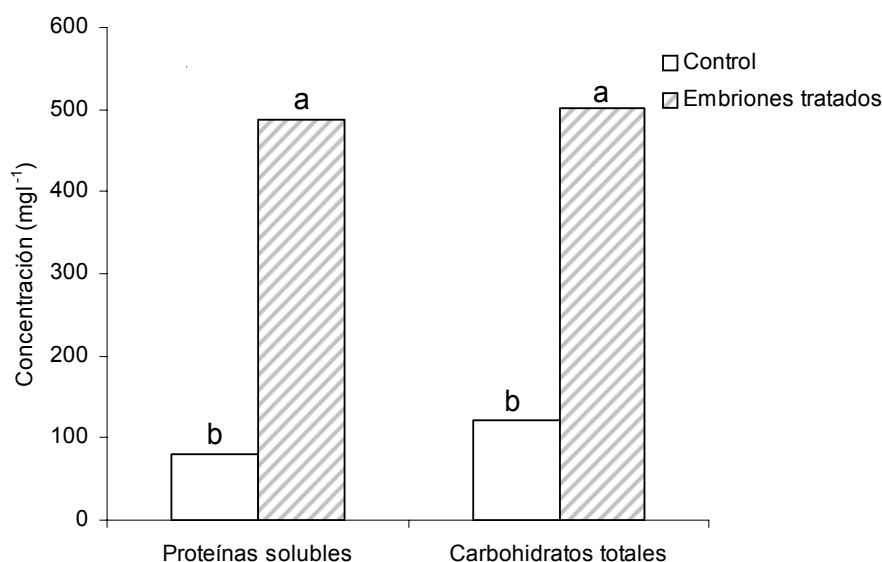


Figura 1. Efecto del tratamiento electromagnético (inducción electromagnética de 2 μ T y tiempo de exposición de 3 minutos) sobre el contenido de proteínas solubles y carbohidratos totales de embriones cigóticos de *Coffea arabica* var. Caturra rojo después de seis semanas de establecidos *in vitro*. Barras con letras diferentes difieren según la prueba de Student ($p < 0.05$).

Las alteraciones inducidas en la doble capa lipídica (iónica) por los campos magnéticos que abarcan desde alteraciones de las funciones de los receptores de la membrana, inhibición de la actividad de las enzimas ligadas a esta hasta cambios en su conformación, debido a las propiedades diamagnéticas de los dominios de los fosfolípidos pueden ser determinantes en las respuestas celulares (Rosen, 1996; Reina *et al.*, 2001; Gallan y Pazur, 2005; Ursache *et al.*, 2009).

La aplicación de campos electromagnéticos en esta fase de cultivo puede contribuir a mejorar la calidad de las plantas obtenidas de embriones cigóticos de café al modificar el curso de algunos procesos fisiológicos y bioquímicos. Esto conllevaría a un aumento del vigor y aseguraría un mejor desarrollo de la planta en fases posteriores.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la aplicación de un tratamiento electromagnético a embriones de *Coffea arabica* L. var. Caturra rojo durante su establecimiento *in vitro*, incrementa de forma significativa el contenido de proteínas solubles y carbohidratos totales con respecto a los embriones que no fueron tratados. Ello puede contribuir a mejorar la calidad de las plantas *in vitro*.

REFERENCIAS

- Arega, Z (2006) Diversity of Arabica coffee populations in afro-montane rainforests of Ethiopia in relation to *Colletotrichum kahawae* and *Gibberella xylarioides*. Addis Ababa University. Thesis for the degree of Master Science in Biology. Addis Ababa
- Azanza, MJ, A Del Moral (1994) Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to Biomagnetism. *Progress in Neurobiology* 44 (93): 517-601
- Balcavage, W X, T Alvager, J Suez (1996) A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 222 (2): 374-378
- Bardasano JL (2000) Bioelectromagnetismo Ciencia y Salud. Mc.Graw- Hill. Madrid
- Berthouly, M, Michaux-Ferreire Nm (1996) High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora* induction condition and histological evolution. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 44: 169-176
- De la Cruz, G, Saborit M (1990) Metodología de micropropagación e identificación bioquímica de variedades de café (*Coffea* sp.). Instituto Jorge Dimitov, Granma, Cuba
- Domínguez, H, A Fong, F Reguera, J Castillo (1996) Estimulador electromagnético para cultivos *in vitro* (BioNak-03). Patente de Invención. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Santiago de Cuba. Cuba
- Dubois, M, Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, PA, Smith, F (1956) The general phenol-sulfuric acid assay for carbohydrate. *Anal. Biochem.* 28:350
- Lowry, O H, N J Rosebrough, AL Farr, R J Randall (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Martínez C, I S Harry, T A Thorpe (1992) Optimization of buds in cotyledonary explant of *Pinus canariensis*. *Plant. Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 247-255
- Martínez-González E, G Barrios, L Rovesti, R Santos (2007) Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Ed. Torralba. España
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Vashisth A, S Nagajaran (2008) Exposure of seed to static magnetic field enhance germination and early growth characteristic in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Bioelectromagnetics* 29:571-578
- Reina FG, Pascual LA, Fundora IA (2001) Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part 2: Experimental results. *Bioelectromagnetics* 22:596– 602
- Rosen, A D, (1996) Inhibition of calcium channel activation in 6H3 cells by static magnetic fields. *Biochemica et Biophysica Acta* 1282: 149-155
- Taiz L, E Zeiger (2006) *Plant Physiology*. Chapter 5, pp. 80-83. Sinauer Associates Inc. Massachusetts
- Ursache M, Mindru G, Creangă D E, Tufescu FM, Goiceanu C (2009) The effects of high frequency electromagnetic waves on the vegetal organisms. *Rom. Journ. Phys.* 54 (1–2): 133–145