

**UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA
CENTRO DE BIOPANTAS
CENTRO NACIONAL DE ELECTROMAGNETISMO APLICADO**

**ACCIÓN DE UN CAMPO ELECTROMAGNÉTICO DE 60HZ EN EL
CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE *COFFEA ARABICA* CV.
CATUAI AMARILLO**

Tesis presentada en opción al grado científico
de Doctor en Ciencias Agrícolas.

ELIZABETH ISAAC ALEMAN

Ciego de Ávila
2013

**UNIVERSIDAD DE CIEGO DE ÁVILA
CENTRO DE BIOPANTAS
CENTRO NACIONAL DE ELECTROMAGNETISMO APLICADO**

**ACCIÓN DE UN CAMPO ELECTROMAGNÉTICO DE 60HZ EN EL
CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE *COFFEA*
ARABICA CV. CATUAI AMARILLO**

Tesis presentada en opción al grado científico
de Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Lic. ELIZABETH ISAAC ALEMAN, MsC
Tutor: Lic. Justo Lorenzo González-Olmedo, Dr C
Lic. María Esther González Vega, Dr. C

**Ciego de Ávila
2013**

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

1. Isaac-Aleman, Elizabeth. Acción de un campo electromagnético de 60 Hz en el cultivo de embriones cigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad “Máximo Gómez Báez”. Centro de Bioplantas. 2013. 98 p.

Según Sistema de Referencia Apellido, año

Isaac-Aleman, Elizabeth. 2013. Acción de un campo electromagnético de 60 Hz en el cultivo de embriones cigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad “Máximo Gómez Báez”. Centro de Bioplantas. 98 p.

*POR TODO SU SACRIFICIO Y COMPRENSIÓN, A MI MÁS PRECIADO TESORO,
MI HIJO*

*Si hoy la vida está vacía, llénala de todo lo que encuentres. Échale ilusiones, sueños, proyectos, esperanzas.
Échale amigos, amores, pasión, ternura, placer, alegría, belleza. Échale todo lo que desees, no te preocupes del
peso de la carga.*

Cuánto más llena esté la vida, menos te pesará.

Porque no es la vida lo que pesa, sino el vacío de llevarla sin gratitud, sin amor y sin esperanza

AGRADECIMIENTOS:

Los sueños aunque propios, no se consiguen realizar sin la ayuda de personas que te acompañan porque creen que se puede. Es larga la caminata, con subidas, bajadas, tropiezos, angustias, desespero, alegrías, lágrimas, tristezas, nostalgias; pero siempre hay grandes manos que se extienden y llegan hasta ti. Y a esas manos, que me condujeron a la realización de este mi sueño, hoy les quiero agradecer:

-especialmente a mi Carlitín, por su infinito amor;

-a mi esposo por su apoyo, a pesar de las ausencias;

-a mi Madre, familiares y seres más queridos, que batallaron junto conmigo;

-a mi incondicional amiga Yilan, por todos estos años de buenos y malos ratos;

-a mis tutores, Dr. Justo Lorenzo González-Olmedo y Dra. María Esther González Vega por su apoyo, constancia y la confianza en que se podía lograr;

-a Albita, Lianne, Dalgis, Melek, Daine, Yilian, Mónica, Clarita, las amigas de siempre;

-a mis compañeros del CNEA, los que están y los que se fueron, todos me ayudaron a mantener mi sonrisa;

-a Maita, que en el empeño por lograr su sueño, hizo realidad el mío;

-a mis hermanos avileños, Ina y Rome, por hacerme parte de su familia;

-a Douglas y Rayzza, porque ellos lograron que no sintiera 11 meses de soledad;

-a todos los que en el Centro de Bioplantas, me aceptaron con cariño;

-a Dra. Claudia Hernández Aguilar, sencillamente Clau, por permitir ser parte de su increíble familia;

-a Dr Antonio Chalfun Junior, cariñosamente Chalfun, por convertirme en parte de su equipo;

-a la Dra. Martha Mesa y el Dr. Hipólito Carvajal, que me ayudaron cuando casi parecía imposible;

-a Lyly, Ricar y Doris, que también batallaron hasta que lo lograron

-a un lindo y entusiasta grupo de jovencitos brasileños con unos deseos enormes de ser científicos y sé que lo lograrán: Rafa, Andre, Samuel, Amanda, Ariadne, Juliete, Rochelli, Pámela, Dalton, Joáz, Bárbara, Solange y Horllys.

-y finalmente, agradecer a mis amigos sinceros y por qué no, también a mis enemigos, que me criticaron para bien y para mal, pues con sus críticas me fortalecí.

*De todo corazón y eternamente, Gracias.
Este no es el fin, es sencillamente.... El principio.*

«Aférrate a los sueños, pues si los sueños mueren la vida es como un ave con alas rotas que no puede volar»

Abreviaturas

-ANOVA: *Análisis de Varianza*

-APX: *ascorbato peroxidasa*

-CAT: *catalasa*

-ADNc: *ácido desoxirribonucleico complementario*

-Cl a: *clorofila a*

-Cl b: *clorofila b*

-MS: *medio de cultivo Murashige-Skoog (1962)*

-RBCS1: *gen de la familia RBCS de la subunidad menor de la Rubisco*

-SDS-PAGE: *gel de electroforesis poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio*

-SOD: *superóxido dismutasa*

$^1\text{O}_2$: *estado singlete del oxígeno*

$^3\text{O}_2$: *estado triplete del oxígeno*

-H₂O₂: *peróxido de hidrógeno*

-O₂⁻: *anión superóxido*

Unidades de medidas:

°C: *grados Celcius*

μL: *microlitros*

Hz: *Hertz*

L: *litros*

min: *minutos*

s: *segundos*

mM: *milimolar*

mT: *mili Tesla*

SÍNTESIS

La especie *Coffea arabica* preferida por su calidad en la bebida constituye el 65% de la producción mundial. Con el objetivo de aumentar el porcentaje de supervivencia y calidad de las plantas de café se realizan diferentes estudios. Actualmente se conoce que la aplicación de los campos electromagnéticos de frecuencias extremadamente bajas (1-10 kHz de frecuencia del espectro electromagnético), tiene efectos positivos en algunos procesos vegetales tales como: la germinación, desarrollo de brotes, procesos fotosintéticos, entre otros. La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar los efectos de un campo electromagnético de 60 Hz en el cultivo de embriones cigóticos de *C. arabica* L. cv. Catuai amarillo, a través de variables morfológicas; fisiológicas, bioquímicas y moleculares; así como determinar el efecto a largo plazo sobre variables morfo-fisiológicas de las plántulas obtenidas. Inicialmente se establecieron *in vitro* los embriones cigóticos y se determinó la influencia de la inducción y el tiempo de exposición del campo electromagnético en las fases de germinación, crecimiento y aclimatización. Se comprobó la estimulación del crecimiento de las plantas tratadas con 2 mT de inducción y tres minutos de exposición y la mejora estructural de las hojas de las plántulas. Se favoreció la fotosíntesis en las etapas de crecimiento y aclimatización. En esta última se obtuvo además la expresión génica diferencial del gen RBCS1. La actividad específica de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa disminuyó en las plántulas de *C. arabica* cv. Catuai amarillo en las etapas de crecimiento y aclimatización. La aplicación de un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción durante tres minutos de exposición, provocaron cambios significativos en la morfología y fisiología de las plantas que perduraron durante cuatro meses, lo que mejoró los procesos fotosintéticos y la calidad de las plántulas obtenidas.

ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1- Generalidades del café y características de <i>Coffea arabica</i> L.....	5
2.2- El cultivo de embriones cigóticos aplicado al Café.....	8
2.3- La fotosíntesis en el desarrollo de plantas obtenidas <i>in vitro</i>	12
2.3.1 <i>El aparato fotosintético y la fotoregulación</i>	14
2.4- Campo electromagnético aplicados a sistemas vegetales.....	17
2.4.1 <i>Campos electromagnéticos en el cultivo in vitro</i>	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.0 -Procedimientos generales.....	25
3.1 -Efecto de un campo electromagnético de 60 Hz a diferentes niveles de inducción y tiempo de exposición en la germinación de embriones cigóticos de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai amarillo.....	26
3.1.1. <i>Caracterización de embriones cigóticos de café sometidos a la acción de un campo electromagnético por microscopía fotoacústica y espectroscopía infrarrojo</i>	28
3.2 -Efecto de niveles de inducción y tiempo de exposición a un campo electromagnético de 60 Hz durante el crecimiento <i>in vitro</i> y aclimatización de plántulas de café.....	29
3.2.1- <i>Caracterización de la anatomía foliar de plántulas de café obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz</i>	31
3.2.2- <i>Determinación de la fotosíntesis neta, transpiración y concentración de pigmentos fotosintéticos de las plántulas de café obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz</i>	32
3.2.3- <i>Determinación del efecto del campo electromagnético sobre las proteínas de membranas de cloroplastos aislados en hojas de plántulas de Coffea arabica cv Catuai amarillo</i>	34
3.2.4- <i>Efecto de un campo electromagnético sobre la expresión del gen RBCS1 en plántulas de Coffea arabica cv Catuai amarillo</i>	36
3.2.5- <i>Determinación de la actividad enzimática asociada al estrés de plántulas de Coffea arabica cv. Catuai amarillo en las fases de crecimiento in vitro y aclimatización bajo la acción de un campo</i>	

<i>electromagnético de 60 Hz</i>	39
3.3 Efecto a largo plazo de la exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia en el crecimiento y desarrollo de plántulas de <i>Coffea arabica</i> cv Catuai amarillo	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. Efecto de un campo electromagnético de 60 Hz a diferentes niveles de inducción y tiempo de exposición en la germinación de embriones cigóticos de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai amarillo	43
4.1.1 <i>Caracterización de embriones de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai sometidos a la acción de un campo electromagnético por microscopía fotoacústica y espectroscopia infrarrojo</i>	50
4.2. Efecto de niveles de inducción y tiempo de exposición a un campo electromagnético de 60Hz durante el crecimiento in vitro y aclimatización de plántulas de café	55
4.2.1- <i>Caracterización de la anatomía foliar de plántulas de café obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz</i>	61
4.2.2- <i>Determinación de la fotosíntesis neta, transpiración y concentración de pigmentos fotosintéticos de las plántulas de café obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz</i>	67
4.2.3- <i>Determinación del efecto del campo electromagnético sobre las proteínas de membranas de cloroplastos aislados en hojas de plántulas de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai amarillo</i>	75
4.2.4- <i>Efecto de un campo electromagnético sobre la expresión del gen RBCS1 en plántulas de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai amarillo</i>	79
4.2.5 <i>Determinación de la actividad enzimática asociada al estrés de plántulas de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai amarillo en las fases de crecimiento in vitro y aclimatización bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz</i>	82
4.3 Efecto a largo plazo de la exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia en el crecimiento y desarrollo de plántulas de <i>Coffea arabica</i> cv. Catuai amarillo	87
5. CONCLUSIONES	97
6. RECOMENDACIONES	98
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. ANEXO	

1. INTRODUCCIÓN

El cafeto *Coffea* spp. es una de las plantas más difundida en el mundo. Se cultiva en diez millones de hectáreas, expandidas en las regiones tropicales y subtropicales. Existen más de 80 países productores de café distribuidos en América, África, Asia, Oceanía y Europa (Mishra y Slater, 2012). Hasta abril de 2013, la producción global de café verde estuvo por encima de 144 646 millones de sacos con valores que excedieron los \$ 22,7 billones en el mercado mundial (ICO, 2013).

La especie *Coffea arabica* es preferida por su calidad en la bebida, características aromáticas, y su bajo contenido de cafeína, por lo que constituye el 65% de la producción mundial. Brasil y Vietnam son los países más productores (Arega, 2006; Mishra y Slater, 2012). En Cuba es un importante producto exportable, cuya calidad se reconoce internacionalmente. El uso que se le da en licorerías, confiterías, helados y fuente de materia orgánica en la producción agrícola, lo convierte en una fuente para el desarrollo económico y social del país. El café es además, una bebida de consumo habitual por la población, alrededor del 81% lo utiliza en forma de infusión (Martínez-González *et al.*, 2007).

En el cafeto se utilizan varios métodos de micropropagación con diversos fines de investigación en el área de la genética, la fisiología, la bioquímica y la fitopatología. Entre estos métodos se incluyen el cultivo de embriones cigóticos, anteras y protoplastos (Sondhal y Lauritis, 1992; Arcila *et al.*, 2001). El cultivo de embriones cigóticos es efectivo en el rescate de material de propagación de semillas de baja viabilidad (Litz, 1991; Kessel, 2008).

Con el objetivo de aumentar el porcentaje de supervivencia y calidad de las plantas de cafeto se realizan diferentes estudios. Actualmente se conoce que la aplicación de los campos electromagnéticos de frecuencias extremadamente bajas (1-10 kHz de frecuencia del espectro

electromagnético), tiene efectos positivos en algunos procesos vegetales tales como: la germinación, el desarrollo de brotes, la producción y la masa promedio de los frutos (Rochalska y Orzeszko-Rywka, 2005; De Souza *et al.*, 2006; Nimmi y Madhu, 2009; Cakmak *et al.*, 2010).

De igual forma, Stange *et al.*, (2002) observaron efectos favorables en la biosíntesis de proteínas, la división celular, la actividad fotoquímica, las tasas de respiración, la actividad enzimática y el contenido de ácidos nucleicos. Este método podría constituir una vía para incrementar el crecimiento y calidad de las plántulas obtenidas *in vitro*.

Aunque se producen cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos en las estructuras celulares, la energía que se transporta por estos campos es muy pequeña para romper uniones químicas o moleculares, porque se originan corrientes eléctricas muy bajas que no provocan daño celular (Pietruszewski *et al.*, 2007). En varios estudios se han evaluado la influencia de diferentes tiempos de exposición e inducciones magnéticas sobre el metabolismo vegetal, y se obtuvieron resultados positivos (Podleśny, 2005; Florez *et al.*, 2007; Vashisth y Nagarajan, 2008). Sin embargo, con excepción del llamado ``efecto magnético en la fotosíntesis`` donde se demostró la interacción de los campos magnéticos con el par de iones intermediarios que participan en el proceso de transferencia electrónica, existe poca información sobre la influencia de este fenómeno físico en la expresión de genes que se involucran en los procesos fotosintéticos (Paul *et al.*, 2006).

Algunos autores plantean que las reacciones fotosintéticas que se desarrollan en los cloroplastos son extremadamente sensibles a cambios que se producen en el vegetal (Fernández *et al.*, 2008). Éstos pueden ser detectados a través de señales en el transporte fotosintético de electrones, cambios en el estado redox de los cloroplastos, acumulación de especies reactivas del oxígeno y señales que regulan la expresión de genes que se asocian a la fotosíntesis (Fernández *et al.*, 2008;

Barajas-López *et al.*, 2012). Este proceso desempeña un papel esencial para evaluar los cambios en el ambiente de crecimiento de las plantas, incluso los que se producen bajo los efectos de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja.

Problema científico:

De los efectos de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en el desarrollo de embriones cigóticos de café existen escasas evidencias experimentales que avalen su influencia en los procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento de las plantas.

De los antecedentes descritos y a partir de la hipótesis: “La aplicación de un campo electromagnético de 60 Hz influye positivamente en variables fisiológicas, bioquímicas y moleculares durante la germinación de embriones cigóticos y el crecimiento de plántulas de *Coffea arabica* L.”; el presente trabajo experimental abordó como objetivo general:

Evaluar el efecto de un campo electromagnético de 60 Hz durante la regeneración de plántulas de café a partir de embriones cigóticos, así como su influencia en indicadores fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de diferentes inducciones y tiempos de exposición de un campo electromagnético de 60 Hz en el cultivo de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuai amarillo, a través de variables morfológicas y anatómicas.
2. Determinar la influencia de un campo electromagnético de 60 Hz en el proceso de fotosíntesis, a través variables fisiológicas y moleculares; y la actividad de enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa) relacionadas con el estrés

abiótico, en las fases de germinación, crecimiento *in vitro* y aclimatización de plántulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuai amarillo.

3. Determinar el efecto a largo plazo de un campo electromagnético de 60 Hz sobre variables morfológicas y fisiológicas en plántulas de *Coffea arabica* L. cv. Catuai amarillo.

NOVEDAD CIENTÍFICA

El desarrollo de esta investigación contribuye al conocimiento del funcionamiento de los sistemas vegetales bajo la influencia de un campo electromagnético de 60 Hz, y los cambios que se producen en procesos bioquímicos y moleculares relacionados con la fotosíntesis. En el cultivo a partir de embriones cigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo bajo el efecto de un campo electromagnético de 60 Hz, se obtienen plántulas con características morfológicas y fisiológicas superiores a las logradas sin este procedimiento. Por primera vez, se determina el efecto a largo plazo de un campo electromagnético de 60 Hz de 2 mT de inducción y 3 minutos de exposición en plántulas de café del cultivar Catuai amarillo, así como la expresión génica diferencial del gen RBCS1 bajo la acción de este campo.

VALOR PRÁCTICO:

Esta investigación permite con el uso de un campo electromagnético de 60 Hz, la obtención de plántulas de café de mayor calidad a partir de embriones cigóticos. Posibilitará a partir de los resultados del modelo experimental estudiado, la aplicación de este método a otros sistemas productivos como la embriogénesis somática y la propagación a través de micro-esquejes de café, tecnologías encaminadas a micropropagar materiales de café élites de forma acelerada y en cantidades suficientes para completar las áreas cafetaleras.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1- Generalidades del cafeto y características de *Coffea arabica* L.

El cafeto es un arbusto siempre verde originario de Etiopía y es sin dudas hoy, uno de los vegetales más conocidos en el mundo. Para el café, Arabia y las zonas cercanas permanecieron como las únicas fuentes de abastecimiento hasta 1658 cuando los holandeses introdujeron la especie *Coffea arabica* en Ceilán y casi 40 años después en Java (Díaz, 1999).

Desde el punto de vista taxonómico, el café arábigo (*Coffea arabica* L.; syn.: *C. vulgaris* Moench, *C. laurijolia* Salisb.), del que actualmente se conocen unas 30 especies, se ubica en el Reino Plantae, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Rubiales, Familia Rubiaceae (Fernández *et al.*, 1988).

Los estudios anatómicos muestran que la planta presenta hojas opuestas, ovaladas, acuminadas de pecíolo corto, bordes ondulados y superficie de color verde intenso y lustroso; ligeramente abarquilladas, de longitud entre 10 - 15 cm de largo y entre 6 - 10 cm de ancho (Arcila *et al.*, 2007).

El tallo es casi recto, cilíndrico y leñoso, ramificado, de 3 - 8 m de altura y con frecuencia multicaule. Posee ramas opuestas, largas, flexibles, muy delgadas, de aspecto semirecto cuando son jóvenes. En la etapa adulta, las ramas se ensanchan y se presentan ligeramente caídas con respecto al tallo. (Arega, 2006). En este arbusto la raíz es de tipo pivotante, robusta y en general corta (0,30 - 0,50 m). En suelos profundos puede alcanzar hasta 1 m de longitud. De la raíz principal emergen raíces secundarias que se hunden en sentido vertical y horizontal, en dependencia de la profundidad y permeabilidad del suelo. Estas raíces secundarias poseen función hídrica y se introducen en el suelo hasta 5 m, a partir de las cuales se desarrollan ramificaciones terciarias (Arcila *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2013).

La planta de cafeto presenta flores blancas de perfume ajazminado, agrupadas por un pedúnculo corto en la región axilar del par de hojas, constituyendo verticilos de 8 - 15 flores. La corola se compone de cinco pétalos adheridos, generalmente más largos que el cáliz. Tiene de 4 - 7 estambres. El estigma es bifurcado y el ovario es ínfero, globular y bicarpelar. El ovario da una fruta esférica, carnosa, de matiz rojo si está madura, constituida por un exocarpio coloreado, un mesocarpio carnoso y blanco amarillento, generalmente jugoso y de sabor dulce y dos semillas unidas por sus caras planas (Fernández, 1988).

La semilla es de color gris amarillento o gris. Está formada por un albumen córneo, de superficie lisa cuya cara está hendida siguiendo el eje mayor por un surco más o menos rectilíneo. El embrión es corto y está situado en la base, comprende una radícula y dos cotiledones cortiforme. Cada grano está protegido por dos envolturas, la primera es el endocarpio, la cual es delgada y de textura esclerosa; la segunda es el perispermo, una membrana muy fina (película plateada, más o menos adherida al grano) (Fernández, 1988; Arcila *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista agronómico, para el cultivo del cafeto se requieren temperaturas diarias de 18 – 22°C con máximas de hasta 30°C; necesita además de 1 200 - 2 200 mm de lluvia anualmente y un pH de 5 - 6 en el suelo (Martínez-González *et al.*, 2007).

El café, se obtiene como bebida a partir de la cereza o grano maduro, que luego de un proceso tecnológico de torrefacción, los granos tostados y molidos pasan por un proceso de ebullición. Es una de las bebidas más importantes en el mundo, rivaliza sólo con el té, la cocoa y el mate. Presenta como componente activo la cafeína. Además posee lípidos, azúcares, aminoácidos, vitamina B y minerales entre los que se encuentran: potasio, magnesio, calcio, sodio y hierro (Trindade *et al.*, 2009). Sus semillas contienen hasta el 2,5% de alcaloides que poseen cualidades

tónicas y su acción consiste en producir la excitación del sistema nervioso central, con aumento de la actividad cardíaca y la capacidad laboral (Patarroyo, 2006).

Por la importancia económica en Cuba, el cultivo del café se desarrolló tradicionalmente en el macizo montañoso de la Sierra Maestra y Sagua-Nipe-Baracoa, en la región Oriental. En las montañas del Escambray, en la región Central y en Pinar del Río, en la región Occidental. Actualmente por las nuevas estrategias del desarrollo cafetalero, su cultivo se extiende a otras provincias del país, como Holguín, Las Tunas, Camagüey, Ciego de Ávila, Villa Clara, Cienfuegos, Santi-Spíritus, y Artemisa, lo que hace necesario impulsar la producción de posturas de alta calidad.

La especie *Coffea arabica* es la más cultivada en nuestro país, entre los 350 - 750 m sobre el nivel del mar. Se desarrollan fundamentalmente las variedades Bourbon, Caturra (amarillo y rojo), Typica, Villalobos y Catuai (amarillo y rojo). De esta última el cultivar Catuai amarillo, se considera de gran importancia por presentar porte bajo, lo que facilita las labores de recolección. Posee además alta productividad y por su plasticidad fenotípica, se cultiva también como café especial (Díaz *et al.*, 2013).

El cafeto es tetraploide ($2n=44$), autocompatible (autógamo) y puede reproducirse fielmente por semillas. Por estas razones, los principios de su mejoramiento se basan en la autogamia que llevaron a la creación de cultivares relativamente homogéneos (Caturra y Mundo novo). Sin embargo, como es recalcitrante y posee una base genética tan estrecha, expone a estos cultivares al peligro de diferentes plagas como la roya, la broca y factores abióticos como el estrés hídrico, salino, incremento de la temperatura, entre otros (Arega, 2006; Marraccini *et al.*, 2011). Por ello es necesario el uso de métodos que permitan el cultivo de esta especie durante todo el año y el mejoramiento de la calidad de las plantas obtenidas con tolerancia al ataque de plagas.

2.2- El cultivo de embriones cigóticos aplicados al café.

El cultivo *in vitro* es una herramienta importante para la preservación del germoplasma. Estos métodos permiten mantener el germoplasma en espacios reducidos, transportarlo fácilmente y garantizar un alto grado de limpieza desde el punto de vista fitosanitario (González *et al.*, 2007).

El caso específico del cultivo de embriones cigóticos es efectivo en el rescate de embriones abortivos que se derivan a partir de la hibridación interespecífica o intergenérica y en el rescate de material de propagación con semillas de baja viabilidad. Así como también para acortar la latencia de semillas, que en algunos casos se debe a inhibidores del desarrollo del embrión presentes en el endospermo o en la cubierta de las semillas (Litz, 1991).

El cultivo de embriones consiste en aislar los embriones obtenidos a partir de un proceso natural de fecundación, separándolos de la semilla y se cultivan en un medio de cultivo estéril que contenga los nutrientes esenciales que les permita germinar. El embrión, se cultiva fácilmente bajo condiciones asépticas y se mantiene genéticamente estable (Marques *et al.*, 2001). En un sentido estricto, el material no se multiplica clonalmente, aunque si se multiplica el germoplasma que de otra manera se perdería, de aquí que se justifique incluir esta estrategia en la multiplicación de ejemplares valiosos (Kessel, 2008).

Para la extracción del embrión, sólo se necesita la desinfección de la superficie externa de la semilla, por el hecho de que el embrión se aloja en la región estéril de la misma. De este modo, el índice de contaminación *in vitro* es mucho más bajo en relación con las demás técnicas de cultivo (Marques *et al.*, 2001).

Numerosos trabajos sugieren que el éxito en el cultivo de embriones de café se asocia a diversos factores, como el tamaño del explante, la luz, la temperatura, el pH y la composición del medio de cultivo (Sondhal y Lauritis, 1992). El medio de cultivo que se utiliza para la

propagación de embriones, se adapta para cada especie y el que se utiliza frecuentemente es el de Murashige-Skoog (1962) (George, 1993).

En el caso específico del cafeto, el cultivo de tejidos representa una herramienta útil para la propagación del material vegetal, ya que las semillas de café tienen la desventaja de perder su viabilidad con el tiempo. El medio de cultivo más utilizado para esta especie es el de Murashige-Skoog (1962), con la adición en el medio de cultivo de L-cisteína y caseína hidrolizada, que evita la oxidación del tejido por la presencia de fenoles (De la Cruz *et al.*, 1992).

De la Cruz *et al.*, (1992) propusieron una nueva técnica para la extracción de embriones cigóticos de cafeto que facilita el proceso de micropropagación. La misma se basa en una primera desinfección de las semillas con formaldehído al 1,6% y posteriormente éstas se mantienen en agitación en solución de ácido bórico al 5%, lo que garantiza la desinfección superficial de las semillas.

Martínez *et al.*, (1999a), establecieron una metodología para la micropropagación de cafetos que incluyó el cultivo de embriones cigóticos, la embriogénesis somática y el cultivo de estacas o multiplicación asexual por microestacas. También se ha estudiado la influencia de metabolitos bacterianos en el desarrollo de embriones y en diferentes etapas del proceso de micropropagación de cafeto (González *et al.*, 2011).

Diversos estudios muestran el uso de la técnica de cultivo de embriones de cafeto en diferentes procesos biotecnológicos. Se utilizó para evaluar el efecto de análogos de brasinoesteroides (Isaac, 2002) y el efecto de reguladores osmóticos (González *et al.*, 2007). Los primeros haploides de cafeto fueron obtenidos por la vía de cultivo de embriones en *C. canephora*, y aunque estas plantas mostraron una fertilidad reducida y un bajo vigor, sirvieron para la construcción del primer mapeo genético en café (Herrera y Camayo, 2008).

También se logró criopreservar eficientemente (con nitrógeno líquido) embriones cigóticos de *C. arabica* y *C. canephora*. Castilla (2012) obtuvo una metodología para la crioconservación de *C. libérica*, *C. arabica* cv. Catimor a partir de embriones cigóticos. Por otro lado, con la encapsulación en una solución de 6% de alginato de sodio de embriones cigóticos de *C. arabica*, se produjeron semillas artificiales, con una supervivencia y regeneración entre 20 - 30% (Muniswamy y Sreenath, 2000).

De igual forma, con la aplicación del cultivo de embriones es posible recuperar más del 75% de la capacidad de germinación de semillas conservadas por más de un año y obtener ejemplares de alta calidad (González *et al.*, 2007).

Es importante señalar que el éxito de la obtención de plántulas a partir de embriones cigóticos depende en gran medida del proceso de aclimatización. Durante esta fase, se debe tener en cuenta diferentes factores entre los que se encuentran el sustrato, el pH, la humedad relativa, la temperatura y el requerimiento de luz (Estrada-Luna, 2001).

En el caso de la humedad relativa, que durante el cultivo *in vitro* es muy alta, se requiere de un cambio gradual descendente durante la adaptación por el pobre control de la transpiración que poseen las plantas obtenidas *in vitro*, de lo contrario éstas se marchitan y pueden morir por estrés. Las plántulas *in vitro*, en general se desarrollan a temperaturas entre los 20°C y 27°C. En el caso específico del cafeto entre los 29-30°C, por lo que es importante manejar estos rangos durante la adaptación de las plantas. Temperaturas más bajas, más altas y/o fluctuaciones muy drásticas pueden dar como resultado un crecimiento muy irregular de las mismas (González *et al.*, 2007).

Una vez trasplantadas, las plántulas obtenidas *in vitro* muestran mayor desarrollo y mejores porcentajes de supervivencia, si al inicio de la aclimatización se mantienen intensidades

lumínicas bajas y un fotoperiodo similar al del laboratorio durante todo el período de cultivo. La mezcla de sustrato a utilizar en el trasplante influye en el porcentaje de supervivencia y en el posterior desarrollo de las plantas (Estrada-Luna *et al.*, 2001).

En el caso del cafeto, los sustratos que se utilizan son suelos areno - arcillosos, con buen drenaje y aireación, para que las raíces puedan desarrollarse eficientemente. El contenido de materia orgánica debe ser aproximadamente de 3% y el pH óptimo debe estar entre 5,5 y 6,5 (Fernández, 1988). González *et al.* (2006) utilizaron durante la fase de aclimatización de plántulas del cultivar Robusta suelo ferralítico rojo y materia orgánica en una relación 3:1 (v:v) y se lograron una supervivencia superior al 75%. Con respecto al riego, inicialmente se realiza varias veces al día con el fin de mantener a las plantas en un ambiente de alta humedad relativa, similar a la que se exponen cuando se cultivan en condiciones *in vitro* (González *et al.*, 2007).

Algunos autores plantean que el trasplante al vivero, puede hacerse cuando las raíces son visibles y están entre los 0,5 y 1,0 cm de longitud. Su permanencia en esta etapa puede ser de seis a ocho semanas, según la respuesta particular de las plantas (Roca y Mogrinski, 1991).

Martínez (1999a) logró la optimización de sistemas de regeneración de plantas con las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas en café. Estos sistemas de regeneración constituyeron una acción importante para la micropropagación de genotipos superiores que se obtuvieron en programas de mejoramiento convencionales y para la aplicación de procedimientos de transformación genética. Sin embargo, es aún una interrogante, el crecimiento lento de las plántulas de cafeto durante los primeros meses, por las condiciones de estrés al que se ven sometidas las mismas durante las diferentes fases del cultivo. Por lo que se hace necesario estudiar este aspecto para, con un manejo adecuado de las plántulas, lograr el éxito en el momento de su inserción al campo.

2.3-La fotosíntesis en el desarrollo de plantas obtenidas *in vitro*.

La fotosíntesis ocurre sólo en las partes verdes del vegetal. Es el proceso mediante el cual el anhídrido carbónico (CO₂) del aire se transforma en materia orgánica, en presencia de la energía luminosa. El producto final principal de la fotosíntesis lo constituyen los azúcares hexacarbonados o hexosas, cuyas moléculas pueden a su vez combinarse para formar derivados de mayor complejidad como el almidón (Taiz y Zeiger, 2006).

Para cualquier especie vegetal, las plantas cultivadas en medio de cultivo semisólido son producidas en un ambiente aséptico, que se caracteriza por una baja intensidad luminosa (flujo de fotones fotosintéticos), elevada humedad relativa y acumulación de etileno en la atmósfera del frasco. Estas plantas carecen de CO₂ en más de la mitad del periodo de luz y la fotosíntesis neta es baja, debido a que la concentración de CO₂ en los frascos decrece drásticamente después de 1 ó 2 horas del fotoperiodo, en condiciones foto-autotróficas (Zobayed *et al.*, 2001; Pospisilová *et al.*, 2007).

Respecto a la influencia de los niveles de iluminación, Fahl *et al.* (1994), estudiaron el efecto de distintos niveles de irradiación en el crecimiento y la fotosíntesis de plantas jóvenes de *C. arabica*. Sobre la base de sus resultados concluyeron que el café se clasifica como una especie facultativa de sombra con atributos de aclimatación al sol. Por lo que el manejo de la iluminación es un factor muy importante a tener en cuenta durante el cultivo *in vitro* y la fase de aclimatización de plántulas de café. Mosquera (1995) determinó la fotosíntesis neta de plantas jóvenes de Catuai, Caturra y de las progenies UFV-1603 y UFV-1359 de Catimor. Los máximos fotosintéticos se obtuvieron cuando la temperatura foliar estuvo entre los 28 y 30°C, y cuando la temperatura foliar fue superior a 30°C alcanzando hasta 33°C, la fotosíntesis neta fue mínima, obteniéndose valores negativos de intercambio de CO₂.

Particularmente el proceso de fotosíntesis implica una liberación -o absorción- de gas, lo que produce cambios de presión dentro del volumen restringido. Este efecto de variación de presión se conoce como efecto bórico y ocurre en hojas vivas en frecuencias de modulación bajas (decenas de Hertz), cuando hay una fase gaseosa adyacente con la célula fotosintetizante y se debe principalmente a la producción de oxígeno (Cardona *et al.*, 2008).

Los efectos fototérmicos forman una clase muy general de fenómenos físicos en los cuales la energía luminosa, al ser absorbida por un material, se transforma en calor, por un proceso de desexcitación no radiativo (Cardona *et al.*, 2008). El diseño básico de un experimento fototérmico consiste en una fuente de radiación cuyo haz luminoso se hace incidir sobre la muestra en estudio, que genera en su interior una respuesta térmica, la cual, al ser detectada es transformada en una señal eléctrica. Esta posteriormente se amplifica y se captura para llevar a cabo un posterior análisis de la información obtenida. Varios estudios permitieron concluir que la señal fotoacústica refleja la ocurrencia de otros efectos además de los térmicos, relacionados con el contenido de humedad asociado al metabolismo (Campos *et al.*, 2008; Cardona *et al.*, 2008).

Aviara *et al.*, (2008) evaluaron por técnicas fotoacústicas la difusividad térmica en semillas de *Pisum sativum*, *Glicine max*, *Lycopersicum sculentum*, y observaron que esta actividad aumentó con el incremento de los contenidos de humedad, que conllevó a un incremento de la actividad enzimática. El uso de la técnica fotoacústica para estudiar las plantas, permite observar el efecto térmico común en los sólidos, además de un efecto adicional como consecuencia de las reacciones químicas, parte de la energía es almacenada para participar en reacciones fotosintéticas (Cardona *et al.*, 2008). Estos resultados denotan por su novedad la importancia de estudiar estos procesos.

2.3.1 El aparato fotosintético y la fotoregulación

Varias etapas de la fotosíntesis tales como la absorción de luz, las reacciones fotoquímicas, el transporte de electrones y la síntesis de adenosin trifosfato (ATP), tienen lugar en las membranas tilacoidales. Consecuentemente, las características de estas membranas del cloroplasto, así como su composición, influyen de manera fundamental en el desarrollo de la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2006).

Entre las proteínas que se localizan en las membranas tilacoidales se destacan los complejos proteicos que participan en el transporte electrónico fotosintético (fotosistema I, fotosistema II, citocromo *b6f* y ATP sintasa) así como proteínas perisféricas (flavoproteínas). Cada fotosistema posee un centro de reacción y un complejo antena, este último se encarga de absorber y transferir la energía de excitación procedente de la luz (Collados, 2006). El fotosistema I (FS I) se localiza casi exclusivamente en las membranas estromales cuyo centro de reacción (CR) tiene un par especial de clorofila *a* (Cl *a*) que absorbe hacia 700 nm, y el fotosistema II (FS II), se localiza mayoritariamente en las lamelas granales, cuyo CR tiene un par especial de Cl *a* que absorbe hacia 670 nm (Taiz y Zeiger, 2006).

El FS II en dependencia de su funcionalidad se puede dividir en distintas subunidades: la antena extrínseca LHC II (Centro Recolector de Luz II), las antenas internas, CR y las proteínas extrínsecas asociadas al FS II que estabilizan el sistema de la fotólisis del agua (Nield y Barber, 2006; Taiz y Zeiger, 2006).

La antena LHC II une aproximadamente la mitad de la clorofila presente en los cloroplastos, y es el mayor colector de luz de la naturaleza. Tiene además un papel importante en el ensamblaje del FS II y en el apilamiento de las membranas tilacoidales, que regula también la distribución de la energía de excitación entre el FS I y el FS II (Bassi, 1990). La LHC II es una familia de proteínas

de gran homología, con una masa molecular entre 25 y 27 kDa que difieren en sus potenciales de fosforilación (Peter y Thornber, 1991). Su localización en el FS II es diferente: las de menor masa molecular (~25 kDa) se encuentran en la periferia del FS II, mientras que las de mayor masa molecular (~27 kDa) se encuentran fuertemente unidas a la unidad central del FS II (Nield y Barber, 2006).

En su forma desfosforilada la proteína LHC II interacciona específicamente en el FS II (estado 2 de transferencia de energía). La feofitina transfiere electrones a los aceptores plastoquinonas A y B (Q_A y Q_B), y el complejo de citocromo *b6f* transfiere electrones a la plastocianina, una proteína soluble, la cual interacciona con el FS I (estado 1 de transferencia de energía) transfiriendo la energía de excitación. Mediante las transiciones de estado de energía, se evita el daño oxidativo que se induce por exceso de absorción de energía luminosa en el FS II. Este fenómeno se conoce con el nombre de transiciones de estado y constituye probablemente el primer mecanismo de foto-aclimatización de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006, Azcón- Bieto y Talón, 2008).

Por lo anteriormente descrito, se plantea que las reacciones fotosintéticas que se desarrollan en los cloroplastos son extremadamente sensibles al estrés. Éstos por lo tanto, desempeñan un papel esencial como sensores de los cambios en el ambiente de crecimiento de las plantas, a través de señales que se relacionan con el transporte fotosintético de electrones, cambios en el estado redox de los cloroplastos, la acumulación de especies reactivas del oxígeno y señales que regulan la expresión de genes asociados a la fotosíntesis (Fernández *et al.*, 2008).

Azcón-Bieto y Talón (2008) plantearon que con el fin de evitar o minimizar la fotoinhibición, las plantas desarrollan varias estrategias. Éstas se basan en cambios en la distribución de la antena del FS II entre los dos fotosistemas (transiciones de estado), en la disipación del exceso de

energía captado en forma de calor y, principalmente, en la reparación del FS II reemplazando sus proteínas dañadas.

Algunos autores comprobaron que una radiación excesiva, produce una saturación lumínica que altera el funcionamiento de los fotosistemas transportadores de la energía que se requiere para la fotosíntesis en plantas adultas de café (Marraccini *et al.* 2011).

Durante el desarrollo de la fotosíntesis en las plantas se establece una relación importante entre la expresión de los genes que codifican el complejo del LHC II y los genes de la subunidad menor S que codifican la ribulosa bifosfato carboxilasa (RBCS) (Sullivan y Gray, 1999). En las plantas C3 que se caracterizan por sólo la carboxilación del CO₂ a través del ciclo de Calvin, la enzima fundamental que regula la fotosíntesis es la Rubisco (ribulosa-1,5-bifosfato carboxylasa/oxygenasa, EC 4.1.1.39), responsable de la fijación del CO₂ y la foto-respiración (Feller *et al.*, 2008).

Esta enzima se localiza en el estroma del cloroplasto y constituye entre el 30 - 60% del total de las proteínas solubles en las plantas. La Rubisco es además, un gran reservorio de nitrógeno en las hojas de las plantas que se moviliza rápidamente bajo condiciones de estrés y durante la senescencia (Feller *et al.*, 2008). En las plantas superiores, la Rubisco está compuesta por una subunidad mayor (RBCL) y una subunidad menor (RBCS), codificadas por un gen único del cloroplasto RBCL y la pequeña familia multigénica RBCS respectivamente (Gutteridge y Gatenby, 1995). A nivel molecular, se comprobó que el déficit hídrico suprime la expresión de muchos genes fotosintéticos, incluso los genes RBCS que codifican para la subunidad menor de la Rubisco (Rizhsky *et al.*, 2003; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2009).

Si la inactivación de la Rubisco contribuye a la limitación no estomática de la fotosíntesis bajo estrés (Lawlor *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2004), existen resultados que demuestran una reducción

de los niveles de Rubisco en plantas de arroz en condiciones de estrés salino (Parry *et al.*, 2002; Ali y Komatsu, 2006). De hecho, el potencial de la actividad de la esta enzima se determina por la cantidad de proteína, la cual a su vez se determina por la velocidad relativa de síntesis y degradación de esta propia enzima. En este sentido, estos procesos se regulan por la expresión génica, la estabilidad de ácido ribonucleico mensajero (RNAm), síntesis de polipéptidos, modificación pos-transcripcional, ensamblaje de las subunidades dentro de la actividad de la Rubisco y varios factores que actúan sobre la degradación de la proteína (Parry *et al.*, 2008). En las plantas superiores, los genes RBCS son muy similares unos con otros, y sólo se diferencian en pocos aminoácidos que codifican la proteína RBCS, por lo que es posible que estas diferencias puedan variar la actividad y regulación de la Rubisco (Rizhsky *et al.*, 2004).

La fotoregulación de la expresión génica se enfoca en los genes nucleares que codifican mensajes para las proteínas de los cloroplastos, por lo que se debe prestar especial atención durante el estudio de diferentes factores ambientales que a este nivel molecular pudieran afectar la actividad fotosintética durante el crecimiento y desarrollo de cualquier especie vegetal.

2.4- Campo electromagnético aplicados a sistemas vegetales.

Desde principios de la década de los 80 comenzaron a publicarse trabajos científicos que demuestran que los sistemas vivos (células y organismos) son sensibles a campos magnéticos (Polk y Postow, 2006). Sin embargo, frente a la aplicación de estos tratamientos existen respuestas que repercuten negativamente y otras que provocan un efecto benéfico. Sobre los mismos, Nilsen y Orcutt (1996) señalaron que algunos factores pueden inducir ambos efectos simultáneamente.

Algunos autores definen el estrés como *‘cualquier factor ambiental biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico (por ejemplo, crecimiento o fotosíntesis) por debajo*

de la tasa máxima que podría alcanzar' (Lambers *et al.*, 1998). Según esta definición, la mayoría de las plantas se someten a algún tipo de estrés, ya que es improbable la ausencia de algún factor limitante.

Estos mismos autores definen tres escalas temporales en la respuesta de las plantas al estrés:

- Respuesta al estrés: es el efecto inmediato, en general de carácter perjudicial. Se produce en una escala de segundos a días;
- Aclimatación: es el ajuste morfológico y fisiológico realizado por la planta (como individuo) para compensar el mal funcionamiento de la misma luego de la exposición al estrés. Ocurre en una escala de días a semanas;
- Adaptación: es la respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones, conduciendo a una compensación morfológica y fisiológica. Ocurre en una escala temporal mucho mayor que la aclimatación, generalmente involucra a muchas generaciones.

Es importante destacar que aunque el estrés y las respuestas que se vinculan con el mismo puedan estar presentes, no siempre esto implica la existencia de daño, aún cuando la planta esté sujeta a períodos largos o incluso a estrés continuo. Existen varias clasificaciones de los factores de estrés. En general, estos se clasifican en físicos, químicos y bióticos, los dos primeros agrupados bajo el término de 'estreses abióticos'. Tambussi (2000) definió que entre los factores físicos se consideran el estrés por déficit o exceso de agua, altas-bajas temperaturas y radiación ultravioleta (UV). Sin embargo se deben considerar los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja como otro tipo de estrés abiótico al que se someten los vegetales. Por tanto merece especial atención su estudio, si se tiene en cuenta el desarrollo tecnológico que existe en

la actualidad y el efecto que ejercen sobre el crecimiento y desarrollo de los vegetales (Kula *et al.*, 2002; Del Rel *et al.*, 2005; Polk y Postow, 2006).

Actualmente se conoce que la aplicación de los campos electromagnéticos de frecuencias extremadamente bajas, tiene efectos positivos sobre varios procesos biológicos y por tanto influyen en las características de las plantas tales como: la germinación de la semilla, el desarrollo de los brotes, la longitud de la planta, la masa fresca, la producción de fruto por planta y la masa promedio del fruto (Aladjadjyan, 2002; Esitken, 2003; Rochalska y Orzeszko-Rywka, 2005; De Souza *et al.*, 2006; Nimmi y Madhu 2009; Cakmak *et al.*, 2010). Los efectos de los campos electromagnéticos de baja frecuencia en el crecimiento vegetal pueden ser diferentes y dependen de las frecuencias electromagnéticas, las formas de ondas, las intensidades del campo electromagnético o la especie biológica en cuestión. Por ejemplo, varios estudios exploran la influencia en las plantas de la exposición a campos magnéticos sinusoidales de 50 - 60 Hz: *Actinidia deliciosa* (kiwi) (Dattilo *et al.*, 2005), semillas de *Phaseolus lunatus* L. (frijol) (Hsin-Hsiung y Show-Ran, 2008); diferentes tiempos de exposición: semillas de *Pisum sativum* L. (chícharo) (Podleśny *et al.*, 2005) y diferentes inducciones magnéticas: *Triticum aestivum* L. (trigo) (Carbonell *et al.*, 2000), *Zea mays* (maíz) (Florez *et al.*, 2007), *Cicer arietinum* L. (garbanzo) (Vashisth y Nagarajan, 2008), con variaciones en el crecimiento de la planta, pigmentos clorofílicos y la actividad de las enzimas que se asocian a la eliminación de especies reactivas del oxígeno.

Estas características físicas del campo electromagnético (frecuencia, tipo de onda e intensidad del campo), son las que determinan los mecanismos primarios de acción biológica y mediante la variación de éstas, se puede regular la efectividad de la acción de los campos electromagnéticos. Éstos actúan sobre las reacciones bioquímicas con más de un par de electrones desapareados, que

tienen lugar en mecanismos moleculares diferentes y en distintos componentes celulares (Atak *et al.*, 2007).

Según Polk y Postow (2006) se explicó la acción del campo electromagnético sobre los organismos mediante dos mecanismos fundamentales, el primero relacionado con el desarrollo de procesos físico - químicos que se asocian con la absorción e interacción de la energía del campo con los tejidos, y el segundo con la influencia de los campos electromagnéticos en el equilibrio y velocidad de las reacciones que se producen en los procesos bioquímicos. Sin embargo, hasta la fecha, para los tejidos vegetales estos mecanismos no están definidos, aunque se ha logrado describir los efectos biológicos que se producen y se agrupan de la siguiente forma:

a) Modificación de la permeabilidad de las membranas y del flujo iónico a través de las mismas.

Algunos autores plantearon un mecanismo que se basa en el efecto Hall, mediante el cual los campos electromagnéticos estáticos y pulsantes de frecuencia extremadamente baja (50 - 60 Hz), pueden modificar el flujo catiónico a través de las membranas biológicas y alterar el metabolismo celular. Éste se basa en la premisa de que el flujo iónico transmembrana, se regula 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 que se afecta (Reina *et al.*, 2001; Galland y Pazur, 2005; Podleśny *et al.*, 2005).

Galland y Pazur (2005) observaron una fuerte influencia del tiempo de exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia en la movilidad electroforética y el contenido de adenosin trifosfato (ATP). Los cambios que se observaron en el contenido de este nucleótido en las células expuestas se consideraron como resultado de modificaciones en los procesos glicolíticos que

pueden reflejar a su vez, la alteración en la actividad de un amplio rango de enzimas. Estos cambios se asocian al mantenimiento estructural de la membrana.

Existen numerosas hipótesis para explicar, desde el punto de vista físico los cambios celulares por la exposición de los organismos biológicos a los campos electromagnéticos. Sin embargo, una de ellas considera la resonancia de un ciclotrón y la resonancia paramagnética, lo que supone, que el principal efecto de los campos electromagnéticos se debe probablemente a las alteraciones de las membranas asociadas al flujo del ión calcio (Gallan y Pazur, 2005).

b) Efectos en los procesos enzimáticos y de acoplamiento:

La mayoría de las metaloenzimas que participan en las reacciones redox tienen un ión metálico paramagnético tales como: Fe^{2+} , Ni^{2+} o Co^{2+} en el centro de actividad catalítica, por lo que las enzimas que participan en las reacciones redox donde hay transferencia de electrones son los blancos de acción de los campos electromagnéticos (Polk y Postow, 2006).

Uno de los principales efectos moleculares de los campos electromagnéticos es su influencia en espines nucleares de moléculas paramagnéticas (Sahebjamel *et al.*, 2007). Este mecanismo juega un importante papel cuando en el curso de una reacción el producto químico se rompe y dos moléculas con electrones no apareados forman un par de radicales. Es entonces que, en dependencia de la orientación de su espín, puede llevarse a cabo la recombinación de radicales o difusión y formación de radicales libres (Li y Cow, 2001; Kula *et al.*, 2002).

El par de radicales libres se afectaría por un intervalo de tiempo continuo y prolongado de exposición a los campos electromagnéticos (Zmys'lonny *et al.*, 2000). Por lo que un cambio en el centro catalítico puede afectar la capacidad de intercambiar electrones, lo cual a su vez modificará las reacciones dependientes y los productos finales de las mismas (Zmys'lonny *et al.*, 2000; Kula *et al.*, 2002).

Un posible vínculo entre campos electromagnéticos y sus efectos sobre los organismos vivos es el hecho de que algunas hipótesis señalan que los primeros son mayores de los 100 mT provocan estrés oxidativo, es decir, aumento de la actividad, la concentración y la duración de los radicales libres (Kula *et al.*, 2002). Una molécula aislada de un solo electrón sin aparear puede adoptar dos orientaciones (estado de singlete y estado de triplete del par radical) en relación con un campo electromagnético externo. La interconversión del estado singlete a triplete, se produce por la interacción entre el spin del electrón y el campo electromagnético externo, que se conoce como interacción Zeeman (Timmel y Henbest, 2004).

Otros autores (Eichwald y Walleczek, 1996), usaron un modelo experimental para estudiar los efectos de los campos electromagnéticos sobre la recombinación del par radical en la cinética enzimática, y según estudios realizados por Grissom en 1995, establecieron que a bajas densidades de flujo magnético, la producción de triplete disminuye por la reducción de la interacción. También mostraron que la ocurrencia de los efectos significativos de los campos electromagnéticos depende de la relación específica de las constantes de velocidad química y señalan que el efecto del campo electromagnético se determina por la relación entre el tiempo de vida del par radical y la tasa del intersistema cruzado sensible al campo electromagnético.

Los efectos positivos de los campos electromagnéticos también se observaron en la biosíntesis de proteínas, producción celular, actividad fotoquímica, tasas de respiración, actividad enzimática y contenido de ácidos nucleicos (Stange *et al.*, 2002; Sahebjamel *et al.*, 2007).

Como resultado de la exposición al campo electromagnético de baja frecuencia se describen alteraciones bioquímicas, efectos que parecen ser reversibles, pero no existe un patrón característico de respuesta bien definido. Tampoco se conoce si estos cambios son resultados directos o indirectos de la exposición a estas condiciones (Sahebjamel *et al.*, 2007). Por tales

razones, se hace necesario profundizar en los mecanismos y efectos que se producen a nivel bioquímico y molecular en los sistemas vegetales bajo la acción de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja.

2.4.1 Campos electromagnéticos en el cultivo *in vitro*

La aplicación de campos electromagnéticos en plantas *in vitro* fue descrita por Lucchessini *et al.* (1992), en plantas de *Prunus cerasifera* Ehrh. provenientes de la etapa de multiplicación *in vitro*. Estas plántulas se colocaron en frascos de vidrio entre dos bobinas que generaban un campo electromagnético y encontraron que las plantas incrementaron significativamente el porcentaje de enraizamiento, el número de brotes y raíces, así como de la altura total en comparación con las que no recibieron el tratamiento electromagnético.

Ružič *et al.* (1992) observaron que campos electromagnéticos débiles pueden estimular el crecimiento de *Castanea sativa* Mill cultivada *in vitro*. Estos autores colocaron para su crecimiento yemas de castaño en medio de cultivo Heller (1975) modificado, con 0,1 mg de 6-BAP y sometieron las yemas a un campo electromagnético homogéneo sinusoidal de 50 Hz e intensidades de 1,2 mT; 3,2 mT y 5,9 mT, una hora diaria durante seis días a la semana por 28 semanas. Estos autores observaron que las yemas tratadas se estimularon y crecieron significativamente. Es probable que los campos electromagnéticos estén acoplados sinérgicamente con las alteraciones del metabolismo endógeno y/o con el transporte de fitohormonas, por tanto el campo pudiera afectar el crecimiento de yemas en una manera variable en el tiempo.

A partir de los estudios antes mencionados, se comprobó que existe un "efecto de ventana", que influye en la capacidad del campo electromagnético para estimular el crecimiento y proliferación de los cultivos vegetales *in vitro*.

De igual forma, Ferrer (2000) determinó el efecto de campos electromagnéticos en la multiplicación de ápices meristemáticos de café (*Coffea arabica* L) cv. Caturra rojo. El efecto del campo electromagnético provocó un aumento en el coeficiente de multiplicación de las plantas *in vitro* al existir un incremento en el número de propágulos y de brotes. Fung *et al.* (2002) realizaron experimentos con campos electromagnéticos de ondas sinusoidal y trapezoidal en embriones cigóticos de *C. arábica* L. cv. Caturra rojo y demostraron la acción de los campos electromagnéticos para ambas ondas en la micropropagación de embriones y se comprobó el efecto estimulante específicamente en la absorción de minerales y el incremento del contenido de pigmentos fotosintéticos.

En la actualidad, las posibles bases biológicas de los efectos de los campos electromagnéticos para el caso de las plantas, que provoca resultados positivos desde el punto de vista fisiológico y que en ocasiones induce o no estrés oxidativo en ellas, es una interrogante sobre el metabolismo vegetal. De ahí la necesidad, de dar continuidad a diferentes estudios que contribuyan a explicar los efectos que producen los campos electromagnéticos de frecuencias extremadamente baja en las plantas en sentido general, y en particular en la expresión génica diferencial de genes asociados al estrés abiótico, en plántulas de café obtenidas *in vitro* bajo la acción de este fenómeno físico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.0- Procedimientos generales

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), de la Universidad de Oriente, Cuba; en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba; y en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Universidad Federal de Lavras, Brasil.

Para la realización de los experimentos se utilizaron semillas de la especie *Coffea arabica* L. cv. Catuai amarillo en buen estado fitosanitario, las cuales se certificaron por el departamento de semillas de la Delegación Provincial de la Agricultura en Santiago de Cuba.

Los tratamientos electromagnéticos se realizaron con un magnetizador BioNaK-03, estimulador electromagnético que se utiliza para cultivos *in vitro* (Domínguez *et al.*, 1999, Patente No. 22602/1999). Este dispositivo consiste en dos bobinas de 56 cm de diámetro con 363 vueltas de alambre de cobre de 1,1 mm. Las bobinas se colocaron verticalmente y se conectaron a un voltaje de 110 volts, lo que generó un campo electromagnético en el interior de las bobinas. La intensidad del campo magnético fue horizontal variable, que cambió de los extremos al centro. El dispositivo funcionó bajo las siguientes condiciones: onda trapezoidal, conexión de bobinas en paralelo y frecuencia de 60 Hz. La inducción electromagnética fue medida en Teslas (T) a 22°C, con un gaussímetro digital de marca Magnet-Physics, modelo FH 54. Los resultados obtenidos de la caracterización del equipo se graficaron con el Software Matlab R2007 (Anexo 1). El grupo control se sometió solamente al campo geomagnético que se midió y fue de 61 μ T. Las muestras se colocaron en un recipiente dieléctrico (tubos de ensayos) dentro del magnetizador en los puntos que correspondieron a las inducciones magnéticas para cada tratamiento, según la caracterización que se realizó.

El diseño experimental que se utilizó se describe en cada experimento. Las tablas y figuras en el acápite de Resultados y Discusión incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso. Para el tratamiento estadístico se empleó el utilitario Statgraphics Plus 5.1 para Windows. Se usaron pruebas paramétricas (ANOVA, t-Student, Tukey, $p \leq 0,05$) después de chequear el ajuste de los datos a la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) y la homogeneidad de varianzas (Levene, $p \leq 0,05$).

3.1-Efecto de un campo electromagnético de 60 Hz a diferentes niveles de inducción y tiempo de exposición en la germinación de embriones cigóticos de Coffea arabica cv. Catuai amarillo.

Con el objetivo de determinar el efecto de diferentes niveles de inducción y tiempos de exposición de un campo electromagnético de 60 Hz primeramente se procedió a la desinfección superficial de las semillas con solución de formaldehído (1,6%) durante 30 min. Luego se realizaron tres lavados con agua estéril en la cabina de flujo laminar. Posteriormente, se inició la imbibición de las semillas en solución de ácido bórico (0,5%) en zaranda marca MARCONI (120 rpm.) durante 72 horas. Al finalizar este periodo, con ayuda de pinzas se separaron las semillas por su eje central rectilíneo; seguidamente con una espátula fina se extrajo el embrión y se colocó en el medio de cultivo.

La siembra de los embriones se realizó en cámara de flujo laminar horizontal. El instrumental que se utilizó se esterilizó previamente en autoclave (ICEM Modelo ASH-269) a $1,2 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 121°C durante 15 min. Para la inoculación de los embriones en el medio de cultivo el instrumental se sumergió en etanol 90% (v:v) y se flameó con mechero de gas licuado.

El desarrollo de la fase de germinación de los embriones cigóticos se realizó en medio de cultivo que contenía sales MS (Murashige-Skoog, 1962), al que se le adicionó $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa, $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar (Agar nutriente UNI-CHEM[®]), $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de L-cisteína, $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de caseína

hidrolizada y se ajustó el pH a 5,6 previo a la esterilización por vapor en autoclave (ICEM Modelo ASh-269) a 121°C y 1,2 kg·cm⁻². Se utilizaron tubos de ensayos de 25x150 mm, que contenían 10 mL de medio de cultivo cada uno. Se colocó un embrión por tubo de ensayo para un total de 500 embriones por tratamiento, con el objetivo de garantizar la consecutividad de los experimentos.

Los embriones se mantuvieron durante seis semanas bajo luz blanca fluorescente, con un flujo de fotones fotosintéticos de 54 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (según la tabla de conversión descrita por George (1993)), con el empleo de lámparas Daylight durante 24 horas, temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa del $70 \pm 5\%$. A los siete días de establecimiento de los embriones de cafeto en medio de cultivo se realizó una exposición a un campo electromagnético de frecuencia de 60 Hz, (Tabla 1). Los tratamientos se evaluaron al finalizar las seis semanas.

Tabla 1. Tratamientos establecidos para la aplicación de un campo electromagnético de 60 Hz.

Tratamientos	Inducción magnética x Tiempo exposición
Control	0
2	2 mT x 3 min
3	2 mT x 9 min
4	4 mT x 3 min
5	4 mT x 9 min
6	6 mT x 3 min
7	6 mT x 9 min

Para la evaluación del efecto del campo electromagnético de 60 Hz en los embriones para cada tratamiento se creó para tales efectos, una escala de rango: 1- no responde; 2- germinación

incompleta (crecimiento de la radícula o de las hojas cotiledonares); 3- germinación completa (crecimiento de radícula y hojas cotiledonares).

Las variables que se evaluaron fueron la longitud del hipocótilo (cm), la longitud de la radícula (cm) y el número de pares de hojas en las plántulas con germinación completa. Se realizaron tres repeticiones y se evaluaron 20 embriones por tratamientos. Estos datos fueron procesados con un Análisis de Varianza de Clasificación Doble con un testigo de referencia y un Test de Comparación Múltiple de Media para datos paramétricos (Tukey).

3.1.1- Caracterización de embriones cigóticos de café sometidos a la acción de un campo electromagnético por microscopía fotoacústica y espectroscopía infrarrojo.

Para la realización de estos ensayos se tomaron diez embriones maduros extraídos de semillas de café (*C. arabica* cv Catuai amarillo), que recibieron el mejor tratamiento del acápite 3.1 y un grupo control. Éstos se desinfectaron como se describió en el acápite anterior.

Los estudios de microscopía fotoacústica se realizaron en una celda fotoacústica cerrada y como sensor un micrófono de electritro, montados en una fase *xy* motorizada, con una resolución espacial de 70 μ y controlada automáticamente por un microprocesador. La fuente de excitación consistió en una fibra láser de diodo a una longitud de onda de 650 nm, con una frecuencia de 1 Hz acoplado a un amplificador *lock-in* SR830 (ALK), según la metodología descrita por Domínguez - Pacheco *et al.* (2010). Se utilizó un objetivo de microscopio para incidir el rayo láser en la superficie del embrión. La señal de la celda fotoacústica se registró como una función de la posición del embrión, con el fin de obtener una imagen que se procesó por el software LabView.

Se realizó la caracterización de los componentes de los embriones de *C. arabica* cv Catuai amarillo bajo el efecto de un campo electromagnético de 60 Hz mediante espectroscopía

infrarroja (IR). Se utilizó un equipo con transformada de Fourier (Bruker Vector 33). La capacidad de medida del instrumento está comprendida entre 500 - 4 000 nm, con un intervalo de medida de 5 nm. Una muestra de 0,1 mg de embriones se trituró con igual cantidad de bromuro de potasio. La mezcla se comprimió en una prensa de troquel mecánica para formar la pastilla translúcida a la que se le determinaron los espectros con la técnica de Reflectividad Total Atenuada en el rango de 400 - 4 000 cm^{-1} . Los resultados se analizaron con el software OMNIC para Windows 09.

3.2- Efecto de niveles de inducción y tiempo de exposición a un campo electromagnético de 60 Hz durante el crecimiento in vitro y aclimatización de plántulas de café.

Con el propósito de evaluar el efecto de un campo electromagnético de 60 Hz en variables morfológicas, anatómicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares en el crecimiento de las plántulas de café *in vitro*. Se utilizaron plántulas provenientes de los embriones germinados del experimento 3.1 con 0,5 cm de longitud y desarrollo del par de hojas cotiledonares.

A los siete días del cultivo en medio de crecimiento, las plántulas se sometieron a los tratamientos de los que procedían según los descritos en la tabla 1 del acápite 3.1.

Para el desarrollo de esta fase, se empleó el medio de cultivo MS, con idénticas características al de la etapa de germinación. Se le adicionó 0,5 μmol de ácido 3-indolacético (AIA), 5 μmol de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 0,05 μmol de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y se ajustó el pH a 5,8. Las plántulas se mantuvieron durante ocho semanas, a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 1\%$ y bajo luz blanca fluorescente con fotoperiodo de 16 horas y $54 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos con el empleo de lámparas Daylight.

Se utilizaron 20 tubos de ensayos para cada variante establecida con tres repeticiones. Al finalizar las ocho semanas, se evaluó la longitud del tallo (cm), la longitud de la raíz principal

(cm) y el número de pares de hojas. Se realizó un Diseño Completamente Aleatorizado con una ANOVA de Clasificación Doble, con un testigo de referencia y un Test de Comparación Múltiple de Medias (Tukey).

Para iniciar la fase de aclimatización se estableció un grupo control de plantas que no recibieron tratamiento electromagnético y un grupo que recibió la inducción y el tiempo del mejor tratamiento del acápite 3.2 (fase de crecimiento) en el momento inicial de la aclimatización. Las plántulas tratadas recibieron el tratamiento electromagnético por tercera ocasión.

Se usaron plántulas que promediaron 4 cm de longitud y dos pares de hojas, provenientes de las mejores condiciones de la fase de crecimiento, las cuales se extrajeron de los tubos de ensayos y se lavaron con abundante agua para eliminarles el medio de cultivo y agar de las raicillas. Luego se trasladaron al área de adaptación y fueron plantadas en bandejas de poliuretano de 70 pocillos (4,5 x 4,5 x 3,5 cm cada uno).

Las condiciones ambientales de la casa de adaptación fueron controladas. Se mantuvo la humedad relativa entre 60 - 80% y la temperatura entre 27 - 31°C. La iluminación se reguló empleando un zarán negro que permitió el paso del 30% de la luz natural ($420 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, medidos a las 12.00 horas), fotoperíodo de luz y oscuridad correspondientes a los ciclos naturales del día y la noche. Se utilizó un sustrato compuesto por una mezcla de suelo y materia orgánica (4,3% de humus de lombriz), en una proporción de 3:1 (v:v), con las siguientes características: $49,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P_2O_5 ; $55,20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de K_2O ; $12,09 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de MgO ; conductividad eléctrica de $3 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ y pH de 6,4. Se realizó además un análisis nematológico al sustrato en el Centro Provincial de Sanidad Vegetal y no se detectó la presencia de este patógeno.

El riego, que garantizó la humedad relativa antes mencionada, se realizó con una frecuencia de tres veces al día con el empleo un sistema Microjet aéreo durante 3 min las dos primeras semanas. Al finalizar este periodo se regó diariamente pero dos veces al día. El agua de riego presentó una dureza cálcica de $66 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; dureza magnésica de $28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; dureza total de $94 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; conductividad eléctrica de $0,25 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ y pH 7,5. En esta fase se evaluaron el porcentaje de supervivencia, la longitud del tallo (cm), la longitud de la raíz (cm) y el número de pares de hojas. Se emplearon 20 plántulas por tratamiento y tres repeticiones con un Diseño Completamente Aleatorizado y t- Student para la comparación de las medias.

3.2.1- Caracterización de la anatomía foliar de plántulas de cafeto obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz.

El estudio anatómico de las hojas de plántulas de cafeto que se obtuvieron bajo el efecto del tratamiento magnético, se realizó a través de microscopía electrónica de barrido según metodología de Alves (2012). Se tomaron muestras del segundo par de hojas de 10 plántulas, del control y del mejor tratamiento del acápite 3.2, tanto para la fase de crecimiento como en la fase de aclimatización.

Las hojas se fijaron durante 24 horas a 20°C en solución *Karnovsky* modificada que contenía 2,5% de glutaraldehído; 2% de formaldehído; $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cacolidato de sodio pH 7,2 y $0,0001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCl_2 . Las muestras fijadas en esta solución se cortaron con bisturí en nitrógeno líquido y se colocaron en tubos *Eppendorf*. Se les adicionó una solución fijadora de 0,1 % de tetraóxido de osmio por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió al lavado de las muestras con soluciones de concentración creciente de acetona (25, 50, 75, 90 y 100%), con diez minutos en cada una de las soluciones. En la solución de 100%, la muestra se colocó tres veces por igual espacio de tiempo.

Las muestras en acetona (100%), se sometieron a secado en punto crítico para lo cual se colocaron en una cámara cerrada herméticamente y refrigerada entre 5 - 6°C. Posteriormente se procedió a la entrada de CO₂ y la muestra quedó sumergida durante 10 min. Luego se extrajo el CO₂ y esta operación se repitió de 5 - 6 veces hasta que la muestra no presentó restos de acetona. Al finalizar, las muestras se colocaron en porta muestras de aluminio para realizar el baño de oro y seguidamente se realizaron las imágenes de microscopía electrónica de barrido a través del microscopio electrónico LEO Evo 40.

Una vez obtenidas las imágenes, en cortes longitudinales de la superficie inferior o abaxial se caracterizó la densidad estomática, el área estomática y el área de la apertura estomática, para un total de 20 mediciones por tratamientos. Se empleó el programa UTHSCSA Imagen Tool para Windows, versión 3.00.

3.2.2- Determinación de la fotosíntesis neta, transpiración y concentración de pigmentos fotosintéticos de las plántulas de café obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz.

Las evaluaciones de la fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y la transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) se realizaron al finalizar las fases de crecimiento y aclimatización a las plántulas que provienen del mejor tratamiento del acápite 3.2.

Se escogieron hojas completamente expandidas de plántulas provenientes de cada uno de los tratamientos, las que se colocaron en la cubeta con un punto de saturación de $600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos. Las tasas máxima de fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) se determinaron 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 todo el área de la cubeta (2,5 cm²). Las condiciones del equipo fueron: 375 μmol·mol⁻¹ de concentración de dióxido de carbono y 80% humedad del aire dentro de la cámara bajo luz controlada a 400 μmol·m⁻²·s⁻¹. Las mediciones se realizaron a las seis horas después que se inició el fotoperiodo.

Las variables se determinaron en cinco plantas, con diez repeticiones cada una, para un total de 50 valores para cada tratamiento.

Con los valores obtenidos de fotosíntesis neta y transpiración se determinó el uso eficiente del agua en la fotosíntesis (WUE_{ph}) (Azcón-Bieto y Talón, 2008) a través de la fórmula:

$$WUE_{ph} = \frac{\text{absorción neta CO}_2 (\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})}{\text{tasa transpiratoria H}_2\text{O} (\text{mm m}^{-2}\text{s}^{-1})}$$

El diseño utilizado fue Completamente Aleatorizado. Se realizó un t-Student que permitió comparar las medias par a par. En todos los casos se empleó paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1 para Windows.

Para la determinación de la concentración de las clorofilas *a* y las clorofilas *b*, en las fases de crecimiento y aclimatización, 25 mg de masa fresca se obtuvieron del segundo par de hojas en ambos tratamientos. El extracto se obtuvo con el uso de etanol al 70%. Para el cálculo de las concentraciones de las clorofilas *a* y *b*, se siguió la metodología modificada de Meyer-Berthenrath's (Ursache *et al.*, 2009). La absorbancia de los extractos se midió a 663 nm y 645 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer, mod. Lambda 25).

$$chl\ a = \frac{12,3E(663)-0,86E(645)}{1000\ dw} \cdot v \quad (2)$$

$$chl\ b = \frac{19,3\ E(645)-3,6E(663)}{1000\ dw} \cdot v \quad (3)$$

Donde:

- chl *a/b*, contenido de clorofila *a* y *b* (mg·g⁻¹ de masa fresca);

- E (l), longitud de onda; d, tamaño de la celda (1 cm);
- v, volumen del extracto en 70% de etanol (mL); w, masa fresca del tejido (g)

Se emplearon 20 plántulas por tratamiento, con tres repeticiones. Se siguió un Diseño Completamente Aleatorizado y un t-Student para la comparación de las medias par a par.

3.2.3-Determinación del efecto del campo electromagnético sobre las proteínas de membranas de cloroplastos aislados en hojas de plántulas de Coffea arabica cv. Catuai amarillo.

Para la obtención de los cloroplastos y las vesículas tilacoidales del FS II, se siguió el protocolo establecido por Peter y Thornber (1991). Se utilizaron 100 mg del segundo par hojas de las plántulas de cafeto obtenidas de los mejores tratamientos en las fases de crecimiento y aclimatización.

Las hojas se homogeneizaron en 150 mL de solución 1, que contenía 50 mM de tampón KOH-tripsina, pH 7,8; 300 mmol·L⁻¹ de sorbitol; 25 mmol·L⁻¹ de NaCl y 5 mmol·L⁻¹ de MgCl₂. Seguidamente, la suspensión se filtró con gasa y se procedió a su centrifugación durante 15 min a 3 000 x g a 4°C (Centrífuga *Heraus* MEGAFUGE 16R).

Se colectó el precipitado y se resuspendió en 3 mL de solución 2 que contenía 40 m mmol·L⁻¹ de tampón KOH-tripsina pH 7,8; 500 mmol·L⁻¹ de sorbitol y 50 mM de NaCl y se centrifugó nuevamente durante 15 min a 3 500 x g a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 mL de solución 3 compuesta por 20 mmol·L⁻¹ de tampón KOH-tripsina, pH 7,8; 250 mmol·L⁻¹ de sorbitol; 25 mmol·L⁻¹ de NaCl y 5 mmol·L⁻¹ de MgCl₂ y nuevamente se colectó el precipitado que contenía los cloroplastos aislados.

Para obtener las membranas tilacoidales, al precipitado se le añadió 0,2% de digitonina (m:v) y se colocó en agitación en zaranda (MARCONI MA 140 CFT), durante 30 min en la oscuridad a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 x g durante 30 min, seguido de una segunda

centrifugación de 50 000 x g durante 50 min. Se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 129 000 g durante 60 min. Se colectó suavemente el precipitado que se resuspendió en 1 mL de solución 1 y se almacenó a -80 °C.

A los extractos obtenidos se les determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (1976). Se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro UV-Vis (LKB-Pharmacia) y el contenido de proteínas se expresó en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$, referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino. Se realizaron tres determinaciones en cada caso. Se utilizaron 20 plántulas por tratamiento, con tres repeticiones. Se siguió un Diseño Completamente Aleatorizado y t- Student para la comparación de las medias par a par.

La electroforesis para determinar la masa molar aparente de las proteínas presentes en el precipitado se desarrolló en condiciones desnaturizante en geles de poliacrilamida (12,5%) con duodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se aplicaron 10 μg de patrones de masa molar conocida y 10 μg de las proteínas obtenidas de los cloroplastos. Para la determinación de los masas molares se empleó como marcador Proteínas BenchMarkTM, de 15 proteínas de masa molar desde 10 - 200 kDa, en las que se que se destacan las de 20 kDa y 50 kDa.

Los patrones y las muestras se disolvieron en un tampón que contenía Tris (0,0625 mol·L⁻¹), SDS (2%, m:v), β -mercaptoetanol (5%, v:v), glicerol (10%, v:v) y bromofenol azul (0,006%, m:v), se ajustó el pH a 6,8 con HCl (1 mol·L⁻¹). Luego se desnaturalizaron con calor (por ebullición) durante 3 min. Las electroforesis se desarrollaron en un equipo vertical, *Mini-Protean III Dual Slab Cell* (BIO-RAD). Se utilizó un voltaje eléctrico de 40 volt durante el paso de las proteínas por el gel concentrador. Luego se incrementó a 120 volt, cuatro horas a 4°C en la oscuridad, y se mantuvo constante durante la corrida por el gel separador. Posteriormente, los

geles se tiñeron con solución del colorante azul de *Coomasie Blue G-250* ($0,2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se lavaron con una solución de 25% de metanol y 7,5% de ácido acético.

3.2.4- Efecto de un campo electromagnético sobre la expresión del gen *RBCS1* en plántulas de *Coffea arabica* cv. *Catuai* amarillo.

El segundo par de hojas, en las primeras horas de la mañana (6:00 a.m-8:00 a.m), se cortaron e inmediatamente se conservaron a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de la extracción. Las mismas se colocaron en morteros y se maceraron con nitrógeno líquido. Para la extracción del ARN con el método *ConcertTM Plant RNA-Reagent (Invitrogen)*, 100 mg de la muestra se colocaron en *Eppendorf* y se le adicionó 600 μL de reactivo *Concert* ARN vegetal, y se homogeneizó en *vortex*. Luego se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se clarificó por centrifugación durante 7 min a $23\ 889 \times g$ a 4°C . Se colectaron 500 μL del sobrenadante y se adicionó 0,1 mL de NaCl y 0,3 mL de cloroformo. Se mezcló la muestra en *vortex* durante un minuto. Posteriormente se centrifugó a $23\ 889 \text{ g}$ a 4°C durante 10 min para separar las fases, y nuevamente se obtuvo el sobrenadante y se repitió el procedimiento antes descrito.

Se colectaron 450 μL del sobrenadante y se le adicionó 400 μL de alcohol isopropílico. Se mezcló en *vortex* y se colocó a -20°C durante una hora. Al finalizar este período la muestra se centrifugó nuevamente a $23\ 889 \times g$ a 4°C durante 25 min. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el precipitado, al que se le adicionó 600 μL de etanol (75%).

Luego se centrifugó a $23\ 889 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se colocaron los tubos *Eppendorf* a secar a temperatura ambiente para eliminar el residuo del etanol en las muestras. Una vez concluido este proceso se adicionaron 20 μL de agua libre de ARNasa para disolver el ARN y se procedió a la cuantificación de este por medio del

espectrofotómetro *NanoDrop*TM 1000. Los ARN se almacenaron a -80°C, para su posterior análisis electroforético a 110 volt durante 30 min.

En todos los casos la corrida electroforética se desarrolló con 2 µL de la muestra, con un ajuste de concentración a 700 ng·µL⁻¹, al que se le adicionaron 6 µL de agua libre de ARNasa y 2 µL de azul de bromoleno como colorante, para 10 µL en total en cada pocillo del gel de agarosa al 1%. Para la preparación del gel se utilizaron 0,7 g de agarosa y se le adicionaron 70 mL de TAE 1x (Tris-ácido acético-EDTA) y 2 µL de *gelRed*.

Con el objetivo de eliminar cualquier contaminación por ADN previo a la obtención del ADNc, las muestras de ARN se trataron de acuerdo al protocolo *DNA Free (Invitrogen)*. Se preparó un tampón mix (2,5 µL de 10x tampón ADNasa y 0,5 µL ADNasa I). Se tomaron 22 µL de mezcla de ARN más agua, al que se le adicionó 3 µL de tampón mix; se golpeó el tubo suavemente para lograr la mezcla y se incubó durante 30 min a 37°C, en baño de María. Posteriormente, se adicionaron 2,5 µL de inactivación de ADNasa y se mezcló suavemente. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. Al finalizar este período las muestras se centrifugaron a 10 000 x g durante 2 min, y se transfirieron 18 µL del sobrenadante a tubos nuevos. El resultado del ARN tratado se verificó en iguales condiciones a las empleadas en la determinación anterior.

Para la obtención del ADNc se utilizó el kit *High Capacity DNAc (Invitrogen)*, que contenía 10 x RT tampón, 100 mmol·L⁻¹ 25 x dNTP Mix; 10 x RT *Random primers*; *MultiScribe*TM Transcriptasa Reversa y agua libre de nucleasa. Se añadieron 10 µL de muestra de ARN tratado a 10 µL de solución *master mix* y se colocaron en el termociclador (*Multigen Labenet International*) con la siguiente secuencia: 25°C, 10 min; 37°C, 120 min; 85°C, 5 min y 4°C por tiempo ilimitado.

-Determinación de la expresión del gen RBCS1 en Tiempo Real (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se desarrolló con el kit *GoTag Hot Start Polymerase (Invitrogen)* que consistió en: 5 x tampón *Green*; 25 mmol·L⁻¹ de MgCl₂; 10 μmol·L⁻¹ de DNTPs; 10 μL de cebador *F*; 10 μL de cebador *R*; 9,7 μL de agua; 0,3 μL *Go Tag* y 1 μL ADNc. El par de cebadores utilizados para la PCR fueron el 18244 (Tabla 2), para amplificar las secuencias de ADNc del gen RBCS de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo. El termociclador (*Multigene Labenet InteARNtional*) se ajustó a las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C, 2 min; seguido de 38 ciclos de 95°C, 30 s, temperatura de alineamiento de 55°C durante 3 s y 72°C por 3 min; y la extensión se realizó a 72°C durante 10 min. La calidad de cada aplicación fue verificada por corridas electroforéticas en gel de agarosa de 1%, como se describió anteriormente y se utilizó en la corrida electroforética un voltaje de 110 volt durante 30 min. Se verificó la PCR y se cuantificó la expresión génica. Las cadenas simples de ADNc se diluyeron (1:5 - 1:625) y se comprobaron con los cebadores T18244 (Tabla 2) para la determinación de la curva patrón, eficiencia de los cebadores y mejor dilución de las muestras.

Tabla 2. Cebadores utilizados para los experimentos de PCR.

Gen	Nombre del primer	Secuencia	(pb)
RBCS-ADN	18244-F	5'GAGAATGGCATCCTCAATGATCTC 3'	660
	18244-R	5'CAGCCCCAGTTCTCAATTTTATTG 3'	648
RBCS-T	T18244-F	5' CTAGCATGGTTGCACCCTTCA 3'	77
	T18244-R	5' AGTAATGTGCGACGGACTTCTTGGA 3'	77
UBIQUITINA	UBQR-F	5'GAGAATGGCATCCTCAATGATCTC 3'	104
	UBQR-R	5'GGCAGGACCTTGGCTGACTAT A 3'	104

La cuantificación relativa (*qPCR*) se desarrolló con 2,5 μL de ADNc diluido; *SYBr Green*[®] *qPCR* mix (Qiagen) 12,5 μL; cebador *F* 2,5 μL; cebador *R* 1,5 μL y 5,5 μL de H₂O miliQ en el

termociclador *Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen)*. La reacción se incubó durante 2 min a 50°C, seguido de un tiempo de inactivación de 5 min a 95°C, con 40 ciclos de amplificación de 3 s a 95°C y 10 s a 60°C de alineamiento y elongación, respectivamente.

Para la determinación de la eficiencia de cada cebador en cada dilución de la muestra se realizó por triplicado. Se consideró el dato de la fluorescencia capturada durante la fase exponencial de amplificación de cada reacción siguiendo la ecuación $e = 10^{-1/a} - 1$, donde e , es la eficiencia del cebador y a , es la pendiente de la regresión. Sólo se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia estuvo comprendida entre 90 - 100 según Ramakers *et al.* (2003).

La especificidad del PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización una vez finalizada la reacción (*curva de melting*). Los datos se analizaron por el programa *Rotor-Gene Series Pure Detection Software* (Versión 2.0.2), para determinar los valores del ciclo umbral (C_t) correspondientes a las medias de las tres réplicas utilizadas en cada dilución.

Para realizar el cálculo de la expresión del gen, cada muestra fue primeramente normalizada con el gen de referencia Ubiquitina (Tabla 2) (Marraccini *et al.*, 2011), por la ecuación:

$$\Delta C_t = C_t \text{ del gen objetivo} - C_t \text{ del gen de referencia.}$$

Posteriormente, la ecuación de la cuantificación relativa fue obtenida por la fórmula $\Delta\Delta C_t$, a partir de los valores de la ecuación anterior. Los niveles de expresión génica fueron analizados por medio del programa *Rotor-Gene Series Pure Detection Software* (Versión 2.0.2).

3.2.5- Determinación de la actividad enzimática asociada al estrés de plántulas de Coffea arabica cv. Catuai amarillo en las fases de crecimiento in vitro y aclimatización bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz.

El segundo par de hojas de las plantas del mejor tratamiento del acápite 3.2 y del control en las fases de crecimiento y aclimatización se utilizaron para la realización de estos ensayos. Las

muestras se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido, según el protocolo de Shwanz y Polle (2001). Se maceraron 200 mg del tejido vegetal y se adicionaron 1 500 μL de buffer de extracción que contenía 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 (pH 7,8), 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico y 50% de polivinil-polipirrolidona insoluble. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -80°C, para determinar la actividad de la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), la L- ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1).

La actividad de la superóxido dismutasa se determinó según el protocolo de Dhindsa *et al.* (1981). Para iniciar la reacción se adicionó a 50 μL del extracto de la muestra 1 500 μL de tampón que contenía 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de riboflavina; 14 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-metionina; 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de *nitro-bluetetrazolium* (NBT); 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido etilendiamintetracético (EDTA); 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ tampón fosfato (pH 7,8) a completar 2 mL con H_2O . Para el desarrollo de la reacción los tubos de ensayos se incubaron a 10 $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de flujo de fotones fotosintéticos durante 7 min y seguidamente se colocaron en la oscuridad para detener la reacción. Las lecturas se obtuvieron a 560 nm y para cada variante se realizaron tres réplicas cada una con tres repeticiones. La actividad SOD específica se calculó como la relación entre la actividad enzimática SOD y la concentración de proteínas obtenida para cada tratamiento. Se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Se realizaron tres determinaciones por extracto.

La actividad de la catalasa se determinó según Azevedo *et al.* (1998), iniciándose la reacción con 100 μL del extracto al que se le añadió 1 900 μL de 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tampón fosfato (pH 7,0) y 12,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2O_2 . Se realizaron las lecturas a 240 nm. La actividad fue determinada monitoreando la degradación del H_2O_2 cada un minuto durante 180 min. La actividad CAT específica se calculó como la relación entre la actividad enzimática CAT y la concentración de

proteínas obtenida para cada tratamiento. Se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Se realizaron tres determinaciones por extracto.

Los ensayos de la actividad de la ascorbato peroxidasa se realizaron de acuerdo con el método de Nakano y Asada (1981). A 100 μL de extracto se le añadió 1 500 μL de reacción que contenía 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de buffer fosfato (pH 7,0); 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_2O_2 y 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico. Las mediciones se realizaron a 290 nm a una temperatura de 30°C. La actividad APX específica se calculó como la relación entre la actividad enzimática APX y la concentración de proteínas obtenida para cada tratamiento. Se expresó en $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Se realizaron tres determinaciones por extracto.

Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford (1976) como se describió en el acápite 3.2.3 y todas las mediciones se realizaron utilizando espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DV640B). El contenido de proteínas se expresó en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$, referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino. Se realizaron tres determinaciones en cada caso.

Se siguió un Diseño Completamente Aleatorizado, con un t-Student para la comparación de las medias. Se realizaron en 10 plántulas con tres repeticiones por tratamientos.

*3.3-Efecto a largo plazo de la exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia en el crecimiento y desarrollo de plántulas de **Coffea arabica** cv. Catuai amarillo*

El siguiente experimento tuvo como objetivo determinar el efecto del campo electromagnético sobre variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en las plántulas de cafeto provenientes de los mejores tratamientos de las fases de germinación, crecimiento y aclimatización, después de cuatro meses de crecimiento.

Para ello, se escogieron un grupo de plantas control y otro grupo que recibió el tratamiento electromagnético en el momento inicial de la aclimatización, como se describió en el acápite 3.2.

Luego de transcurrir seis semanas en esta fase, se trasplantaron a macetas plásticas de (11 x 10 x 8 cm) que contenían un sustrato con idénticas características al utilizado en la fase de aclimatización. Permanecieron en estas condiciones durante 16 semanas.

Durante este periodo, con el uso de un sistema de Microjet aéreo se regó dos veces al día durante 3 min y las condiciones ambientales se mantuvieron idénticas a las descritas en la fase de aclimatización.

Al concluir las 16 semanas, se determinaron la longitud del tallo, longitud de la raíz, número de pares de hojas, concentración de pigmentos fotosintéticos, fotosíntesis neta, transpiración y actividad específica de enzimas asociadas al estrés, según los protocolos anteriormente descritos.

Se evaluaron 20 plantas por grupo experimental con tres repeticiones. Se empleó un Diseño Completamente Aleatorizado y t-Student para la comparación de las medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de un campo electromagnético de 60 Hz a diferentes niveles de inducción y tiempo de exposición en la germinación de embriones cigóticos de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo.

Los resultados obtenidos al evaluar diferentes niveles de inducción y tiempos de exposición a un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) de embriones de café durante la fase de germinación *in vitro*, se muestran en la tabla 3

Tabla 3: Influencia de la inducción electromagnética y tiempo de exposición de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) durante la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L cv. Catuai amarillo.

Tratamiento		Germinación Completa	Germinación Incompleta	No Responde
Inducción electromagnética	Tiempo de exposición	(crecimiento de radícula y hojas cotiledonares)	(crecimiento de la radícula o de las hojas cotiledonares)	
0	0	5 ^{bc}	13 ^a	2 ^{ns}
2 mT	3 min	14 ^a	6 ^c	0 ^{ns}
2 mT	9 min	13 ^a	7 ^c	0 ^{ns}
4 mT	3 min	8 ^b	12 ^b	0 ^{ns}
4 mT	9 min	7 ^b	10 ^b	3 ^{ns}
6 mT	3 min	8 ^b	11 ^b	1 ^{ns}
6 mT	9 min	1 ^c	16 ^a	3 ^{ns}
EE		3,9	3,2	2,5

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas; n.s: diferencias no significativas (ANOVA bifactorial; Tukey; $p \leq 0,05$; $n=20$)

En el análisis bifactorial (inducción electromagnética y tiempo de exposición) hubo interacción entre los factores. Los resultados mostraron que existen diferencias significativas para la germinación completa de los embriones entre los embriones tratados y el control. El material vegetal que presentó mayores índices de germinación completa, es decir embriones que desarrollaron la radícula y las hojas cotiledonares, se obtuvieron para los que fueron tratados con una inducción electromagnética de 2 mT, independientemente del tiempo de exposición, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos y el control, por lo que en este

caso, el factor tiempo de exposición no estableció diferencias entre los tratamientos y si la variable inducción electromagnética.

Se observaron además, los menores valores para el tratamiento 6 mT de inducción electromagnética y 9 min de exposición con resultados inferiores con respecto al control y los demás tratamientos. En el caso de los embriones con germinación incompleta los mayores resultados se obtuvieron para este mismo tratamiento, sin diferencias significativas con respecto al control, pero sí con respecto a los demás tratamientos. Para los embriones que no respondieron no hubo diferencias significativas.

Este resultado pudiera estar relacionado con el denominado efecto ventana, descrito por algunos autores (Ubeda *et al.*, 1983). Este fenómeno se basa en el hecho de que para determinados tratamientos electromagnéticos con una misma inducción electromagnética y diferentes tiempos de exposición, la energía del sistema en cuestión es la misma y por tanto el efecto biológico resultante no difiere entre los tratamientos. Es importante tener en cuenta, además, que si el tiempo de exposición al campo electromagnético es mayor o igual que el tiempo de relajación del sistema, entonces se observarán efectos biológicos diferentes (Polk y Postow, 2006). Es por ello que este estudio para una inducción de 2 mT, pudiera considerarse que los tiempos de exposición utilizados son inferiores al tiempo de relajación del sistema biológico y por lo tanto el resultado para la misma inducción electromagnética y diferentes tiempos de exposición es similar.

Otro aspecto a tener en cuenta al analizar los resultados alcanzados es el mecanismo biofísico descrito por Liboff (1985). Este autor estableció la relación que existe entre la inducción electromagnética y el incremento de la movilidad de los iones a través de la membrana, específicamente el ión calcio.

El calcio (Ca^{2+}) actúa como segundo mensajero en el funcionamiento de algunas hormonas y en respuestas medio-ambientales. Está implicado además en la fosforilación de algunas proteínas, de manera que el Ca^{2+} puede desempeñar un papel importante en la actividad y regulación de algunas enzimas. Su unión reversible a la calmodulina le permite ejercer una importante función como modulador enzimático y desempeñar un papel fundamental en la emisión de señales celulares (Azcon-Bieto y Talón, 2008). A través de estas relaciones, se pudiera justificar los efectos del tratamiento electromagnético sobre la respuesta fisiológica observada en los embriones.

Algunos autores observaron que durante la exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia los canales y poros de las membranas celulares permanecen abiertos por más tiempo y se produce un incremento en la absorción de nutrientes incrementándose de esta forma el metabolismo celular (Yano *et al.*, 2004; Dattilo *et al.*, 2005; Del Rel *et al.*, 2006; Hsin-Hsiung *et al.*, 2008). De esta forma, la germinación completa que se produce en los embriones y el nivel de inducción electromagnética al que se someten los mismos se relacionan con el incremento de la permeabilidad de la membrana a los nutrientes presentes en el medio de cultivo en el que se encuentran los embriones en el momento de la germinación.

Este comportamiento permite corroborar que los efectos del campo magnético sobre los iones presentes en los medios biológicos inciden en la actividad de los mismos (García y Arza, 2001).

Durante el proceso de germinación, que se inicia por la toma de agua por las semillas y culmina cuando emerge la radícula, se producen alteraciones temporales en la permeabilidad diferencial de las membranas, con pérdidas pasivas de diferentes metabolitos de baja masa molar (azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos y péptidos) lo que indica la transformación de los componentes fosfolipídicos de la membrana celular. Se produce incremento de la síntesis de

ATP, de la actividad respiratoria y de un amplio rango de enzimas. Se aumenta la síntesis de ADN y con ello la síntesis proteica, así como una alta actividad mitótica (Azcón- Bieto y Talón, 2008).

Como se mencionó con anterioridad, los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja, influyen en los procesos de permeabilidad de las membranas y sobre la cinética de la actividad enzimática a nivel celular. También pueden incidir en una mayor degradación de sustancias orgánicas y en el aumento de la tasa de respiración (Rochalska y Orzeszko-Rywka, 2005), lo cual repercute en eficiente germinación de los embriones como sucedió en el tratamiento de 2 mT.

Las membranas plasmáticas no poseen estructuras adecuadas para actuar en la percepción de señales que se producen por el campo electromagnético, a diferencia de lo que sucede con el campo eléctrico, lo cual se ejemplifica con la presencia de los llamados canales voltaje-dependientes. El comportamiento se atribuye a las propiedades anisotrópicas de los fosfolípidos que conforman a la membrana. En un campo electromagnético, los fosfolípidos se reorientan, lo que provoca la deformación de los canales y de esta forma se modifica su conductividad (Galland y Pazur, 2005), lo que presumiblemente ocurrió en los embriones con germinación completa.

Durante el desarrollo del embrión, una reducción de los niveles de nitrógeno celular conlleva a una disminución de los niveles de proteínas y con ello se observa una disminución en el crecimiento del embrión (Teichert *et al.*, 2003). Probablemente los resultados que se obtuvieron para las inducciones 4 mT y 6 mT, se relacionen con la modificación en la conductividad de las membranas y la reducción de la disponibilidad de nutrientes.

Resultados del incremento del porcentaje de germinación para valores pequeños de tiempo de exposición, también se obtuvieron por Dziwulska-Hunek *et al.* (2009) y Sujak y Dziwulska-Hunek (2010) en semillas de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.), con el uso de un campo electromagnético de 50 Hz a 30 mT durante 30 segundos de exposición.

Los resultados del crecimiento de las plántulas bajo el efecto del tratamiento electromagnético de 60 Hz durante la etapa de germinación *in vitro*, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Influencia de la inducción electromagnética y el tiempo de exposición de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en la longitud del tallo, longitud de la raíz y número de pares de hojas de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo durante la fase de germinación *in vitro*.

Tratamiento		Longitud del hipocótilo (cm)	Longitud de la radícula (cm)	No. Pares de hojas cotiledonares (promedio)
Inducción electromagnética	Tiempo de exposición			
0	0	0,47 ^b	0,24 ^b	0,33 ^b
2 mT	3 min	1,57 ^a	1,27 ^a	1,73 ^a
2 mT	9 min	1,52 ^a	0,87 ^a	1,43 ^a
4 mT	3 min	0,58 ^b	0,32 ^b	0,40 ^b
4 mT	9 min	0,57 ^b	0,26 ^b	0,40 ^b
6 mT	3 min	0,57 ^b	0,16 ^b	0,40 ^b
6 mT	9 min	0,44 ^b	0,15 ^b	0,20 ^b
EE		0,47	0,38	0,58

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA bifactorial; Tukey; $p \leq 0,05$; $n=20$)

En el análisis bifactorial para estos resultados se observó interacción entre los factores en estudio. Se destaca que no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de exposición para una misma inducción electromagnética. Los mayores resultados de longitud del hipocótilo y radícula y número de pares de hojas cotiledonares se obtuvieron para el tratamiento de 2 mT de inducción y tres minutos de exposición, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos y el control. Para las inducciones de 4 mT y 6 mT no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las variables que se evaluaron.

Al respecto es de destacar que la dirección de la expansión celular está regulada por la orientación de microfibrillas de la celulosa en las paredes celulares. Este cambio a su vez está

controlado por la orientación de los microtúbulos corticales (Esau, 1995) y se plantea que un campo electromagnético variable en el tiempo induce cambios en la orientación celular y arquitectura de los tejidos (Binhi y Savin, 2002). Al parecer el campo electromagnético para 2 mT de inducción, tres minutos de exposición promueve la orientación transversa de los microtúbulos y por tanto se acelera la elongación celular y con ello el crecimiento de las plántulas en esta etapa de germinación.

La embriogénesis inicia el crecimiento y el desarrollo del vegetal y establece la organización de los meristemos que dan lugar a los órganos en las plantas adultas. Los meristemos entran en una etapa continua de división celular, con patrones específicos de expansión celular (Taiz y Zeiger, 2006).

Diferentes estudios demuestran el efecto que ejerce el campo electromagnético en el metabolismo de células meristemáticas, fundamentalmente su efecto en la fase G1 del ciclo celular; cambios en las reacciones metabólicas, sistemas de señalización celular, ciclo celular, síntesis y transcripción de proteínas provocan diferentes respuestas biológicas en el sistema vegetal (Paul *et al.*, 2006). De esta forma, un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción y tres minutos de exposición probablemente actúa en la actividad meristemática radicular y caulinar de los embriones en fase de germinación lo que provoca el crecimiento de los mismos, como se observó en los resultados.

De igual forma, el incremento del número de pares de hojas cotiledonares está asociado al crecimiento como resultado de las modificaciones morfológicas que se produce en los órganos.

En las hojas cotiledonares se acumulan una serie de sustancias de reserva (proteínas, lípidos, carbohidratos) que deberán ser movilizadas hasta los órganos de crecimiento activo a través de las rutas correspondientes, con una hidrólisis previa de las mismas, que se acompaña

fundamentalmente con una elevación de los niveles de Ca^{2+} (Azcón-Bieto y Talón, 2008). El campo electromagnético aplicado en los embriones influye en la movilidad de estos iones y acelera la movilización de las sustancias de reserva y por tanto se produce un mayor crecimiento en las plántulas.

Podleśny *et al.* (2005) y Pietruszewski (2007) informaron que los campos magnéticos estáticos y pulsantes de baja frecuencia (50-60 Hz) e inducciones de hasta 100 mT pueden modificar el flujo catiónico a través de las membranas biológicas y alterar el metabolismo celular. De esta forma, se desencadenan varios procesos fisiológicos que intervienen de forma positiva en la planta, por lo que su crecimiento se ve favorecido por la influencia de un campo electromagnético, lo que coincide con los resultados obtenidos.

Este resultado coincide además, con los mostrados por Fung *et al.* (2002) al estudiar el efecto de un campo electromagnético en el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *C. arabica* L. cv. Caturra rojo que obtuvieron la mayor estimulación en el crecimiento de los embriones para los tratamientos con un nivel de inducción de 2 mT y 9 min de exposición.

Similares resultados, que se relacionan con tiempos pequeños de exposición al campo electromagnético fueron los que lograron Casate *et al.* (1995) al estudiar el efecto del campo electromagnético en el crecimiento de plantas de piñas *in vitro*. Estos autores obtuvieron el mayor coeficiente de multiplicación para la inducción de 13 mT y tiempos de exposición de cinco y diez minutos.

No existe un modelo para establecer la relación óptima entre la inducción electromagnética y el tiempo de exposición. La respuesta varía en dependencia de la especie en cuestión. Por ejemplo, Martínez *et al.* (1999a) observaron que el tratamiento crónico de las semillas (tratamiento con imanes durante tiempos de exposición relativamente grandes) a 150 mT, proporcionaron efectos

estimulantes significativos en el vigor de las plántulas provenientes de semillas de *Oryza sativa* L. Phirke *et al.* (1996) encontraron que resulta necesario aplicar un tiempo de exposición de 25 minutos, para estimular la respuesta fisiológica de semillas de *Glicine max* (soya) tratadas a 100 mT. Amaya *et al.* (1996), requirieron valores de 250 mT en tratamientos crónicos, para lograr efectos estimulantes de 3% en la germinación y 15% en la longitud de las plántulas de lenteja (*Lens culinaris*); mientras que para el tomate (*L. sculentum*) se obtuvo un 8 y 5%, respectivamente. Aladjadjian y Ylieva (2003) observaron que el incremento de la germinación en el cultivo de *Nicotiana tabacum*, varía de forma lineal a un valor de 150 mT durante los primeros 30 minutos de exposición.

Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia para 2 mT de inducción durante 3 min de exposición ejercen un efecto estimulante en el proceso de germinación y garantizan el crecimiento de los órganos que darán lugar a la futura plántula, como se observó en los resultados obtenidos en el presente estudio en *C. arabica* cv. Catuai amarillo.

4.1.1 Caracterización de embriones de *Coffea arabica* cv Catuai sometidos a la acción de un campo electromagnético por microscopía fotoacústica y espectroscopía infrarrojo.

Los resultados de la caracterización de embriones cigóticos sometidos a un campo electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja a una inducción de 2 mT durante 3 min y embriones que no recibieron el tratamiento electromagnético, por medio de microscopía fotoacústica se observan en la figura 1.

La escala de colores obtenida de la imagen fotoacústica indicó que en los embriones que recibieron el tratamiento electromagnético se produjo un incremento del contenido de humedad entre el 50 - 75 % en la toda región cotiledonar. En esta misma variable en los embriones

control, se observaron sólo pequeñas áreas con un 37,5% de contenido de humedad en la región radicular, y de 25% en la región cotiledonar.

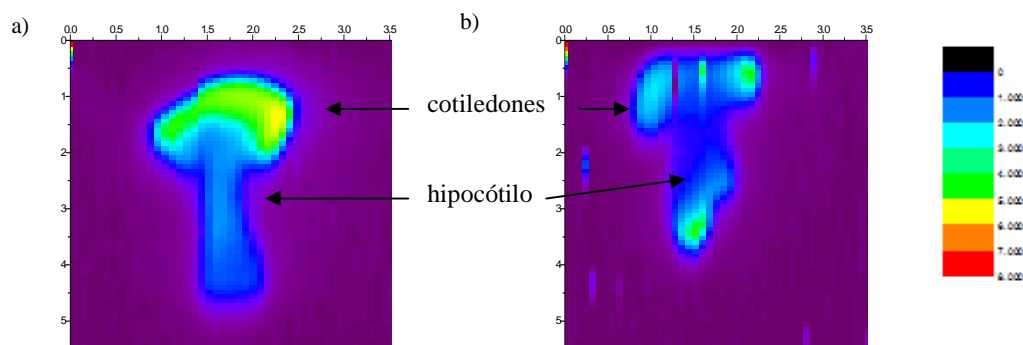


Figura 1. Imagen de microscopía fotoacústica de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L.cv Catuai amarillo (a) con tratamiento electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), 2 mT de inducción, tres minutos de exposición. (b) embriones sin tratamiento electromagnético. La escala de colores muestra del negro al rojo, el incremento del contenido de humedad en las semillas (%)(negro representa 0 contenido de humedad, rojo representa 100 % de contenido de humedad). Ejes X y Y: dimensión de la celda fotoacústica.

Los resultados alcanzados, pudieran estar relacionados con la influencia que ejerció el campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja, a una inducción de 2 mT durante 3 min de exposición, sobre el incremento en la permeabilidad de las membranas en los embriones de café tratados con respecto al control. Este incremento en la permeabilidad de las membranas, provoca una mayor entrada de agua y con ello la estimulación del proceso de germinación.

Como se planteó con anterioridad los campos electromagnéticos, influyen sobre la permeabilidad de las membranas y además en la cinética de la actividad de un amplio rango de enzimas (Reina *et al.*, 2001).

Durante la fase de imbibición (cuando la semilla sólo absorbe agua y no hay multiplicación celular) probablemente el campo electromagnético aumenta la absorción de agua por el embrión, lo que probablemente acelera su metabolismo Finalmente la hidratación de las semillas provoca

la hidrólisis de algunas fitohormas, iniciándose la acción hormonal que conduce a la germinación y que concluye con la emergencia de la radícula, producida básicamente por la elongación celular y una alta actividad mitótica (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Por otro lado, en la fase de crecimiento del embrión en el cotiledón se sintetizan y se depositan las proteínas, almidón y lípidos que luego se utiliza por los embriones durante su crecimiento, aunque en los cotiledones de dicotiledóneas no son abundantes (Taiz y Zeiger, 2006). En este estudio los resultados mostraron un aumento del contenido de humedad asociado con el incremento del metabolismo en los cotiledones de los embriones tratados.

En las células del embrión se considera la existencia de una baja actividad del transporte activo de sustancias (incluyendo los iones), a través de la membrana, por lo que existe un equilibrio entre las fuerzas que provocan el flujo de portadores de carga (iones o biomoléculas cargadas), hacia y desde la célula (Sveinsdóttir *et al.*, 2009). Este equilibrio se basa en la igualdad del gradiente de concentración y el gradiente provocado por el campo eléctrico de la biomembrana (Coro, 1996). La presencia de un campo electromagnético externo modifica las concentraciones de partículas cargadas dentro y fuera de las células, al conducir iones desde uno hacia otro lado de las membranas utilizando la fuerza de Lorentz (García y Arza, 2001).

Existen además, investigaciones sobre el efecto de los campos electromagnéticos con significativo incremento en la germinación de las semillas y en la actividad de la formación de las proteínas (Paul *et al.*, 2006), que se corroboran con los resultados antes expuestos.

Los resultados mostrados en la imagen fotoacústica de embriones de café, pueden relacionarse con los resultados obtenidos del análisis realizado por espectroscopía infrarroja (IR) en la figura 2, que sin ser concluyentes, permitieron identificar incrementos de algunos componentes en las

muestras tratadas con un campo electromagnético de 60 Hz en comparación con las que no fueron sometidas al tratamiento electromagnético.

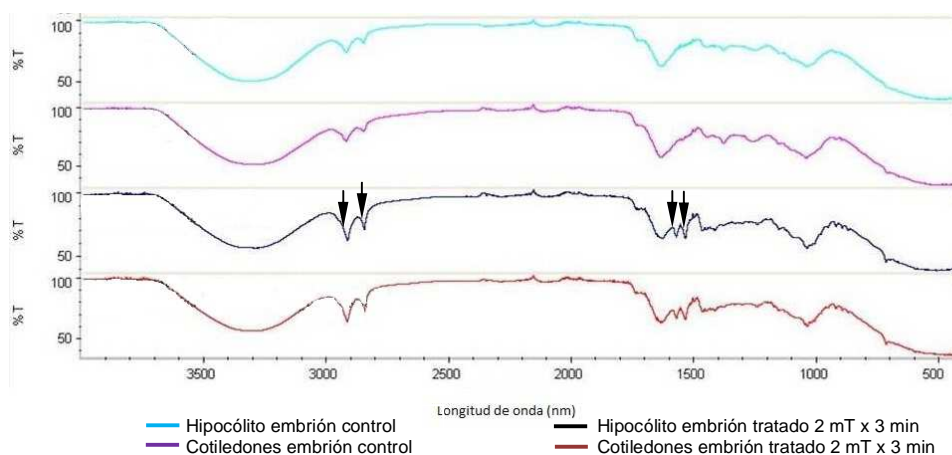


Figura 2. Espectro Infrarrojo de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. cv Catuai amarillo bajo un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción, tres minutos de exposición y embriones que no reciben el tratamiento electromagnético. El eje X muestra la longitud de onda (nm) y en el eje Y la derivada primera de la absorbancia.

En la figura 2 se observa la interpretación de cuatro picos sensibles, que varían para los embriones tratados con respecto al control. Dichos picos corresponden a NO_2 (1 500 nm); enlace doble conjugado $\text{C}=\text{C}$ (1 600 nm) y aldehídos (2 800 nm).

En los resultados alcanzados en las muestras que recibieron el tratamiento de 2 mT de inducción electromagnética y tiempo de exposición tres minutos, probablemente se relacione con mayor actividad metabólica asociada a la formación de compuestos estructurales. Una vez que se conoce que para la activación de los procesos de germinación los doble enlaces carbono-carbono, forman parte del anillo purínico de bases nitrogenadas que participa en la biosíntesis de los nucleótidos, que son precursores directos del ADN y ARN (Taiz y Zeiger, 2006).

Además, la presencia del pico nitrito también pudiera estar relacionada con que este ión es reducido por la nitrito reductasa a ión amonio, a nivel de plastidios. Finalmente la forma amida

se incorpora a la glutamina, hasta convertirse en otros aminoácidos que dan lugar también a proteínas y ácidos nucleicos (Taiz y Zeiger, 2006).

Los embriones vegetales son morfológicamente simples pero molecularmente complejos. En los mismos se encuentran alrededor de 20 000 moléculas de ARN. Este número es similar al encontrado en órganos más complejos como hojas, raíces, flores y anteras; donde los ARN son específicos de un estadio determinado y constituyen una modesta fracción del total, representando, sin embargo, a un gran número de genes (Picca y Cardone, 2004). La información brindada por los espectros de la figura 2, permiten considerar la presencia de estas reacciones del metabolismo nucleotídico en los embriones de café estudiados, en correspondencia con la conocida la influencia que ejerce el campo electromagnético sobre biosistemas y bioestructuras, con una moderada alteración en las tasas de producción de ADN, ARN, y transcritos de ARNm, ARNt y ARNr (Volpe, 2003).

Răuciu *et al.* (2007), en semillas de *Zea mays* tratadas con campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (50 Hz) e inducciones entre 1-10 mT, demostraron un efecto estimulante en los niveles de ácidos nucleicos. Los autores encontraron que estos efectos ocurrieron por reacciones de regeneración en los procesos metabólicos de las plantas contra posibles calentamientos del tejido vegetal producido por la energía de los campos electromagnéticos. Dicha energía absorbida por nano-partículas magnéticas internalizadas en el tejido vegetal.

De esta forma se demuestra el efecto positivo de los campos electromagnéticos de baja frecuencia para una inducción de 2 mT durante tres minutos de exposición en el proceso de germinación de embriones cigóticos de café, asociado con el aumento de la permeabilidad de las membranas.

4.2. Efecto de niveles de inducción y tiempo de exposición a un campo electromagnético de 60 Hz durante el crecimiento *in vitro* y aclimatización de plántulas de café.

En la tabla 5 se observan los valores de longitud del tallo, longitud de la raíz y número de pares de hojas de las plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo, en la fase de crecimiento *in vitro*.

Tabla 5. Influencia de la inducción electromagnética y el tiempo de exposición de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en la longitud del tallo, longitud de la raíz y número de pares de hojas de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo durante la fase de crecimiento *in vitro*.

Tratamiento		Longitud del tallo	Longitud de la raíz	No. Pares de hojas
Inducción magnética	Tiempo de exposición	(cm)	(cm)	(promedio)
0	0	2,43 ^b	2,64 ^c	2,04 ^c
2 mT	3 min	4,56 ^a	4,50 ^a	4,47 ^a
2 mT	9 min	4,24 ^a	4,12 ^a	4,08 ^a
4 mT	3 min	3,42 ^b	3,15 ^b	3,21 ^b
4 mT	9 min	3,21 ^b	2,67 ^b	2,87 ^b
6 mT	3 min	3,38 ^b	2,64 ^b	2,75 ^b
6 mT	9 min	2,50 ^b	2,63 ^c	2,05 ^c
EE		1,2	0,53	0,85

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas (ANOVA bifactorial; Tukey; $p \leq 0,05$; $n=20$)

En el análisis bifactorial (inducción y tiempo de exposición) para estos resultados se obtuvo interacción entre los factores. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los tiempos de exposición para una misma inducción, excepto para la inducción de 6 mT. Los mayores resultados se obtuvieron en los tratamientos con la más baja inducción (2 mT), independientemente del tiempo de exposición, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, como se muestran en la tabla 5.

En la fase de crecimiento, el tratamiento de menor inducción electromagnética y menor tiempo de exposición presentó la mayor longitud promedio del tallo, de la raíz principal y del número de pares de hojas, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos.

Los resultados obtenidos sugieren que el meristemo radical incrementó su actividad meristemática bajo la acción de un campo electromagnético. Además aceleró el proceso de

división celular que probablemente produjo una alteración de la permeabilidad de las membranas celulares, con un incremento de la turgencia celular lo que facilita los mecanismos de transporte de nutrientes del medio de cultivo hacia la planta. De esta forma contribuye a un mayor crecimiento de las raíces y de la plántula en sentido general.

Es conocido que los iones participan directamente en la división celular y en el crecimiento de las plantas. El calcio, considerado un mensajero intracelular controla el transporte de célula a célula, abriendo o cerrando los plasmodesmos, y otros iones como el potasio y el cloro que participan en la regulación de la bomba sodio-potasio a nivel de membrana citoplasmática (Pimentel, 1998). Se plantea que la aplicación de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja puede incrementar la movilidad de iones específicos cerca de lugares receptores y/o a través de los canales iónicos de las membranas celulares, sobre todo de iones calcio o agregados formados por racimos de iones en el citoplasma (Karnaukhov, 1994). Este aumento de la entrada de los iones del medio de cultivo al interior de la célula, por la acción del campo electromagnético de 2 mT de inducción, provoca por tanto mayor crecimiento de las plántulas como se muestra en los resultados.

Experimentos realizados por Barnes (1996) permitieron comprobar que en el caso del crecimiento de las raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.) se producen micro corrientes por iones H^+ que producen cambios sensitivos en la absorción de otros iones como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , que influyen en el crecimiento de las raíces y estas micro corrientes se incrementan bajo la acción de los campos electromagnéticos. Lucchesini *et al.* (1992) observaron mayor crecimiento en el ápice radical para plantas de *Prunus cerasifera* cultivadas *in vitro* y estimuladas con campos electromagnéticos pulsantes. Namba *et al.* (1995) indicaron un aumento en la longitud de los brotes y raíces, por la aplicación de un campo magnético oscilante de 1 - 4 mT en plantas

de *Brassica* spp. De igual forma, Fung, *et al.* (2002) observaron un efecto estimulante en el crecimiento acelerado de raíces y con ello una reducción del tiempo en la regeneración, al tratar con un campo electromagnético embriones cigóticos de café (*Coffea arabica* L.) cv. Caturra rojo.

Por otro lado, se evidenció que las plantas, al ser tratadas con campos electromagnéticos, logran acelerar su crecimiento (Rajendra *et al.*, 2005; Yacyly y Alikamanoglu, 2005; Vashisth y Nagarajan, 2008); por tanto es de esperarse que se acelere el crecimiento de las hojas y el tamaño de las mismas.

Los resultados mostraron un incremento en el número de pares de hojas en las plantas que recibieron un tratamiento electromagnético de 2 mT independientemente del tiempo de exposición, probablemente asociado a la mayor absorción de nutrientes a través de la raíz.

En estudios realizados por Ferrer (2000), sobre el efecto del campo magnético de frecuencias entre 20 - 60 Hz e inducción de 2 mT en la micropropagación del café, obtuvo para el cultivar Caturra rojo entre 2,5 - 3,3 pares de hojas en plantas *in vitro* después de ocho semanas de cultivo. En los resultados de esta experimentación las plántulas de café alcanzaron más de cuatro pares de hojas.

Las hojas son órganos de vital importancia para las plantas. El desarrollo del número de pares de hojas es determinante en las plántulas obtenidas *in vitro* para pasar de la fase *in vitro* a la fase de aclimatación, pues en ellas ocurren los procesos de fotosíntesis y transpiración (Pospíšilová *et al.*, 2007).

Se describe en la literatura que el cultivar Catuai amarillo, es de porte bajo y uno de los más productivos. Se utiliza tanto para la producción nacional, como café especial cuando se cultiva por

encima de los 400 m sobre el nivel del mar. Según estos criterios, para la producción de posturas en los cafés especiales, el primer par de hojas se alcanza a los 130 días del cultivo (Díaz *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos mostraron que para el tratamiento de 2 mT de inducción, tres minutos de exposición, a los 3 meses (90 días), se alcanzan los mejores resultados para la fase de crecimiento *in vitro*. Se lograron plántulas con un promedio de 4,47 pares de hojas, lo que constituye un elemento significativo en la calidad de las plantas y el valor de esta investigación.

En la tabla 6 se observan los valores de porcentaje de supervivencia, longitud del tallo, longitud de la raíz y número de pares de hojas en plántulas de *C. arabica* cv Catuai amarillo en la fase de aclimatización.

Tabla 6. Influencia de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en la longitud del tallo, longitud de la raíz y número de pares de hojas de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo después de ocho semanas de aclimatización.

Tratamientos		Porcentaje de supervivencia (%)	Longitud del tallo (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Número de pares de hojas (promedio)
Inducción magnética	Tiempo de exposición				
0	0	88 ^b	3,74 ^b	6,49 ^b	4,85 ^b
2 mT	3 min	96 ^a	5,47 ^a	8,23 ^a	6,72 ^a
EE		5,04	2,07	1,86	1,85

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas. Comparación de medias (t- Student; $p \leq 0,05$; n=20)

Luego de ocho semanas de adaptación con el efecto de un campo electromagnético de 2 mT de inducción y 3 min de exposición, se obtuvieron valores promedios de 6,72 pares de hojas, incremento en la longitud del tallo, la raíz y porcentaje de supervivencia.

En el caso específico de los individuos evaluados en el proceso de aclimatización, no se existieron plántulas fuera de tipo. Es decir no se presentaron hojas etioladas y raíz principal torcida, según los criterios establecidos por Arcila *et al.* (2001).

En el análisis del porcentaje de supervivencia de las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético (2 mT, 3 min), se obtuvo diferencias significativas con respecto al control. Se observó un incremento de la calidad de las plántulas tratadas que se reflejó fundamentalmente en el crecimiento de la zona radical y el número de pares de hojas.

En el proceso de aclimatación se produce un cambio significativo en el desarrollo morfo-anatómico de las plántulas, si se tiene en cuenta que provienen de condiciones controladas en el laboratorio (alta humedad relativa e iluminación) y deberán adaptarse a las nuevas condiciones del lugar donde continuarán su ciclo de vida (Pospíšilová *et al.*, 2007), por lo que el porcentaje de supervivencia en el momento de la transición en el momento *in vitro* - *ex vitro* juega un papel fundamental.

En los resultados obtenidos, el tratamiento electromagnético, además de incrementar el porcentaje de supervivencia, también incrementó la longitud del tallo y la raíz, lo que indicó el efecto promotor de este efecto físico en el crecimiento de las plántulas de café que logradas partir de embriones cigóticos.

Los efectos promotores de los campos electromagnéticos sobre la elongación del tejido vegetativo se observó en muchas especies y se plantea por varios autores (Rochalska y Orzeszko-Rywka, 2005; De Souza *et al.*, 2006; Cakmak *et al.*, 2010), que inducen el alargamiento celular.

El resultado que se obtuvo en el incremento del número de pares de hojas pudiera relacionarse con un aumento significativo en el índice mitótico en la zona caulinar, donde además se desarrollan los primordios foliares. Diferentes estudios demuestran el efecto que ejerce el campo

electromagnético en el ciclo celular de células meristemáticas, acelerando la división celular (Paul *et al.*, 2006), como se mencionó anteriormente.

Los resultados coinciden además, con los de otros autores que señalan que los campos electromagnéticos en diferentes especies vegetales, tienen un efecto positivo en la velocidad de regeneración, la masa fresca de los brotes, el número de pares de hojas, la longitud del tallo y de la raíz en comparación con plantas que no reciben el tratamiento magnético (Yaycili y Alikamanoglu, 2007; Alikamanoglu y Send, 2011).

Se debe señalar que el crecimiento rizogénico juega un papel fundamental en las plantas de café para garantizar la aclimatización de éstas, pues se incrementa la absorción de nutrientes a través del mejoramiento del desarrollo radical y se promueve mediante este órgano la disponibilidad de estos y con ello crecimiento de la planta. En estudios de Arcila *et al.* (2001) con el uso de tratamientos electromagnéticos, se comprobó que existe una tasa mejorada de absorción de minerales y de agua, lo que justifica el favorable empleo de un campo electromagnético de 2 mT durante tres minutos para estimular el crecimiento vegetal en este estudio.

Lucchesini *et al.* (1992) y Rajendra *et al.* (2005) observaron además del incremento de la división celular y el crecimiento radical de plántulas obtenidas a partir de semillas de *Vicia faba* expuestas a 100 μ T de campo electromagnético. De igual manera, Răuciu *et al.* (2006) informaron que la altura de plantas de maíz (*Zea mays* L.) experimentó un comportamiento lineal respecto a la inducción magnética en un intervalo de 50-300 mT. Así mismo Alikamanoglu *et al.* (2007) mostraron el aumento en el número de hojas de plántulas de *Paulownia tomentosa* Baill, sometidas a tratamiento crónico a 2,9 - 4,8 mT durante aproximadamente un mes.

Todo lo anterior corrobora los resultados obtenidos para el caso de *C. arabica* cv. Catuai amarillo, donde se estimuló el crecimiento de una raíz pivotante en sentido vertical; se incrementó la longitud del tallo y el número de pares de hojas, cuando se aplicó el tratamiento electromagnético (2 mT, 3 minutos de exposición) en la fase de aclimatización.

4.2.1- Caracterización de la anatomía foliar de plántulas de cafeto obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz.

Los valores del índice estomático, el área y la apertura estomáticas de las plántulas tratadas y control, en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Influencia de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en el índice estomático, área estomática y área de la apertura estomática de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo después de 8 semanas de aclimatización.

Fase de cultivo	Tratamiento		Índice estomático	Área estomática	Área de la apertura estomática
	Inducción	Tiempo de exposición			
Crecimiento <i>in vitro</i>	0	0	2,1 ^b	1,65 ^{n.s}	0,18 ^{n.s}
	2 mT	3 min	3,5 ^a	1,50 ^{n.s}	0,11 ^{n.s}
EE			0,2	0,17	0,03
Aclimatización	0	0	13,80 ^b	3,05 ^b	1,38 ^a
	2 mT	3 min	18,54 ^a	6,70 ^a	1,11 ^b
EE			2,34	2,09	0,98

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas; n.s: diferencias no significativas Comparación de medias (test Student; $p \leq 0,05$; $n=20$).

Como se observa, en la fase de crecimiento *in vitro*, sólo se presentaron diferencias significativas en las plántulas tratadas con respecto al control para el índice estomático. En la fase de aclimatización, para las variables índice estomático y área estomática, los mayores valores se obtuvieron para las plántulas tratadas con diferencias significativas con respecto al control, mientras que en el caso del área de la apertura estomática los valores fueron menores con diferencias significativas con respecto al control.

Según Esau (1995), el número de estomas varía considerablemente de una especie a otra y por unidad de área incluso en la misma especie, dependiendo de la localización de la hoja y de las condiciones ambientales. Los resultados obtenidos en las plántulas tratadas se relacionan con lo anteriormente descrito.

Estos resultados corroboran el papel de los campos electromagnéticos en el funcionamiento y desarrollo estructural de los diferentes órganos de la planta. Aunque la formación de estas estructuras está predeterminada genéticamente (Esau, 1995) al actuar los campos electromagnéticos sobre el metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos, pudiera ocurrir un aumento en la formación estructural en las plantas tratadas con respecto al control.

Los estomas, son estructuras epidérmicas foliares, que tienen su origen a partir del cambium primario del tejido epidérmico. Presentan ostiolo y células oclusivas con una alta funcionalidad incluso en el periodo de senescencia de la hoja. Se caracterizan fundamentalmente por presentar la pared celular, hacia el interior del ostiolo, muy engrosada y hacia la parte más externa más elástica que le permite al estoma en dependencia de la presión de turgencia celular abrir o cerrar. Estas paredes se encuentran formadas por celulosa (polisacáridos formados por unidades de D-glucosa). Las microfibrillas se disponen en sentido longitudinal, en forma de que la pared hacia el interior es menos elástica y se encuentra más engrosada que la pared externa. El ostiolo está ocluido por ceras que contribuyen a aumentar la resistencia difusiva. No poseen conexión con el resto de las células epidérmicas a través de los plasmodesmos y en las células guardianes se pueden observar cloroplastos, lo que permite desarrollar su propio metabolismo (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Probablemente el número de estomas por células epidérmicas se incrementó por el efecto del campo electromagnético (2 mT, 3 min) en la permeabilidad de la membrana, que provoca un

aumento del intercambio iónico, con una mayor entrada de nutrientes a la célula y con ello el crecimiento foliar, como se mencionó anteriormente.

También, al estudiar el área de la apertura estomática, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, donde los valores más bajos para esta variable se alcanzaron para las plántulas tratadas en la fase de aclimatización. La apertura, cierre y cambio del tamaño del estoma está ocasionado por cambios en la forma de las células guardianes, de modo que un incremento en la turgencia de estas células provoca que el estomas se abra y ante una disminución se cierre, ya que el proceso de apertura y cierre está regulado por la actividad metabólica en las células guardianes.

A pesar de existir para las plántulas tratadas el mayor número de estomas, se obtuvieron los valores más bajos de apertura estomática, que pudo estar dado según Galland y Pazur, (2005) porque los campos electromagnéticos interactúan con el plasmalema. Esto ocurre de manera tal que muestran efectos a corto plazo sobre el potencial de membrana en reposo y la acidificación del medio, teniendo en cuenta que la bomba de protones del plasmalema entrega la fuerza motora por el fuerte flujo de iones que requiere la apertura estomática. La pérdida de agua por la planta en forma de vapor que se produce en el proceso de transpiración a través de los estomas se reduce por las razones antes expuestas. Además pudiera favorecer una mejor adaptación de las plantas de café con la aplicación del campo electromagnético durante la aclimatización y se corrobora una vez más la acción positiva de este efecto físico, que se atribuye a que los mismos influyen sobre la estabilidad de la membrana.

En los cortes longitudinales y transversales que se realizaron en las hojas de café, durante las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización, se corroboró el mejor desarrollo anatómico en las plántulas tratadas con respecto al control.

Al comparar la anatomía de las hojas de *Coffea arabica* cv. Catuai entre las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético y el control durante la fase de crecimiento *in vitro*, se observó el parénquima más compactado con abundante gránulos de almidón o amiloplastos (Po) y tubos xilemáticos (X) con paredes más gruesas (Fig. 3A y 3B), lo que evidencia el papel beneficioso de los campos electromagnéticos en el desarrollo estructural de la planta.

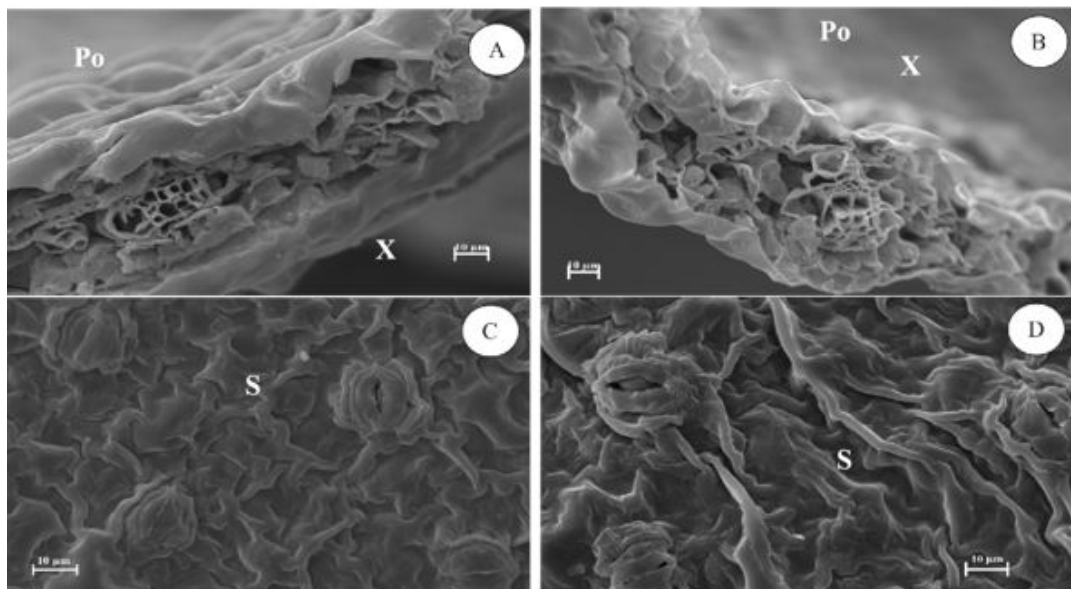


Figura 3. Imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido de hojas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo en fase de crecimiento *in vitro*. A la izquierda: A, C (control) y a la derecha: B, D (tratadas con un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción y tres minutos de exposición). *S*-estoma, *X*-vasos del xilema, *Po*-amiloplastos.

En el caso de los estomas (S) (Fig. 3C y 3D) se observó un encrestamiento en las células oclusivas de los mismos. Este resultado probablemente está relacionado con aumento en el espesor de la capa de la cutícula en las plantas tratadas con respecto al control, asociado además a la elevación del metabolismo antes mencionado.

Los cambios anatómicos observados en las plantas que reciben el tratamiento electromagnético pudieron favorecer los procesos fotosintéticos ya que se incrementó la aparición de amiloplastos en el tejido parenquimatoso. Pierik (1990) informó que una planta generada *in vitro*, tiene una cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa dentro del envase de cultivo. Además hay mayor transpiración y las hojas son fotosintéticamente poco activas. Sin embargo, los resultados obtenidos en las plantas de café que recibieron el tratamiento electromagnético mostraron abundantes amiloplastos en la región del parénquima. Este manejo resultó favorable y pudiera constituir un valioso aspecto a considerar en los programas de propagación acelerada del café.

En la figura 4 se muestran los resultados de las imágenes de microscopía electrónica de barrido de hojas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo de plántulas obtenidas *in vitro* luego de ocho semanas en fase de aclimatización.

En el caso de las hojas de plántulas de café en fase de aclimatización, no se observaron diferencias con respecto al control en el desarrollo del tejido parenquimatoso, pero es apreciable el aumento en el grosor de los vasos xilemáticos (Fig. 4A y 4B). En el grupo tratado con campo electromagnético también se observó un engrosamiento de las paredes internas de los estomas, con respecto al control (Fig. 4 C y D).

Estos resultados sugieren que los menores valores obtenidos en el área de la apertura estomática (Tabla 7), se relacionen además con el incremento que se produce en el grosor de las paredes de los estomas.

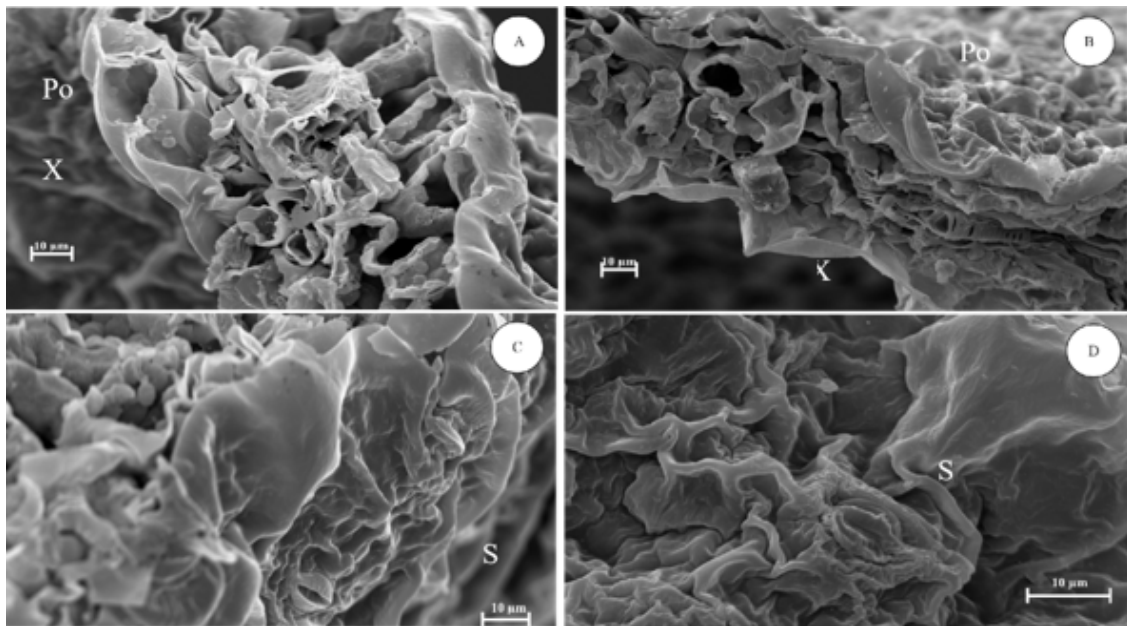


Figura 4. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido de hojas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo en fase de aclimatización. A la izquierda: A, C (control) y a la derecha: B, D (tratada con un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción y tres minutos de exposición). *Sestoma*, *X*-vasos del xilema, *Po*-amiloplastos.

El desarrollo de los vasos xilemáticos que se produjo en las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético también se asocia a un incremento general del metabolismo que pudiera provocar mayor la lignificación de estos vasos.

En sentido general en el estudio de microscopía de barrido que se realizó a las hojas de las plántulas de los dos grupos experimentales, en ambas fases no hubo deformaciones estructurales. Las células epidérmicas resultaron ser poligonales alargadas, predominantemente hexagonales; y los estomas se presentaron aislados pero anatómicamente normales.

En este estudio, el desarrollo favorable de las plántulas de café que recibieron el tratamiento electromagnético durante la fase de aclimatización, se traduce en que existe un mayor número de estomas por superficie foliar con menor área de la apertura estomática. De esta forma

desempeñaran un papel más activo en la regulación del intercambio gaseoso y del estado hídrico de las plantas, con un mejor aprovechamiento del agua y estarán mejores condiciones para pasar a la etapa de vivero.

4.2.2- Determinación de la fotosíntesis neta, transpiración y concentración de pigmentos fotosintéticos de las plántulas de café obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz.

Los valores obtenidos de fotosíntesis neta de plántulas de *C. arabica* cv. Catuai amarillo en las fase de crecimiento *in vitro* y aclimatización, de las plántulas tratadas con un campo electromagnético de inducción 2 mT y tres minutos de exposición y el grupo control presentaron diferencias significativas, como se observa en la figura 5.

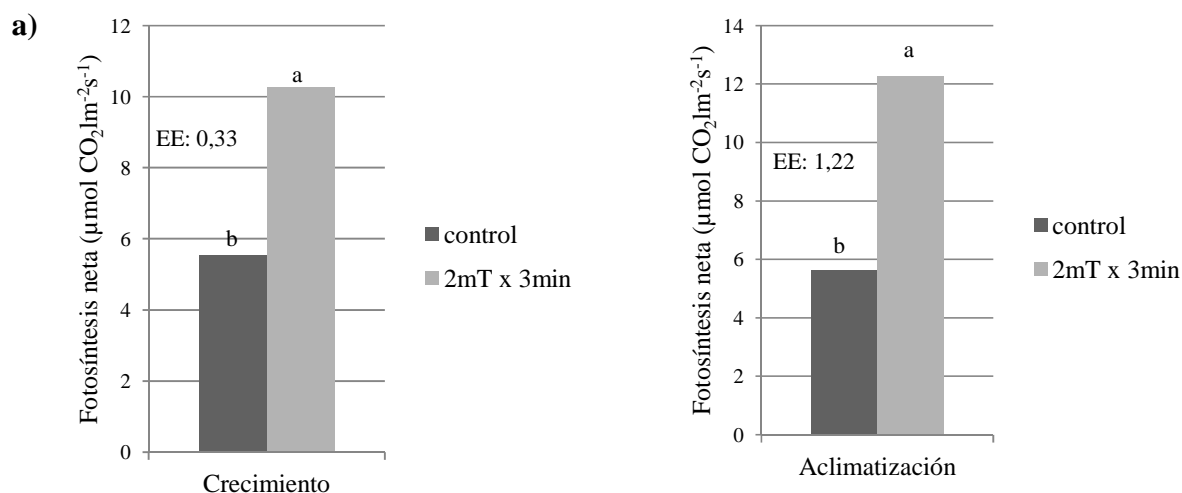


Figura 5. Efecto de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), 2 mT de inducción y tres minutos de exposición sobre la tasa de fotosíntesis neta en plántulas *C. arabica* cv. Catuai amarillo. a) fase de crecimiento *in vitro*; b) fase de aclimatización. Comparación de medias (t-Student, $p \leq 0,05$; $n=50$).

Al evaluar la tasa de fotosíntesis neta para las fases de crecimiento *in vitro* (Figura 5a) y aclimatización (Figura 5b), los valores de fotosíntesis neta fueron superiores (85,4% y 117,9%

respectivamente) en las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético con diferencias significativas respecto al control.

El incremento de la actividad fotosintética en las plántulas tratadas en ambas fases pudiera asociarse al desarrollo de los fotosistemas que participan en la absorción de la luz y a la interacción con el campo electromagnético. Probablemente este por su componente eléctrico, produce un cambio conformacional en el grupo hierro "no hemo", cofactor de unión de las proteínas del FS II, que se ubica en los citocromos y se altera la transferencia de electrones desde las plastoquinonas hacia el complejo citocromo. Esto pudiera asociarse con un incremento de la transferencia electrónica y con ella una elevación de los niveles de fotosíntesis neta en las plántulas tratadas.

Los iones paramétricos que se entrelazan a las proteínas, bajo la acción de un campo electromagnético pueden tener cambios rotacionales que producen un cambio en las proteínas en las que se encuentran enlazados (Polk y Postow, 2006), razón que justifica los resultados antes expuestos. El cambio conformacional en las proteínas del FS II conlleva a una mayor absorción de energía y/o incremento de la transferencia de electrones de un centro captador de energía a otro, aumentando así los niveles de fotosíntesis neta.

Las fuerzas aplicadas por un campo eléctrico producen una velocidad mayor para partículas cargadas positiva y negativamente (Barnes, 1996). Según plantean Nossol *et al.* (1993), los campos magnéticos alternos (50 Hz) influyen en la actividad redox de la citocromo *c* oxidasa, una vez que se conoce que los citocromos, son enzimas transportadoras de electrones que tienen ferroporfirina como grupo prostético. Estas moléculas aceptan y liberan alternativamente electrones, que pasan a otro citocromo en una cadena de reacciones químicas la llamada

transferencia de electrones, que funciona con liberación de energía, a través de los mecanismos de las cromoproteínas LHC II (Collados, 2006). De esta forma las plantas que reciben el tratamiento electromagnético logran compensar los niveles de concentración de CO₂, obtener máximos fotosintéticos y con ello un incremento de la fotosíntesis neta.

En este sentido, algunos autores plantearon que la transferencia de energía de excitación que se produce del FS II al FS I constituye probablemente el primer mecanismo de fotoaclimatización de las plantas, evitando el daño oxidativo inducido por el exceso de absorción de energía luminosa del FS I (Hong y Xu, 1999; Collados, 2006). Con estas características las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético pudieran adaptarse más fácilmente a las condiciones de campo.

La fotosíntesis neta en plántulas de *C. arabusta* cultivadas *in vitro* en condiciones mixotróficas, se incrementó con el aumento de la concentración de CO₂ y la intensidad luminosa (Nguyen *et al.*, 1999). La elevada capacidad fotosintética demostrada por los resultados de esta investigación coincide con los mayores niveles de fotosíntesis del estudio antes mencionado.

El café considerado facultativo de sombra posee una fotosíntesis neta baja (Arcila *et al.*, 2001). Sin embargo, en varios estudios se encontró que las tasas de fotosíntesis neta varían en el rango de 0,44 - 5,54 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Nutman, 1937; Nunes *et al.*, 1968; Sondhal, 1976; Yamaguchi y Friend, 1979; Friend, 1984; Isaac *et al.*, 2010). Plantas adultas registraron tasas superiores de fotosíntesis neta (11,7 $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 25°C) para tres genotipos de café (Mosquera-Sánchez *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos corroboran la capacidad fotosintética de las plántulas de *C. arabica* cv. Catuai amarillo, una vez que los valores que alcanzados están en el rango de los que se plantean por diferentes autores.

De igual forma, los estudios de transpiración revelaron que para todas las etapas, en las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético se produjo una disminución de la transpiración con respecto al control, como se muestra en la figura 6.

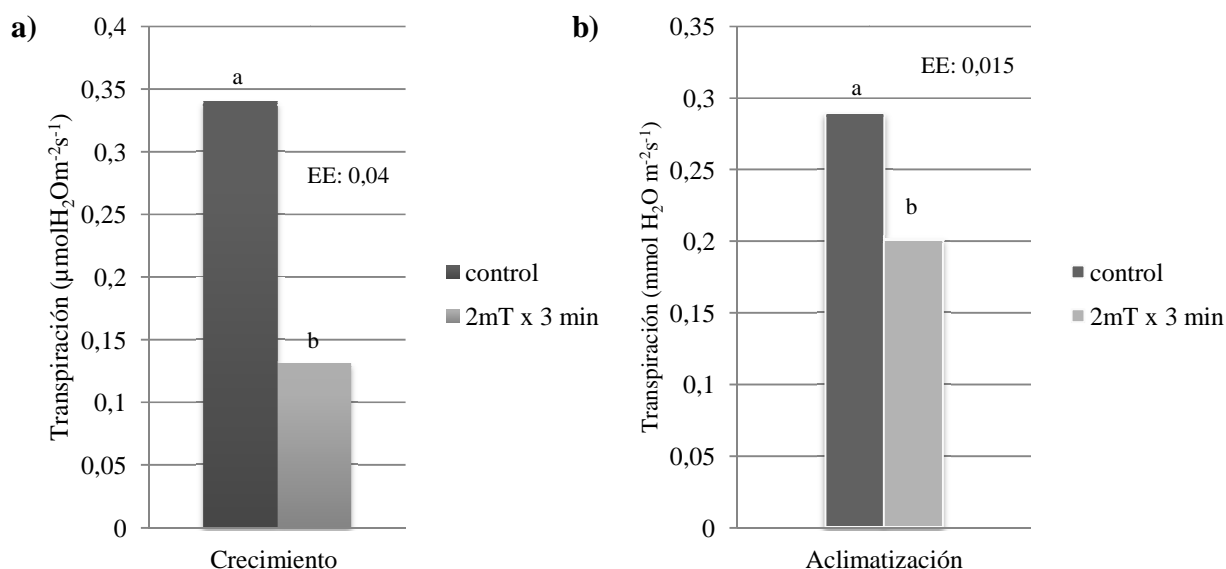


Figura 6. Efecto de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), 2 mT de inducción y tres minutos de exposición sobre la transpiración en plántulas *C. arabica* cv. Catuai amarillo. a) fase de crecimiento *in vitro*; b) fase de aclimatización. Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=50$).

Estos resultados pudieran estar relacionados con el cierre estomático que se observó en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización. El cierre estomático, sirve como una barrera efectiva para evitar la pérdida de agua y las protege de la desecación (Taiz y Zeiger, 2006; Azcon-Bieto y Talón, 2008;).

Las plantas deben obtener CO_2 para mantener la fotosíntesis y a través de los estomas llevar a cabo el intercambio más importante de H_2O y CO_2 . De esta forma la apertura estomática juega un papel crucial no sólo en la transpiración sino también en el proceso de fotosíntesis.

Los cambios en la resistencia estomática son importantes en la regulación de la pérdida de agua por la planta y para el control de la tasa de CO₂ absorbido, necesario para la fijación sostenida de CO₂ durante la fotosíntesis. El uso eficiente del agua y el estado hídrico del tejido vegetal potencialmente incrementan el crecimiento y el rendimiento biológico de las plantas. Este aumento en el uso eficiente del agua es resultado del aprovechamiento de las concentraciones de CO₂ en el proceso de fotosíntesis y resulta en ocasiones más importante que la elevación de los niveles de fotosíntesis neta (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Merece destacar que la mayor actividad fotosintética relacionada con la disminución de la transpiración producida en las plántulas de café tratadas durante el crecimiento *in vitro*, resulta favorable para la transición a la fase de aclimatización.

En la tabla 8, se muestran los resultados del uso eficiente del agua de la fotosíntesis, en las plantas tratadas con un campo electromagnético de 60 Hz y el control, en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización.

Tabla 8. Influencia de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en el uso eficiente del agua de la fotosíntesis en plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización.

Valores	Fase de Crecimiento <i>in vitro</i>		Fase de Aclimatización	
	Control	2 mT x 3 min	Control	2 mT x 3 min
Fotosíntesis neta [$\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	5,54	10,27	5,63	12,27
Transpiración [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	0,341	0,131	0,289	0,201
Uso eficiente del agua de la fotosíntesis	16,29	78,39	19,48	61,04

Los resultados muestran que en las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético, hay una mayor asimilación de CO₂, por molécula de agua, para ambas fases en comparación con las plántulas control. La eficiencia en el uso del agua es una medida de la eficacia de los estomas

para maximizar la fotosíntesis, reduciendo al mismo tiempo la pérdida de agua. De esta forma, las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético lograron maximizar el crecimiento teniendo en cuenta la cantidad de agua disponible.

En el caso de la fase de aclimatización, estos valores son menores debido a que en esta fase la humedad relativa es menor en comparación con la que existe en el interior del frasco, en las plantas que crecen *in vitro*. Azcón-Bieto y Talón, (2008) señalan que una disminución de la humedad relativa elevará la transpiración sin un incremento simultáneo de la fotosíntesis, lo cual conduce a una disminución en la eficiencia transpiratoria.

De igual forma, para el desarrollo de la fotosíntesis, es importante la presencia de los pigmentos fotosintéticos, que incrementan su concentración con la acción del tratamiento electromagnético, como se observa en la figura 7.

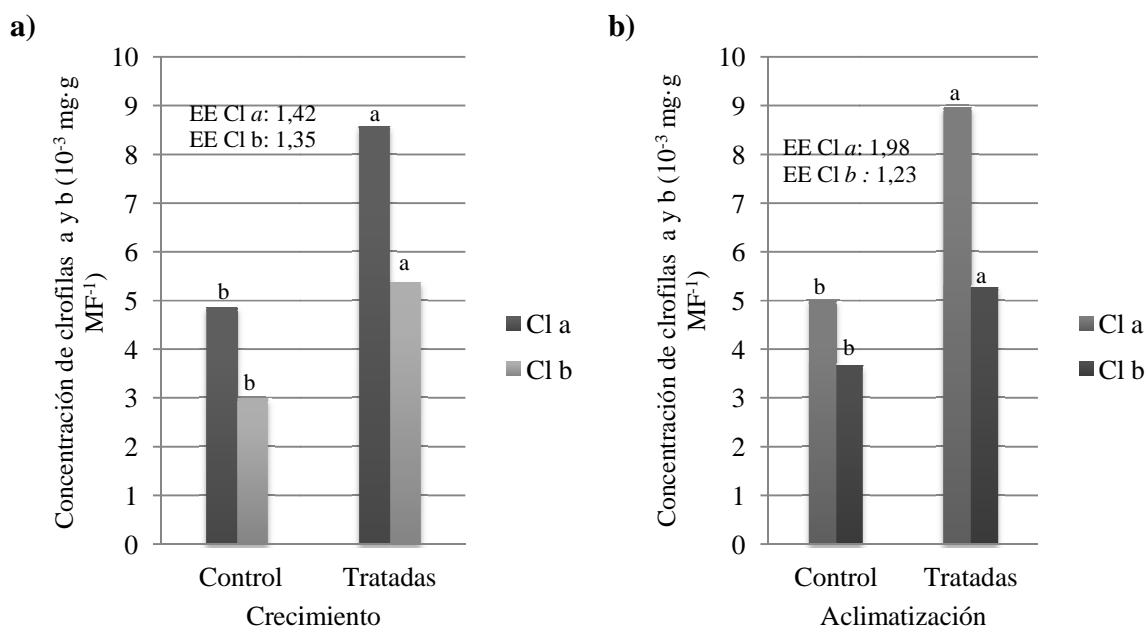


Figura 7: Influencia de los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) 2 mT de inducción y tres minutos de exposición sobre en la concentración de pigmentos clorofílicos de plántulas *C. arabica* cv. Catuai amarillo. a) fase de Crecimiento *in vitro*; b) fase de Aclimatización. Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=20$).

Las mayores concentraciones de clorofilas *a* y *b* se obtuvieron para las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético en las dos fases de cultivo que se analizaron.

Las clorofilas, son moléculas cromóforas sensibles, que se unen a las proteínas fotosintéticas y forman un complejo pigmento-proteína. Habitualmente se asocian de forma no covalente a los polipéptidos constitutivos de las antenas de los fotosistemas. Se caracterizan por un anillo tipo porfirina con un catión metálico de magnesio ligado al anillo, con enlaces conjugados que le confieren la capacidad de absorber la luz visible (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El incremento en la concentración de pigmentos clorofílicos en las plántulas que recibieron el efecto del campo electromagnético de 2 mT de inducción durante tres minutos de exposición, pudiera relacionarse con la influencia que tiene el tratamiento sobre el ión metálico del complejo proteína clorofila. Este incremento produce un aumento de la eficiencia fotosintética en el caso de las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización como se mencionó anteriormente.

Ferrer (2000) en estudios sobre el efecto del campo electromagnético en la multiplicación *in vitro* de café, obtuvo resultados similares donde las concentraciones de pigmentos fotosintéticos fueron superiores al control en los brotes tratados magnéticamente. Isaac *et al.* (2007) encontraron que el tratamiento prolongado durante nueve minutos a una inducción de 2 mT en plántulas de café (cv. Isla 5-15) provocó incrementos en el contenido de clorofila *a* desde 6,27 - 8,87 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y en el contenido de clorofila *b* de 2,37 - 4,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los resultados son similares además, con los informados por Ursache *et al.* (2009), quienes lograron incrementos en la relación de la concentración de clorofilas *a* y *b* en plántulas de maíz sometidas a la acción de un campo electromagnético de 6 mT de inducción electromagnética.

Por otro lado, la relación de clorofilas *a/b* se conoce como un indicador indirecto de la actividad energética de los sistemas colectores de luz (LHC II), que es la primera etapa de la conversión de la energía solar en energía química (Azcon-Bieto y Talón, 2008).

Los resultados relacionados con la relación clorofila *a/b* se muestran en la figura 8.

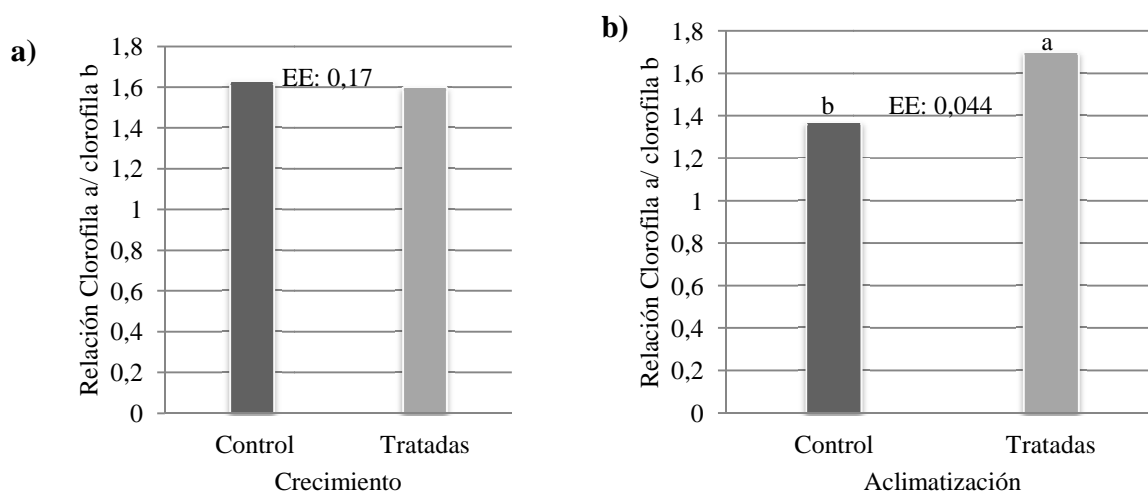


Figura 8. Influencia de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) 2 mT de inducción durante tres minutos de exposición sobre la relación de clorofilas *a/b* en plántulas *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo. a) fase de Crecimiento *in vitro*; b) fase de Aclimatización. Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=20$).

Los resultados muestran mayor variación de la relación clorofila *a/b* en las plántulas de cafeto que recibieron el tratamiento electromagnético durante la fase de aclimatización, mientras que en la fase de crecimiento no se obtuvieron diferencias significativas.

Es importante tener en cuenta la relación que se establece entre estos resultados y los que se obtuvieron de fotosíntesis neta. En el caso de las plantas en fase de aclimatización tanto los valores de relación clorofila *a/b*, al igual que la fotosíntesis neta, fueron superiores en las plantas tratadas (2 mT, 3 min) con respecto al control. Las plántulas en fase de crecimiento *in vitro* no mostraron diferencias significativas, lo que sugiere una sensibilidad electromagnética de la eficiencia fotosintética en dependencia del desarrollo fisiológico de las plantas.

Estos resultados son similares a los de Răuciu *et al.* (2006) e Isaac *et al.*, (2011) que observaron una ligera variación en la relación de pigmentos clorofílicos de hojas de *Zea mays* a una inducción de 50 mT de campo magnético de frecuencia extremadamente baja en comparación con plantas control.

En sentido general, los resultados mostraron que las plántulas de *C. arabica* cv. Catuai amarillo que se obtienen *in vitro* y en fase de aclimatización, poseen una capacidad fotosintética que se eleva bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz, que garantiza además un uso eficiente del agua en las plantas, en ambas fases y con ello logran incrementar su crecimiento.

4.2.3-Determinación del efecto del campo electromagnético sobre las proteínas de membranas de cloroplastos aislados en hojas de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo.

En la tabla 9 se muestran los resultados relacionados con la concentración de proteínas de cloroplastos aislados de hojas de café en las diferentes fases del cultivo estudiadas.

Tabla 9. Influencia de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) en la concentración de proteínas de cloroplastos aislados de hojas de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo.

Tratamientos		Concentración de proteínas de cloroplastos aislados ($\mu\text{g}\cdot\text{gMF}$)	
Inducción	Tiempo de exposición	Crecimiento <i>in vitro</i>	Aclimatización
0	0	3502,6 ^{n.s}	3153,4 ^b
2 mT	3 min	4283,8 ^{n.s}	6372,8 ^a
EE		1714,5	1786,1

Medias con letras diferentes representan diferencias significativas; n.s: diferencias no significativas. Comparación de medias (t- Student; $p \leq 0,05$; $n=20$).

En el caso de la fase de crecimiento *in vitro* no se observó un incremento de las proteínas del complejo de cloroplastos en las plántulas de café que recibieron el tratamiento electromagnético con respecto al control. Mientras que, en la fase de aclimatización se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos.

Este resultado pudiera relacionarse con los efectos positivos que tienen los campos electromagnéticos en el incremento de la síntesis de proteínas (Sahebjamel *et al.*, 2007) y que consecuentemente trae aparejado el incremento en los niveles de fotosíntesis neta en los análisis previamente realizados.

Algunos autores plantearon que las características de las membranas del cloroplasto, así como su composición, influyen de manera fundamental en el desarrollo de la fotosíntesis una vez que se conoce que en las membranas de los cloroplastos se ubican los complejos proteicos que participan en el transporte de electrones (Collados, 2006; Taiz y Zeiger, 2006).

Las membranas tilacoidales son bicapas lipídicas, es decir poseen una cabeza polar y una cola hidrofóbica, compuestos fundamentalmente por galactolípidos, sulfolípidos y fosfolípidos. Estos últimos que representan entre 7 - 10%, el más importante entre ellos el fosfatidil glicerol, tiene carga negativa que parece ser necesaria para que LCH II forme trímeros (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Los campos electromagnéticos, participarían en la reorientación de esta carga negativa incrementándose de esta forma los procesos fotosintéticos.

Para corroborar los resultados obtenidos de la concentración del complejo proteínas cloroplastos, se realizó una electroforesis de las proteínas presentes en estos organelos que se aislaron en cada una de las fases del cultivo estudiadas, tanto para las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético como para el control.

La figura 9 muestra la imagen correspondiente a un gel de poliacrilamida de las fracciones de proteínas presentes en los cloroplastos aislados de hojas de café.

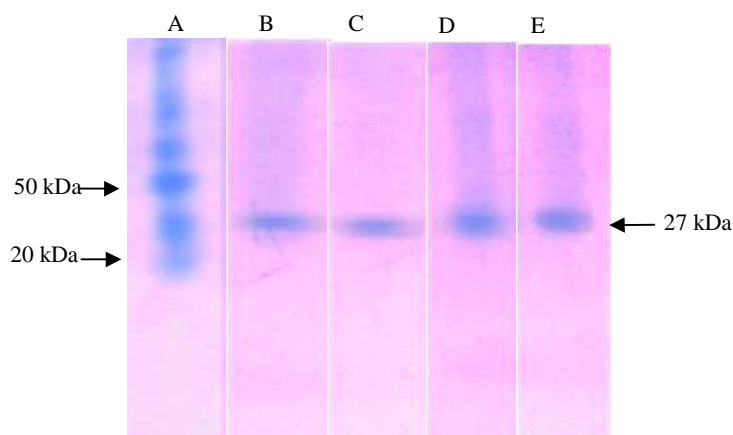


Figura 9. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas de membranas de tilacoides en plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), 2 mT de inducción y tres minutos de exposición. A. patrón de masa molar conocida; B. Crecimiento *in vitro* control; C. Crecimiento *in vitro* tratadas; D. Aclimatización control; E. Aclimatización tratadas.

En el gel, las fracciones proteicas se agruparon en una banda comprendida sólo entre los 22 - 27 kDa. Este comportamiento electroforético es característico para las proteínas del complejo LHC II, lo que corroboró la presencia de este complejo proteico tanto en las plantas tratadas como en el control.

Como se planteó con anterioridad, la cromoproteína del LHC II juega un papel fundamental en la transferencia de energía de excitación del FS II al FS I. Además, esta proteína une aproximadamente la mitad de la clorofila presente en los cloroplastos y tiene un papel importante en el apilamiento de las membranas tilacoidales, regulando la distribución de la energía de excitación entre los fotosistemas I y II (Bassi, 1990). Se conoce que varias etapas de la fotosíntesis como la absorción de la luz, las reacciones fotoquímicas, el transporte de electrones y la síntesis de ATP, tienen lugar en estas membranas (Hong y Xu, 1999).

De esta forma, en las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético el mejoramiento de las propiedades de las membranas tilacoidales desempeñarían un papel muy importante en el proceso de recuperación de la actividad fotosintética,

Los citocromos y las enzimas transportadoras de electrones relacionadas con ellos, son determinantes en el transporte de electrones a través de los mecanismos de las cromoproteínas LHC II (Collados, 2006). También se ha encontrado que la actividad citocromo-1 en *Arabidopsis thaliana* se modificó por la acción de un campo magnético externo, lo cual presupone la participación de los mismos en la respuesta de las plantas, ante la acción de este tipo de agente físico (Solov'yov y Schulten., 2009).

La aplicación del campo electromagnético de baja frecuencia probablemente actúa sobre el grupo prostético de los citocromos, por su contenido de hierro, y de esta forma pudiera incrementar el flujo de fotones fotosintéticos. A su vez incrementa la concentración de las proteínas del LHC II lo que favorece la actividad fotosintética en las plántulas de café.

Los resultados obtenidos de forma general, con el incremento de los niveles de fotosíntesis neta en las plántulas tratadas en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización, revela que un campo electromagnético de 60 Hz, nivel de inducción 2 mT durante tres minutos de exposición, produce un efecto positivo sobre la transferencia de electrones que participan en los fotosistemas en las plantas de café. Este comportamiento junto con el incremento que se obtuvo en la concentración de los pigmentos fotosintéticos, en las proteínas de los cloroplastos y la relación de la capacidad fotosintética con la regulación hídrica, demuestra el valor del tratamiento electromagnético para elevar la calidad de las plántulas obtenidas.

4.2.4- Efecto de un campo electromagnético sobre la expresión del gen *RBCS1* en plántulas de *Coffea arabica* cv. *Catuai* amarillo.

El efecto del campo electromagnético de 60 Hz de 2 mT de inducción y tres minutos de exposición se analizó también en la expresión del gen de la subunidad menor de la ribulosa 1,5- bifosfato carboxilasa (*RBCS1*) en hojas de plántulas de café en las etapas de crecimiento *in vitro* y aclimatización (Figura 10).

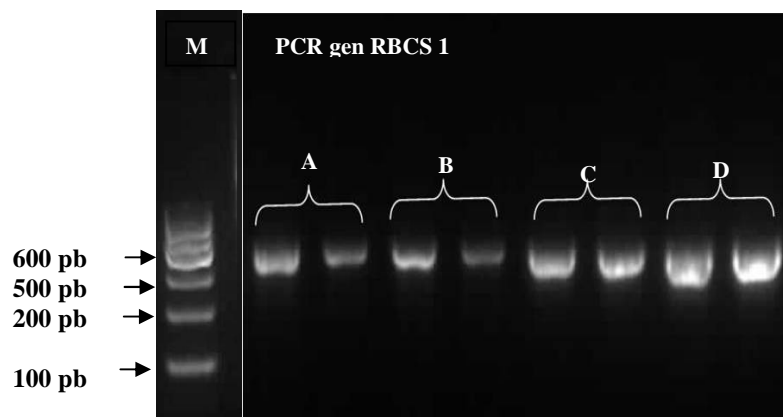


Figura 10. Electroforesis de ADNc amplificado por PCR para la identificación del gen de la subunidad menor del gen de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (*RBCS1*) en plántulas de *Coffea arabica* cv. *Catuai* amarillo bajo el efecto de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz). A. Crecimiento *in vitro* Control; B. Crecimiento *in vitro* 2 mT de inducción y tres minutos de exposición; C. Aclimatización control; D. Aclimatización 2 mT de inducción y tres minutos de exposición, M. marcador (ADN, 100 pb).

La electroforesis muestra las bandas de los fragmentos para 668 pb que se corresponde con fragmentos de ADNc del gen *RBCS1* en las dos fases del cultivo que se analizaron. Los transcritos *RBCS1* fueron altamente detectados tanto en las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético como en el control en la fase de aclimatización en comparación con los escasamente detectados en la fase de crecimiento *in vitro*. Este resultado probablemente debido al desarrollo foliar que alcanzan las hojas de las plántulas en la fase de aclimatización, si

se considera el desarrollo fotosintético en esta fase en las plántulas de café en correspondencia con los análisis del comportamiento de este proceso fisiológico anteriormente descrito.

La expresión del gen RBCS1 fue además estudiada por cuantificación en tiempo real, utilizando el gen UBQ, como gen interno de referencia. Los datos de la cuantificación relativa se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la cuantificación relativa (RQ) para el gen RBCS1 en plantas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción durante tres minutos de exposición en las diferentes fases del cultivo.

Fases del cultivo	RQ (T)	RQ (C)	RQ(T)/RQ(C)
Crecimiento <i>in vitro</i>	5,67±0,12	5,52±0,16	1,02
Aclimatización	1,84±0,07	1,00±0,06	1,83

RQ (T) (RQ Plántulas reciben 2 mTx3'); RQ(C) (RQ Plántulas control).

Al analizar los resultados de la cuantificación relativa, en ninguna de las fases se observó la sobre expresión del gen RBCS1. Sin embargo, en las plántulas de café en fase de aclimatización se obtuvo 1,83 grados de expresión relativa diferencial de este gen plantas tratadas con respecto al control.

Estos datos indican que el campo electromagnético a una frecuencia de 60 Hz, 2 mT de inducción, tres minutos de exposición, aunque no conlleva a una sobre - expresión del gen, tampoco resulta un factor estresante para las plántulas, ya que el metabolismo de la proteína relacionada con la fotosíntesis, la Rubisco, no se afectó.

Estos resultados corroboran además, los obtenidos para las variables fotosintéticas anteriormente estudiadas, que se incrementaron en las plántulas tratadas con respecto al control.

Existen pocos trabajos que relacionan la acción del campo electromagnético de 60 Hz sobre la expresión génica en sistemas vegetales, sin embargo como se ha mencionado con anterioridad, se observó la influencia que ejerce el campo electromagnético sobre la alteración en las tasas de producción de ARN, y transcritos de ARNm, ARNt y ARNr (Volpe, 2003). Este incremento en

la producción de transcritos, se asocia con el incremento por la permeabilidad de la membrana de compuestos minerales como nitrógeno y sulfuros, que son constituyentes de compuestos carbonados, como aminoácidos, proteínas, amidas, ácidos nucleicos, nucleótidos, entre otros.

Se ha descrito además, la influencia que ejercen los campos electromagnéticos sobre los nucleótidos independientes incrementando la producción de éstos (Liboff *et al.*, 2003; Galland y Pazur, 2005).

Las posibles modificaciones en el genoma del material biológico, producida por la acción de los campos electromagnéticos, no están profundamente estudiadas. Los valores de inducción magnética que generalmente se registran se encuentran en el intervalo de 100 - 250 mT. Estos valores son inferiores a los de campos alternos que pueden implicar cambios genotípicos, que se encuentran entre los 400 mT y 3 T (Suzuki *et al.*, 2001). Algunos estudios en plantas modelos como la *Arabidopsis thaliana*, demostraron que los campos magnéticos de hasta 9 T, no afectan la expresión del gen GUS, asociado a la producción de determinadas enzimas bajo condiciones de estrés fisiológico (hipoxia, bajas temperaturas o cambios geo-gravitatorios) (Yowtak, 2000). Otros autores (Paul *et al.*, 2006), evaluaron la influencia de un campo magnético de alta frecuencia (15 T - 30 T) en la expresión génica de *A. thaliana* y observaron que de 8 000 genes estudiados, 114 fueron diferencialmente 2,5 grados sobre-expresados en comparación con el control.

Algunos estudios muestran la expresión de los genes RBCS en respuesta a la luz y en diferentes tipos de tejidos. Además describen que los transcritos a partir de genes individuales se acumulan diferenciadamente y que éstos son regulados positivamente en respuesta de la luz (Gilmartin *et al.*, 1990).

En contraste, existen evidencias, que bajo condiciones de estrés muy severos o estrés aplicados durante un periodo de tiempo prolongado, disminuye los niveles de expresión génica de los homólogos RBCS y con ello la cantidad de Rubisco (Marraccini *et al.*, 2007).

En plantas superiores, se comprobó la disminución de los transcriptos de RBCS en plantas sometidas a estrés hídrico y consecuentemente la reducción de la proteína Rubisco en las hojas (Chen, 2007; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2009; Marriaccini *et al.*, 2011).

Los cloroplastos producen múltiples señales en diferentes momentos de su desarrollo y en respuesta a los cambios en el ambiente, que orquestan mayores cambios en la expresión génica a nivel nuclear. De este modo, aunque los cloroplastos dependen del núcleo para su desarrollo y función, estos ejercen un control significativo sobre el funcionamiento de la célula (Strand, 2004).

Numerosos estudios muestran que los transcriptos RBCS se acumulan diferencialmente en respuesta a la intensidad luminosa o el desarrollo del tejido. Esto plantea la posibilidad de que las subunidades RBCS pueden regular la estructura y función de la Rubisco (Spreitzer, 2003).

Por lo antes descrito, el empleo de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja a niveles de inducción 2 mT, durante tres minutos de exposición, a pesar de ser un estrés abiótico al que se sometieron las plántulas de cafeto, regula positivamente la expresión génica del gen RBCS. No obstante se deberá determinar la incidencia de este fenómeno físico sobre la proteína Rubisco, como enzima reguladora del proceso fotosintético en plantas C3.

4.2.5 Determinación de la actividad enzimática asociada al estrés de plántulas de Coffea arabica cv. Catuai amarillo en las fases de crecimiento in vitro y aclimatización bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz.

Los resultados del efecto del campo electromagnético sobre la actividad de las enzimas relacionadas con el estrés, en las fases de crecimiento *in vitro* y aclimatización de las plántulas de café se muestran en la figura 11.

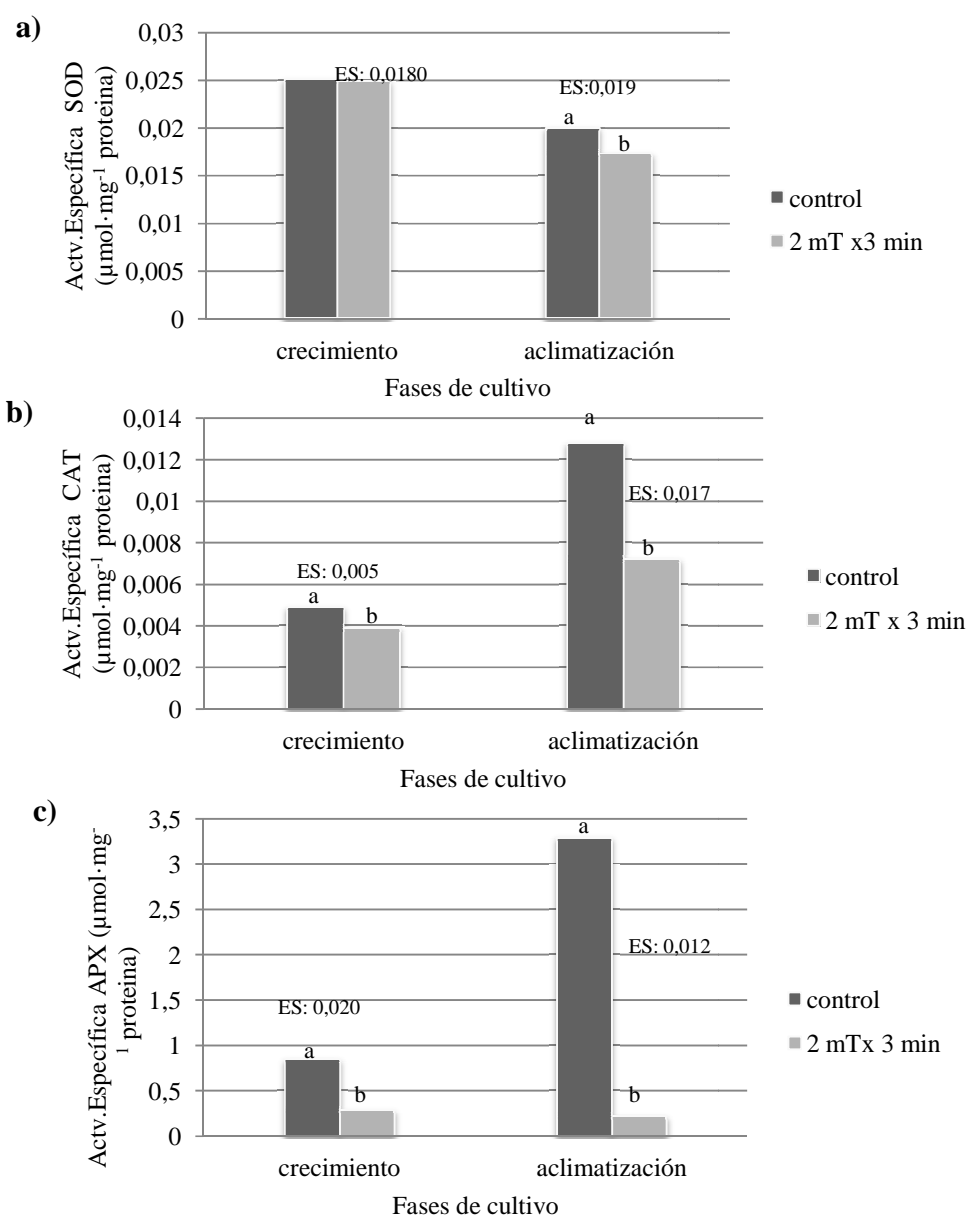


Figura 11. Actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD) (a), catalasa (CAT) (b) y ascorbato peroxidasa (APX) (c) de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo obtenidas bajo la acción de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), 2 mT de inducción tres minutos de exposición y plántulas control. Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=10$).

Como se aprecia en la fase de crecimiento los campos electromagnéticos no afectaron la actividad de la SOD, una vez que las plántulas tratadas no mostraron diferencias significativas en comparación con las plantas control. Sin embargo, en la fase de aclimatización, la actividad de la SOD disminuye en las plántulas de café que reciben el tratamiento electromagnético con diferencias significativas en comparación con las plantas control, (Figura 11a).

En el caso de la actividad específica de la catalasa disminuyó en las plántulas expuestas al tratamiento de 2 mT de inducción electromagnética durante tres minutos con diferencias significativas en comparación con las plantas control en ambas fases (Figura 11b).

De igual forma, la actividad de la APX mostró diferencias significativas en las fases de cultivo analizadas, obteniéndose los menores valores de actividad enzimática en las plántulas que recibieron el tratamiento electromagnético en comparación con el control (Figura 11c).

En el caso de la superóxido dismutasa los resultados obtenidos probablemente estén relacionados con la influencia que ejerce el campo electromagnético sobre los radicales superóxido. Estos contienen un electrón no apareado, con propiedades paramagnéticas que los hacen altamente reactivos y poseen un tiempo de vida corto por lo que, probablemente se afecta por un intervalo de tiempo continuo y prolongado de exposición al campo electromagnético (Zmys'lony *et al.*, 2000; Sahebjamel *et al.*, 2007; Mannerling *et al.*, 2010). Presumiblemente un campo electromagnético de 2 mT de inducción, tres minutos de exposición en las plántulas de café conlleva a una eliminación de los radicales superóxido y la enzima disminuyó su actividad específica por disminuir su acción catalítica por la baja concentración de sustrato disponible.

Por otro lado, en el FS II, el oxígeno de la atmósfera en estado triplete ($^3\text{O}_2$) es excitado al estado singlete ($^1\text{O}_2$) por el centro de reacción de las clorofilas $^3\text{P680}$. Se plantea que el campo electromagnético influye en la conversión del estado triplete a singlete. Por tanto, un campo

electromagnético de 60 Hz, a una inducción de 2 mT y un tiempo de exposición de tres minutos, en las plántulas de café, disminuye el rendimiento del radical superóxido, que se obtiene en el fotosistema II. De esta manera, la actividad de las enzimas también disminuye en las plántulas de café que reciben el tratamiento electromagnético en la etapa de aclimatización.

Algunos autores plantean que inducciones entre los 1 - 50 mT, provocan una alteración en los niveles de energía Zeeman (energía de inter conversión del par radical de singlete-triplete) de los radicales libres, lo que a su vez ocasionan un cambio en la velocidad o distribución del producto final del par radical (De Certains, 1992; Grisson, 1995; Cintolesi *et al.*, 2003; Solov'yov y Schulten., 2009). Estos autores asumen que estos campos magnéticos pueden afectar las reacciones químicas por cambios en la localización del espín del electrón y de esta forma ocasionar efectos positivos o negativos a nivel molecular y biológico.

La evolución del spin del par radical depende del campo electromagnético. En particular se sabe que el rendimiento de los productos tripletes disminuye para densidades magnéticas en el rango de los 10 – 50 mT y se incrementa nuevamente para valores por encima de los 200 mT (Cintolesi *et al.*, 2003; Timmel y Henbest, 2004; Solov'yov y Schulten, 2009).

Aunque se plantea que las reacciones luminosas son una fuente importante de especies reactiva del oxígeno en las células del mesófilo (Asada, 2006), la baja generación de estas (presumiblemente O_2^-) en plántulas tratadas con campo electromagnético garantiza su posterior desarrollo; los campos electromagnéticos de bajo nivel pueden modular la interconversión del estado singlete al estado triplete de los radicales superóxido, inhibiendo la tasa de producción de éstos. Ambos estados se encuentran en el centro del mecanismo del par radical (Cintolesi *et al.*, 2003; Timmel y Henbest, 2004; Solov'yov y Schulten, 2009).

Otra interpretación de los resultados se enfoca en función de que la respuesta de la actividad de la SOD frente a la acción de los campos electromagnéticos varía positiva o negativamente en dependencia de la especie vegetal, el tejido y la duración de la exposición (Shabangi y Majd, 2009). La influencia de los campos magnéticos sobre la actividad enzimática de peroxidasas, catalasa y superóxido dismutasas (Batcioglu *et al.*, 2002; Ružič y Jerman, 2002; Rochalska y Grabowska, 2007; Sahebjamel *et al.*, 2007) también varían en dependencia de la inducción y tiempo de exposición empleados. Además Møller *et al.*, (2001) al estudiar los efectos de los campos electromagnéticos en la oscilación de la reacción peroxidasa-oxidasa, observaron que existe una interrelación no lineal, entre los campos electromagnéticos y la concentración enzimática de la superóxido dismutasa. Así se justifica el comportamiento de la actividad específica de la SOD en plántulas de cafeto cv. Catuai amarillo mostrado en la figura 11a.

Conocido que dentro de las células la SOD constituye la primera línea de defensa contra las especies reactivas del oxígeno su acción catalítica genera peróxido (H_2O_2), que es convertido en agua y oxígeno por la catalasa. La detoxificación del peróxido celular a través del ciclo Asada-Halliwell es un paso importante en la defensa contra las especies reactivas del oxígeno. La APX cataliza la reacción del ácido ascórbico con el peróxido de hidrógeno con mayor afinidad que la catalasa (Taiz y Zeiger, 2006).

Los resultados de la actividad específica de la CAT y APX, probablemente se relacionen con la disminución de la acción catalítica de la SOD y con ella la producción de peróxido. Con la reducción de este sustrato, la acción de catalasa y ascorbato peroxidasa también reducen su acción catalítica y con ello actividad específica en especial en las plantas tratadas electromagnéticamente.

Es necesario señalar además que, los resultados obtenidos de incremento de la actividad de la catalasa y la ascorbato peroxidasa en las plantas control durante la fase de aclimatización se pueden relacionar con el hecho de que las plántulas durante el proceso de transición de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro* se someten a un estrés intenso, debido a los cambios que se producen en las condiciones ambientales como la luz y la humedad relativa (Kozai *et al.*, 2001; Aragón *et al.*, 2012, 2013).

Por tal motivo, en las plantas se produce un estrés abiótico que frecuentemente se manifiesta a través de la deshidratación y la foto-oxidación. Esto genera cambios en la cadena de transferencia de electrones así como en el sistema redox, lo que conlleva a un incremento de la actividad enzimática, con el objetivo de eliminar las especies reactivas al oxígeno que se originan (Gratão *et al.*, 2005).

En resumen, los resultados muestran que en las plántulas de *C. arabica* cv Catuai amarillo, la aplicación de los campos electromagnéticos a una inducción de 2 mT, producen una disminución de la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX que participan como barrera de los radicales superóxido, lo que indica que esta inducción provoca una mejor capacidad anti-estresante que favorece el metabolismo de las plántulas de café en ambas etapas, como se evidenció en los experimentos anteriores.

*4.3 Efecto a largo plazo de la exposición a un campo electromagnético de baja frecuencia en el crecimiento y desarrollo de plántulas de **Coffea arabica** cv. Catuai amarillo*

Las variables morfológicas de plantas de café de cuatro meses de edad después de tratadas con un campo electromagnético de 60 Hz, 2 mT de inducción durante tres minutos en el momento de la aclimatización, se muestra en la figura 12.

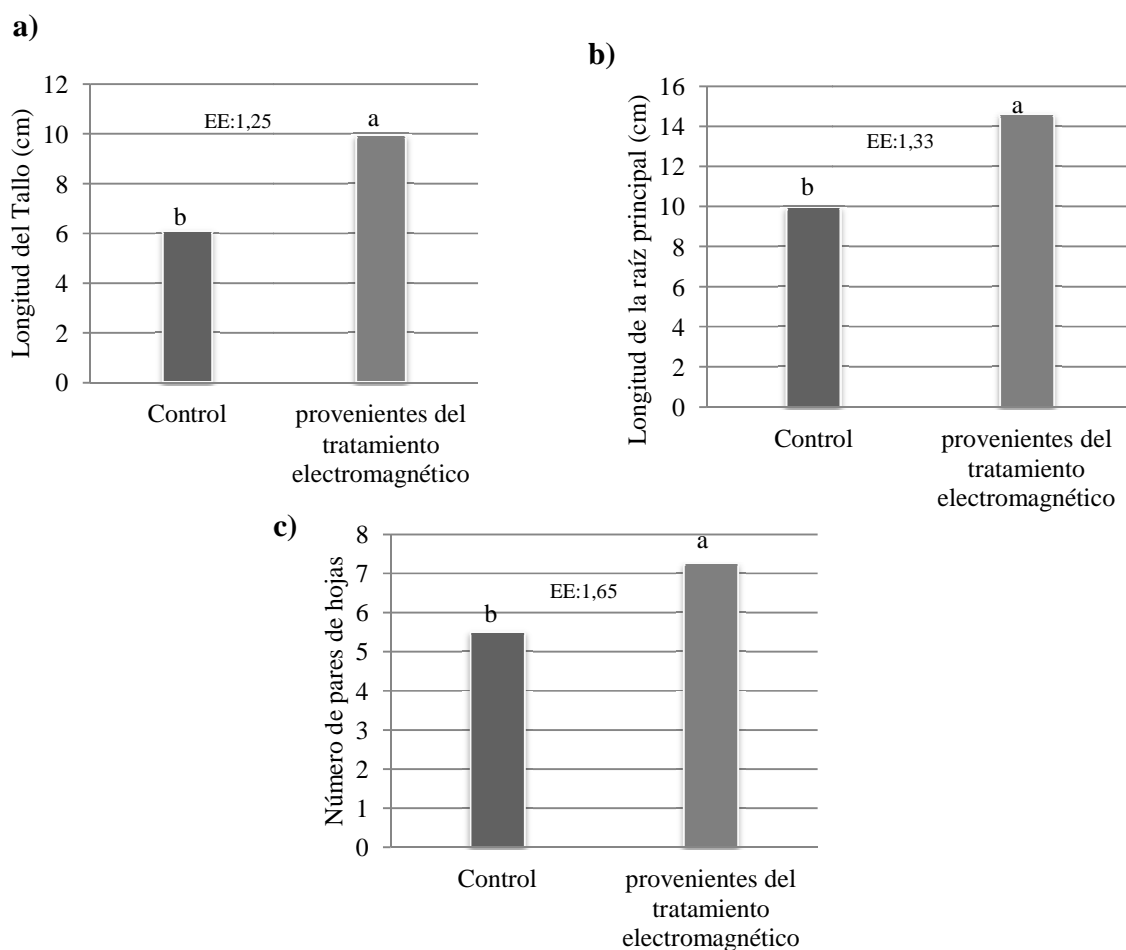


Figura 12. Variables morfológicas de plántulas de cafeto de cuatro meses de edad, crecidas después de recibir tratamiento electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) 2 mT de inducción durante tres minutos de exposición comparados con el control. Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=20$).

El análisis estadístico mostró en la media de los valores de longitud de las raíces, del tallo y el número de pares de hojas, diferencias significativas entre las plantas obtenidas cuatro meses después del tratamiento electromagnético en comparación con las plantas que no recibieron el tratamiento.

La utilización de un campo electromagnético de baja frecuencia, de 60 Hz, 2 mT de inducción durante tres minutos de exposición antes de la fase de aclimatización, estableció un efecto a

largo plazo en las plantas en su posterior crecimiento. Los resultados evidencian que las modificaciones fisiológicas que se produjeron en las plántulas durante las primeras etapas y que provocaron un efecto positivo en su crecimiento, prevalecen a lo largo de su ciclo de vida.

No existen publicaciones hasta la fecha, de la evaluación a largo plazo de los efectos de los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia, inducción de 2 mT y tiempo de exposición de tres minutos en el crecimiento de plántulas de café. Sin embargo, varios autores estudiaron el efecto de los campos electromagnéticos en el crecimiento de plántulas a partir de semillas tratadas con estos (Carbonell *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002; Florez *et al.*, 2007; Vashisth y Nagarajan, 2008; Isaac *et al.*, 2011). Cuando observaron una estimulación del crecimiento en el tallo, la raíz y números de pares de hojas en las plántulas obtenidas a partir de las semillas tratadas lo consideran la prevalencia del efecto inductor electromagnético. Pero sólo en esta investigación se estudian estos efectos sobre plántulas después de cuatro meses de crecimiento.

La incidencia de un tratamiento crónico sobre el crecimiento, pudiera estar dada por el intervalo de inducción magnética que se emplee. Las plantas generalmente están sometidas a campos magnéticos menores que 0,1 mT, por lo que variaciones de órdenes mucho mayores pueden incidir sobre algún tipo de cambios fisiológicos que provoquen modificaciones en el crecimiento (Yao *et al.*, 2005). Este mismo análisis es válido en la interpretación de los resultados mostrados en la investigación.

Según informaron Díaz *et al.* (2013), las posturas de *C. arabica* para su extracción del vivero y colocarlas en el campo, deben presentar de cinco a seis pares de hojas, no deben tener afecciones por plagas ni deficiencias nutricionales y no deben mostrar deformaciones. El tiempo desde la siembra de las semillas hasta la extracción de las posturas es de 11 meses. Con el empleo del campo electromagnético en la obtención de plántulas de *C. arabica* cv Catuai amarillo a partir de

embriones cigóticos, el periodo transcurrido no sobrepasa los 11 meses establecidos por el método tradicional y se obtienen plántulas con promedio de 7,3 pares de hojas, libres de patógenos y buenas condiciones nutricionales.

Otro factor importante a tener en cuenta en la calidad de las posturas de cafeto, es el crecimiento de la zona radical, de manera que garantice la supervivencia a la hora de la plantación, así como el desarrollo de la zona foliar. Las plántulas tratadas con campo electromagnético de baja frecuencia, después de cuatro meses de crecimiento, mostraron un promedio de 14,6 cm de longitud de las raíces, valores superiores y con diferencia significativas respecto al control.

El sistema radical de los cafetos además de ser el soporte de la planta, actúa como el principal órgano para la absorción de nutrientes y agua. Las raíces producen también diferentes sustancias con actividad hormonal que son importantes para el funcionamiento de los cafetos. En este sentido, Arcila *et al.* (2001, 2007) plantearon que en el caso del cafeto, el crecimiento de raíces absorbentes responde también a efectos climáticos debido a las diferentes condiciones de temperatura y humedad a lo largo del año. Al mismo tiempo el manejo durante el crecimiento de las plántulas y cuidados al trasplante, pueden determinar el éxito o el fracaso de una plantación al influenciar directamente en el desarrollo de las raíces.

En el cafeto es importante el desarrollo de un el sistema radical que se caracterice por una raíz pivotante notoria y muchas raíces laterales. Cuando esta raíz se atrofia puede formar un sistema radical superficial con una raíz pivotante muy corta (sistema radical plano). Este tipo de sistema radical ofrece condiciones de anclaje muy pobres (Hernández *et al.*, 2012). Cualquier factor que reduzca la profundidad de penetración de la raíz pivotante disminuye el volumen de raíces efectivas y aumenta la tendencia a la caída del arbusto. Teniendo en cuenta los resultados

obtenidos, la aplicación de un campo electromagnético durante el desarrollo de plántulas de café, permite atenuar este efecto con el desarrollo que se produce en la raíz pivotante.

Estos cambios morfológicos observados en las plántulas a los cuatro meses de edad, pudieran relacionarse con cambios fisiológicos que se producen y que son evaluados al medir los procesos de fotosíntesis neta, transpiración y concentración de pigmentos fotosintéticos (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la fotosíntesis neta, transpiración y concentración de pigmentos clorofílicos de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo de cuatro meses de crecimiento, provenientes de la fase de aclimatización.

	Fotosíntesis neta ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Transpiración ($\text{mmolH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Clorofila a ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$)	Clorofila b ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$)	Carotenoides ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$)
Control	1,77 ^{n.s}	0,88 ^a	0,0092 ^{n.s}	0,041 ^b	4,13 ^{n.s}
*Tratadas	1,83 ^{n.s}	0,52 ^b	0,0105 ^{n.s}	0,047 ^a	3,65 ^{n.s}
EE	0,67	0,01	0,015	0,002	0,5

*(Reciben tratamiento magnético 2 mT durante 3 minutos de exposición en el momento 0 de la aclimatización). Medias con letras diferentes representan diferencias significativas; n.s: diferencias no significativas Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=20$).

Los resultados mostraron que existieron diferencias significativas para los valores de transpiración y concentración de clorofila *b*, con valores superiores en las plántulas que reciben el tratamiento electromagnético en el momento de la aclimatización. Para las demás variables, no hubo diferencias significativas.

El hecho de que el contenido de clorofila *b* sea mayor con respecto a la clorofila *a*, pudiera relacionarse con que las plantas de sombra, como es el caso del cafeto, tienen una relación clorofila *b* /clorofila *a*, más alta que las plantas de sol (Taiz y Zeiger, 2006). Los resultados obtenidos con respecto a la concentración de pigmentos clorofílicos reflejan además, el efecto positivo de los campos electromagnéticos de baja frecuencia sobre la concentración de pigmentos clorofílicos y un incremento en la madurez fisiológica. Cuando la planta alcanza la maduración, los niveles de clorofilas aumentan, con un aumento de los niveles de Rubisco y la actividad fotosintética (Pal *et al.*, 2011).

Los niveles de fotosíntesis neta aunque no mostraron diferencias significativas entre las plantas tratadas con respecto al control, se observó una reducción en estas plántulas en comparación con las plántulas de las fases del crecimiento *in vitro* y la aclimatización. Este hecho pudiera estar asociado probablemente con la reorganización del aparato fotosintético y adecuación progresiva de la fotosíntesis en las plantas, que normalmente en las plántulas de café jóvenes es muy baja. López Ruiz (2004) en plantas adultas de café, obtuvo valores de fotosíntesis neta de $5 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. En los resultados obtenidos, en las plántulas jóvenes, se alcanzaron valores de $1,835 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que indicó una baja tasa de fotosíntesis neta.

De igual forma, la disminución de los valores de transpiración que se obtuvo en las plántulas tratadas con respecto al grupo control, se interpreta como una mejor regulación de la actividad estomática de estas plántulas.

Este aspecto también resalta la importancia del desarrollo del aparato estomático en las plantas durante las fases de crecimiento *in vitro*. Se demostró el desarrollo morfológico que alcanzaron las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético. Lo que permitió una mejor adaptación y mayor calidad de las plantas en la fase de aclimatización. Por tanto, en fase de plántulas, después de cuatro meses de crecimiento, las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético mantuvieron los niveles de transpiración inferiores al control. Esto sugiere un uso eficiente del agua por las plantas, que se traduce en un mayor crecimiento, como lo demuestran los resultados obtenidos.

Por otro lado el comportamiento en la concentración de carotenos en las plantas de cuatro meses de edad y que reciben el tratamiento electromagnético, indica de forma indirecta la eficiencia fotosintética de las plántulas, relacionado con el incremento en la fotosíntesis neta y concentración de pigmentos clorofílicos *b* en comparación con las plántulas control.

Al realizar el análisis de la actividad específica de las enzimas SOD y catalasa se observó que la primera no varió en ninguno de los tratamientos cuando se incrementó la segunda en las plantas que recibieron el tratamiento electromagnético en comparación con las plantas control con diferencias significativas; mientras que la actividad específica APX fue menor con diferencias significativas con respecto al control (Figura 13).

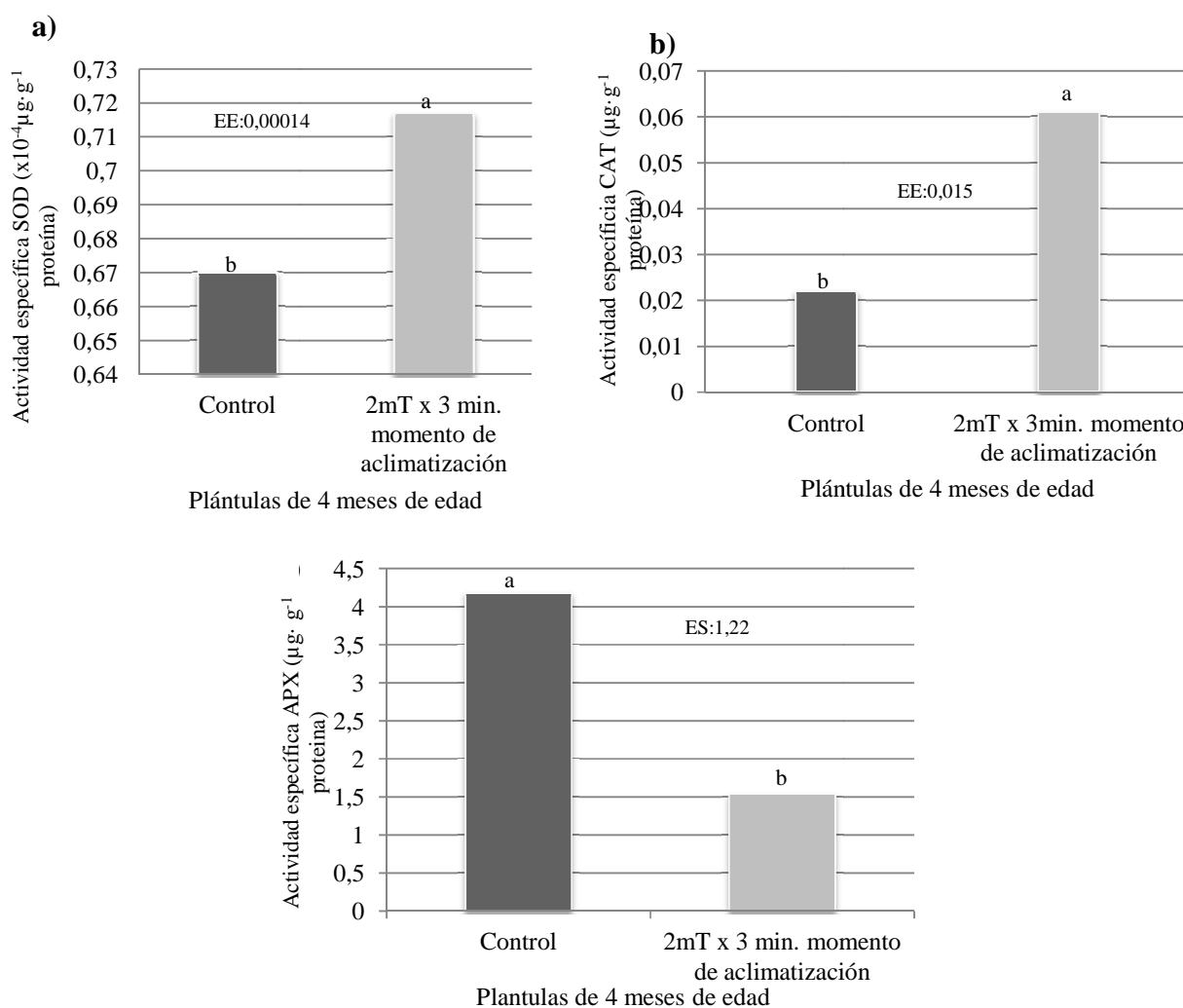


Figura 13. Actividad específica de la a) superóxido dismutasa (SOD); b) catalasa (CAT) y c) ascorbato peroxidasa (APX); de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai de 4 meses de edad, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* bajo el efecto de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) de 2 mT de inducción y tres minutos de exposición comparadas con el control. Comparación de medias (t-Student; $p \leq 0,05$; $n=10$).

Como se explicó anteriormente según los resultados, la actividad específica de estas enzimas disminuyó bajo la acción de un campo electromagnético. Sin embargo, después de cuatro meses del crecimiento de las plántulas, éstas se encuentran adaptadas a sus nuevas condiciones ambientales. Por tanto, la aparición de esta actividad específica de la SOD y CAT se relaciona más con procesos fisiológicos que generan radicales superóxido, como son los procesos fotosintéticos, que a factores ambientales.

Los centros de reacción de los FS I y FS II en los cloroplastos son los mayores centros de generación de especies reactivas al oxígeno y a su vez la foto-producción de estas especies está principalmente afectada por factores fisiológicos (Asada, 2006), y el radical superóxido no desaparece porque no está presente la acción del campo electromagnético.

Este hecho justifica la similitud en la actividad específica de la SOD en la figura 13a ya que los niveles de fotosíntesis en ambos tratamientos son similares. Si bien no se generan mayor cantidad de peróxido de hidrógeno sustrato de la catalasa, por esta razón, la actividad específica incrementada como se aprecia en la figura 13b, se justifica por la foto-respiración presentes en las plantas C3.

Las enzimas CAT, actúan específicamente en la ruta fotosintética del carbono 2 o foto-respiración. El ciclo fotosintético oxidativo del carbono (C2) actúa como una operación de recolector, para recuperar el carbono perdido durante la fotosíntesis por la reacción oxigenasa de la rubisco. El peróxido de hidrógeno liberado en el peroxisoma es destruido por la acción de la catalasa, mientras que el glixilato continúa la transaminación a glutamato y se produce el aminoácido glicina (Taiz y Zeiger, 2006).

Por tanto, este proceso llamado foto respiración puede proteger al aparato fotosintético contra la fotoinhibición a través del mantenimiento activo de la cadena de transporte de electrones,

limitando entonces la acumulación de electrones y especies reactivas al oxígeno (Da Matta *et al.*, 2002). La ruta del C2 está dirigida fundamentalmente a la recuperación de la Rubisco y producción de aminoácido glicina, de esta forma en las plantas que recibieron un tratamiento electromagnético que provocó el incremento de su actividad metabólica y aseguró su rápido y sostenido crecimiento, logran regular este proceso de merma de la eficiencia fotosintética.

Por otro lado, el incremento de las concentraciones de H₂O₂ en las hojas por el incremento de la actividad fotosintética, es importante para la inducción de los genes de las APX. Por lo que la disminución de la concentración de la actividad específica de la enzima APX, en las plantas de café de cuatro meses que fueron expuestas a un campo magnético de baja frecuencia, pudiera relacionarse con este aspecto.

Se piensa que el peróxido de hidrógeno se difunde tan fácil como el agua a través de las membranas biológicas, entonces el peróxido de hidrógeno derivado de la actividad de los cloroplastos podría funcionar como una señal plastidial y actuar como una molécula señalizadora. Algunos autores señalan que juega un papel importante en la respuesta sistémica de las plantas expuestas a un exceso de iluminación por el incremento que se produce en la fotosíntesis de estas plantas (Van Breusegem *et al.*, 2001; Pessaraki, 2002), razón que se descarta en la interpretación de estos resultados.

En sentido general se demuestra, que la aplicación de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), de 2 mT de inducción y tres minutos de exposición en la obtención de plántulas de *C. arabica* cv. Catuai amarillo que se obtuvieron a partir de embriones cigóticos, produce cambios significativos en la morfología y fisiología de las plantas. Se modifica el curso de algunos procesos fisiológicos y bioquímicos, que a largo plazo garantizaron

un mejor crecimiento de las plántulas y la obtención de posturas de mayor calidad que deberán ser introducidas en el proceso productivo.

5. CONCLUSIONES

1. La obtención de plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo a partir de embriones cigóticos, con un campo electromagnético de 2 mT de inducción y tres minutos de exposición estimuló la germinación y el crecimiento de las plantas tratadas. Así como la mejora estructural de órganos que son de interés para el crecimiento posterior de la planta.
2. La aplicación de un campo electromagnético favoreció la fotosíntesis, disminuyó la transpiración y aumentó el uso eficiente del agua en las fases de crecimiento y aclimatización; en esta última se reguló positivamente la expresión génica diferencial del gen RBCS1, favoreciendo la calidad de las plantas.
3. El campo electromagnético disminuyó la actividad específica de las enzimas SOD, CAT, APX, en las plántulas de *Coffea arabica* cv. Catuai amarillo en las etapas de cultivo estudiadas lo que evidenció una mejor capacidad anti-estresante que favoreció la actividad metabólica asociada a la calidad de las mismas.
4. La mejor calidad de las plantas en las fases tempranas de crecimiento *in vitro* y aclimatización por la aplicación del campo electromagnético prevaleció cuatro meses después del crecimiento, logrando la obtención de posturas más competentes para el proceso productivo.

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar la introducción en la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao de las plántulas de cafeto que se obtienen bajo la acción de un campo electromagnético de 60 Hz de frecuencia, 2 mT de inducción y tres minutos de exposición y evaluar los cambios morfo-anatómicos que se producen una vez establecidas en campo, teniendo en cuenta el impacto en el proceso de floración y producción de frutos.
2. Evaluar los efectos del campo electromagnético sobre proteínas que participan en la fotosíntesis y otras proteínas de membranas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALADJADJIYAN A. Study of the influence of magnetic field on some biological characteristics of *Zea mays*. J. Cent. Eur. Agri. 3: 89-94. 2002.
2. ALADJADJIYAN A., YLIEVA T. Influence of stationary magnetic field on the early stages of the development of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). Journal of Central European Agriculture. 4(2): 131-138. 2003.
3. ALI G M., KOMATSU S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. J Proteome Res. 5(2): 396-403. 2006.
4. ALIKAMANOGLU S., SEN A. Stimulation of growth some biochemical parameters by magnetic field in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue cultures. African Journal of Biotechnology. 10(53): 10957-10963. 2011
5. ALIKAMANOGLU S., YAYCILI O., ATAK C., RZAKOULIEVA A. Effect of magnetic field and gamma radiation on *Paulownia tomentosa* tissue culture. Biotechnol. Eq. 21(1): 49-53. 2007.
6. ALVES E. Curso de Microscopia Eletrônica de Varredura. Universidad Federal de Lavras. UFLA. pp 17-24. 2012.
7. AMAYA J.M., CARBONELL M.V., MARTÍNEZ E., RAYA A. Incidencia de campos magnéticos estacionarios en la germinación y crecimiento de semillas. Agricultura. 773 (Dic): 1049-71054. 1996.
8. APEL K., HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373–399. 2004.
9. ARAGÓN C., CARVALHO L., GONZALEZ-OLMEDO J.L., ESCALONA M., AMANCIO S. The physiology of *ex vitro* (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by enviromental conditions. Plant Cell Reports. Berlin. 31: 57-76. 2012.
10. ARAGÓN C., CARVALHO L., GONZALEZ-OLMEDO J.L., ESCALONA M., AMANCIO S. The physiology of *ex vitro* (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by environmental conditions: Proteomic and transcriptomic profiles. Plant Cell Reports. Berlin. DOI: 10.1007/s00299-013-1493-3. 2013.
11. ARCILA J., BUHR L., BLEIHOLDER H., HACK H., WICKE H. Application of the “Extended BBCH-Scale” for the description of the growth stages of coffee (*Coffea* spp.). Centro Nacional de Investigaciones de Café - Cenicafé. (Boletín Técnico). 23: 32 p. 2001.

12. ARCILA J., FARFAN F., MORENO A., SALAZAR L.F., HINCAPIE E. Sistemas de producción de café en Colombia. (1ra Edición). Ed. Cenicafé. Cap. 2. pp 25-28. 2007.
13. AREGA Z. Diversity of Arabica coffee populations in afro-montane rainforests of Ethiopia in relation to *Colletotrichum kahawae* and *Gibberella xylarioides*. Addis Ababa University. Tesis de maestría en Biología. p. 57. 2006.
14. ASADA K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. 141: 391-396. 2006.
15. ATAK C., OLİK C., OLGUN A., ALIKAMANOĞLU S., RZAKOULIEVA A. Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. *Biotech. Eq.* 21: 166-171. 2007.
16. AVIARA N.A., HAQUE M.A., OGUNJIMI L.A.O. Thermal properties of gona seed. *Int. Agrophysics*. 22: 291-297. 2008.
17. AZCON-BIETO J., TALÓN M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2da Edición. McGraw Hill Interamericana. 638 p. 2008.
18. AZEVEDO R.A., ALAS R.M., SMITH R.J., LEA P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant*. 104: 280-292. 1998.
19. BARAJAS-LÓPEZ J.D; BLANCO N. E., STRAND Å. Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta*, xxxx, 2012
20. BARNES F.S. Effect of electromagnetic fields on the rate of chemical reactions. *Biophysics*. 41(4): 790-797. 1996.
21. BASSI R. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochemistry and Photobiology*. 52: 1187-1206. 1990.
22. BATCIOĞLU K., CETIN OZTURK I., ATALAY S., DOGAN D., BAYRI N., DEMIRTAS H. Investigation of time dependent magnetic field effects on superoxide dismutase and catalase activity: an *in vitro* study. *J. Biol. Physics and Chem.* 2: 108.112. 2002.
23. BINHI V.N., SAVIN A.V. Molecular gyroscope and biological effects of weak of extremely low-frequency magnetic fields. *Phys. Rev. E*. 65(051912): 1-10. 2002.
24. BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. 1976.

25. CAKMAK T., DUMLUPINAR R., ERDAL S. Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. *Bioelectromagnetics*. 31: 120-129. 2010.
26. CAMPOS V.M., PASIN L.A., BARJA P.R. Photosynthetic activity and growth analysis of the plant *Costus spicatus* cultivated under different light conditions. *Eur. Phys. J. Special Topics*. 153: 527-529. 2008.
27. CAMPOS M.F., ONO E.O., RODRIGUES J. D. Desenvolvimento da parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. *Revista Ceres*. 56(01): 74-79. 2009.
28. CARBONELL M.V., MARTINEZ E., AMAYA J.M. Stimulation of germination in rice (*Oryza sativa* L.) by a static magnetic field. *Electromagn. Biol. Med*. 19(1): 121-128. 2000.
29. CARDONA A.R., DE LARRAGUE B., PEÑA RODRIGUEZ G., MARIN E., CALDERON A.A. Aplicación de la técnica fotoacústica resuelta en tiempo para el monitoreo de la fotosíntesis en plantas de lirio acuático. *Respuestas*. 13(1): 5-11. 2008.
30. CARVALHO J.M.F.C., FURTADO C.M., SILVA H., DE CASTRO J.P. Metodologia para o superbrotaamento de amendoim (*Arachis hipogaea*) através do cultivo “*in vitro*”. Campina Grande: Embrapa Algodão. Comunicado Técnico. 196: 1-3. 2003.
31. CASATE R., DE SOUZA A., JIMÉNEZ H., GARCÍA, B. Efecto del contenido de agua de las semillas sobre la respuesta al tratamiento con radiación láser. En: Resúmenes. V Taller «Las radiaciones y los isótopos en la agricultura» y II Taller «Las técnicas físicas en la agricultura». INIFAT-GIATNA. La Habana, Cuba. 8 p. 1995.
32. CASTILLA Y. Conservation of phytogenetic resources of coffee-tree (*Coffea* spp.) by biotechnological methods: an alternative to its preservation. *Cultivos Tropicales*. 33(4): 29-39. 2012.
33. CHAVES M.M., PEREIRA J.S. Water stress, CO₂ and climate change. *J Exp Bot*. 43:1131-1139. 1992.
34. CHEN Z.J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol*. 58: 377-340. 2007.
35. CINTOLESI F., RITZ T., KAY C.W.M., TIMMEL C.R., HORE P.J. Anisotropic recombination of an immobilized photoinduced radical pair in a 50-mT magnetic field: a model avian photomagnetoreceptor. *Chemical Physics*. 294: 385-399. 2003.

36. COLLADOS R. Mecanismos de regulación de la expresión de los genes de las desaturasas de plantas: adaptabilidad a la luz e influencia de los procesos redox fotosintéticos. Tesis Doctoral. Estación Experimental de Aula Dei. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Zaragoza, España. pp 37-38. 2006.
37. CORO F. Fisiología Celular: Un enfoque Biofísico. Ed. Universidad de La Habana. La Habana. 345 p. 1996.
38. DAMATTA F.M., LOOS R.A., SILVA E.A., LOUREIRO M.E. Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. J Plant Physiol. 159(9): 975-981. 2002.
39. DATTILO A.M., BRACCHINI L., LOISELLE S.A., OVIDI E., TIEZZI A., ROSSI C. Morphological anomalies in pollen tubes of *Actinidia deliciosa* (Kiwi) exposed to 50 Hz magnetic field. Bioelectromagnetics. 26: 153-156. 2005.
40. DE CERTAINES J.D. Molecular and cellular responses to orientation effects in static and homogeneous ultra high magnetic fields. Amn. Ny. Acad-Sci. 649: 35-43. 1992.
41. DE LA CRUZ G., ESTRADA S., OROZCO S., LABRADA P.M. Metodología para la micropropagación e identificación bioquímica de variedades de cafetos. Bayamo. Granma, 61 p. 1992.
42. DE SOUZA A., GARCIA D., SUEIRO L., GILART F., PORRAS E., LICEA L. Pre-sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants. Bioelectromagnetics. 27: 247-257. 2006.
43. DEL REL B., BERSANI F., AGOSTINI C., MERSICA P., GIORGIL G. Various effects in *Escherichia coli* cells due two different ELM.-MF signals. Bioelectromagnetics. 23: 347-354. 2005.
44. DHINDSA R.S., PLUMB-DHINDSA P., THORPE T.A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Botany. 32: 93-101. 1981.
45. DÍAZ W. Café y Cacao. Panorámica de su desarrollo. Principales resultados científico –técnicos de ECICC, al arribar a su XX Aniversario. Retos y perspectivas a la entrada de un nuevo siglo. En: Simposio Internacional de Café y Cacao. Cubacafé'99. 25-27 de Noviembre. Santiago de Cuba. p.16. 1999.
46. DÍAZ W., CARO P., BUSTAMANTE C., SÁNCHEZ CI., RODRIGUEZ M., VAZQUEZ E., GRAVE DE PERALTA G., RAMAJO J.L., RAMOS R., NAVARRO D., FERNANDEZ I., MARTINEZ F.,

- RODRIGUEZ Y., ARAÑÓ L., YERO A., MORAN N. Instructivo Técnico Café Arábico. Instituto de Investigaciones Agroforestales. Dirección de Café y Cacao del Grupo Empresarial. Ministerio de la Agricultura. Cuba. p 20. 2013.
- 47.DOMÍNGUEZ H., FONG A., REGUERA F., CASTILLO J. Estimulador electromagnético para cultivos *in vitro* (BioNak-03). Patente No 22602. 1999.
- 48.DOMINGUEZ-PACHECO A., HERNANDEZ-AGUILAR C., CRUZ-OREA A., CARBALLO-CARBALLO A., ZEPEDA-BAUTISTA R., MARTINEZ-ORTIZ E. Semilla de maíz bajo la influencia de irradiación de campos electromagnéticos. Rev. Fitotec. Mex. 33(2): 23-28. 2010.
- 49.DZIWULSKA-HUNEK A., KORNARZYŃSKI K., MATWIJCZUK A., PIETRUSZEWSKI S., SZOT B. Effect of laser and variable magnetic field simulation on amaranth seeds germination. International Agrophysics. 23: 229-235. 2009.
- 50.EICHWALD C., WALLECZEK J. Model for magnetic field effects on radical pair recombination in enzyme kinetics. Biophys. J. 71: 623-631. 1996.
- 51.ESAU K. Tratado de Botánica. New York, Wiley-Interscience. 336 p. 1995.
- 52.ESITKEN A. Effect of magnetic fields on yield and growth in strawberry 'Camarosa'. J. Hort. Sci. Biotechnol. 78(2):145-147. 2003.
- 53.ESTRADA-LUNA A., DAVIES JR., EGILLA J. Physiological change and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 17-24. 2001.
- 54.FAHL J. I., CARELLI M.L.C., VEGA J., MAGALHAES A.C. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). J. Hort. Sci. 69: 161-169. 1994.
- 55.FELLER U., ANDERS I., MAE T. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. J Exp Bot. 59(7): 1615-1624. 2008.
- 56.FERNÁNDEZ M. J. El cultivo del cafeto. T1. Editorial Científico Técnica. La Habana. Cuba. 177-280. 1988.
- 57.FERNÁNDEZ DA SILVA R. Establecimiento de un método para la transformación genética de café (*Coffea arabica* cv. Catimor) e incorporación del gen *bar* que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Act. Cult. Veg. 54(4): 284-287. 2003.

58. FERNÁNDEZ A.P., STRAND Å. Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 509-513. 2008.
59. FERRER A. Estudio del efecto del campo magnético en la micropropagación de caféto (*Coffea arabica* L.) var. Caturra Rojo. Tesis en opción al Título de master en Biotecnología. Santiago de Cuba. 2000.
60. FLOREZ M., CARBONEL M.V, MARTINEZ E. Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth. *Environ. Exp. Bot.* 59: 68-75. 2007.
61. FRIEND, D. J. C. Shade adaptation of photosynthesis in *Coffea arabica* L. *Photosynthesis Research.* 5: 325-334. 1984.
62. FUNG Y., FERRER A., ISAAC E., BOTTA A. Efecto de la onda sinusoidal en el establecimiento *in vitro* de embriones de caféto (*Coffea arabica* L.). *Rev. Café y Cacao.* 3(2): 25-29. 2002.
63. GALLAND P., PAZUR A. Magnetoreception in plants. *J. Plant Res.* 118(6): 371-389. 2005.
64. GARCIA F., ARZA L. Influence of stationary magnetic field on water relation in lettuce seeds. Part I: Theoretical considerations. *Bioelectromagnetics.* 22: 589-595. 2001.
65. GEORGE E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology. 2da Edición. Cap 9. p 256-268. 1993.
66. GILMARTIN P.M., SAROKIN L., MEMELINK J., CHUA N.H. Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell.* 2(5): 369-378. 1990.
67. GONZÁLEZ E., HERNÁNDEZ M.M., MAZORRA L.M, RODRÍGUEZ Y., CABRERA M. Influencia de la época del año y el genotipo en la respuesta morfogénica y bioquímica de explantes foliares *Coffea canephora* P. var. Robusta empleados para la formación de callos. *Revista de Biotecnología Vegetal.* 6(1): 121-129. 2006.
68. GONZÁLEZ E., CASTILLA Y., HERNÁNDEZ A. Empleo de métodos biotecnológicos para la conservación de recursos fitogenéticos de caféto (*Coffea* sp.) (Rubiaceae) en Cuba. *Revista Actualidades Biológicas.* 29(1): 119-127. 2007.
69. GONZÁLEZ E., CASTILLA Y, HERNÁNDEZ A. Obtención de suspensiones celulares y embriones somáticos de caféto (*Coffea canephora* P.), con el empleo de metabolitos bacterianos. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 13 (1): 123-131. 2011.
70. GRATÃO P.L., POLLE A., LEA P.J., AZEVEDO R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* 32: 481- 494. 2005.

71. GRISSOM B. Magnetic field effects in biology: A survey of possible mechanism with emphasis on radical-pair recombination. *Chem. Rev.* 95: 3-24. 1995.
72. GUTTERIDGE S., GATENBY A. Rubisco synthesis, assembly, mechanism, and regulation. *Plant Cell.* 7(7): 809-819. 1995.
73. HAYANO-KANASHIRO C., CALDERÓN-VÁZQUEZ C., IBARRA-LACLETTE E., HERRERA-ESTRELLA L., SIMPSON J.: Analysis of gene expression and physiological responses in three mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS ONE.* 4 (10):e7531. 2009.
74. HERNÁNDEZ E., CAMPOS G.V., ENRÍQUEZ J.R., RODRÍGUEZ-ORTIZ G., VELASCO V.A. Carbon sequestration by *Inga jinicuil* Schltdl in a shadow coffee agroforestry system. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales.* 3(9): 11-22. 2012.
75. HERRERA J.C., CAMAYO G.C. Caracterización morfológica y citológica de árboles de *Coffea arabica* L. regenerados por cultivo *in vitro* de polen aislado. *Cenicafé.* 59(2): 143-158. 2008.
76. HONG S.S., XU D.Q. Reversible inactivation of PS II reaction centers and the dissociation of LHC II from PS II complex in soybean leaves. *Plant Sci.* 147: 111-118. 1999.
77. HSIN-HSIUNG H., SHOW-RAN W. The effects of inverter magnetic fields on early seed germination of mung beans *Bioelectromagnetics.* 29(8): 649-657. 2008.
78. ICO. International Coffee Organization, "ICO Annual Review 2013".on line: <http://www.ico.org/>. Revisado en abril. 2013.
79. ISAAC E. Efecto del Biobras-16 y un biopreparado de *Trichoderma reesei* sobre plantas de café en fase de aclimatización. Tesis en opción al título de Master en Biotecnología vegetal. Centro de Bioplantas UNICA. 2002.
80. ISAAC E., RODRÍGUEZ O.A., PÉREZ Y. Efecto del tiempo de exposición y niveles de inducción a los campos electromagnéticos en la concentración de pigmentos. *Tecnología Química.* 24 (Edición especial): 78-80. 2007.
81. ISAAC E., GONZÁLEZ-OLMEDO J., PÉREZ A., ARAGÓN C. Caracterización del intercambio gaseosos asociado con la actividad fotosintética de dos variedades de *Coffea arabica* obtenidas por cultivo *in vitro*. *Cultivo Tropicales.* 2: 74-76. 2010.

82. ISAAC E., HERNÁNDEZ C., DOMÍNGUEZ A. ORNETA A. Efecto pre-siembra del tratamiento electromagnético sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.). *Agronomía Colombiana*. 29(2): 213-220. 2011.
83. KARNAUKHOV A.V. Estructuras disipativas en campos magnéticos débiles. *Biofísica*. 39(6): 1009-1014. 1994.
84. KESSEL A. Aplicación de técnicas biotecnológicas en frutales, una vía valiosa para el rescate y conservación de estas especies. *Rev. Cultivos Tropicales*. 29(3): jul-sep. 2008.
85. KOZAI T., KUBOTA CH. Developing photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *J. Plant Research*. 114(4): 525-537. 2001.
86. KULA B., SOBCZACK A., KUSKA R. Effects of electromagnetic field on free-radical process in stell workers. Part 1: Magnetic field influence on the antioxidant activity in red blood cells and plasma. *J Occup Healt*. 44(4): 226-229. 2002.
87. LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685. 1970.
88. LAMBERS H., CHAPIN F.S., PONS T.L. *Plant physiological ecology*. New York: Springer-Verlag. p540. 1998.
89. LAWLOR DW., CORNIC G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ*. 25(2):275-294. 2002.
90. LIBOFF A.R. Geomagnetic cyclotron resonance in living cell. *J. Bio. Physc*. 13: 99-102. 1985.
91. LIBOFF A.R., CHERNG S., JENROW K.A., BULL A. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity is altered by 20 mT magnetostatic fields. *Bioelectromagnetics*. 24:32-38. 2003.
92. LITZ R. "Cultivo de embriones y óvulos". En: *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Roca y Mroginsky editores. p 295-312. 1991.
93. LÓPEZ-RUIZ, J. C. Comportamiento del intercambio gaseoso de *Coffea arabica* L. en tres altitudes de la zona cafetalera central colombiana. *Cenicafé*. 55(3): 202-212. 2004.
94. LUCCHESINI M., SABATINI A.M., VITAGLIANO C., DARIO P., HAYASHI M., KANO A., GOTO E. The pulsed electro-magnetic field stimulation effect on development of *Prunus cerasifera* *in vitro* derived plantlets. *Acta Hort*. 319: 131-136. 1992.

95. MANNERLING A.C., SIMKO M., MILD K.H, MATTSSON M.O. Effects of 50-Hz magnetic field exposure on superoxide radical anion formation and HSP70 induction in human K562 cells. *Radiat Environ Biophys.* 49(4): 731-734. 2010.
96. MARQUES L., PASCUAL M., REZENDE A., BARRETO A., CAVALCANTE-ALVES J. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: Influência de NAA e BAP. *Ciênc. Agrotec.* 25(5): 1063-1070. 2001.
97. MARRACCINI P., DA SILVA V.A., ELBELT S., GUIMARÃES B.L.S, LOUREIRO M.E., DAMATTA F.M., FERRÃO M.A.G., DA FONSECA A.F.A., DA SILVA F., ANDRADE A.C. Análise da expressão de genes candidatos para a tolerância a seca em folhas de clones de *Coffea canephora* var Conillon, caracterizados fisiologicamente. Proceedings of the V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil Aguas de Lindoia (SP), Brasil. 2007.
98. MARRACCINI P., FREIRE L., ALVES G.S.C, VIEIRA N., VINECKY F., ELBELT S., RAMOS H.J.O, MONTAGNON C., VIEIRA L.G.E., LEROY T., POT D., SILVA V. A., RODRIGUES G.C., ANDRADE A. C. *RBCS1* expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. *BMC Plant Biology.* 11(85): 2-27. 2011.
99. MARTÍNEZ E., CARBONELL M., DUARTE, C. Efecto del tratamiento magnético en la germinación del arroz (*Oriza sativa* L.). *Alimentaria.* Julio- Agosto: 95-98. 1999.
100. MARTINEZ C., HARRY I.S., THORPE T.A. Optimization of buds in cotyledonary explant of *Pinus canariensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 29(2): 47-255. 1999a.
101. MARTÍNEZ E., CARBONELL M.V, FLOREZ M. Magnetic biostimulation of initial growth stages of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electromagn. Biol. Med.* 21(1): 43-53. 2002.
102. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ E., BARRIOS G., ROVESTI L., SANTOS R. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Ed. Torralba. España. 101-103. 2007.
103. MISHRA K., SLATER A. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. *Biotech. Research Intern.* Vol. Article ID 580857. 17 p. DOI:10.1155/2012/580857. 2012.
104. MØLLER I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591. 2001.
105. MOSQUERA S. Medida de la magnitud de la foto-respiración y respiración mitocondrial en hojas de diferentes cultivares de *Coffea arabica* L. Editorial Popayán. Colombia. 103 p. 1995.

106. MOSQUERA-SÁNCHEZ L., RIAÑO N., LÓPEZ Y., ARCILA J. Net photosynthesis and CO₂ compensation concentration in three coffee (*Coffea* sp.) genotypes and beans under three temperatures. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin*. 58(2): 2827-2835. 2005.
107. MUNISWAMY B., SREENATH H. Standardization of encapsulation technique for producing synthetic seeds in coffee. In: *Coffee Biotechnology and Quality. Proceeding of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry*. Londrina, Brazil. 135-142. 2000.
108. MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497. 1962.
109. NAKANO Y., ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 22: 867-880. 1981.
110. NAMBA K., SASAO A., SHIBUSAMA S. Effect of magnetic field on germination and plant growth. *Acta Hort*. 399: 143-145. 1995.
111. NGUYEN Q.T, KOZAI T., NIU G., NGUYEN U.V. Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlet *in vitro* in response to different CO₂ concentrations and light intensities. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 55: 133-139. 1999.
112. NIELD J., BARBER J. Refinement of the structural model for the photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1757: 353-361. 2006.
113. NILSEN E.T., ORCUTT D.M. *The Physiology of Plants under Stress: Abiotic Factors*. New York, John Wiley & Sons. 689 p. 1996.
114. NIMMI V., MADHU G. Effect of pre-sowing treatment with permanent magnetic field on germination and growth of chili (*Capsicum annun* L.). *Int. Agroph*. 23: 195-198. 2009.
115. NOSSOL B., BUSE G., SILNY J. Influence of weak static and 50 Hz magnetic fields on the redox activity of cytochrome-C oxidase. *Bioelectromagnetics*. 14(4): 361-72. 1993.
116. NUNES M., BIERHUIZEN J., PLOEGMAN C. Effect of light, temperature and CO₂ concentration on photosynthesis of *Coffea arabica* L. *Acta Botánica Neerlandica*. 17: 93-102. 1968.
117. NUTMAN F. J. Studies of the physiology of *Coffea arabica*: photosynthesis of coffee leaves under natural conditions. *Annals of Botany*. 1 (3): 353-367. 1937.
118. PAL R., SINGH O., MUKES H. Cloning and transformation of rbc L gene in *Solanum melongena* L. *Recent Research in Science and Technology*. 3(12): 46-52. 2011.

119. PARRY M.A.J., ANDRALOJC P.J., MADGWICK P.J., KHAN S., LEA P.J., MEDRANO H., KEYS A.J. Rubisco activity: effects of water stress. *Ann Bot.* 89(7): 833-839. 2002.
120. PARRY M., KEYS A., MADGWICK P., CARMO-SILVA A., ANDRALOJC P. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J. Exp. Bot.* 59(7): 1569-1580. 2008.
121. PATARROYO M. Composición química del café y sus efectos en la salud. Conferencia presentada en el marco del XXI Simposio Latinoamericano de Caficultura Gotas de Café. El café es vida. Boletín Informativo.1: 3. 2006. online: <http://www.procafe.com.sv>. Revisado enero. 2009.
122. PAUL A.L, FERL R.J., MEISEL M. W. High magnetic field induced changes of gene expression in Arabidopsis. *BioMagnetic Research and Technology.* 4(7):1-10. 2006.
123. PESSARAKLI M. Handbook of Plant and Crops Physiology. 2dn edition. Ed. Marcel Dekker Inc. Cap. 33. 659 p. 2002.
124. PETER T.P., THORNER J. P. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *The Journal of Biological Chemistry.* 266: 16745-16754. 1991.
125. PHIRKE P.S., KUBDE A.B., UMBARKAR S.P. The influence of magnetic field on plant growth. *Seed Sci. Technol.* 24: 375-392. 1996.
126. PICCA A., CARDONE S. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, Parte III: Métodos para generar variabilidad. Ediciones INTA. Cap. 4. 135-144. 2004.
127. PIERIK R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa. 326 p. 1990.
128. PIETRUSZEWSKI S., MUSZYŃSK S., DSIWULSKA A. Electromagnetic fields and electromagnetic radiation as non invasive external stimulants for seeds (select method and responses). *Int. Agroph.* 21: 95-100. 2007.
129. PIMENTEL C. Metabolismo del carbono. Editorial Seropédica. UFRRJ. Brasil. pp: 77-79. 1998.
130. PODLEŚNY J., PIETRUSZEWSKI S., PODLEŚNA A. Influence of magnetic stimulation of seeds on the formation of morphological features and yielding of the pea. *Int. Agroph.* 19: 61-68. 2005.
131. POLK C., POSTOW E. Handbook of biological effects of electromagnetic fields. 3ra Edición. Ed. Taylor & Francis Group, LLC. 503 p. 2006.
132. POSPISILOVÁ J., SYNKOVA D., HAISEL D., SEREMADOVA S. Acclimatization of plantlets to *ex vitro* conditions: Effect of air, humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). *Acta Hort.* 748: 29-38. 2007.

133. RĂCUCIU M., CAUGARU G.H, CREANGA D.E. Static magnetic field influence on some plant growth. Romania Journal of Physics. 51(1-2): 245- 251.2006.
134. RAJENDRA P., NAYAK H.S., SASHIDHAR R. B , SUBRAMANYAM C., DEVENDRANATH D.,GUNASEKARAN B., ARADHYA R. S. S., BHASKARAN A. Effects of power frequency electromagnetic fields on growth of germinating *Vicia faba* L., the broad bean. Electro. Biol. and Medicine. 24(1): 39-54. 2005.
135. RAMAKERS C., RUIJTER J.M., DEPREZ R.H., MOORMAN A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett. 339(1): 62-66. 2003.
136. REDDY A.R., CHAITANYA K.V., VIVEKANANDAN M. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J Plant Physiol. 161(11): 1189-1202. 2004.
137. REINA F.G., PASCUAL L.A., FUNDORA I.A. Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part 2: Experimental results. Bioelectromagnetics. 22: 596-602. 2001.
138. RIZHSKY L., LIANG H., MITTLER R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiol. 130(3): 1143-1151. 2003.
139. RIZHSKY L., LIANG H., SHUMAN J., SHULAEV V., DAVLETOVA S., MITTLER R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. Plant Physiol. 134(4): 1683-1696. 2004.
140. ROCA W.M., MROGINSKI L.A. Cultivo de Tejidos: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Costa Rica. pp: 95-126. 1991.
141. ROCHALSKA M., GRABOWSKA K. Influence of magnetic fields on the activity of enzymes: α - and β -amylase and glutathione S-transferase (GST) in wheat plants. Int. Agrophys. 21: 185-188. 2007.
142. ROCHALSKA M., ORZESZKO-RYWKA A. Magnetic field treatment improves seed performance. Seed Sci. Technol. 33: 669-674. 2005.
143. RUŽIČ R., JERMAN I., JEGLIC A., FEFER D. Electromagnetic stimulation of buds of *Castanea sativa* Mill. in tissue culture. Electromag. Biol. and Med. 11(2): 145-153. 1992.
144. RUŽIČ R., JERMAN I. Weak magnetic field decreases heat stress in cress seedlings. Electromag. Biol. Med. 21(1): 69-80. 2002
145. SAHEBJAMEL H., ABDOLMALEKI P., GHANATI F. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultures tobacco cells. Bioelectromagnetics. 28: 42-47. 2007.

146. SHABRANGI A., MAJD A. Comparing effects of electromagnetic fields (60 Hz) on seed germination and seedling development in monocotyledons and dicotyledons. PIERS Proceedings, Moscow, Russia, August. 18(21): 704-709. 2009.
147. SOLOV'YOV I., SCHULTEN K. Magnetoreception through cryptochrome may involve superoxide. Biophysical Journal. 96: 4804–4813. 2009.
148. SONDHAL M., LAURITIS J. Coffee. In: Hammerschlag F., Litz, R.E. (Ed.). Biotechnology of perennial fruit crops. Berlin. Springer Verlag, pp: 401-420. 1992.
149. 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. 27: 1187-1195. 1976.
150. SPREITZER R.J. Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Arch Biochem. Biophys. 414(2): 141-149. 2003.
151. STANGE B.C., ROWLAND R.E., RAPPLEY B.I., PODD J.V. ELF magnetic fields increase aminoacid uptake into *Vicia faba* L. roots and alter ion movement across the plasma membrane. Bioelectromagnetics. 23: 47–354. 2002.
152. STRAND A. Plastid-to-nucleus signaling. Current Opinion in Plant Biology. 7: 621-625. 2004.
153. SUJAK A., DZIWULSKA-HUNEK A. Minerals and fatty acids of amaranth seeds subjected to pre-sowing electromagnetic stimulation. International Agrophysics. 24(4): 375-379. 2010.
154. SULLIVAN J.A., GRAY J.C. Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea lip1 mutant. Plant Cell. 11: 901-910. 1999.
155. SUZUKI Y., IKEHATA M., NAKAMURA K., NISHIOKA M., ASANUMA K., KOANA T. Y SHIMIZU H. Induction of micronuclei in mice exposed to static magnetic fields. Mutagenesis. 16(6): 499-501. 2001.
156. SVEINSDÓTIR H., YAN F., ZHU Y., PEITER-VOLK T., SCHUBERT S. Seed ageing induced inhibition of germination and post-germination root growth is related to lower activity of plasma membrane H^+ ATPase in maize roots. Journal of Plant Physiology. 166(2): 128-135. 2009.
157. TAIZ L, ZEIGER E. Plant Physiology. (4ta edition). Sinauer Associates Inc. Massachussets. Cap 5. pp: 80-83. 2006.
158. TAMBUSSI E., BARTOLI C., BELTRANO J., GUIAMET J., ARAUS J. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). Physiologia Plantarum. 108: 398-404. 2000.

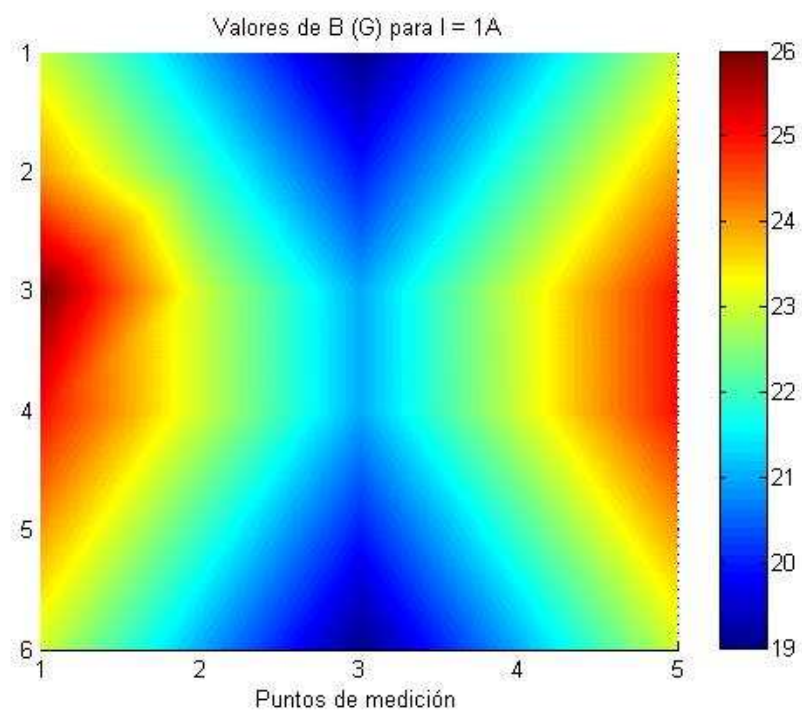
159. TEICHERT S., DÁVILA M., MEDIEROS G. SEMENTES: Fundamentos Científicos y tecnológicos. Ed Bibliotecaria. Pelotas Brasil. Cap 2. pp 113. 2003.
160. TIMMEL C., HENBEST K. A study of spin chemistry in weak magnetic fields. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a- Mathematical Physical and Engineering Sciences. 362: 2573-2589. 2004
161. TRINDADE S., ELOY R. C., DE TOLEDO M. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência Quim. Nova. 29(6): 1164-1169. 2009.
162. UBEDA A., LEAL J., TRILLO M., JIMENEZ M., DELGADO J. Pulse shape of magnetic fields influence chick embryogenesis. J. Anat. 137: 513-536. 1983.
163. URSACHE M., MINDRU G., CREANGĂ E., TUFESCU F.M., GOICEANU C. The effects of high frequency electromagnetic waves on the vegetal organisms. Rom. J. Phys. 54 (1-2): 133-145. 2009.
164. VAN BREUSEGEM F., VRANOVÁ E., DAT J.F., INZÉ D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science 161. 405- 414. 2001.
165. VASHISTH A., NAGARAJAN S. Exposure of seeds to static magnetic field enhances germination and early growth characteristic in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Bioelectromagnetics. 29: 571-578. 2008.
166. VOLPE P. Interactions of zero-frequency and oscillating magnetic fields with biostructures and biosystems. Photochem. Photobiol. Sci. 2: 637-648. 2003.
167. YAMAGUCHI D., FRIEND D.J.C. Effect of leaf and irradiance on photosynthesis of *Coffea arabica* L. Photosynthetica. 13: 271-278. 1968.
168. YANO A., OHASHI Y., HIRASAKI T., FUJIWARA K. Effects of a 60 Hz magnetic field on photosynthetic CO₂ uptake and early growth of radish seedlings. Bioelectromagnetics. 25: 572-581. 2004.
169. YAO L., LI Y., YANG Y, LI C. Effects of Seed pretreatment by magnetic field on the sensitivity of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings to ultraviolet-B radiation. Environmental and Experimental Botany. 54(3): 286-294. 2005.
170. YAYCILI O., ALIKAMANOGLU S. The effect of magnetic field on Paulownia tissue culture. Plant. Cell Tissue Org. Cult. 83: 109-114, 2005.

171. YOWTAK J. Transgenic Arabidopsis plants as the subject of magnetic field effects. Web site: Department of Physics, University of Florida, Gainesville FL & University of Dallas. Agosto-2000.
172. ZMYŚLONY M., PALUS J., JAJTE J., DZIUBAŁTOWSKA E., RAJKOWSKA E. DNA damage in rat lymphocytes treated *in vitro* with iron cations and exposed to 7mT magnetic fields (static or 50 Hz). Mutat Res. 453: 89-96. 2000.
173. ZOBAYED S.M.A., AFREEN F., KOZAI T. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. In vitro Cell. Devol Biol. Plant. 37: 807-813. 2001.

a)



b)



Anexo 1: Estimulador electromagnético local BioNaK-03. a) Vista de las plántulas en el interior de las bobinas. b) Mapa de la distribución del campo electromagnético en el interior del equipo.