

Genética y mejoramiento

Efecto del estrés hídrico sobre el comportamiento de cultivares de *Coffea arabica* bajo condiciones *in vitro*¹

Ramón Antonio Ramos-Navas*, Tesfaye Shimer**, Taye Kufa**, Felipe Martínez-Suárez*, Endale Taye**, Wondyifraw Tefera**, Endale Gebre*** y Ayelign Menegecha**

Resumen

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología en el Centro de Investigaciones Agrícolas de Gima (Jimma Agricultural Research Centre), al suroeste de Etiopía; en el período comprendido entre enero y octubre de 2007, con el objetivo de evaluar el efecto del estrés osmótico (estrés hídrico) sobre el crecimiento del tallo y raíces de cuatro cultivares de *Coffea arabica* bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Se utilizaron muestras de semillas maduras de cuatro cultivares de *Coffea arabica* (Aba Buna, F-59, 7487 y Gawe) producidas en la temporada de 2006 a 2007 y beneficiadas por el departamento de Coffee Breeding y Coffee Agronomy de JARC. Los embriones cigóticos se depositaron sobre el medio basal SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), conteniendo BAP (0,02 mg/L), ANA (0,02 mg/L) y GA₃ (0,05 mg/L). Se utilizaron seis concentraciones del agente osmótico Manitol (0, 2, 4, 6, 8 y 10 %) por cada genotipo de café. Se encontraron diferencias significativas entre los germoplasmas de café sometidos al estrés ($p < 0,05$) para la longitud de la raíz. El crecimiento de la raíz de los cuatro cultivares fue significativamente inhibido con el estrés osmótico producido por el uso del Manitol. Sin embargo, una concentración de Manitol al 2 % produjo la estimulación en la elongación de la raíz a los 20 días y 45 días luego del tratamiento. Las dosis letales (DL) para el crecimiento de la raíz fueron del 6 % de Manitol a los 20 días, y 6,5 % de Manitol a los 10 y 45 días.

Palabras clave: estrés osmótico, estrés hídrico, cultivo de tejido, cultivo de embriones.

Abstract

The investigation was developed in the biotechnology laboratory in the Centro de Investigaciones Agrícolas of Gima (Jimma Agricultural Research Centre), to the Southwest of Ethiopia; between January and October of the 2007 period; to value the effect of the osmotic stress (water stress) on the growth of the stalk and roots of four cultivars of *Coffea arabica* under cultivation conditions *in vitro*. Samples of mature seeds of four *Coffea arabica* cultivars were used (Aba Buna, F-59, 7487 and Gawe), taken place in the season from the 2006 to the 2007 and benefitted by Coffee Breeding department and Coffee Agronomy of JARC. The zygotic embryos were deposited on the basal means SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), containing BAP (0.02 mg/L), ELL (0.02 mg/l) and GA₃ (0.05 mg/L). Six concentrations of the Manitol osmotic agent's (0, 2, 4, 6, 8 and 10 %) were used for each coffee genotype. A significant differences among the coffee germplasm subjected to the stress ($p < 0.05$) for the root longitude. The growth of the root of the four cultivars was significantly inhibited with the osmotic stress taken place by the use of the Manitol. However, a Manitol concentration to 2 % produced the stimulation in the elongation from the root to the 20 days and 45 days after the treatment. The lethal doses (DL) for the root growth were 6 % from Manitol to the 20 days and 6.5 % from Manitol to the 10 days and 45 days.

Key words: osmotic stress, water stress, tissue culture, embryos cultivation.

¹ Recibido: 24/12/2010

Aprobado: 2/5/2011

* Estación Experimental Agro-Forestal Tercer Frente, Santiago de Cuba. genetica1@tercerfrente.inaf.co.cu

**Jimma Agricultural Research Centre (JARC), P. Bo. Box 192, Jimma, Ethiopia

*** Ethiopian Institute of Agricultural Research (EIAR), Addis Ababa, Ethiopia

Introducción

El agua es un componente fundamental del metabolismo de los organismos vivos, facilitando diferentes reacciones biológicas por ser el solvente el medio de transporte y el refrigerante (Bohnert, Nelson y Jensen, 1995). En las plantas y otros fotoautotróficos el agua juega el papel adicional de proporcionar la energía necesaria para desarrollar la fotosíntesis. Las moléculas de agua son divididas en un proceso de autólisis para rendir los electrones que se usan en este proceso (Salisbury y Ross, 1992).

El estrés provocado por la sequía es uno de los factores más importantes que limitan altos rendimientos de las cosechas a nivel mundial (Jones y Corlett, 1992). Los síntomas más notorios de déficit de agua son crecimiento reducido, disminución en la eficiencia del uso del CO₂ por cierre de estoma y senescencia temprana de hojas más viejas (Bradford y Hsiao, 1982).

El déficit de humedad es uno de los principales problemas que impiden la expansión del café en áreas del norte de Etiopía. En este contexto se han realizado diversos esfuerzos en condiciones controladas y de campo en el sudeste de Etiopía con el objetivo de entender los mecanismos de tolerancia a la sequía e identificar y mejorar los genotipos tolerantes (Tesfaye, 2006). Desarrollar técnicas de campo para evaluar resistencia de los genotipos a la sequía es engorroso.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del estrés osmótico (estrés hídrico) sobre el crecimiento del tallo y raíces de cuatro cultivares de *Coffea arabica* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Jimma Agricultural Research Centre (JARC), sureste de Etiopía, durante el período comprendido entre enero y octubre de 2007. Muestras de semillas maduras de cuatro selecciones de *Coffea arabica* (Aba Buna, F-59, 7487 y Gawe) producidas en la temporada de 2006 a 2007 y beneficiadas por el departamento de Coffee Breeding y Coffee Agronomy de JARC, se usaron en la presente investigación.

Las semillas fueron seleccionadas en el laboratorio teniendo en cuenta el vigor, color y sanidad. Posteriormente se sumergieron en una solución de ácido fórmico (1,6 % v/v) por 30 min, lavadas tres veces con agua desti-

lada estéril y sumergidas en una solución de ácido bórico (0,5 %) por 72 h. En la segunda desinfección las superficies de las semillas fueron esterilizadas en un 20 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 20 min, seguido por tres lavadas con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas en la cabina de flujo laminar (Ramos y Ochoa, 1999). Finalmente, las semillas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril con cisteína.

Los embriones fueron extraídos asépticamente a través de un corte longitudinal en la semilla en la orientación que esta localizado el embrión; posteriormente el endospermo fue removido cuidadosamente dejando libre sin cubierta al embrión. Estos fueron plantados en el medio de cultivo con ayuda de un escalpelo.

Los embriones fueron depositados sobre el medio basal SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), conteniendo BAP (0,02 mg/L), ANA (0,02 mg/L) y GA₃ (0,05 mg/L). Se utilizaron seis concentraciones del agente osmótico Manitol como estresante (0, 2, 4, 6, 8 y 10 %) por cada genotipo de café. El tratamiento testigo es donde la dosis de Manitol es cero. Se evaluó la longitud del tallo y la raíz a los 10, 20, 30 y 45 días de cultivo.

Plantas enraizadas *in vitro* con más de tres pares de hojas se sometieron a condiciones de aclimatización sobre potes llenados con suelo y pulpa de café bien descompuesta a una relación de 1:1. Los potes se mantuvieron bajo una manta de nailon transparente por 10 días, antes de ser transferidos al vivero con un 70 % de luz natural.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (CRD) con 15 réplicas por tratamiento y dos explantes por réplica (recipiente). Se realizó un ANOVA para la comparación de varianzas y una prueba de Rangos Múltiples de Duncan para las separaciones de las medias. En todos los casos el análisis se realizó usando el paquete Statistica versión 5.1.

Resultados y discusión

Se encontraron diferencias significativas entre los germoplasmas de café sometidos a estrés ($p < 0,05$) para la longitud de la raíz. El efecto del estrés osmótico no iónico (estrés hídrico) sobre los germoplasmas para las tres evaluaciones se muestra en la tabla 1. Sin embargo, diferencias no significativas se encontraron entre

los cultivares de café para la longitud del tallo y la raíz a los 20, 30 y 45 días luego de la aplicación del estrés. Las selecciones de café F-59 y 7487 presentaron las raíces

más largas sin diferenciarse entre ellas. Por otro lado, los híbridos Aba Buna y Gawe desarrollaron las menores longitudes de la raíces.

Tabla 1. Diferencias entre variedades para la longitud de la raíz y el tallo a diferentes días luego de la aplicación

Cultivares de café	Tiempo (días)							
	10		20		30		45	
	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz
Aba Buna	0,56	0	1,16	0,49 b	1,07	0,40 b	1,24	0,53 c
F-59	0,56	0	1,07	0,93 a	1,01	1,15 a	1,28	1,36 a
7487	0,56	0	1,05	0,99 a	1,08	1,19 a	1,38	1,34 ab
Gawe	0,54	0	1,05	0,63 b	1,00	0,68 b	1,33	0,83 bc
ES	0,02 ns		0,04 ns	0,11**	0,04 ns	0,11**	0,06 ns	0,12**
CV (%)	0,27	-	0,40	1,43	0,40	1,37	0,43	1,24

Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por Wintgens (2004), quien reportó tales diferencias entre cultivares y especies de café. Taye (2006) también reportó la existencia de una gran variabilidad en la magnitud de la tolerancia al estrés hídrico entre las accesiones de las poblaciones de café silvestre en Etiopía.

El crecimiento de la raíz fue significativamente inhibido en los cuatro cultivares con estrés osmótico producido por el uso del Manitol. Sin embargo, la concentración de

Manitol al 2 % produjo estimulación en la elongación de la raíz a los 20 y 45 días después del tratamiento. Los efectos más adversos se notaron con dosis superiores al 4 % de Manitol (Fig. 1A).

En general, el estrés hídrico deprimió en mayor magnitud el crecimiento de la raíz que el crecimiento del tallo en los cultivares evaluados (Fig. 1B), los que está en correspondencia con lo planteado por otros autores (Coste, 1992).

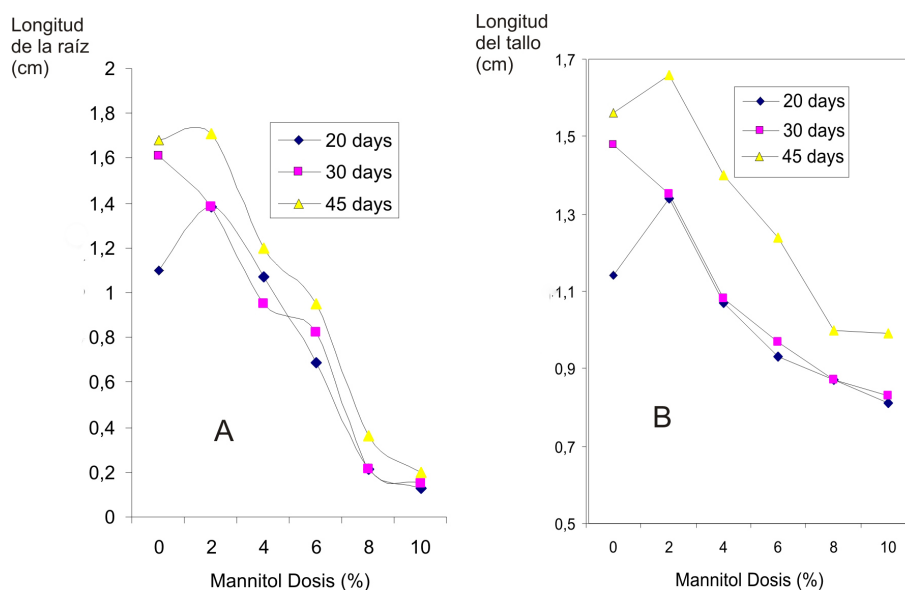


Fig. 1. Influencia de la concentración de Manitol sobre la longitud de la raíz (A) y el tallo (B).

La dosis letal (DL) obtenida para el crecimiento de la raíz fue del 6 % de Manitol a los 20 días, y 6,5 % de Manitol a los 10 y 45 días a partir del análisis de la fig. 1. El 6 % de Manitol puede ser considerado como el umbral del nivel letal por ser la menor dosis en la cual se produce un efecto negativo sobre el crecimiento de la raíz, disminuyendo este a la mitad del tratamiento testigo (cero dosis de Manitol) (Fig. 1A). La dosis letal (DL) para el crecimiento del tallo es mayor a las concentraciones usadas en los tratamientos evaluados (Fig. 1B), o sea, para causar la

disminución de la longitud del tallo en más de la mitad del tratamiento testigo en los cultivares utilizados se necesitan concentraciones superiores al 10 % de Manitol.

Existieron diferencias visuales entre los germoplasmas evaluados para cada dosis de Manitol. Las selecciones F-59 y 7487 se comportaron mejor que los híbridos F1 Aba Buna y Gawe bajo todos los niveles de estrés hídrico (Fig. 2). Esta prueba *in vitro* de materiales resistentes a la sequía es un método potente para estudiar germoplasmas de café a un tiempo relativamente corto.

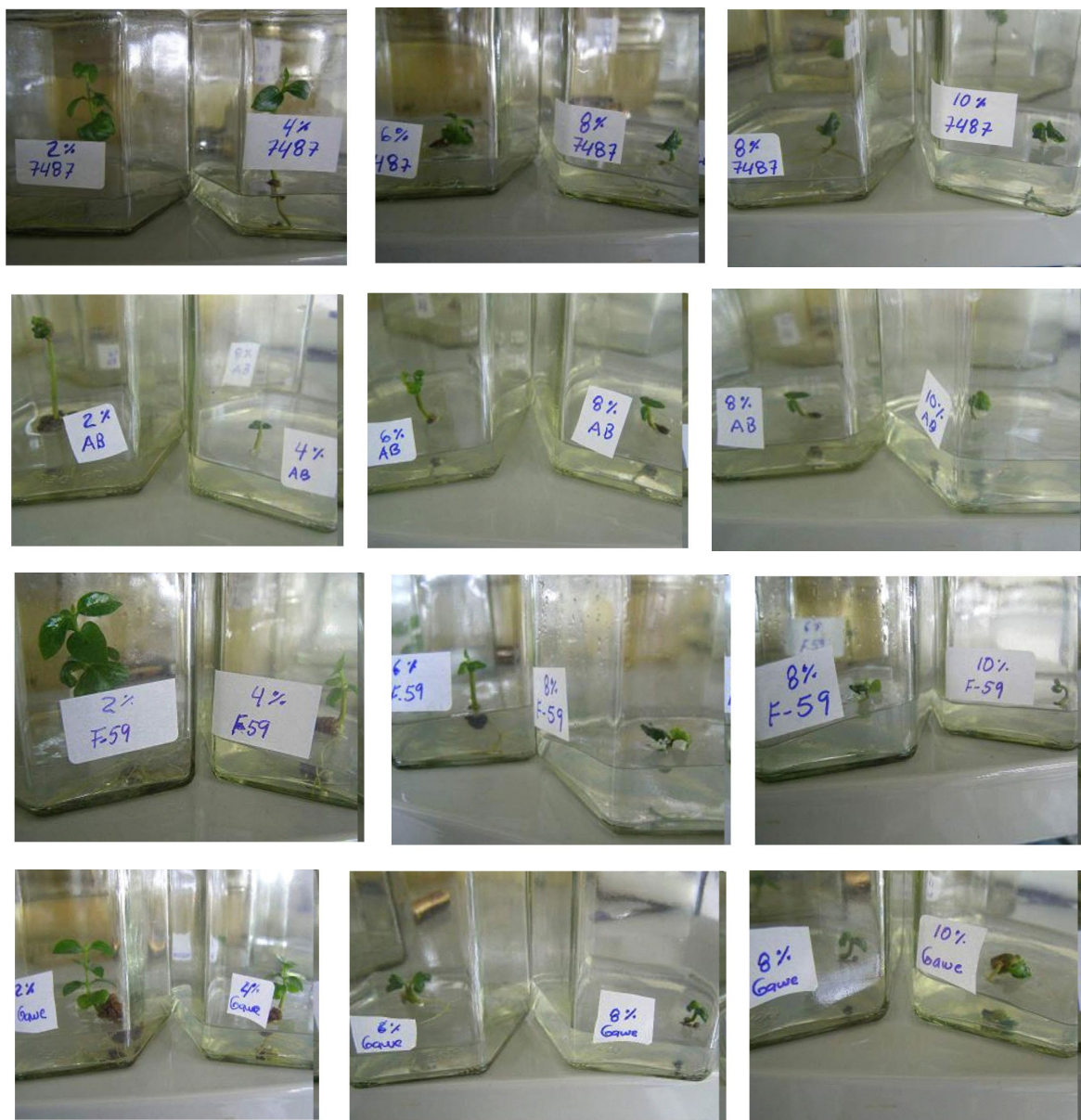


Fig. 2. Crecimiento y desarrollo de embriones cigóticos maduros sobre medio semisólido a) Selección 7487, b) Híbrido Aba Buna, c) Selección F-59 y d) Híbrido Gawe.

El análisis de regresión mostró valores de pendiente de -0,25 cm/%, -0,31 cm/% y -0,33 cm/% a los 20, 30 y 45 días después de la implantación de los embriones en los medios con el estrés osmótico. El factor de regresión (R^2) fue de 0,84, 0,97 y 0,95, respectivamente. La magnitud de la pendiente incrementó proporcionalmente con los días de cultivo debido a que las plantas de mayor edad son más dañadas al someterlas al estrés osmótico. En este sentido, Bray (1993) planteó que la intensidad de la respuesta depende de la severidad y la duración del estrés aplicado y del estado de desarrollo de la planta.

Conclusiones

- Se demostró que las selecciones y los híbridos de *Coffea arabica* evaluados exhibieron variación significativa en el crecimiento de la raíz en relación con la magnitud del estrés osmótico aplicado.
- Los resultados encontrados en el cultivo *in vitro* están en correspondencia con las evaluaciones realizadas en el campo para estos materiales de café, por lo que pudieran ser utilizados por consumir mucho menor tiempo.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer al equipo técnico del Laboratorio de Biotecnología de las Plantas del Jimma Agricultural Research Center, Etiopia, por la dedicación durante la preparación de las muestras.

Bibliografía

- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E. and R. G. Jensen: Adaptations to environmental Stresses. *Plant Cell*, 7:1099-1111, 1995.
- Bradford, K. L. and T. C. Hsiao: Physiological responses to moderate water stress. In: *Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds.). Encyclopedia of plant physiology (new series) 12B: Physiological plant ecology. II. Water relations and carbon assimilation* Springer-Verlag, pp. 263–324, Berlin, 1982.
- Bray, E.A.: Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*. 103:1035-1040, 1993.
- Coste, R.: Coffee. The plant and the product. Macmillan, London, pp. 285, 1992.
- Jones, H. G. and J. E. Corlett: Current topics in drought physiology: *Review. J Agric Sci.*, 119:291-296, 1992.
- Ramos N., R.; Cabrera, Mireya; Chill, Idelsis; González, Ma. Esther; Mederos, Yunis; Díaz, A.; Pérez, A. y F. Martínez: Tecnología para la recuperación del agar a partir de los medios de cultivos de tejidos de desechos empleados en biotecnología vegetal. En: *Programa, Conferencias y Resúmenes Simposio Internacional de Café y Cacao*, p. 39, Teatro Heredia, Santiago de Cuba, 1999.
- Salisbury, F. B. and C. W. Ross: Photosynthesis: Chloroplasts and Light. In: *Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company*, pp. 214-218, 1992.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204. 1972.
- Taye, Kufa: Ecophysiological diversity of wild Arabica coffee populations in Ethiopia: Growth, water relations and hydraulic characteristics along a climatic gradient, *Ecology and Development Series*, No. 46, Cuvillier Verlag, 2006.
- Tesfaye, Shimer: "Growth, water relation, yield and crop quality of Arabica coffee in response to water stress and deficit irrigation" [inédito], tesis de candidatura, University Putra Malaysia, 2006.
- Wintgens, J. N.: Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. A guide for growers, traders, and researchers. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co.KGaA, 115 pp., Weinheim, Germany, 2004.