

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA ASOCIADA CON EL INTERCAMBIO GASEOSO DE DOS VARIEDADES DE *Coffea arabica* OBTENIDAS POR CULTIVO *In Vitro*

Elizabeth Isaac[✉], J. L. González-Olmedo, Maribel Rivas y A. Moreno

ABSTRACT. This work was developed at Plant Cell and Tissue Culture Laboratory from Bioplant Center in July, 2007, with the objective of evaluating the photosynthetic activity of *Coffea arabica* seedlings var. Catuay and Caturra rojo, obtained by *in vitro* culture at the multiplication phase. Net photosynthesis rate, transpiration, stomatal conductance and chlorophyllous pigment concentration were determined for each of the varieties after eight weeks of being cultivated; vitroplants grew in a MS medium supplemented with 0.5 μmol of AIA and 5 μmol of 6-BAP under controlled conditions. Results showed that both *in vitro*-developed varieties presented similar net photosynthesis rates to the adult coffee plants grown under field conditions, which proved seedling photosynthesis capacity, preserving a suitable balance for gas exchange in the photosynthetic process during *in vitro* multiplication stage.

Key words: *Coffea arabica*, vitroplants, photosynthesis, transpiration, leaf conductance, stoma

RESUMEN. El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Células y Cultivo de Tejidos del Centro de Bioplasmas en julio de 2007, con el objetivo de evaluar la actividad fotosintética de las plántulas de *Coffea arabica* var. Catuai y Caturra rojo, obtenidas *in vitro* en fase de multiplicación. Se determinaron la tasa de fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática y concentración de pigmentos clorofílicos para cada una de las variedades a las ocho semanas de cultivadas; las vitroplantas crecieron en condiciones controladas en un medio MS suplementado con 0,5 μmol de AIA y 5 μmol de 6-BAP. Los resultados mostraron que ambas variedades desarrolladas *in vitro* presentaron tasas de fotosíntesis neta similares a las plantas de café adultas cultivadas en condiciones de campo, lo que demostró la capacidad de fotosíntesis de las plántulas, conservando un adecuado equilibrio para el intercambio gaseoso en el proceso fotosintético durante la etapa de multiplicación *in vitro*.

Palabras clave: *Coffea arabica*, vitroplantas, fotosíntesis, transpiración, conductancia foliar, estoma

INTRODUCCIÓN

El café es la planta estimulante más difundida en el mundo y uno de los productos comerciales más extendidos de las regiones tropicales (1, 2, 3). En Cuba, es de consumo habitual por la población y un producto exportable importante, cuya calidad es reconocida internacionalmente, incrementándose las fuentes de divisas para el desarrollo económico y social.

El cultivo del café por vía biotecnológica puede constituir una vía de gran utilidad, para recuperar más del 75 % de la capacidad de germinación de semillas conservadas por más de un año (4).

Las plántulas *in vitro* de cualquier especie se producen en un ambiente aséptico, caracterizado por una baja intensidad luminosa o flujo de fotones fotosintéticos (5), por lo que el intercambio gaseoso asociado a la actividad fotosintética de las plántulas obtenidas *in vitro* varía considerablemente y es importante evaluar estos aspectos para el desarrollo fisiológico del vegetal en cuestión.

Ms.C. Elizabeth Isaac, Especialista del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, apartado postal 4078, Santiago 4, Santiago de Cuba; Dr.C. J. L. González-Olmedo, Investigador Titular; Ms.C. Maribel Rivas y Ms.C. A. Moreno, Investigadores del Laboratorio de Células y Cultivo de Tejidos, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Avila, carretera Morón km 9, Ciego de Avila, CP 69450, Cuba.

✉ elizabeth@cnea.uo.edu.cu, eli3073@yahoo.com

Aunque la fotosíntesis del café ha sido tema de estudio por muchos años en condiciones controladas y de campo (6), hasta la fecha no se ha informado para variedades de *Coffea arabica* la actividad fotosintética asociada al intercambio gaseoso de plántulas obtenidas *in vitro*, por lo que se conoce poco del comportamiento fisiológico que ocurre a este nivel. Por tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad fotosintética de plántulas de *Coffea arabica* var. Catuai y Caturra rojo obtenidas *in vitro* en fase de multiplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo. Los microesquejes de plántulas de *C. arabica* var. Caturra rojo y Catuai con tres pares de hojas opuestas se desarrollaron durante ocho semanas en un medio MS suplementado 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. Se emplearon tubos de ensayos de 25x150 mm, conteniendo cada uno 10 mL de medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $24^{\circ}\text{C}\pm 1$, humedad relativa de $70\%\pm 5$ y un fotoperíodo de 16 h y 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ con el empleo de lámparas fluorescentes.

Determinación de la actividad fotosintética y el intercambio gaseoso de plántulas de *C. arabica* var. Catuai y Caturra rojo durante la etapa de multiplicación *in vitro*. Para determinar las variables, se tomaron hojas completamente expandidas de plántulas provenientes de cada una de las variedades, que se colocaron en la cubeta con un punto de saturación de $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La tasa máxima de fotosíntesis ($\mu\text{mol}(\text{C}_2\text{O})\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), transpiración ($\mu\text{mol}(\text{H}_2\text{O})\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y conductancia estomática ($\mu\text{mol}(\text{H}_2\text{O})\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se determinó con el equipo *Pen-Centra-200* y la cubeta universal *PLC-6* del equipo portátil *CIRAS-2 (Europe, PP systems, UK)*.

En cada medición se cubrió toda el área de la cubeta ($2,5 \text{ cm}^2$). Las condiciones del equipo fueron la concentración de CO_2 y humedad del aire dentro de la cámara $375 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y 80% respectivamente bajo luz controlada a $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las mediciones se realizaron a las seis horas después de iniciado el fotoperíodo. Estas variables se realizaron a cinco plantas, las más representativas para cada variedad, con diez repeticiones cada una, para un total de 50 valores para cada variedad.

Determinación de la concentración de pigmentos clorofílicos. Se tomaron hojas de 20 plántulas por variedad, provenientes de cinco muestras del extracto para cada una de las variedades. La obtención del extracto clorofílico se realizó con acetona al 80% y la absorbancia se midió a 663 y 645 nm en el espectrofotómetro *UV-Vis (LKB-Pharmacia)*. Las clorofilas *a*, *b* y totales se calcularon por el método de Porras (7).

Análisis estadístico. Se empleó un diseño completamente aleatorizado. Para el análisis de los datos de fotosíntesis neta se utilizó un ensayo de Kruskal Wallis, pues no cumplían con una distribución normal. En el caso de los datos de transpiración y conductancia estomática, se realizó un Análisis de Varianza de Clasificación Simple y una prueba de Scheffe, que permitió comparar las medias par a par. En todos los casos se usó el paquete estadístico *Statgraphics Plus 5.1* para *Windows*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos de fotosíntesis neta de plántulas de *C. arabica* var. Caturra rojo y Catuai, en fase de multiplicación *in vitro*, no presentaron diferencias significativas, como se observa en la Figura 1a.

A pesar de que se considera que las plantas cultivadas *in vitro* realizan una escasa fotosíntesis, se ha confirmado la capacidad fotosintética de varias especies (5, 8, 9, 10, 11), lo que coincide con los resultados en los que se muestra la capacidad de fotosíntesis de las plántulas de café obtenidas *in vitro* para las dos variedades.

Estos resultados son, además, similares a los informados para los cafetos adultos. En estudios realizados en plantas adultas de *Coffea arabica*, cultivadas a una altura de 1900 m sobre el nivel del mar, la fotosíntesis neta obtenida fue de $5 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (6).

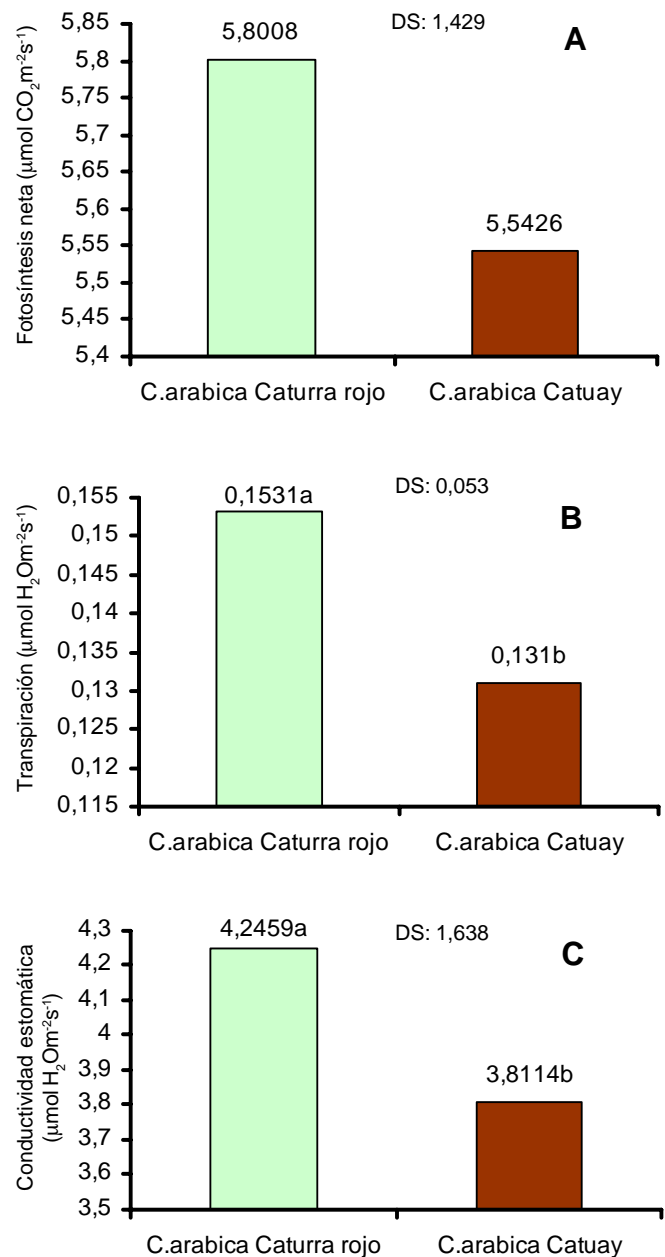


Figura 1. Valores de fotosíntesis neta (a), transpiración (b) y conductancia estomática (c) de plántulas de *C. arabica* var. Caturra rojo y Catuai en fase de multiplicación *in vitro* para un nivel de significación del 95%

Los resultados de la fotosíntesis neta obtenidos para las dos variedades son superiores a los presentados antes [$0,44$ - $2,84 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] a 25°C (12); [$3,51$ - $4,41 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] a 24°C (13); [$3,87 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] a 20°C (14); [$3,5 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] a 25°C (15) y [$4,4 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] (16), mientras que en plantas adultas se registraron tasas superiores de fotosíntesis neta para tres genotipos de café [$11,7 \mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] a 25°C (17).

Por otro lado, al evaluar los resultados de transpiración y conductancia estomática, para la variedad Caturra se obtuvieron $0,155 \mu\text{mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $4,366 \mu\text{mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

respectivamente, mientras que para Catuai los valores fueron de $0,13 \mu\text{molH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de transpiración y $3,811 \mu\text{molH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de conductancia estomática, obteniéndose diferencias significativas entre las variedades (Figura 1b y c).

Las plantas se enfrentan al compromiso de obtener CO_2 para mantener la fotosíntesis. A través de los estomas se lleva a cabo el intercambio más importante de H_2O y CO_2 , jugando la apertura estomática un papel crucial tanto en la transpiración como en la fotosíntesis foliar (18).

En la Tabla I se muestran los resultados de la concentración de pigmentos clorofílicos, aunque no existen diferencias significativas entre los valores.

Tabla I. Concentración de pigmentos obtenidos en plántulas de *Coffea arabica* variedad Caturra rojo y Catuai durante el proceso de micropropagación

	clorofila a ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	clorofila b ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	clorofila total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Caturra rojo	$18,40 \pm 0,0005$	$12,38 \pm 0,0001$	$31,24 \pm 0,00005$
Catuai	$19,36 \pm 0,0002$	$14,41 \pm 0,00005$	$33,77 \pm 0,0002$

Nivel de significación 95 %

Estos resultados corroboran otros obtenidos anteriormente (19, 20), en los que se obtuvo una concentración similar de pigmentos clorofílicos en plantas de café en condiciones *in vitro*.

De forma general, los resultados muestran que las plántulas de *Coffea arabica* var. Caturra rojo y Catuai mantienen su capacidad fotosintética durante el cultivo *in vitro*, conservando un adecuado equilibrio para el intercambio gaseoso en el proceso fotosintético durante la etapa de multiplicación *in vitro*, lo que permite garantizar una aclimatización exitosa de estas vitroplantas.

REFERENCIAS

- Starbird, A. The Bonanza Bean: Coffee By Ethel [online] [Consultado: junio 2008] Disponible en: <<http://www.nationalgeographic.com/coffee/ax/frame.html>>.
- Arega, Z. Diversity of Arabica coffee populations in a fromontane rainforests of Ethiopia in relation to *Colletotrichum kahawae* and *Gibberella xylarioides*. [Thesis for the degree of Master Science in Biology]. Addis Ababa: University, 2006, 57p.
- Patarroyo, M. Composición química del café y sus efectos en la salud. Conferencia presentada en el marco del XXI Simposio Latinoamericano de Caficultura. *Boletín Informativo [en línea]*, 2006, no. 1, p. 3. [Consultado: enero 2009] Disponible en: <<http://www.procafe.com.sv>>.
- Martínez, E.; Barrios, G.; Rovesti, L. y Santos, R. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. La Habana: Centro Nacional de Sanidad Vegetal; España: Entrepueblos; Italia: Gruppo di Volontariato Civile, 2007. 526 p.
- Pospíšilová, J.; Catsky, J. y Sesták, Z. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. In: Pessaraki M. (ed). *Handbook of photosynthesis*. New York: Marcel Dekker; Hong Kong: Basel, 1997. p. 525-540. [Books in soils, plants and the environment] ISBN: 0-8247-9708-6
- López-Ruiz, J. C. Comportamiento del intercambio gaseoso de *Coffea arabica* L. en tres altitudes de la zona cafetalera central colombiana. *Cenicafé*, 2004, vol. 55, no. 3, p. 202-212.
- Porras, R. J. Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic and marine organisms including recalcitrant algae. In: Scheer, H (Ed.). *Chlorophylls*. Boca Raton: CRC. Press Inc., 1991, p 31-57.
- Van Huylenbroeck, J.; Piqueras, M. y Deberg, A. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*, 1998, vol. 134, p. 21-30.
- Carvalho, L. C.; Osorio, M. L.; Chávez, M. M. y Amancio, S. Chlorophyll fluorescent as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, vol. 67, p. 271-280.
- Castro, D. y González, J. L. Control de condiciones ambientales y medios de cultivos para la propagación de *Eucalyptus grandis* en el sistema de inmersión temporal. *Actual Biol.*, 2001, vol. 23, no. 75, p. 13-18.
- González-Olmedo, J. L.; Córdova, A.; Aragón, C., Pina, D.; Rivas, M. y Rodríguez, R. Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plántulas de FHIA-18 expuestas a un estrés térmico. *Info Musa*, 2005, vol. 14, no. 1, p. 18-20.
- Nutman, F. J. Studies of the physiology of *Coffea arabica*: photosynthesis of coffee leaves under natural conditions. *Annals of Botany*, 1937, vol. 1, no. 3, p. 353-367.
- Nunes, M. A.; Bierhuizen, J. F. y Ploegman, C. Effect of light, temperature and CO_2 concentration on photosynthesis of *Coffea arabica* L. *Acta Botanica Neerlandica*, 1968, vol. 17, p. 93-102.
- Sondhal, M. R. Measurements of ^{14}C incorporation by illuminated intact leaves of coffee plants from gas mixtures containing $^{14}\text{CO}_2$. *Journal of Experimental Botany*, 1976, vol. 27, p. 1187-1195.
- Yamaguchi, D. y Friend, D. J. C. Effect of leaf and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica* L. *Photosynthetica*, 1979, vol. 13, p. 271-278.
- Friend, D. J. C. Shade adaptation of photosynthesis in *Coffea arabica* L. *Photosynthesis Research*, 1984, vol. 5, p. 325-334.
- Mosquera-Sánchez, L.; Riaño, N. M.; López, Y. y Arcila, J. Net photosynthesis and CO_2 compensation concentration in three coffee (*Coffea* sp.) genotypes and beans under three temperatures. *Rev.Fac. Nal.Agr.Medellin*, 2005, vol. 58, no. 2, p. 2827-2835.
- Taiz, L. y Zeiger, E. *Plant Physiology*. 4th ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 2006, 83 p. ISBN-10: 0878938567.
- Cost, S.; Ferrer, A.; Pérez, A., Fung, Y. Análisis del contenido de clorofila y carotenoides en vitroplantas de café (*Coffea arabica* L.) var. Caturra rojo expuestas a campos electromagnéticos. 16ta. Conferencia de Química. *Revista Cubana de Química*, 1999, vol. 11, no. 2 p: 5-8.
- Isaac, E.; Rodríguez, O. y Pérez, Y. Efecto del tiempo de exposición y niveles de inducción a los campos electromagnéticos en la concentración de pigmentos fotosintéticos durante la multiplicación de embriones de *Coffea arabica* L. var. Isla 5-15. *Rev. Técnica Química*, 2007. Edición Especial.

Recibido: 17 de febrero de 2009

Aceptado: 7 de abril de 2010