

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PECTIMORF EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE MANDARINA CLEOPATRA (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) MEDIANTE MARCADORES ISOENZIMÁTICOS

Reina M. Hernández[✉], Regla M. Lara, Esther Diosdado, J. C. Cabrera, Clara González, Marlyn Valdés y Xonia Xiqués

ABSTRACT. Pectimorf is a non-traditional growth regulator produced by the partial degradation of the cellular wall of citric barks; it presents the characteristic to elicit defense mechanisms and to act modifying the processes of plant growth and development. The objective of the present work was to detect somatic embryogenesis changes in Cleopatra mandarin under the action of Pectimorf; by means of six isoenzymatic systems, different types of vegetable materials were used as: ova, proembryos, embryos at different developing stages (globular, heart-shaped, torpedo and cotyledonar) and embryogenic calluses upon treatments with Pectimorf or without it. The genetic-biochemical study showed 84.78 % polymorphism in the six isozyme systems studied, where carbon anhydrase proved to be the most polymorphic one (90.9 %). The Cluster analysis according to DICE coefficient of similarity, allowed to form three groups: in the first one appear the ova, that is the starting material while in the remaining groups, treatments appear according to different developing stages of the somatic embryogenesis and to the differential expression of genotypes, in answer to the use of this growth bioregulator.

Key words: *Citrus*, isozymes, somatic embryogenesis, plant growth substances

RESUMEN. El Pectimorf es un regulador del crecimiento no tradicional, que se produce por la degradación parcial de la pared celular de la corteza de los cítricos; presenta la característica de activar los mecanismos de defensa propios de las plantas y/o actuar modificando los procesos de su crecimiento y desarrollo. El objetivo de nuestro trabajo fue conocer mediante diferentes sistemas isoenzimáticos si el Pectimorf empleado en la embriogénesis somática de la mandarina Cleopatra, produce variabilidad genética. Se utilizaron diferentes tipos de materiales vegetales como: óvulos, proembriones, embriones en los distintos estadios de desarrollo (globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar) y callos embriogénicos, tratados o no con Pectimorf. El estudio genético-bioquímico mostró un 84.78 % de polimorfismo en los seis sistemas isoenzimáticos estudiados, donde la anhidrasa carbónica resultó ser el sistema más polimórfico (90.9 %). El análisis de Conglomerados, según el coeficiente de similitud de DICE, permitió formar tres grupos: en el primero aparecen los óvulos, que es el material de partida, mientras que en los restantes grupos aparecen los tratamientos de acuerdo a las diferentes etapas del desarrollo de la embriogénesis somática y a la expresión diferencial de los genotipos, en respuesta al empleo de este biorregulador del crecimiento.

Palabras clave: *Citrus*, isoenzimas, embriogénesis somática, sustancias de crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se utilizan técnicas de cultivo *in vitro*, en las que el medio de cultivo se suplementa con sustancias biorreguladoras del crecimiento, que pueden acelerar el desarrollo de embriones, callos, así como

estimular el desarrollo vegetativo e intervenir en los mecanismos de defensa de las plantas.

El Pectimorf es un biorregulador sintetizado por el Laboratorio de Oligosacarinas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, constituido por una mezcla de oligopectatos obtenidos a partir de residuos de la industria citrícola (1).

Los resultados demuestran que este producto no solo puede sustituir de forma parcial o total a los reguladores del crecimiento tradicionales, sino que en la mayoría de los casos, se obtienen resultados superiores a los obtenidos con las fitohormonas tradicionales, en el desarrollo morfogenético de los cultivos vegetales (2).

Los embriones somáticos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) tratados con el Pectimorf, tuvieron un desa-

Ms.C. Reina M. Hernández, Profesora Auxiliar del Centro Universitario Isla de la Juventud. Carretera Aeropuerto km 3 ½, Nueva Gerona, Isla de la Juventud; Ms.C. Regla M. Lara, Especialista del Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Dra.C. Esther Diosdado; Dra.C. Clara González, Ms.C. Marlyn Valdés y Dra.C. Xonia Xiqués, Profesoras Auxiliares de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba; Dr. J. C. Cabrera, Investigador, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP), Namur, Bélgica.

✉ rmargarita21@hotmail.com

rollo más vigoroso que los que no presentaban este oligosacárido en los medios de cultivo (3). En caña de azúcar (*Saccharum spp. hybrid*) se ha trabajado con callos, estimando la inducción de enzimas peroxidases a diferentes tiempos, con distintas concentraciones de este oligopectato, obteniéndose los mejores resultados a las 48 horas con una concentración de 10 mg.L⁻¹ de Pectimorf (4). Sin embargo, en café (*Coffea sp.*) se evaluó el efecto del oligogalacturonido con auxinas (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y citoquininas (kinetina como testigo), y se validó el efecto de este compuesto en sustitución de las citoquininas (1).

Un aspecto importante a conocer es la estabilidad genética del material obtenido por las técnicas del cultivo *in vitro* y el uso de este biorregulador. La caracterización isoenzimática de los diferentes estadios de desarrollo de las plantas, permite valorar esta estabilidad y su posible utilización en futuras investigaciones. Las isoenzimas son herramientas poderosas en el estudio y monitoreo de la variabilidad genética, provocada por las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas. Específicamente sirven como indicadores de esta variación, en la visualización de la pérdida de cromosomas en los tejidos de híbridos sexuales y somáticos, y brindan un sistema experimental para el estudio de la recombinación somática, alteraciones del cariotipo, mutaciones puntuales y presencia de elementos transponibles (5).

En tal sentido, el objetivo de nuestro trabajo fue determinar si el uso del Pectimorf en el cultivo *in vitro* de la mandarina Cleopatra produce variabilidad genética, mediante la evaluación de seis sistemas isoenzimáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron óvulos, embriones y callos embriogénicos cultivados en el medio MS (6), que contenían o no el biorregulador del crecimiento objeto de nuestro estudio, Pectimorf 10 mg.L⁻¹.

Tabla I. Tratamientos empleados en el desarrollo *in vitro* de la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra y su nomenclatura

Material vegetal	Nomenclatura
Óvulos	Ov.
Proembrión control	Pc.
Proembrión Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	Pp.
Globular control	Gc.
Globular Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	Gp.
Acorazonado control	Ac.
Acorazonado Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	Ap.
Torpedo control	Tc.
Torpedo Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	Tp.
Cotiledonar control	Cc.
Cotiledonar Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	Cp.
Callo control	Clc.
Callo Pectimorf (10 mg.L ⁻¹)	Clp.

Electroforesis de isoenzimas. Para la preparación de los extractos se tomaron 0.5 g de masa fresca y se maceraron en N₂ líquido con un tampón de extracción de sacarosa al 20 %.

Las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos, se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida (PAGE) en lámina vertical y un sistema de tampones discontinuos (7, 8), con tampón de corrida Tris-Glicina 0.04M, pH 8.3 y empleando un gel de separación al 10 %. Se efectuaron dos réplicas para cada corrida electroforética de las isoenzimas. Una vez efectuada la separación, se realizaron las tinciones específicas, para la caracterización de los sistemas como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Sistemas isoenzimáticos y métodos de tinción empleados para el estudio de la variabilidad genética en mandarina Cleopatra

Sistema isoenzimático	Método de tinción
Peroxidasas (E.C.1.11.1.7)	(9)
Polifenoloxidasas (E.C.1.10.3.1)	(10)
Esterasas (E.C.3.1.1)	(11)
Anhidrasa carbónica (E.C.4.2.1.1)	(12)
Superoxido dismutasa (E.C.1.15.1.1)	(13)
Fosfatasas ácidas (E.C.1.8.14)	(14)

Las moviidades electroforéticas fueron medidas en centímetros; se tomó como punto cero u origen el comienzo del gel de separación de cada sistema para confeccionar los zimogramas (11). Se establecieron los fenotipos isoenzimáticos en cada variante sobre la base del número, la posición y presencia o no de cada banda; se determinaron las bandas propias y el porcentaje de bandas polimórficas en relación con el total de bandas.

Los resultados de los electroforetogramas fueron analizados mediante el paquete de programas NTSYS-pc (15). La matriz binaria se empleó para construir una matriz de distancias moleculares (DM) entre todos los tratamientos y estadios de desarrollo, y se establecieron las semejanzas entre los materiales, por el coeficiente de similitud (16), con el uso del programa SIMQUAL. La matriz fue analizada mediante un análisis de Conglomerados (*Cluster Analysis*) (17), con el método de la media aritmética de grupos no ponderados (UPGMA) en el programa SHAN y los grupos se formaron a partir del 50 % de afinidad (18).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del zimograma del sistema peroxidases (Figura 1), obtenido para los distintos estadios de desarrollo del explante, mostró la presencia de siete bandas; de ellas, seis fueron polimórficas. En la etapa de óvulo, solo apareció la banda que es común a todo el material vegetal ubicada a 1.0 unidad, mientras que en la etapa proembrionaria, se expresaron cuatro isoformas, donde las tres bandas situadas a 1.6, 1.8 y 2.0 unidades no estuvieron presentes en las etapas siguientes del desarrollo embrionario. Para los cuatro estadios posteriores de desarrollo del embrión, se expresó la banda de mayor migración anódica ubicada a 3.0 unidades; en las fases de acorazonado y torpedo se expresaron dos isoformas

para este sistema situadas a 0.2 y 0.5 unidades, lo cual pudiera estar relacionado con la presencia del Pectimorf en el medio a la concentración de 10 mg.L⁻¹; un comportamiento similar fue observado en los callos embriogénicos, donde la banda de mayor migración en el callo control resultó ser inhibida.

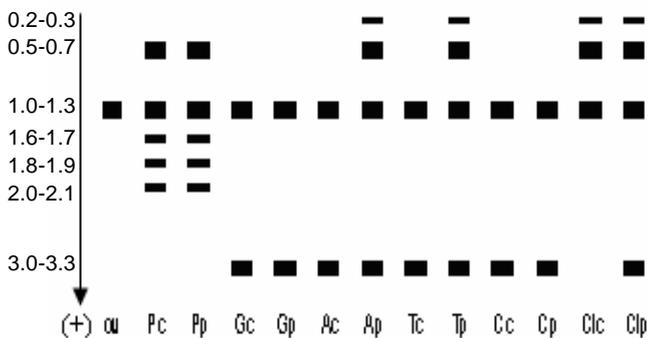


Figura 1. Zimograma de las isoenzimas peroxidadas en los diferentes materiales vegetales de mandarina Cleopatra tratados con Pectimorf. Las abreviaturas se corresponden en orden con: óvulos, proembrión control, proembrión más Pectimorf + 10 mg.L⁻¹, Globular control, Globular + Pectimorf 10 mg.L⁻¹, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Torpedo control, Torpedo Pectimorf +10 mg.L⁻¹, cotiledonar control, cotiledonar Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf +10 mg.L⁻¹

Las isoenzimas peroxidadas se caracterizan por presentar de una a dos bandas en las diferentes especies y variedades de cítricos, aunque se han encontrado diferencias cuantitativas con relación a la actividad enzimática en diferentes variedades e híbridos de estos cultivos (19, 20). En estudios sobre variabilidad genética en citranger Troyer cultivado *in vitro*, se observó una sola banda para todas las muestras analizadas durante la primera generación del cultivo, pero en posteriores generaciones se observaron de tres a cinco bandas (21).

De manera similar, se presentan los resultados de otros biorreguladores del crecimiento, como son los de análogos de brasinosteroides, en el cultivo *in vitro* de callos no embriogénicos del naranjo agrio, donde en el análisis de este sistema se encontraron de tres a cuatro bandas en los distintos tratamientos empleados (22); de lo que podemos deducir que la aparición de un mayor número de bandas se puede deber al efecto del Pectimorf dentro del género *Citrus*.

En caña de azúcar (*Saccharum spp. hybrid*), otros plantearon que altas concentraciones de citoquininas estimulan la transcripción del (o los) gen (es) que codifican para estas bandas en este sistema (4). Además, se plantea en numerosos estudios en tabaco (*Nicotiana tabacum*), caña de azúcar (*Saccharum spp. hybrid*) y café (*Coffea sp.*) (23, 24, 25), que el Pectimorf tiene efecto

citoquinínico; de ahí pudiera ser que este regulador del crecimiento intensifique los procesos transcripcionales para estos genes en específico.

En el análisis del zimograma de polifenoloxidasas (Figura 2), se observó la presencia de cuatro bandas, de las cuales tres resultaron ser polimórficas. Los óvulos presentaron la banda que es común a todo el material situado a 1.1 unidad. En las siguientes etapas del desarrollo del embrión, se observó la aparición de la banda de mayor migración anódica a 3.2 unidades, con excepción de la fase de torpedo en el medio con Pectimorf. En la etapa proembriónica y los cuatro estadios de desarrollo del embrión y en la fase de callo, se evidenció la activación de dos isoformas de menor migración a 0.2 y 0.5 unidades, aunque en el caso del embrión globular control y el callo control, estas isoformas no se expresaron; mientras que para la fase proembriónica control, cotiledonar control y callo con Pectimorf 10 mg.L⁻¹, solo se expresó la banda ubicada a 0.5 unidades.

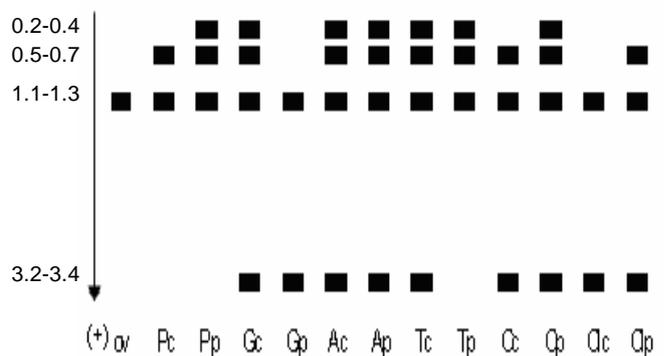


Figura 2. Zimograma de las isoenzimas polifenoloxidasas en los diferentes materiales vegetales de mandarina Cleopatra tratados con Pectimorf. Las abreviaturas se corresponden en orden con: óvulos, proembrión control, proembrión Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Globular control, Globular Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf+10 mg.L⁻¹, Torpedo control, Torpedo Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Cotiledonar control, Cotiledonar Pectimorf+10 mg.L⁻¹, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf+10 mg.L⁻¹

Las funciones de las polifenoloxidasas no han sido determinadas respecto a su gran distribución, por lo que se propone hipotéticamente que participen en la defensa, biosíntesis de fenilpropanoides, regulación de oxígeno plastídico y el transporte de electrones (26).

El zimograma para anhidrasa carbónica (Figura 3) mostró la presencia de un total de 11 bandas, 10 de ellas polimórficas. Resultado similar al obtenido para el sistema peroxidasa, se presenta aquí para los óvulos, en el cual solo aparece la banda ubicada a 0.2 unidades, que es común a todo el material de estudio. Sin embargo, en las etapas posteriores del desarrollo proembriónico,

embrionario y del callo, se apreció que en las fases donde el explante creció en un medio suplementado con Pectimorf, se inhibe la expresión de varias isoformas, como son el caso de las bandas situadas a 0.2, 0.5, 0.8, 5.4, entre otras; solo para la fase de desarrollo globular con Pectimorf se evidenció la existencia de tres bandas propias ubicadas a 4.7, 5.4 y 7.0 unidades respectivamente. En el caso de los callos con Pectimorf 10 mg.L⁻¹, solo se evidenció la banda que es común a todo el material situada a 1.1 unidades.

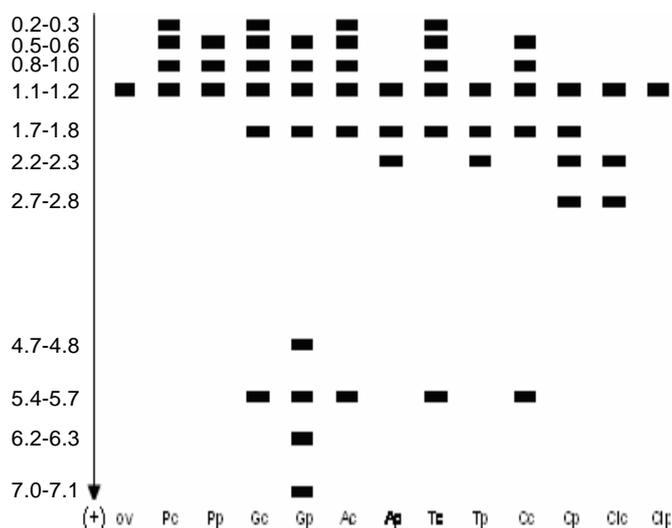


Figura 3. Zimograma de las isoenzimas anhidrasa carbónica en los diferentes materiales vegetales de mandarina Cleopatra tratados con Pectimorf. Las abreviaturas se corresponden en orden con: óvulos, proembrión control, proembrión Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Globular control, Globular Pectimorf+10 mg.L⁻¹, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Torpedo control, Torpedo Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Cotiledonar control, Cotiledonar Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf +10 mg.L⁻¹

La mayoría de los informes de anhidrasa carbónica en plantas son concernientes a la función que realizan en los tejidos verdes, pero a pesar de su abundancia, el rol fisiológico de esta enzima está aún escasamente entendido (27). También se refiere que están relacionadas con la respuesta al enraizamiento y constituyen un marcador para este proceso (28). Se plantea que en plantas C₃ la mayoría de la actividad de anhidrasa carbónica reside dentro del estroma del cloroplasto. Por lo que ha sido propuesto que esta enzima acelera la deshidratación del bicarbonato a dióxido de carbono, para proveer un suministro constante de dióxido de carbono para la actividad de la Rubisco durante la fotosíntesis (27).

Trabajos realizados en el género *Citrus* (29) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (30) muestran también muy poca variabilidad genética para estas isoenzimas.

Sin embargo, en las variedades de tabaco Habana 2000 y Habana 2.1.1, se observó la inhibición de algunas bandas cuando el material vegetal creció en un medio de cultivo suplementado con Pectimorf 10 mg.L⁻¹ (23).

En la Figura 4, se presenta el patrón de bandas del sistema isoenzimático esterasas, para el cual existen un total de nueve bandas, ocho de ellas polimórficas. En este sistema se evidenció una marcada expresión de isoformas en todas las etapas del desarrollo y la diferenciación del explante, siempre que el biorregulador estuvo presente en el medio de cultivo. La banda de menor migración anódica ubicada a 0.2 unidades, después de formado el embrión globular, se vio inhibida en presencia del Pectimorf 10 mg.L⁻¹ para todas las etapas siguientes de desarrollo del material vegetal, comportándose de igual forma el callo embriogénico control.

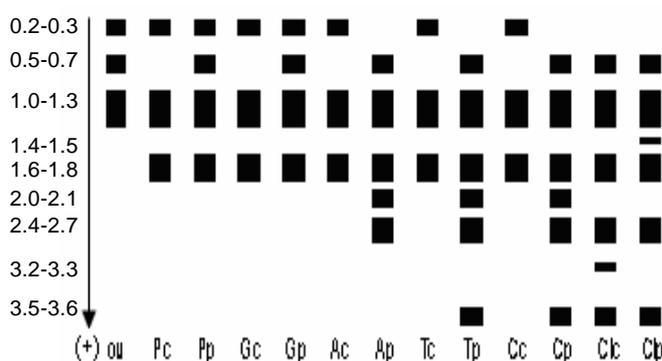


Figura 4. Zimograma de las isoenzimas esterasas en los diferentes materiales vegetales de mandarina Cleopatra tratados con Pectimorf. Las abreviaturas se corresponden en orden con: óvulos, proembrión control, proembrión Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Globular control, Globular Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Torpedo control, Torpedo Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Cotiledonar control, Cotiledonar Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf +10 mg.L⁻¹

En estudios realizados para este sistema isoenzimático en el cultivo de anteras de cebadas, se observó un marcado polimorfismo en dependencia de la diferenciación de las estructuras embrionarias (31); sin embargo, en el análisis de tres tipos de callos diferentes, las esterasas resultaron muy sensibles para la detección de la embriogénesis, antes de formarse el embrión somático (32).

El zimograma de fosfatasa ácida (Figura 5) mostró un total de 10 bandas, nueve de ellas polimórficas. En la etapa de óvulo se expresó la banda que es común a todo el material vegetal situada 1.3 unidades, mientras que en las restantes etapas del desarrollo, se presentaron patrones de bandas bien definidos con isoformas de alto, medio y bajo peso molecular, con una expresión no

uniforme tanto para los explantes tratados como para los no tratados, pudiéndose asociar estas diferencias al proceso de diferenciación celular y al efecto que pudiera estar ejerciendo el Pectimorf sobre el explante en este proceso. Sin embargo, desde las fases de acorazonado a cotiledonar, se apreció una expresión de isoformas ubicadas a 2.6, 2.9, 3.1 y 3.5 unidades en el medio enriquecido con Pectimorf 10 mg.L⁻¹; un comportamiento similar se evidenció en la etapa de callo, observándose las bandas ubicadas a 2.6 y 2.9 unidades.

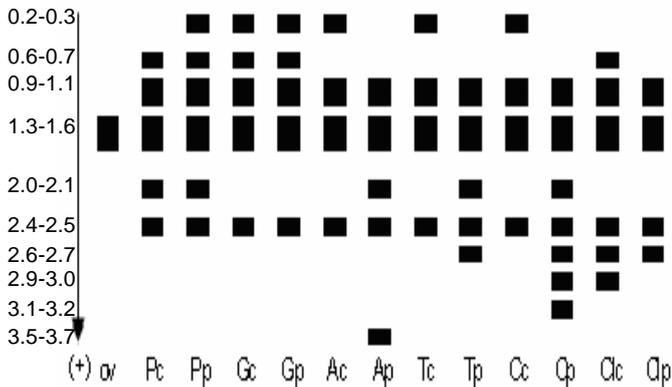


Figura 5. Zimograma de las isoenzimas fosfatasa ácida en los diferentes materiales vegetales de mandarina Cleopatra tratados con Pectimorf. Las abreviaturas se corresponden en orden con: óvulos, proembrión control, proembrión Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Globular control, Globular Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Torpedo control, Torpedo Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Cotiledonar control, Cotiledonar Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf +10 mg.L⁻¹

Las fosfatasa ácida juegan un papel importante en la hidrólisis del fósforo orgánico y, por ende, en el ciclo biogeoquímico de este elemento y en la nutrición de las plantas. La actividad de estas enzimas se ha asociado con la capacidad de algunos genotipos de tolerar la baja disponibilidad de fósforo (33, 34).

El patrón isoenzimático para la superóxido dismutasa presenta un total de cinco bandas, tres de las cuales son polimórficas. Se debe señalar que en las etapas de óvulo, proembrión y las dos primeras fases del desarrollo del embrión (globular y acorazonado), tratados o no con Pectimorf 10 mg.L⁻¹, presentaron solo las dos bandas que son comunes a todo el material ubicadas a 1.3 y 1.7 unidades. Mientras que para las restantes fases del crecimiento embrionario y del callo, se observó la activación de dos isoformas de mayor peso molecular ubicadas a 0.2 y 0.6 unidades. En la etapa de callo también se expresó la isoforma de mayor migración anódica situada a 2.7 unidades, la cual también se puso de manifiesto para la fase cotiledonar con Pectimorf 10 mg.L⁻¹.

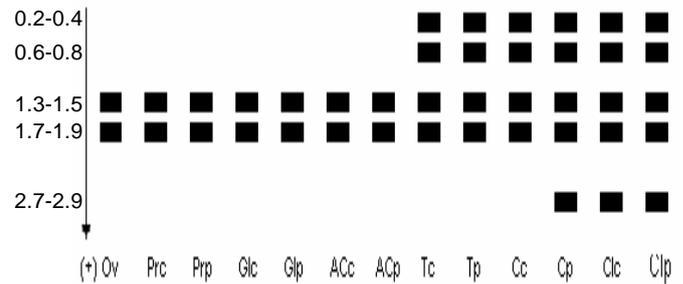


Figura 6. Zimograma de las isoenzimas superóxido dismutasa en los diferentes materiales vegetales de mandarina Cleopatra tratados con Pectimorf. Las abreviaturas se corresponden en orden con: óvulos, proembrión control, proembrión Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Globular control, Globular Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Torpedo control, Torpedo Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Cotiledonar control, Cotiledonar Pectimorf +10 mg.L⁻¹, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf +10 mg.L⁻¹

De manera general, se puede decir que en este sistema se evidencia un desarrollo ontogenético para las distintas fases del crecimiento, que está relacionado con el aumento de la expresión de isoformas y el incremento de productos tóxicos como consecuencia del aumento del metabolismo, debido a que son etapas más avanzadas en el desarrollo del material vegetal. De ahí que la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la dismutación del radical oxígeno (O₂[•]) y convierte en agua el peróxido de hidrógeno que se produce durante la respiración, pueda ser eliminado por varias enzimas antioxidantes, tales como las catalasas (35).

La Tabla III muestra los resultados del análisis cuantitativo de los zimogramas de los distintos estadios del material vegetal y tratamientos analizados. El sistema más polimórfico resultó ser el de anhidrasa carbónica con un 90.9 %, seguido de las fosfatasa ácida con un 90 % y las esterasa con 88.8 %. El 84.78 % de polimorfismo obtenido del análisis de los seis sistemas enzimáticos, está dado por la etapa de desarrollo en que se encuentra el explante y por el efecto que ejerce este biorregulador dentro de cada etapa en cuestión.

Sin embargo, al realizar estudios de la variabilidad genética dentro del género en *Musa* (36, 37), se encontraron valores altos de polimorfismo para el sistema anhidrasa carbónica.

Los resultados del análisis de conglomerados para el Pectimorf se muestran en la Figura 7, donde se puede apreciar que con un índice de similitud del 50 % se generan tres grupos bien definidos. En el grupo I aparecen separados los óvulos, agrupamiento lógico ya que es el explante de partida y al parecer en esta fase de desarrollo, son pocas las vías metabólicas que se encuentran activas para dar una respuesta desde el punto de vista fisiológico.

Tabla III. Análisis cuantitativo de los zimogramas de los distintos estadios del material vegetal y tratamientos analizados en mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan)

Sistemas isoenzimáticos	Total de bandas	Total de bandas comunes	Total de bandas propias	Total de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
Proxidasas	7	1	0	6	85.7
Polifenoloxidasa	4	1	0	3	75
Anhidrasa carbónica	11	1	3	10	90.9
Esterasas	9	1	2	8	88.8
Fosfatasas ácidas	10	1	1	9	90
Superóxido	5	2	0	3	60
Total	36	7	6	39	84.78

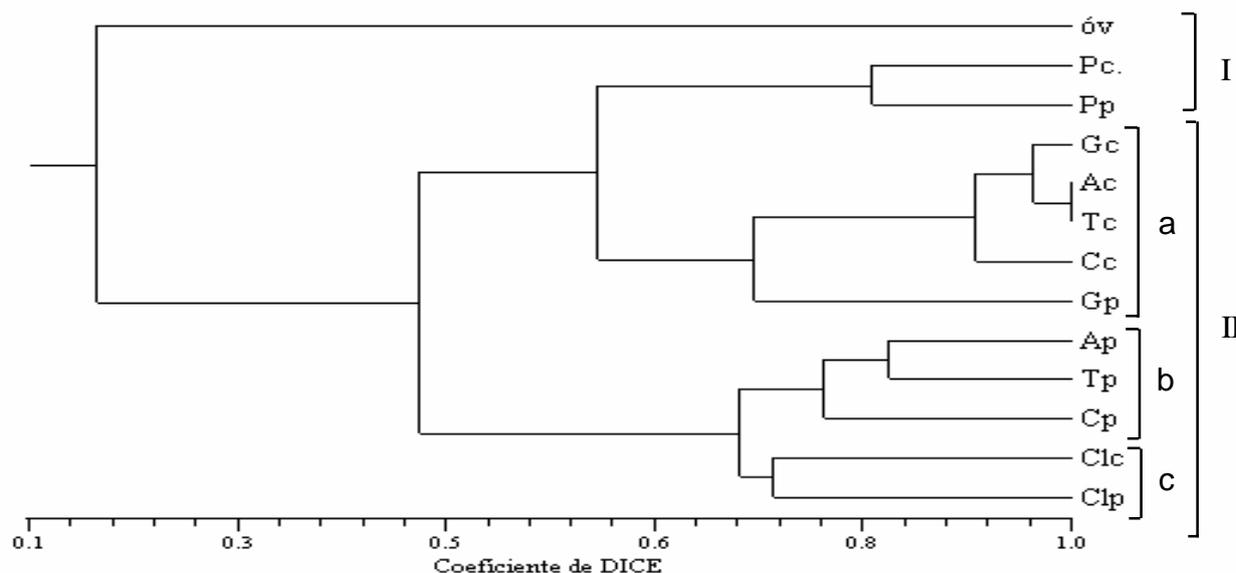


Figura 7. Dendrograma obtenido a partir del procesamiento en el software NTSYS 2.02, de la matriz de datos (presencia/ausencia) construida a partir de los seis sistemas isoenzimáticos estudiados para el Pectimorf. En el eje de las X están representados los valores del coeficiente de similitud de DICE. Las abreviaturas se corresponden con: Óvulos, Proembrión control, Proembrión Pectimorf, Globular control, Globular Pectimorf, Acorazonado control, Acorazonado Pectimorf, Torpedo control, Torpedo Pectimorf, cotiledonar control, cotiledonar Pectimorf, Callo embriogénico control y callo embriogénico Pectimorf

El grupo II presenta tres subgrupos: los proembriones en el subgrupo a), en el b) los cuatro estadios del desarrollo del embrión control (globular, acorazonado, torpedo, cotiledonar) y en el c) el globular con Pectimorf +10 mg.L⁻¹. Estos resultados siguen una secuencia lógica y en cada subgrupo la ubicación parece estar mediada por el nivel de diferenciación y desarrollo alcanzado. En el tercer subgrupo el biorregulador produjo un efecto sobre la expresión de genes, que de alguna forma activan vías metabólicas que inducen una respuesta que permite separarlos del resto de los controles.

El resto de los tratamientos se ubica en el grupo III, formado también por tres subgrupos. El subgrupo a) integrado por las fases de acorazonado y torpedo tratados con Pectimorf+10 mg.L⁻¹, mientras que el cotiledonar con Pectimorf+10 mg.L⁻¹ aparece solo en el subgrupo b); en el último subgrupo se encuentran los callos control y callos con Pectimorf +10 mg.L⁻¹, por presentar un nivel superior de desarrollo.

Estos resultados coinciden con otros encontrados (3, 38), donde se refiere que en los cítricos la embriogénesis somática es de tipo directa, la cual pasa por varias etapas, con formación de estructuras proembrionarias, seguida de las fases del desarrollo embrionario y por último la formación del callo embriogénico.

Esta agrupación a partir de la expresión diferencial de isoformas, está en total correspondencia con los resultados a partir del análisis de las diferentes etapas de desarrollo del material vegetal y al efecto que puede estar ejerciendo este biorregulador del crecimiento.

CONCLUSIONES

El estudio isoenzimático de los diferentes sistemas demostró que existe un marcado polimorfismo, debido a las diferentes etapas de desarrollo morfogénico del material vegetal empleado y al efecto del Pectimorf.

REFERENCIAS

- Cabrera, J. C.; Gutiérrez, A. y González, S. Highly pure acid and bioactive oligogalacturonides. En: 7 Cell Wall Meeting Abstracts and Programme. Santiago de Compostela, 1995. 72 p.
- Cabrera, J. C. Obtención de una mezcla de (1-4) - α -D-oligogalacturónidos bioactivos a partir de subproductos de la industria cítrica. [Tesis de Doctorado]; INCA, 2000. 100 p.
- Diosdado, E. Efecto de biorreguladores sobre el proceso de embriogénesis somática y el cultivo de protoplastos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). [Tesis de Doctorado]; Universidad de La Habana, 1997. 125 p.
- Benítez, D. Actividad biológica del Pectimorf sobre el desarrollo de callos de *Saccharum officinarum* L. de la variedad C 87-51. [Tesis de Diploma]; Fac. Biología. UH. 1998. 61 p.
- González, C.; Valdés, M.; Roman, M. I.; Xiqués, X.; García, H.; Hernández, I. y Marqués, M. Empleo de técnicas citogenéticas e isoenzimáticas en estudio de haploides de *Nicotiana* spp. En: Resúmenes del Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal (REDBIO 98), (3:1998:La Habana), 1998.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
- Davis, B. J. Disc electrophoresis II. Methods and applications to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, p. 404-422.
- Orstein, L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, p. 321-349.
- Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merr). [Tesis de doctorado]; Universidad de La Habana, 1986. 100 p.
- Guedes, M. y Rodríguez, C. I. Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. Sep. the Portugal. *Acta Biológica*, 1974, vol. 13, p. 169-177.
- González, C. y González, J. A. Estudio de patrones para la lima persa III. Caracterización isoenzimática. *Cienc. Téc. Agric.*, 1981, vol. 4, no. 2, p. 102-108.
- Brewer, G. J. y Singh, C. F. Introduction to isozyme techniques. New York:Acad. Press, 1971. 186 p.
- Iglesias, L.; Lima, H. y Simón, J. P. Isozyme identification of nucelar seedlings in *Citrus*. *J. Heredity*, 1974, vol. 65, p. 81-84.
- Wendel, J. F. y Weeden, N. F. Visualization and interpretation of plant isozymes in plant biology: 1989. 45 p.
- Rohlf, F. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 3.2i. Exeter Software Setauket, New York, 2001.
- Dice, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 1945, vol. 26, p. 297-302.
- Daviers, J. C. Statistic and date analysis in geology I. New York:Winley and Sons, 1973, 536 p.
- Linares, G. Análisis de datos. La Habana: Pueblo y Educación, 1980. 590 p.
- González, C. y Roman, M. I. Análisis electroforético en el gel de poliacrilamida para diferentes tipos de *poncirus trifoliata*, *citranjos* y *citrumelos*. *Cienc. Tec. Agric. Cítricos y otros frutales*, 1982, vol. 5, no. 3, p. 15-24.
- González, C.; Lavista, M. y González, J. Estudios de la lima Persa. *Pesc. Int. Soc. Cítric. Brasil*, 1983.
- Reyes, B. Estudio de la variabilidad genética en cultivo de tejido de cítricos *in vitro*. [Tesis de Diploma]. Fac. Biología. UH. 1990. 49 p.
- Quesada, S. Efecto del brassinosteroide sintético BIOBRAS-6 sobre el desarrollo *in vitro* de callos de *Citrus aurantium* L. [Tesis de Diploma]. Facultad de Biología. UH. 1994. 55 p.
- Acosta, A. Estudio del efecto de dos oligosacarinas sintéticas sobre el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 2006. 78 p.
- Cevallo, A. Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp). Determinación de marcadores morfohistológicos bioquímicos. [Tesis de Maestría]; Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 1998. 97 p.
- Fidalgo, A. Efecto biológico del Pectimorf sobre diversos eventos morfogénicos en caña de azúcar (*Saccharum spp. hybrid*) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). 2003. 65 p.
- Hernández, Y. Estudio de las diferencias genéticas en especies silvestres del género *Nicotiana*. [Tesis de Diploma]. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 2007. 75 p.
- Badger, M. R. y Price, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, 1994, vol. 45, p. 369-392.
- Geada, D. Variabilidad isoenzimática del género *Eucalyptus* en la región occidental de Cuba. [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 2003. 124 p.
- González, C. Comportamiento genético bioquímico de la lima Persa SRA-58 (*Citrus latifolia* Tan) sobre diferentes patrones en Cuba. [Tesis de Doctorado]; Facultad de Biología. UH. 1989. 120 p.
- Florida, M. Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) atendiendo a características morfobioquímicas y tolerancia al calor. [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 1999. 87 p.
- Pedersen, S. y Andersen, S. B. Developmental expression of isozymes during embryogenesis in barley anther culture. *Plant Science*, 1993, vol. 91, p. 75-86.
- Coppens, L. y Dewitte, D. Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. *Plant Science*, 1990, vol. 67, p. 97-100.
- Gaume, A.; Machler, F.; León, C. de; Narro, L. y Frossard, E. Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. *Plant Soil.*, 2001, vol. 228, p. 253-264.
- Ming, F.; Mi, G.; Zhang, F. y Zhu, L. Differential responses of rice plants to low-phosphorus stress and its physiological adaptive mechanism. *J. Plant Nutr.*, 2002, vol. 25, p. 1213-1224.
- García, P. E.; Arreola, A. y Castro, E. Oxígeno, herramienta para fabricar defensas bioquímicas en la planta del Chile. *Ciencia y Desarrollo en Internet*, 2004, vol. 7-8, p. 5.
- Dueñas, F. Determinación de la variabilidad genética en clones y somaclones de bananos y plátanos del género *Musa*. [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 2005. 73 p.
- Pérez, L. Caracterización morfoagronómica, citogenética e isoenzimática de ocho variedades de tabaco negro (*Nicotiana* spp.) de interés comercial. [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 2006. 66 p.
- Lima, H. Los cítricos. Enciclopedia popular. Instituto del Libro. 1979. 65 p.

Recibido: 10 de mayo de 2007

Aceptado: 20 de noviembre de 2007