

Evaluación del efecto de biorreguladores de origen natural sobre la germinación en semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. Var. H-2000).

Alexis Acosta^{1*}, Lien González¹, Carmen Dorca², Juan Carlos Cabrera³, Humberto García⁴ y Esther Diosdado¹

¹Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 No. 455, entre I y J, Vedado, CP 10400, Ciudad de la Habana, Cuba. Tel.: (537) 8328542, Fax.: (537) 8321321. ²Universidad de Jaén, Paraje la Lagunillas, Jaén, Andalucía, España. ³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera de Tapaste, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. ⁴Instituto de Investigaciones del Tabaco, Carretera Tumbadero, Km. 8½, San Antonio de los Baños, La Habana, Cuba. *Correo electrónico: roxette@fbio.uh.cu

RESUMEN

En Cuba se trabaja en la producción de nuevas fitohormonas no tradicionales de origen sintético a partir de materias primas nacionales, entre las cuales el Pectimorf (mezcla de oligogalacturónidos), ha demostrado ser un efectivo biorregulador de la morfogénesis y las respuestas de defensas en plantas obtenidas *in vitro*. Actualmente, se continúan estudiando nuevos productos (como Xiloglucanos) para determinar su efecto sobre las plantas, ante diversos factores bióticos y abióticos. El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación del Pectimorf y Xiloglucanos, obtenidos por el Laboratorio de Productos Naturales del INCA, sobre la germinación en semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. Var. H-2000). Las comparaciones se realizaron en semillas procedentes de la finalizada campaña 2002-2003 y en semillas que estaban almacenadas desde el año 2000. Las mismas fueron embebidas en cada producto en dos tiempos (5 y 21 horas) y se evaluaron cuatro concentraciones de cada uno (0.5, 1, 10 y 100 mg/L). Como controles se utilizaron el ácido giberélico (AG₃) 0.15 g/L, agua destilada y semillas sin tratar. A los siete días se determinó la Energía de Germinación y a los 15 el Porcentaje de Germinación. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre los tiempos de exposición a los productos evaluados, ni en los porcentajes de germinación obtenidos con cada uno. Sin embargo, existieron diferencias cualitativas evidentes en el desarrollo morfo genético entre las semillas tratadas con Pectimorf, siendo más efectiva la concentración de 10 mg/L, que con los Xiloglucanos. Para ambos productos la concentración de 100 mg/L tuvo un efecto inhibitorio sobre la germinación y el desarrollo vegetativo.

INTRODUCCIÓN

En las plantas se producen diversos compuestos orgánicos, algunos de los cuales presentan actividad biológica a muy bajas concentraciones, capaces de alterar los procesos del desarrollo (Creelman y Mullet, 1997). Estos compuestos son conocidos como: fitohormonas o reguladores del crecimiento.

En la actualidad se conocen cinco tipos de fitohormonas principales, también denominadas tradicionales, que son: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido ascórbico y etileno (Smith y Word, 1996). Adicionalmente, se han identificado otras clases de moléculas con propiedades reguladoras, las cuales se han agrupado bajo el término de fitohormonas no tradicionales, entre las que se encuentran los brasinoesteroides, el ácido salicílico y las oligosacarinas.

Las oligosacarinas son oligosacáridos solubles, los cuales se producen por la degradación parcial de los polímeros que integran la pared celular (Barceló *et al.*; 1988). Estas presentan la característica de elicitar mecanismos de defensa propios de las plantas y/o actuar modificando los procesos de crecimiento y desarrollo de los mismos (Aldigton *et al.*; 1991).

Dentro del gran grupo que forman las oligosacarinas podemos destacar los productos de la degradación de las pectinas constituyentes de la pared celular, las cuales se denominan Oligogalacturónidos u Oligopectatos. Estas sustancias se encuentran formadas por una cadena lineal de moléculas de ácido galacturónido, unidos por enlaces α -(1-4). El grado de polimerización de las moléculas dependerá del número de residuos de D-galacturonanos que presente la misma (Liners *et al.*; 1992).

Los Oligogalacturónidos provocan una gran variedad de efectos en las plantas, en las que ejercen su acción a nivel del núcleo celular (González *et al.*; 2000). Los diferentes resultados encontrados sobre la acción biológica de estas sustancias dependen, fundamentalmente, de la concentración de trabajo, el grado de polimerización y el balance fitohormonal presente en el medio de cultivo (Eberhard *et al.*; 1989).

En Cuba se trabaja en la producción de nuevas fitohormonas no tradicionales de origen sintético, entre las que se encuentra el Pectimorf, el cual es un oligopectato de grado de polimerización mayor que 12 (DP>12), obtenido por el Laboratorio de Oligosacarinas del Departamento de Fisiología Vegetal, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA, San José de las Lajas, Cuba). El principio activo del Pectimorf es una mezcla de oligosacáridos de origen péctico (Patente No. 1998/171¹) que son reguladores endógenos del desarrollo y la morfogénesis de las plantas (Cabrera *et al.*; 1998). Este producto ha demostrado que no solo puede sustituir, de forma parcial o total, a los reguladores tradicionales, sino que, en la mayoría de los casos, se obtienen resultados superiores (Cabrera, 2000). De esta manera, el producto ha sido evaluado en el cultivo *in vitro* de plátano, cítricos, tabaco, cafeto, entre otros.

Actualmente, el Laboratorio de Oligosacarinas del INCA continúa trabajando en la búsqueda de nuevos productos de origen natural (como Xiloglucanos) con propiedades biorreguladoras, en los cuales aún es preciso determinar su efecto sobre las plantas ante diversos factores bióticos y abióticos.

¹ Patente titulada: Procedimiento de obtención de una mezcla de Oligosacáridos; otorgada al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Concedida por Resolución No. 155/2003.

Por otra parte, el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) resulta de gran interés para la evaluación de estos biorreguladores, pues el mismo ha sido ampliamente usado como modelo en estudios fisiológicos y bioquímicos (Greiner *et al.*; 2000), de genética molecular básica (Zhang *et al.*; 1998), entre otros. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación del Pectimorf y Xiloglucanos, obtenidos por el Laboratorio de Productos Naturales del INCA, sobre la germinación de semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. Var. H-2000).

MATERIALES Y MÉTODOS.

▪ Material Vegetal.

Se emplearon semillas botánicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de la variedad H-2000, procedentes del Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT, San Antonio de los Baños, Cuba). De dicha variedad se evaluaron dos lotes de semillas: el primero obtenido durante la campaña 1999-2000 y que estaban conservadas a 4°C desde esa fecha (se denominaron Semillas Viejas); y el segundo correspondió a la recién concluida campaña 2002-2003 (Semillas Nuevas).

▪ Evaluación de Pectimorf y Xiloglucanos.

Para evaluar el efecto del Pectimorf y los Xiloglucanos (procedentes del Departamento de Fisiología Vegetal, INCA, San José de las Lajas, Cuba) sobre la germinación de las semillas, se establecieron 10 tratamientos para cada lote a estudiar (Tabla 1).

Tabla 1: Composición de los 10 tratamientos evaluados para determinar el efecto sobre la germinación de semillas de tabaco de la variedad H-2000 de diferentes concentraciones de Pectimorf y Xiloglucanos.

TRATAMIENTO ¹	BIORREGULADOR	CONCENTRACIÓN (mg/L)
1	Pectimorf	0.5
2	“	1
3	“	10
4	“	100
5	Xiloglucanos	0.5
6	“	1
7	“	10
8	“	100
CONTROLES		
9	Giberelina	0.15 g/L
10	Agua destilada	-

¹Como cada tratamiento se aplicó a los dos lotes de semilla evaluados, fueron un total de 20 tratamientos.

▪ Germinación de semillas.

Las semillas fueron embebidas en cada solución de trabajo (tratamientos del 1-10, tabla 1) por dos períodos de tiempo (5 y 21 horas), luego de los cuales se lavaron con agua destilada. Se tomaron 100 semillas para cada uno de estos tratamientos, se colocaron en placas petri sobre papel de filtro, previamente humedecido con agua destilada, y se mantuvieron en luz artificial continua.

A los siete días posteriores se determinó la Energía Germinativa y a los 15 días el Porcentaje de Germinación, en ambos casos mediante el conteo del número de semillas germinadas por tratamiento. Los resultados obtenidos se compararon desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. El análisis cuantitativo (porcentaje) se realizó mediante una prueba de Kolmogorov – Smirnov (Sigarroa, 1985), para determinar las posibles diferencias significativas entre los tratamientos evaluados para $p \leq 0.05$. Desde el punto de vista cualitativo, se estableció una escala de rangos de 0-7, que nos permitió evaluar el desarrollo de raíces, hojas y vigor de las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos al determinar la Energía Germinativa y el Porcentaje de Germinación, desde el punto de vista cuantitativo, se muestran en la tabla 2. El Porcentaje de Germinación nunca fue del 100%, el cual se comportó, de manera general, entre 63 y 81% para la semilla vieja y entre 83 y 91% para la nueva.

En la tabla 2 se puede apreciar, que con el empleo del Pectimorf y los Xiloglucanos a la concentración de 100 mg/L, ambos productos tuvieron un efecto inhibitorio sobre la germinación, lo cual fue más evidente a las 5 horas de exposición, fundamentalmente en semillas viejas y más marcada con los Xiloglucanos. La mejor respuesta con el Pectimorf como estimulante de la germinación, se obtuvo a la concentración de 10 mg/L y para los Xiloglucanos a la de 0.5 mg/L.

Al comparar los porcentajes mediante la Prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sigarroa, 1985) se obtuvo, que no existieron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados, ya sea con respecto a los controles, para un mismo producto a diferentes tiempos, ni entre las concentraciones de un mismo producto. Esto evidenció, que estos biorreguladores no tuvieron un efecto significativo sobre la germinación de las semillas de tabaco, sin embargo, este sí fue marcado desde el punto de vista morfogénico, en el cual se evidenciaron diferencias en la intensidad de la coloración de los explantes y de su vigor.

Tabla 2: Resultados de la Energía Germinativa y del Porcentaje de Germinación en semillas de tabaco de la variedad H-2000, al evaluar diferentes concentraciones de Pectimorf y Xiloglucanos en dos tiempos de exposición al producto.

Lote de Semilla	Tratamiento	Energía Germinativa (%)		Porcentaje de Germinación (%)	
		5 Horas	21 Horas	5 Horas	21 Horas

H-2000 Vieja	1	60	63,6	72	73
	2	60	75	63	75
	3	60	63	67	75
	4	40	72	60	81
	5	60	54	80	64
	6	53	76	70	76
	7	60	67	78	73
	8	37	62	64	74
	9	44	64	44	67
	10	66	64	70	64
H-2000 Nueva	1	77	85	85	90
	2	84	85	85	85
	3	87	81	91	83
	4	86	83	93	84
	5	78	85	89	89
	6	82	89	90	89
	7	86	85	86	89
	8	81	79	89	83
	9	81	82	90	86
	10	81	81	86	90

En el caso del Pectimorf, éste mostró un efecto positivo sobre el desarrollo foliar y radical a la concentración de 10 mg/L, en los dos tiempos de exposición evaluados, lo cual se ejemplifica en la figura 1 para 5 horas. Estos resultados son consistentes con lo observado durante la germinación de las semillas. Dentro de los tiempos, la exposición de 21 horas fue más efectiva, así como el desarrollo foliar fue más marcado que el radical.

Para los Xiloglucanos, los mejores resultados cualitativos se obtuvieron igualmente a la concentración de 0.5 mg/L, tras 5 horas de exposición. Sin embargo, cuando se evaluó el tiempo de exposición de 21 horas se observó, una inhibición generalizada de la morfogénesis (figura 2). En este sentido cabe destacar que para dicho producto, concentraciones mucho más bajas que las empleadas, podrían resultar más efectivas, ya que aunque esta concentración fue la más positiva, no fue del todo exitosa, porque se apreció en las semillas germinadas una evidente afectación del desarrollo de las mismas.

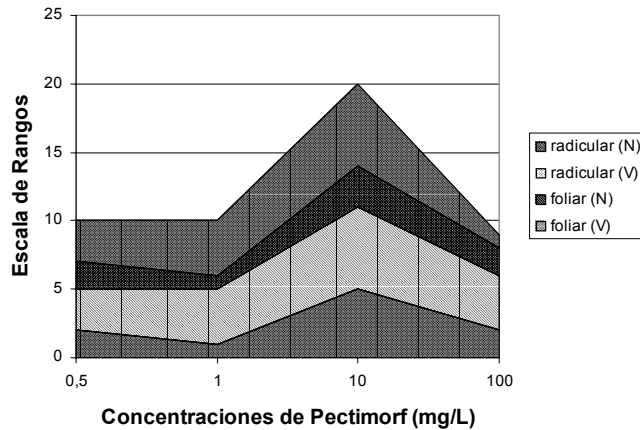


Figura 1: Efecto del Pectimorf a 5 horas de exposición, sobre semillas de tabaco H-2000, viejas (V) y nuevas (N), en el desarrollo foliar y radicular de los explantes. En el eje Y, los rangos están sumados para una mejor visualización de los resultados.

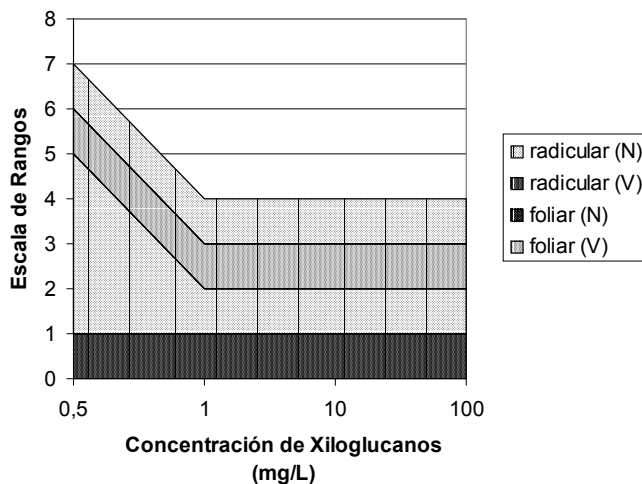


Figura 2: Efecto de los Xiloglucanos a 21 horas de exposición, sobre semillas de tabaco H-2000, viejas (V) y nuevas (N), en el desarrollo foliar y radical de los explantes. En el eje Y, los rangos están sumados para una mejor visualización de los resultados.

Al comparar los resultados entre las mejores concentraciones de ambos productos, se observó un efecto más acentuado sobre la morfogénesis del Pectimorf con respecto a los Xiloglucanos (Figura 3). Esto se evidenció porque el Pectimorf indujo un mayor desarrollo de los meristemos caulinares, traduciéndose en un aumento del crecimiento vegetativo, al igual que sobre el sistema radical, con el consecuente aumento en la longitud de las raíces presentes en las plantas obtenidas. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en la evaluación de este producto sobre la regeneración de raíces, al ser adicionado en el medio de cultivo *in vitro*, tanto para explantes de

tabaco (Fidalgo, 2003), como en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex. Tan) (Hernández, 2003). En ambos casos, la concentración óptima resultó ser la de 10 mg/L, como también se demostró en este trabajo. Sin embargo, los Xiloglucanos son productos con los que recién se comienza a trabajar y cuyas concentraciones óptimas para su actividad biológica no se conocen, por lo que se requiere de un mayor número de ensayos.

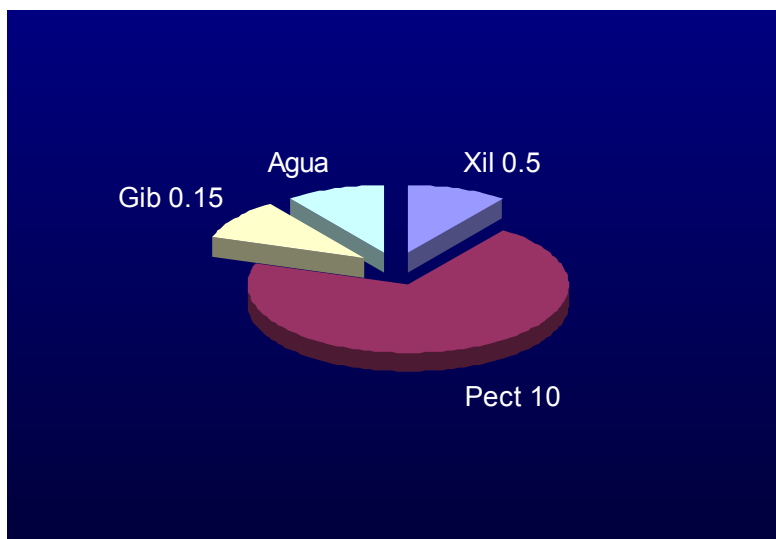


Figura 3: Comparación del efecto del Pectimorf y los Xiloglucanos, con respecto a los controles de agua y Giberelina, a 21 horas de exposición a estos productos, sobre semillas de tabaco H-2000, viejas (V) y nuevas (N), en el desarrollo foliar y radicular de los explantes.

El aumento en el número de hojas, el tamaño de éstas y el desarrollo del sistema radical al aplicar el Pectimorf en las condiciones evaluadas, evidencian otra de sus potencialidades, que es la de inducir la morfogénesis en cultivos *in vitro*, como un efectivo biorregulador en la obtención de plantas y que repercute en un mayor éxito adaptativo de las mismas, a las condiciones naturales. De mantenerse la acción del Pectimorf sobre el desarrollo en condiciones de campo, aumentaría el rendimiento de los cultivos con los grandes beneficios económicos que de ello se deriven.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldigton, S.; Mc Daugal, G.J. y Frey, C. 1991. Structure activity relationships of biologically active oligosaccharides. *Plant Cell and Environment*. 14: 625-636.
- Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, B. Y Sánchez R. 1988. *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide S.A., Madrid, España. 823 p.
- Cabrera, J.C. 2000. Obtención de una mezcla de (1-4) α -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria citrícola. Tesis Doctoral. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Universidad Agraria de la Habana, Cuba. 100 p.
- Cabrera, J.C. y col. 1998. Pectimorf: un biorregulador cubano para la biotecnología vegetal. Resumen XI Seminario Científico INCA. PB-P14. 133 p.

- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. 1997. Oligosaccharines, Brasinolides and Jasmonates: Non traditional regulator of plant growth, development and gene expression. The Plant Cell. American Society of Plant Pathologists. Crop Biotechnology Center, Texas. 9: 1211-1223.
- Eberhard, S.; Doubiava, N.; Marfa, V.; Mohnen, D.; Southwick, A.; Darvill, A. y Albersheim, P. 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis. The Plant Cell. 1: 747-755.
- Fidalgo, A. 2003. Efecto Biológico del Pectimorf sobre diversos eventos morfológicos *in vitro* en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Tesis en Opción al título de maestro en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. 74 p.
- González, S.; Garbey, P.G.; Alvarez, Y.A.; Benitez, D.L. y Cabrera, J.C. 2000. Actividad peroxidasa en callos de caña de azúcar tratados con un oligopectato. Rev. Jara. Bot. Nac. 21(1): 89-94.
- Greiner, S.; Koster, U.; Lauer, K.; Rosenkranz, H.; Vogel, R. Y Rausch, T. 2000. Plant invertase inhibitors: expression in cell culture and during plant development. Australian J. Plant Physiol. 27 (8/9): 807-814.
- Hernández, R.M. 2003. Estudio del efecto de biorreguladores cubanos sobre la embriogénesis somática y la variabilidad genética en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex. Tan). Tesis en Opción al título de maestro en Ciencias en Biología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. 71 p.
- Liners, F.; Thibault, J.F. y Van Cutsem, P. 1992. Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. Plant Physiol. 99: 1099-1104.
- Sigarroa, A. 1985. Biometría y Diseño Experimental. Ed. Pueblo y Educación, La Habana. 743 p.
- Smith, C. y Word, E.J. 1996. Plant Hormones. En: Cell Biology. Ed. Chapman y Hall. 1540 p.
- Zhang, S.; Williams, C.R.; Jackson, D. y Lemaux, P.G. 1998. Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during *in vitro* axillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (*Zea mays* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). Planta. 204(4): 542-549.