

Artículo original

Efecto de extractos de sustancias húmicas en la germinación y el crecimiento de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.), cv. INCA LP-5

José Marcelino Galbán-Méndez^{1*} 

Dariellys Martínez-Balmori² 

Deborah González-Viera¹ 

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

²Universidad Agraria de La Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”, carretera a Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

* Autor para correspondencia: marcelino@inca.edu.cu

RESUMEN

La utilización de bioestimulantes en la agricultura está ganando terreno en el contexto internacional con resultados muy prometedores para la sostenibilidad de la agricultura en el nuevo milenio. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad biológica de dos extractos de sustancias húmicas (ESH I y ESH II) en el cultivo del arroz cv INCA LP-5. Se ejecutó un experimento en la fase germinativa: semillas de arroz se germinaron en diluciones de los extractos ESH I y ESH II y se evaluó el porcentaje de germinación, la longitud de la radícula y del coleoptilo a los 7 días después de germinadas (ddg) y otro en la fase vegetativa: semillas de arroz se embebieron 24 horas en diluciones de ESH I y ESH II, luego se sembraron y a los 7 y 14 ddg se realizó la aspersión foliar de diluciones de ESH I y ESH II, los indicadores altura de la planta y longitud de las raíces se determinaron a los 14 y 21 ddg. Los extractos de sustancias húmicas empleados no ejercieron efecto en la germinación de las semillas de arroz; no obstante, el uso de diluciones del ESH II benefició la longitud de la radícula y el coleoptilo. El efecto de la aplicación foliar de ambos ESH fue perceptible en la parte aérea, en la raíz solamente el uso de ESH I en la dilución 1:60 fue beneficioso. Otras investigaciones serán necesarias para considerar el uso de ESH I y ESH II en el cultivo del arroz.

Palabras clave: aplicación foliar, bioestimulante, cereales, vermicompost

Recibido: 22/10/2019

Aceptado: 09/12/2020

INTRODUCCIÓN

Los bioestimulantes usados en la agricultura, en los que se incluyen a las sustancias húmicas (SH), incrementan la eficiencia en la nutrición, la tolerancia al estrés abiótico y la calidad de los cultivos ^(1,2). Las SH son formadas por transformaciones químicas y biológicas de material de plantas y animales, así como del metabolismo microbiano y representan la mayor reserva de carbono en la superficie terrestre ⁽³⁾. Estas sustancias se definen químicamente como una mezcla de diversas pequeñas moléculas que forman una asociación supramolecular estabilizada por interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrogeno ⁽⁴⁾ y se clasifican en función de su solubilidad en función del pH en ácidos húmicos (AH) y ácidos fúlvicos (AF).

Los efectos de las SH en las plantas son complejos e involucran procesos dinámicos no lineales e interrelacionados que deben ser tratados con una visión interdisciplinaria: arquitectura de las raíces, actividad H⁺-ATPasa de membrana, metabolismo primario y secundario, proteínas y expresión de genes, los que son dependientes de las condiciones ambientales, tipo de plantas y su ontogénesis ⁽⁵⁾. La intensidad y tipo de bioactividad de las SH en plantas está más relacionada a su complejidad estructural (conformación y organización estructural) que al tipo de estructuras presentes en estas ⁽⁶⁾.

La mayoría de las SH usadas en la agricultura son actualmente derivadas de fuentes no renovables y se requiere del desarrollo de productos húmicos a partir de fuentes renovables ⁽³⁾, como es el caso de las SH aisladas de vermicompost. En el Departamento de Química de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana, durante varios años se ha venido desarrollando diferentes productos líquidos (extractos de SH:ESH) y sólidos (residuos sólidos obtenidos del proceso de extracción de SH:RS) a base de sustancias húmicas extraídas de vermicompost de estiércol vacuno. En otros trabajos ^(7,8) se compilan los resultados de varios estudios con los ESH y RS en la agricultura y el medio ambiente y se señala que estos productos pueden incrementar la producción agrícola, mejorar las condiciones del suelo y retener cationes de metales pesados presentes en residuales líquidos. Varios estudios continúan demostrando que la aplicación foliar de los ESH en diferentes cultivos genera efectos beneficiosos en la productividad biológica y agrícola de los mismos ⁽⁹⁻¹²⁾. En el cultivo del arroz se reportan estudios del efecto protector de los AH aislados de vermicompost frente a estrés oxidativo y estrés hídrico ⁽¹³⁻¹⁵⁾; sin embargo, estudios en este cultivo sobre el uso de ESH son escasos. De esta forma, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad biológica de dos extractos de sustancias húmicas (ESH I y ESH II) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), cultivar INCA LP-5.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en los laboratorios del Departamento de Química de la Facultad de Agronomía en la Universidad Agraria de La Habana (UNAH), durante el primer semestre del 2015. Se utilizó el cultivar de ciclo corto INCA LP-5, obtenido por Pérez y Castro ⁽¹⁶⁾ mediante el método de hibridación de las variedades CP1C8 y 2077, el cual fue donado y certificado por la Unidad Científica Tecnológica de Base (UCTB) “Los Palacios”, Pinar del Río, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Los extractos de sustancias húmicas (ESH I y ESH II) fueron obtenidos a partir de un vermicompost de estiércol vacuno suministrado por la finca Guayabal, perteneciente al Complejo Científico de la UNAH, el que fue realizado en pilas sobre suelo con lombrices rojas africanas (*Eiseinafoetida*) durante tres meses. El vermicompost de estiércol vacuno tamizado ($2\ \mu\text{m}$) y seco, fue sometido a extracción con una solución básica (KOH/Urea/ KH_2PO_4 —0,15/0,1/0,03 mol L^{-1}), en una proporción 1:10 (m:v), con modificaciones de la metodología de Hernández ⁽¹⁷⁾, propuestas por Lukambani ⁽¹⁸⁾. En la Figura 1 se presenta el diagrama de flujo para la obtención de los ESH, algunas propiedades químicas y físico-químicas de los extractos obtenidos se reportan en la Tabla 1.

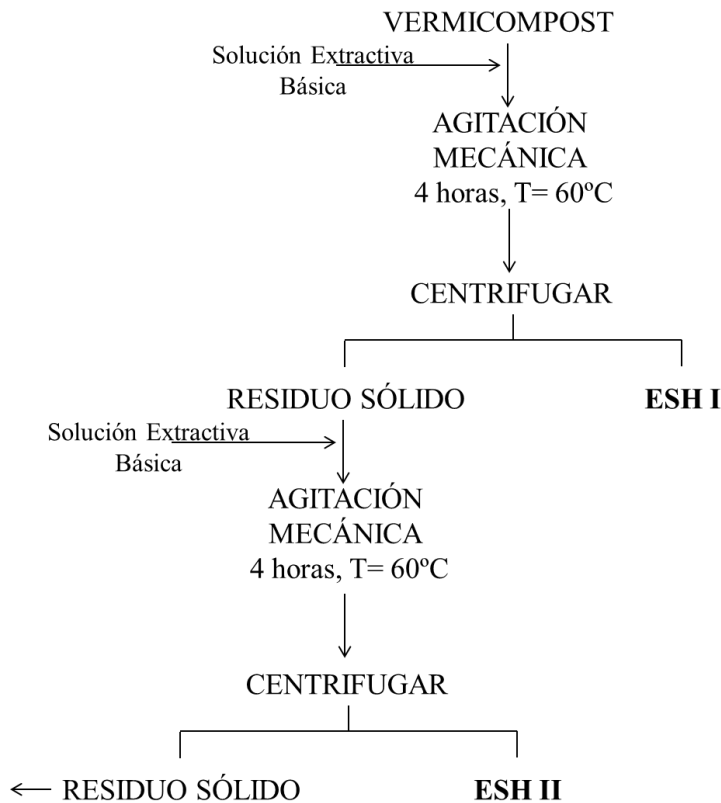


Figura 1. Protocolo de obtención de los extractos de sustancias húmicas ESH I y ESH II

Tabla 1. Propiedades químicas y físico-químicas de los extractos de sustancias húmicas ESH I y ESH II

Propiedades	ESH I	ESH II
pH	7,33 ± 0,01	7,09 ± 0,01
TDS (g L ⁻¹)	5,51 ± 0,01	5,04 ± 0,01
C.E (mS cm ⁻¹)	9,53 ± 0,01	8,67 ± 0,01
% Sales	0,52 ± 0,01	0,47 ± 0,01
% C orgánico	21,30 ± 1,25	28,90 ± 1,22

La actividad biológica de extractos de sustancias húmicas en el cultivo del arroz fue evaluada en la fase germinativa y en la fase vegetativa, montando un experimento para cada una de estas. En la fase germinativa, semillas de arroz previamente seleccionadas por flotación fueron embebidas en agua durante 24 h; transcurrido este tiempo se secaron al aire y se colocaron a germinar en placa Petri, presencia de diluciones de los extractos ESH I y ESH II (Tabla 2), a razón de 100 semillas por placa. A los tres, cinco y siete días de colocadas a germinar, se efectuó el conteo de semillas germinadas tomándose la emisión de la radícula como criterio de germinación. Se calculó el porcentaje de germinación y se efectuó la medición de las longitudes de la radícula (en cm) y del coleoptilo (en cm) a 15 plántulas por tratamiento, correspondiente a cinco plántulas por placa.

Tabla 2. Tratamientos empleados para evaluar el efecto de diferentes diluciones de los ESH en el cultivar INCA LP-5

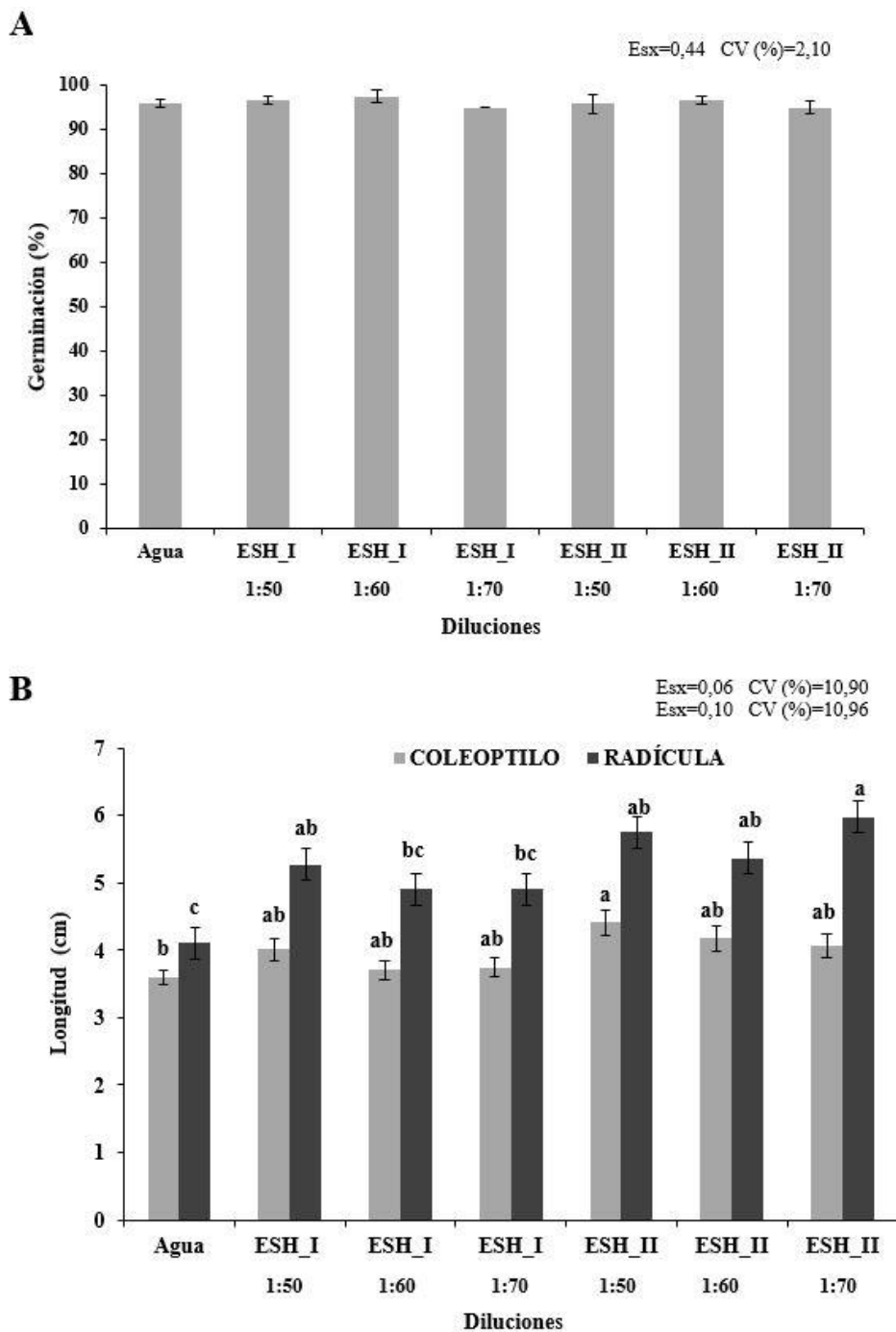
Tratamientos	Dilución de ESH (v:v)	
T1	Agua	-
T2	ESH_I	1:50
T3	ESH_I	1:60
T4	ESH_I	1:70
T5	ESH_II	1:50
T6	ESH_II	1:60
T7	ESH_II	1:70

Para la fase vegetativa, las semillas previamente seleccionadas fueron embebidas durante 24 horas en agua y en las diferentes diluciones de ESH I y ESH II (Tabla 2). Posteriormente, fueron sembradas en bandejas plásticas (18x3 cm) con suelo Gleysol Vértico⁽¹⁹⁾ aproximadamente 50 semillas. A los 7 y 14 días de germinadas; se procedió a la aspersión foliar (200 mL) de diluciones de ESH I y ESH II, manteniéndose los tratamientos descritos anteriormente en la Tabla 2. A los 14 y 21 días de germinadas; se muestrearon de manera aleatoria 15 plántulas por tratamiento distribuidas en cinco plántulas por bandeja y se hizo la medición de la altura de la plántula (cm) y la longitud de las raíces (cm).

En ambos experimentos se empleó un diseño completamente aleatorizado con un total de siete tratamientos con tres réplicas para cada uno. Los datos se procesaron mediante un Análisis de Varianza de Clasificación Simple (ANOVA) con el *software* Statgraphics Plus versión 5.1, utilizándose la transformación $\sqrt{(\%)}$ cuando fue requerido y cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias, se aplicó la prueba de Tukey al 95 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fase germinativa se aprecia para todos los tratamientos (Figura 2A) el efecto fisiológico deseado sobre la germinación (más del 90 % de las semillas germinan), además que las diluciones empleadas de los extractos húmicos ESH I y ESH II no afectan el porcentaje de germinación de las semillas de arroz.



a b letras desiguales muestran diferencias estadísticas según Tukey al 95 %

Figura 2. Porcentaje de germinación (A), longitud del coleóptilo y de la radícula (B) de plántulas de arroz tratadas con dos extractos de sustancias húmicas a los siete días de germinadas

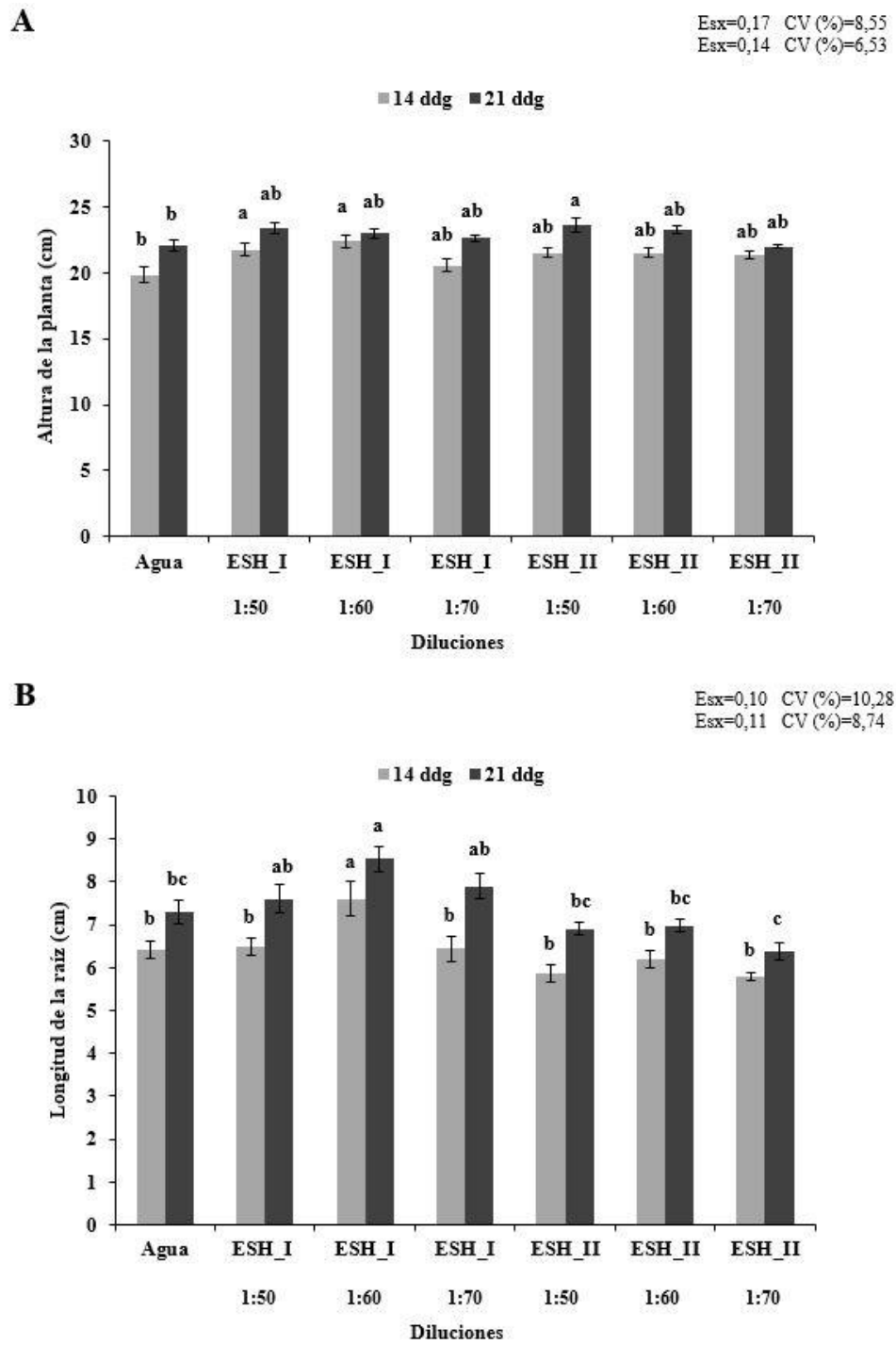
Existen pocos reportes del efecto de las SH en el porcentaje de germinación, proceso en el que ocurren eventos metabólicos y celulares complejos, que se inician con la absorción de agua y finaliza con la emergencia de la radícula y que no incluye el crecimiento de la plántula ⁽²⁰⁾.

Los indicadores longitud del coleóptilo y longitud de la radícula de las plántulas de arroz a los 7 ddg las semillas (Figura 2B) se modifican con el uso de los extractos de sustancias húmicas ESH I y ESH II.

Es apreciable una tendencia al aumento de la longitud del coleoptilo con el uso de los ESH; sin embargo, solamente el tratamiento T5, que se corresponde con ESH II (1:50), difiere significativamente con el tratamiento control (T1). En el caso de la longitud de la radícula, a excepción de los tratamientos T3 y T4, es perceptible el incremento significativo de este indicador con el uso de los ESH. Sin embargo, solamente el tratamiento T7, que se corresponde con ESH II (1:70), difiere significativa y positivamente con el tratamiento control (T1).

La acción estimuladora de las SH en el crecimiento de las plántulas se ha reportado por varios autores (3,7,21,22), la que ha sido asociada a un incremento de la actividad de la enzima H^+ -ATPasa de membrana plasmática (23-25), de la misma forma que las auxinas exógenas inducen el crecimiento de las plantas; a la presencia de diferentes fitohormonas en la estructura de las SH (26); y a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), que funcionan como moléculas señal, provocando eventos como la hiperpolarización de la membrana y la activación de canales de Ca^{2+} intra y extracelulares (27). Además, según García (6), la recalcitrancia y labilidad de las fracciones húmicas son propiedades químicas que definen la estimulación de los parámetros radicales de las plantas, donde la longitud de la raíz y la emisión de raíces más pequeñas están relacionadas con estructuras menos complejas y funcionalizadas.

Los resultados de la aplicación foliar de los ESH en la fase vegetativa del arroz se presentan en la Figura 3 (A y B). La altura de las plantas de arroz (Figura 3A), en ambos momentos de evaluación, de manera general se estimula con el uso de los ESH. Mientras que a los 14 ddg los tratamientos T2 y T3 (ESH I dilución 1:50 y 1:60, respectivamente) muestran valores de altura significativamente superior al control, a los 21 ddg solamente el tratamiento T5 (ESH II dilución 1:50) es el que muestra este comportamiento.



a b letras desiguales muestran diferencias estadísticas según Tukey al 95 %

Figura 3. Altura de las plantas (A) y longitud de la raíz (B) de plántulas de arroz tratadas con dos extractos de sustancias húmicas a los 14 ddg y a los 21 ddg

No se observó el mismo comportamiento en el indicador longitud de la raíz (Figura 3B). Tanto a los 14 ddg como a los 21 ddg solamente el tratamiento T3 mostró valores significativamente superiores al control. Además a los 21 ddg, aunque no se aprecia un efecto inhibitorio del uso del ESH II se observa que el uso de las diluciones de este extracto resultaron las de menores valores de longitud de la raíz.

Es posible que con el extracto ESH II sea necesario el uso de otras diluciones, considerando que el contenido de C orgánico de este extracto es superior al del ESH I (Tabla 1).

Los mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal por la aplicación foliar de las SH son pocos discutidos. Las principales investigaciones están relacionados con la aplicación de estas sustancias por la raíz; no obstante, el efecto estimulante de la aplicación foliar está bien documentado. En una revisión sobre el empleo de AH y AF como bioestimulantes en plantas hortícolas ⁽³⁾, se reportan varios trabajos donde se realiza aplicación foliar de SH y los efectos encontrados son de incrementos en la floración, la fructificación, la producción, la calidad de fruto y el uso eficiente de nutrientes; pocos trabajos (3 de 19 trabajos reportados con aplicación foliar), relatan el efecto en el crecimiento de la raíz.

Los ESH de este trabajo son humatos potásicos aislados de vermicompost de estiércol vacuno, obtenido a partir del protocolo propuesto por Lukambani ⁽¹⁸⁾, quien modificó el protocolo de Hernández ⁽¹⁷⁾, por lo que nuestros resultados se corresponden con los reportados por Hernández *et al.*, ⁽²⁸⁾, quienes en la evaluación de la aplicación foliar de diluciones de un humato aislado de vermicompost en el cultivo de la lechuga, encontraron que la dilución 1:60 produjo los impactos más notables en los indicadores de productividad biológica y agrícola, reduciendo el ciclo de producción del cultivo en 21 días, lo cual beneficia enormemente a los productores de esta hortaliza.

Es posible que la acción estimulante observada para los ESH sea debido a las SH que contienen (AH y AF), cuya polifuncionalidad y composición estructural heterogénea pueden contener compuestos estimuladores de actividades enzimáticas ⁽²⁸⁾ o a la presencia de otros componentes como aminoácidos, minerales, fitohormonas o precursores de fitohormonas, así como también de microorganismos ^(8,17,18), o quizás a la acción conjunta de estos.

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren la necesidad de evaluar en futuras investigaciones, las diferencias estructurales que pudieran presentar las sustancias húmicas de cada uno de los extractos, así como también las dosis y formas de aplicación de los ESH, incluso la posibilidad de combinarlos con bacterias promotoras del crecimiento vegetal ⁽²⁹⁾ para que estos bioestimulantes puedan ser incluidos en la producción orgánica y sostenible del arroz.

CONCLUSIONES

- El uso de los ESH no modifica el porcentaje de germinación de semillas, pero beneficia el crecimiento de las plántulas de arroz, especialmente con el uso de diluciones de ESH II.
- La aspersión foliar de los ESH beneficia el crecimiento de la parte aérea de la planta, el efecto en el crecimiento de las raíces solamente se observa con el uso de ESH I 1:60 (v:v).

BIBLIOGRAFÍA

1. Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil*. 2014;383(1-2):3-41.
2. Du Jardin P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:3-14.
3. Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P, et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia horticulturae*. 2015;196:15-27.
4. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in agronomy*. 2002;75:57-134.
5. Canellas LP, Olivares FL. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2014;1(1):3.
6. García AC, De Souza LGA, Pereira MG, Castro RN, García-Mina JM, Zonta E, et al. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-10.
7. García AC, Izquierdo FG, González OLH, de Armas MMD, López RH, Rebato SM, et al. Biotechnology of humified materials obtained from vermicomposts for sustainable agroecological purposes. *African Journal of Biotechnology*. 2013;12(7):625-34.
8. García A, Izquierdo F, Balmori D, Berbara R. Vermicompost-Derived Liquid Humus in Low Input and Small Sacle Farming. In: Laurence B, (Ed). *EBook Humic Substances and Natural Organic Matter*. Nova Science Publisher, Inc. 2015. p. 17.
9. García A, Izquierdo F, Berbara R. Effects of Humic Materials on Plant Metabolism and Agricultural Productivity. In: Ahmad P, (Ed). *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Biological Techniques*. India: Academic Press. 2014. p. 449–466. doi:10.1016/B978-0-12-800876-8.00018-7
10. Hernandez OL, Calderín A, Huelva R, Martínez-Balmori D, Guridi F, Aguiar NO, et al. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for sustainable development*. 2015;35(1):225-32.
11. Calderín García A, Pimentel Quintero J, Martínez Balmori D, Huelva López R, Guridi Izquierdo F. Efeitos no cultivo do milho de um extrato líquido humificado residual, obtido a partir de vermicomposto. *Revista Ciências Técnicas Agropecuarias*. 2016;25(1):38-43.
12. Balmori DM, Domínguez CYA, Carreras CR, Rebatos SM, Farías LBP, Izquierdo FG, et al. Foliar application of humic liquid extract from vermicompost improves garlic (*Allium sativum* L.) production and fruit quality. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 2019;8(1):103-12.

13. García AC, Santos LA, Izquierdo FG, Sperandio MVL, Castro RN, Berbara RLL. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*. 2012;47:203-8.
14. García AC, Berbara RLL, Farías LP, Izquierdo FG, Hernández OL, Campos RH, et al. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(13):3125-34.
15. Guridí Izquierdo F, Calderín García A, Louro Berbara RL, Martínez Balmori D, Rosquete Bassó M. The humic acids from vermicompost protect rice (*Oryza sativa* L.) plants against a posterior hidric stress. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(2):53-60.
16. Pérez N, Castro RI. A new short cycle rice variety: INCA LP-5. *Cultivos Tropicales*. 2000;21(4).
17. Hernández O. Modificaciones al proceso de obtención de sustancias húmicas a partir de vermicompost: efectos biológicos. [Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Ciencias de la Química Agrícola.]. [Cuba]: Universidad Agraria de La Habana, Facultad de Agronomía.; 2010.
18. Lukambani L. Prospección de microorganismos en extractos acuosos de sustancias húmicas y sus efectos en el cultivo del frijol *Phaseolus vulgaris*. L. Agraria de La Habana; 2015.
19. Hernández JA, Pérez JJM, Bosch ID, Castro SN. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA. 2015;93.
20. Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edition. 2013. 392 p.
21. Martínez D, Huelva R, Portuondo L, Guridis F. Evaluación del efecto protector de las Sustancias Húmicas Líquidas en plantas de maíz cultivar P-2928 en condiciones de salinidad. *Centro Agrícola*. 2012;39(1):29-32.
22. García AC, Tavares OCH, Balmori DM, dos Santos Almeida V, Canellas LP, García-Mina JM, et al. Structure-function relationship of vermicompost humic fractions for use in agriculture. *Journal of soils and sediments*. 2018;18(4):1365-75.
23. Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant physiology*. 2002;130(4):1951-7.
24. Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize *Zea mays* L. *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(398):803-13.

25. Trevisan S, Pizzeghello D, Ruperti B, Francioso O, Sassi A, Palme K, et al. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. *Plant Biology*. 2010;12(4):604-14.
26. Nardi S, Pizzeghello D, Schiavon M, Ertani A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*. 2016;73(1):18-23.
27. Berbara RL, García AC. Humic substances and plant defense metabolism. En: *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*. Springer; 2014. p. 297-319.
28. Hernandez OL, Huelva R, Guridi F, Olivares FL, Canellas LP. Humatos aislados del vermicompost como el promotor de crecimiento en la producción de la lechuga orgánica. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2013;22(1):70-5.
29. Olivares FL, Busato JG, de Paula AM, da Silva Lima L, Aguiar NO, Canellas LP. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and biological technologies in agriculture*. 2017;4(1):1-13.