

EFECTO DE DOS OLIGOSACARINAS SOBRE LA EXPRESIÓN ISOENZIMÁTICA AL SER APLICADAS SOBRE DOS VARIEDADES DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)

A. Acosta[✉], Lien González, Marlyn Valdés, Clara González y Laura Sánchez

ABSTRACT. Cuba is engaged in searching and designing new phytohormones, such as Pectimorf and xyloglucans, which are oligosaccharide mixtures from pectic (Patent No. 22859/2003) and hemicellulose polysaccharides, respectively. It has been reported that both are endogenous regulators of plant development and morphogenesis and can also elicit defence responses. However, less well-known are molecular mechanisms activated. That is the reason to continue studying to evaluate the role they play and the ways by which these compounds act on plant development. To get a first approach to the action mechanism of both compounds on the genome, the expression of four isoenzymatic systems - peroxidases, polyphenoloxidases, carbonic anhydrase and esterases- was analyzed in two varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), treated with both bioproducts. Data obtained were statistically analyzed by means of a package of NTSYS-PC programs and their importance was valued on the development and morphogenetic mechanisms of plants. As a result, characteristic zymotypes were obtained per each isoenzymatic system for the two varieties (H-2000 and H-2.1.1) studied. Also, inhibition and/or induction of some isoforms were observed in plants grown in a medium supplemented with both bioregulators, in comparison to the controls used. These results evidenced a modulation on the expression of genetic information mediated by these products, at least, for the four systems analyzed in this crop.

Key words: pectins, bioproducts, *Nicotiana tabacum*, plant growth substances

INTRODUCCIÓN

En Cuba se trabaja en la búsqueda y producción de nuevas fitohormonas, entre las que se encuentran el Pectimorf y los xiloglucanos, obtenidos ambos por el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto Nacional

Ms.C. A.Acosta, Profesor Instructor; Dra.C. Lien González, Profesor Asistente e Investigadora Auxiliar; Ms.C. Marlyn Valdés y Dra.C. Clara González, Profesoras Auxiliares y Laura Sánchez, Reserva Científica de la Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ aacosta@fbio.uh.cu, roxette@fbio.uh.cu

RESUMEN. En Cuba se trabaja en la búsqueda y producción de nuevas fitohormonas, entre las que se encuentran el Pectimorf y los xiloglucanos. El principio activo de estas es una mezcla de oligosacáridos, en el primer caso de origen péctico (Patente No. 1198/171) y en el segundo, de hemicelulosa. Se plantea que ambos son reguladores endógenos del desarrollo y la morfogénesis de las plantas y, además, inducen respuestas de defensa. Sin embargo, menos conocidos son los mecanismos moleculares que se activan, por lo que se continúan los estudios para evaluar el papel que juegan y las vías por las que actúan dichos compuestos en el desarrollo de las plantas. Para obtener una primera aproximación del mecanismo de acción de ambos compuestos sobre el genoma, se analizó la expresión de cuatro sistemas isoenzimáticos -Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Anhidrasas Carbónicas y Esterasas- en dos variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tratadas con los bioproductos. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el paquete de programas NTSYS-PC y se valoró su importancia sobre el desarrollo y la morfogénesis de las plantas. Como resultado se obtuvieron los zimotipos característicos para cada sistema isoenzimático de las dos variedades estudiadas (H-2000 y H-2.1.1). Además, se observó inhibición y/o inducción de isoformas en las plantas crecidas en medio suplementado con ambos biorreguladores, en comparación a los controles empleados. Estos resultados evidenciaron una modulación de la expresión de la información genética mediada por estos productos, al menos, para los cuatro sistemas analizados en el cultivo empleado.

Palabras clave: pectinas, productos biológicos, *Nicotiana tabacum*, sustancias de crecimiento vegetal

de Ciencias Agrícolas (INCA). El principio activo de estas es una mezcla de oligosacáridos, en el primer caso de origen péctico (1) y en el segundo, de hemicelulosa. Se plantea que son reguladores endógenos del desarrollo y la morfogénesis de las plantas (2, 3, 4).

Los resultados demuestran que el Pectimorf 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 en cuanto al vigor y la coloración de las plantas (1). La capacidad de este oligopectato para inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos,

catalizar la degradación de la pared celular de los callos, cuando se desea obtener suspensiones celulares e incrementar de forma notable el desarrollo y vigor de las plántulas, la validan como una alternativa promisoría en la Biotecnología Vegetal cubana (5). Por su parte, en el caso de los xiloglucanos, se ha comprobado que estos poseen actividad biológica, entre las que se encuentran la actividad auxínica y antiauxínica, dependiendo de la concentración de trabajo (6) y no se descarta la posibilidad de que también jueguen un papel en la activación de las vías de defensa. No obstante, en ambos casos, se continúan los estudios para evaluar el papel que juegan dichas hormonas en el desarrollo de las plantas y, de esta manera, garantizar la utilización segura de productos naturales en la mejora de cultivos, sin que estos provoquen alteraciones de su genoma o causen daños en el ecosistema.

Por otra parte, las isoenzimas han tenido un rol prominente en los estudios de poblaciones vegetales, para determinar la variabilidad y estructura genética, sistemática y biología evolutiva, así como en la descripción de germoplasma e identificación de variedades (7, 8). Estas se definen como diferentes formas moleculares de una enzima que poseen una actividad catalítica común, es decir, actúan sobre el mismo sustrato. Ciertos cambios (mutaciones) en los genes que codifican estas enzimas pueden resultar en modificación de la composición de aminoácidos, originando proteínas con la misma actividad biológica pero con diferente carga neta y, por tanto, con diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico. Estas diferencias determinan patrones característicos de migración electroforética de las formas isoenzimáticas. Por lo tanto, en base a este principio, las técnicas isoenzimáticas se han descrito como un método sencillo y barato, para medir las variaciones genéticas cercanas al nivel de ADN, relativamente libre de efectos ambientales, y sobre un mayor número de muestras manipulables (9).

Adicionalmente, el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) resulta de gran interés para la evaluación de biorreguladores, por las implicaciones tanto en la investigación básica (ha sido ampliamente usado como modelo) en estudios fisiológicos y bioquímicos y de genética molecular (10) como aplicada, pues constituye uno de los principales renglones económicos de nuestro país.

Es por ello que para estudiar si existe relación entre la regulación de la expresión de isoformas en determinados sistemas isoenzimáticos bajo la acción de bioproductos, el objetivo de este trabajo fue determinar variabilidad en la expresión genética, mediante el análisis de cuatro sistemas isoenzimáticos diferentes, de plantas crecidas en medios suplementados con xiloglucanos y Pectimorf.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y fitohormonas empleadas. Se emplearon semillas botánicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

de las variedades cultivadas Habana-2.1.1 (H-2.1.1) y Habana-2000 (H-2000) de la campaña 2002-2003, ambas gentilmente cedidas por el Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT).

Se emplearon dos bioproductos: a) Pectimorf (compuesto por una mezcla de (1→4)- α -D-oligogalacturonidos, con un grado de polimerización (Gp) entre 7 y 16); y b) xiloglucanos (compuestos por una mezcla de D-glicopiranosos unidos por enlaces β -1,4), ambos obtenidos y cedidos gentilmente por el Departamento de Fisiología Vegetal del INCA.

Cultivo in vitro aplicando los biorreguladores de interés. Para las evaluaciones *in vitro*, se colocaron las semillas de ambas variedades en un medio básico Murashige y Skoog (MS) sin estimuladores tradicionales de la germinación, únicamente suplementado con cada biorregulador: Pectimorf a 10 mg.L⁻¹ (MS/P) y xiloglucanos a 0,1 mg.L⁻¹ (MS/X). Como control negativo se empleó el medio MS sin fitohormona.

Primeramente, las semillas se desinfectaron mediante inmersión en lejía comercial durante 20 min., seguida de tres lavados en agua destilada, todo lo cual se desarrolló en un flujo laminar horizontal (*Veb Elektromat*, Alemania). Se colocaron cinco semillas por frasco y de estos se emplearon 10 por tratamiento (réplicas). Los frascos se mantuvieron en luz artificial continua y temperatura controlada por un período de 45 días.

Análisis de los sistemas isoenzimáticos. Para el análisis de las isoenzimas se partió de 5 g de hojas por tratamiento, las cuales se maceraron en mortero y se les añadió cinco gotas de sacarosa al 2 %. Los extractos obtenidos se filtraron por gasa y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización. Las corridas de electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida (gel de separación al 10 % y un gel concentrador al 4 %), y un sistema de buffer discontinuos (11). Estas se desarrollaron en tampón Tris-Glicina 0.04 M (pH=8.3) y a 50mA de corriente constante. Para cada sistema estudiado se aplicaron tinciones específicas: Peroxidasas (Px, E.C.1.11.1.7, 12); Esterasas (Est, E.C.3.1.1, 13); Anhidrasas Carbónicas (Anc, E.C.2.4.1.1, 14) y Polifenoloxidasas (Ppo, E.C.1.10.3.1, 10). Las movibilidades electroforéticas fueron medidas en centímetros, tomando como punto cero u origen el comienzo del gel de separación y colocándolas en un papel milimetrado.

Análisis estadísticos. A partir de los resultados, se confeccionaron las matrices de datos binarias para la presencia (1) o ausencia (0) de bandas en cada sistema evaluado, las que se analizaron mediante el paquete de programas estadísticos NTSYS-PC (versión 2.1; 15), empleando el coeficiente de Dice (16) y aplicando el programa SIMQUA. Basados en estas matrices de distancias, se usó el método de la media aritmética de grupos no ponderados (UPGMA) en el programa SHAN, para producir los dendrogramas de las variedades estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los sistemas isoenzimáticos mostró inducción y/o inhibición de bandas en el material tratado respecto a los controles. Dichas variaciones en la expresión de las isoformas podrían estar relacionadas con la modulación de diferentes procesos biológicos, entre ellos los de morfogénesis y defensa y, por lo tanto, brindan información sobre el papel biológico de los productos evaluados. A continuación se analizan los resultados para los cuatro sistemas estudiados:

Isoenzimas peroxidasas. A partir del análisis del zimograma de peroxidasas para el Pectimorf (Figura 1a), se puede apreciar que del total de nueve bandas cinco son comunes a todo el material, las que pueden ser características del género. Resultados similares fueron obtenidos en un análisis isoenzimático de siete variedades cultivadas de tabaco (17). La banda ubicada en 2.8 unidades es característica de la variedad H-2.1.1, la cual se encuentra ausente en la muestra donde se aplicó Pectimorf; el resto del patrón de isoformas fue idéntico en esta variedad. Para la H-2000, las bandas ubicadas en 0.2 y 1.6 unidades son propias de esta, donde la última constituye un alelo raro que permite diferenciar a esta variedad y coincide con lo publicado anteriormente (18). A su vez, no aparece en el material tratado con el biorregulador la isoforma ubicada en 5.1 unidades.

Para los xiloglucanos (Figura 1b), se puede apreciar que existen un total de nueve bandas, de las que cuatro son comunes a todo el material y probablemente características del cultivo. Se aprecia también una zona de bandas compactas, donde se ubican las isoformas de mayor peso molecular y, por tanto, de mayor migración anódica. Las bandas ubicadas en 0.2 y 1.6 unidades respectivamente, aparecen en la variedad H-2.1.1 crecida en medio con xiloglucanos, mientras que las isoformas correspondientes a 2.8 y 4.9 unidades solo se observan en el control y no existen bandas características de esta

variedad para el sistema en estudio. La isoforma de 3.4 unidades es característica de la variedad H-2000 y solo apareció en el material tratado con el biorregulador. Al igual que para la otra variedad, en esta se produjeron inducciones y represiones de determinadas bandas en respuesta al producto evaluado; por ejemplo, en el material tratado se indujo la isoforma localizada en 2.8 unidades, mientras que se inhibió las de 0.2, 1.6 y 5.1 unidades.

Al Pectimorf se le ha atribuido un papel en la inducción de respuestas de defensa, pues mimetiza la presencia de patógenos que liberan, a partir de la interacción con la pared celular, oligopeptatos con estructuras similares a las del biorregulador. También es conocida la acción directa sobre la morfogénesis al ser liberados de forma natural por acción enzimática (5). En el sistema analizado se apreció inhibición y no inducción de isoformas, lo cual constituye una novedad. Sin embargo, la explicación a este resultado podría ser compleja. La relación con la inducción de vías de defensa sería poco probable por las bajas concentraciones empleadas en los tratamientos, además de la relación entre oligosacarinas y las vías de defensa inducidas por el ácido jasmónico o salicílico y no el sistema de oxidasas (19). Por lo tanto, resulta más probable una relación directa entre la morfogénesis y la inhibición de las isoformas de peroxidasas, a partir de una relación directa con hormonas tradicionales.

En el caso de los xiloglucanos, y dado el importante papel que desempeña este sistema isoenzimático en la síntesis de los componentes de la pared, regulación del crecimiento, diferenciación celular, resistencia a factores abióticos y bióticos, entre otros (6), podría decirse que las isoformas inducidas poseen una actividad catalítica superior a las que normalmente se expresan, lo que estaría en correspondencia con el desarrollo morfogénico alcanzado por las plantas en el momento de efectuar el estudio (datos no mostrados).



Figura 1. Zimogramas para el sistema isoenzimático peroxidasas. Donde: (a) tratamiento con el Pectimorf, y (b) tratamiento con los xiloglucanos. Los carriles se corresponden con: 1-H-2.1.1 en MS, 2-H-2.1.1 en MS/Bioproducto, 3-H-2000 en MS, 4-H-2000 en MS/Bioproducto

Isoenzimas polifenoloxidasas. En el análisis del zimograma de polifenoloxidasas para el Pectimorf (Figura 2a), se apreció un total de siete bandas, de las cuales se observan dos localizadas en 4.0 y 4.3 unidades comunes a todo el material. Para la variedad H-2.1.1, se apreció que las bandas ubicadas en 2.1 y 4.6 unidades aparecen en el control pero no en el material tratado. A su vez, esta última correspondiente con la isoforma de mayor migración anódica, parece ser característica de la variedad. Para la H-2000 se apreció la inhibición de dos isoformas en el material tratado (1.9 y 3.2 unidades) y no se apreciaron bandas características.

El análisis de este sistema para los xiloglucanos (Figura 2b) mostró un total de siete bandas, donde tres (2.1, 3.2 y 4.0 unidades) son características de las dos variedades. En la variedad H-2.1.1 solo se apreció inhibición de isoformas en el material tratado con el biorregulador respecto al control empleado y estas estuvieron ubicadas en 1.9, 2.8 y 4.3 unidades. No se observaron bandas características para esta variedad. Las bandas localizadas en 1.9 y 4.3 unidades respectivamente, se presentaron en las variedades crecidas en medio MS, no así en el medio con xiloglucanos.

En general, existen dos zonas de migración diferentes: la primera comprendida desde 1.9 a 3.2 unidades y la segunda desde 4.0 a 4.6 unidades, característica que ha sido descrita en tabaco (17, 18), así como también en otros cultivos como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (9) y plátano (*Musa spp.*) (20).

Las polifenoloxidasas, al igual que las peroxidases, son isoenzimas que participan en importantes rutas de defensa contra diferentes patógenos (9); en este caso mediante la oxidación de compuestos fenólicos naturales en quinonas, que polimerizan en pigmentos carmelitas o negros (en presencia de oxígeno), los que constituyen compuestos tóxicos para diferentes patógenos e implica su restricción, e incluso inhibición de su crecimiento (21). Sin embargo, en el material tratado y similar a las peroxidases, se apreció

inhibición de isoformas en lugar de inducción, lo cual se podría deber a la activación de vías diferentes de defensa que no involucran procesos de oxidación-reducción de derivados fenólicos, o que estos sistemas se inducen tempranamente y el tiempo tomado para el análisis estuviera fuera del rango de inducción. No obstante, sería interesante realizar otros estudios, que permitan conocer las causas reales de la inhibición de las isoformas en períodos de tiempo prolongados y cortos de interacción biorregulador-planta, así como determinar la actividad de la fenil amonio liasa (PAL) y otras enzimas que permitan caracterizar las vías inducidas (22).

Isoenzimas esterasas. En el caso del Pectimorf (Figura 3a), se encontró un total de ocho bandas, de las cuales cinco están ubicadas en 2.0, 2.4, 2.9, 5.5 y 5.9 unidades y son comunes a todo el material, constituyendo este un sistema bastante uniforme. Similares resultados fueron obtenidos al analizar híbridos interespecíficos de *N. tabacum* x *N. megalosiphon* (7), así como en el estudio de nueve variedades de tabaco (17). En la variedad H-2.1.1 crecida en medio con Pectimorf, se indujo la expresión de dos isoformas ubicadas en 1.3 y 5.0 unidades y no aparecen bandas características. Las bandas ubicadas en 1.3 y 3.4 unidades son características de la variedad H-2000 y solo se expresó cuando esta creció en medio suplementado con biorregulador.

El electroforetograma de esterasas para los xiloglucanos (Figura 3b) mostró un total de ocho bandas, de las cuales cinco están ubicadas en 2.4, 2.9, 5.0, 5.5 y 5.9 unidades y son comunes a todo el material analizado. En la variedad H-2.1.1 se observó la inducción de dos isoformas en el material crecido en medio MS/X, localizadas en 1.3 y 3.4 unidades y no se apreció para este sistema bandas características de la variedad. También para la variedad H-2000 se observó inducción de tres isoformas en las plantas crecidas bajo el efecto de los xiloglucanos, las que se ubicaron en 1.3, 2.0 y 3.4 unidades, correspondiéndose la primera y la última con las bandas que se indujeron en la variedad H-2.1.1. Tampoco se apreciaron bandas características para esta variedad.

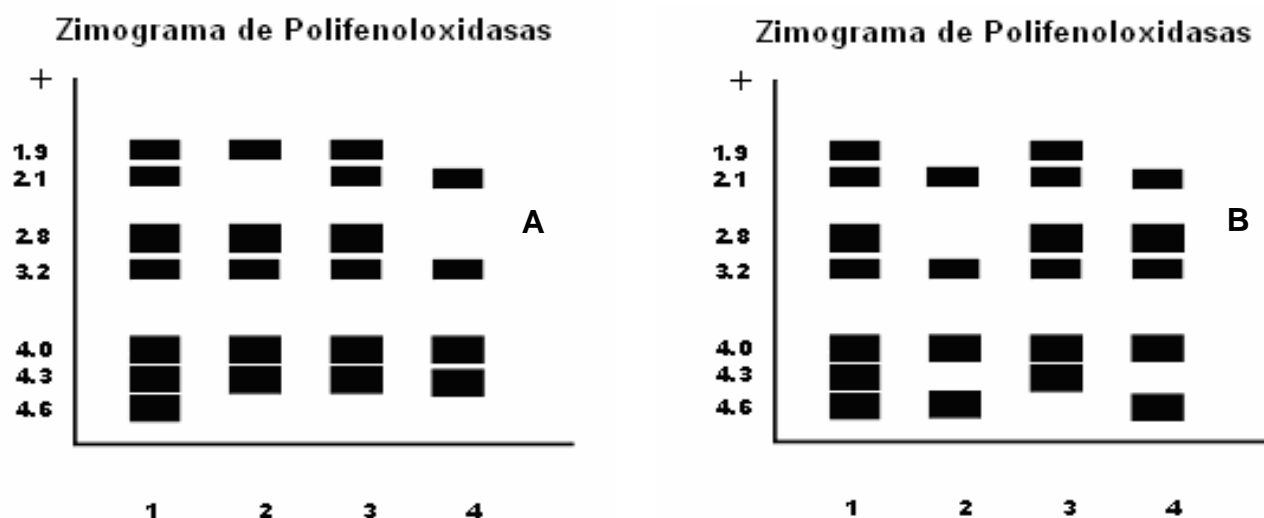


Figura 2. Zimogramas de la electroforesis para el sistema isoenzimático polifenoloxidasas. Donde: (a) tratamiento con el Pectimorf, y (b) con los xiloglucanos. Los carriles se corresponden con: 1-H-2.1.1 en MS, 2-H-2.1.1 en MS/Bioproducto, 3-H-2000 en MS, 4-H-2000 en MS/Bioproducto

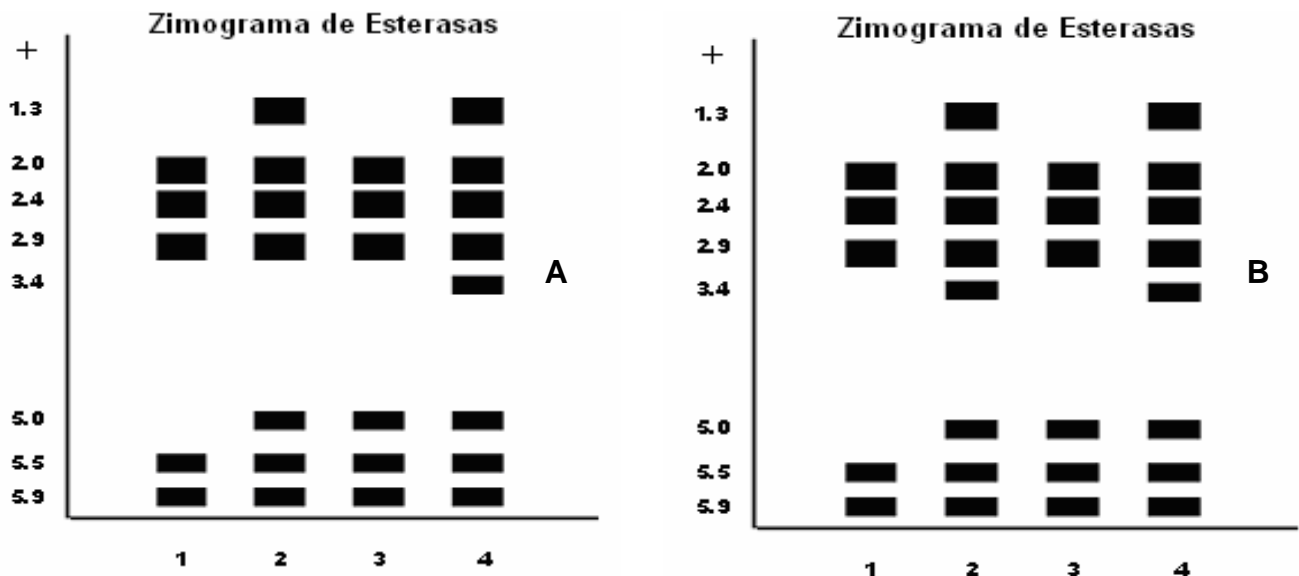


Figura 3. Zimogramas de la electroforesis para el sistema isoenzimático esterasas. Donde (a) tratamiento con el Pectimorf, y (b) con los xiloglucanos. Los carriles se corresponden con: 1–H-2.1.1 en MS, 2–H-2.1.1 en MS/Bioproducto, 3–H-2000 en MS, 4–H-2000 en MS/Bioproducto

En el estudio de híbridos interespecíficos y progenitores del género *Nicotiana*, se encontraron ocho bandas para este sistema (8) pero, a diferencia del nuestro, con un elevado polimorfismo. La alta homogeneidad en el zimograma se puede deber a la importancia de este sistema de isoenzimas en el metabolismo, ya que las esterasas pertenecen al grupo de las hidrolasas, las cuales participan activamente en procesos catabólicos y, por tanto, de entrada de sustratos a las vías de obtención de energía (23). Esto se correspondería con un activo metabolismo a nivel celular (reacciones anabólicas y catabólicas) y que no es más que el reflejo del vigor fenotípico observado en las plantas tratadas en el momento del análisis.

Isoenzimas anhidrasa carbónica. Para el sistema de anhidrasa carbónica, obtenido a partir de plantas tratadas con Pectimorf (Figura 4a), se obtuvo un total de nueve bandas, de las cuales las ubicadas en 1.9, 2.4, 2.9 y 5.3 unidades son comunes a todo el material y posiblemente sean características del cultivo. En la variedad H-2.1.1 crecida en medio con Pectimorf se indujeron diferentes isoformas, ubicadas en 0.9, 1.2, 4.8 y 5.6 unidades y no se apreciaron bandas características para esta variedad. En la H-2000 solo se indujo una banda bajo el efecto del biorregulador, la cual se corresponde con la isoforma ubicada en 3.5 unidades, el resto fue homogéneo y tampoco aparecieron bandas características para esta variedad.

En tanto que, para los xiloglucanos, un análisis del sistema de anhidrasa carbónica (Figura 4b) mostró un total de nueve bandas, de las cuales seis son comunes a las dos variedades analizadas (1.9, 2.4, 2.9, 4.8, 5.3 y 5.6 unidades) y posiblemente del cultivo. Al analizar ambas variedades solo se apreció inducción de isoformas en las plantas crecidas en medio suplementado con xiloglucanos. Para la H-2.1.1, aparecieron dos bandas

ubicadas en 0.9 y 1.2 unidades, mientras que para la H-2000, solo se indujo la isoforma correspondiente a 3.5 unidades. En ninguno de los dos casos se apreciaron bandas características.

El sistema de anhidrasa carbónica ha sido analizado para el estudio del género *Nicotiana*, como es el caso en que se encontraron ocho bandas (17) y los que encontraron siete bandas en *Clitoria ternatea* L. (24). Este está muy relacionado con las vías anabólicas en las plantas, fundamentalmente con la fotosíntesis (12), de ahí que se pueda establecer una relación positiva entre el vigor y la intensidad de la coloración verde observada en las plántulas crecidas en medio con Pectimorf y la inducción de isoformas, tanto en el sistema esterasas como anhidrasa carbónica, que no es más que un reflejo a nivel molecular del vigor fenotípico apreciado.

Análisis de conglomerados a partir de los sistemas isoenzimáticos estudiados. Los resultados obtenidos a partir del procesamiento de las matrices, mostraron una clara separación de las dos variedades empleadas, así como también una diferenciación entre el material tratado respecto al control. Este análisis permite suponer una acción directa de los bioproductos sobre la regulación de la expresión génica y, por tanto, sobre diferentes procesos en plantas. A continuación se analizan los resultados para los dos bioproductos empleados:

Pectimorf. Los resultados obtenidos a partir del procesamiento de la matriz construida con los cuatro sistemas isoenzimáticos analizados, se muestran en la Figura 5. En ella se puede apreciar que con un coeficiente de similitud de DICE del 85 % se forman dos grupos bien definidos. El grupo I está formado solo por la variedad H-2.1.1 obtenida en medio MS, mientras que en el grupo II aparece la variedad H-2.1.1 en medio MS/P, así como la variedad H-2000 en medio MS y MS/P.

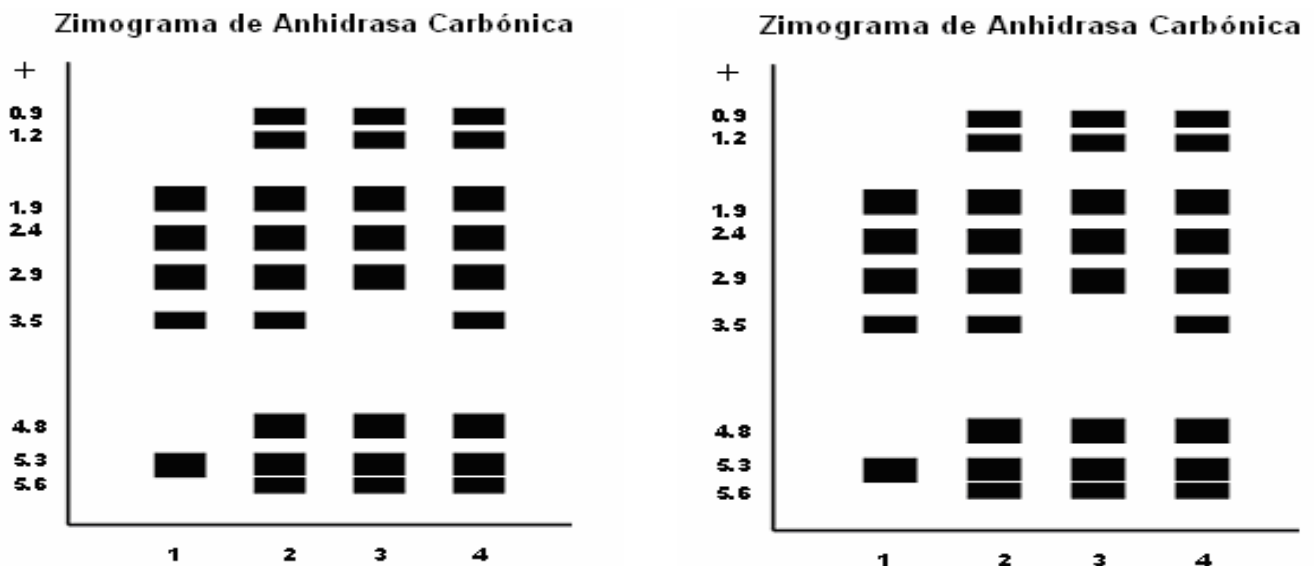


Figura 4. Zimograma de la electroforesis para el sistema isoenzimático anhidrasa carbónica. Donde (a) tratamiento con el Pectimorf, y (b) con los xiloglucanos. Los carriles se corresponden con: 1-H-2.1.1 en MS, 2-H-2.1.1 en MS/Bioproducto, 3-H-2000 en MS, 4-H-2000 en MS/Bioproducto

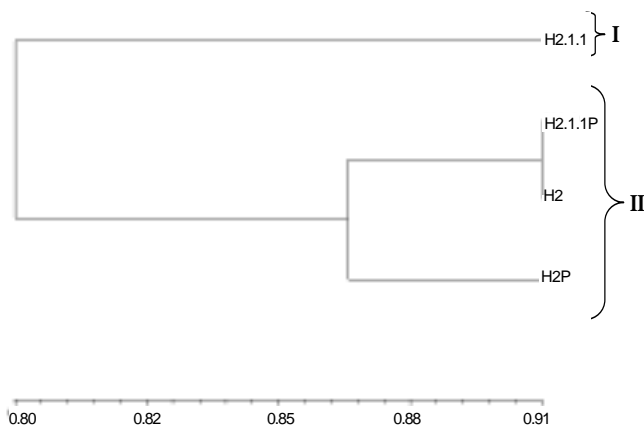


Figura 5. Dendrograma obtenido para los cuatro sistemas isoenzimáticos estudiados al emplear el Pectimorf, a partir del análisis de la matriz de datos binario y construido mediante el paquete de programas estadísticos NTSYS-PC 2.02. En el eje de las X están representados los valores del coeficiente de similitud de DICE. I y II representan los grupos que se definen al establecer un coeficiente de similitud de DICE del 85 %

La separación de los controles en dos grupos, a partir del análisis de los sistemas isoenzimáticos, coincide con los resultados del estudio de filogenia de nueve variedades de tabaco (17), y entre las que se encontraban las dos analizadas en este trabajo. Esta subdivisión podría deberse a que la H-2.1.1 es altamente resistente al moho azul (*Peronospora hyoscyami*), lo cual coincide con otros trabajos (18), mientras que la H-2000 lo es a la pata prieta (*Phytophthora nicotianae*).

El control de la variedad H-2000 mostró mejor desarrollo morfológico que el de la H-2.1.1; sin embargo, al crecer esta última en medio MS/P, su vigor se vio incrementado (mayor número de hojas, coloración y desarrollo de raíces más largas), lo cual puede estar correlacionado con la inducción de isoformas de insoenzimas implicadas en vías metabólicas (anhidrasa carbónica y esterases). Esta podría ser la causa de que se agrupen con un 85 % de similitud en el dendrograma. *Xiloglucanos*. Los resultados del análisis de conglomerados para los xiloglucanos se muestran en la Figura 6. En ella se puede apreciar que con un índice de similitud del 80 % se generan dos grupos bien definidos. En el grupo I se agrupan ambas variedades obtenidas en medio MS, mientras que en el grupo II están las procedentes de medios MS/X. Esta agrupación a partir de la expresión diferencial de isoformas, están en total correspondencia con los resultados del análisis de los caracteres morfológicos (desarrollo de raíces y hojas), al igual que lo obtenido para el Pectimorf (datos no mostrados).

La inclusión de la variedad H-2.1.1 y la H-2000 en un mismo grupo no está en contradicción con lo planteado en el análisis del dendrograma asociado a la acción del Pectimorf, pues si tomamos para este caso un 85 % en lugar de un 80 % se generarían tres grupos, uno para la variedad H-2000 crecida en medio MS, otro para H-2.1.1 también obtenida en MS y un tercero donde se mantienen ambas variedades bajo el efecto de los xiloglucanos.

Esta agrupación a partir de la expresión diferencial de isoformas, está en total correspondencia con los resultados del análisis de los caracteres morfológicos (desarrollo de raíces y hojas - datos no mostrados), al igual que los obtenidos para el Pectimorf. En el caso de los xiloglucanos, este tipo de agrupación bien definida de las variedades para los diferentes medios permite proponer-

los como mejores inductores de eventos morfogénicos con respecto al Pectimorf, con su correspondiente expresión diferencial marcada a nivel genético.

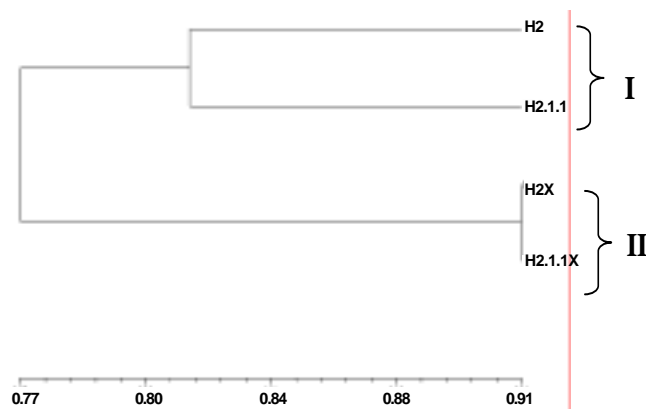


Figura 6. Dendrograma obtenido para los cuatro sistemas isoenzimáticos estudiados al emplear los xiloglucanos, a partir del análisis de la matriz de datos binario y construido mediante el paquete de programas estadísticos NTSYS-PC 2.02. En el eje de las X están representados los valores del coeficiente de similitud de DICE. I y II representan los grupos que se definen al establecer un coeficiente de similitud de DICE del 80 %

De forma general, los análisis genético-bioquímicos mostraron diferentes zimotipos para los sistemas enzimáticos estudiados, lo cual indica que las variaciones que se presentan en los patrones isoenzimáticos de las variedades son debido a la expresión diferencial de los genotipos en respuesta los bioproductos empleados en el medio de cultivo.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los zimotipos característicos de las dos variedades estudiadas (H-2000 y H-2.1.1), a partir de los cuatro sistemas isoenzimáticos analizados.
- Se observó inhibición y/o inducción de isoformas en las plantas crecidas en medio suplementado con biorregulador (Pectimorf o xiloglucanos) en comparación a los controles empleados.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan C. Cabrera, Investigador Titular del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) y Dr. Humberto García, Investigador Agregado del Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), por sus aportes de productos y semillas para las investigaciones.

REFERENCIAS

1. Cabrera, J. C. Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal. Patente Cubana 22859/2003.
2. Falcón, A. y Cabrera, J. C. Actividad auxínica del Pectimorf como inductor de enraizamiento en peciolos de Violeta Africana. En: Congreso Científico del INCA (13:2002, nov. 12-15, La Habana). Memorias. CD-Rom. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. ISBN 959-7023-229.
3. Fidalgo, A. Efecto biológico del Pectimorf sobre diversos eventos morfogénicos *in vitro* en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 2003. 74 p.
4. York, W y Eberhad, S. Xyloglucan - composition and glycosyl sequence. *Plant Cell Wall*, 2004.
5. Cabrera, J. C.; Fernández, H. y García, T. Pectimorf: un biorregulador cubano para la biotecnología vegetal. Resumen. En: Seminario Científico INCA. (11:1998:La Habana). p. 133.
6. Shirakawa, M. y Yamatoya, K. Xyloglucans: Its structure and function. *Journal of Biology*, 2003, vol. 208, no. 11, p. 325-331.
7. González, C. y García, H. Análisis isoenzimático de peroxidadas, polifenoloxidasas y esterases de progenitores e híbridos de tabaco (*Nicotiana* sp.) en Cuba. *Rev. Biología*. 1992, vol. 6, no. 3, p. 192-196.
8. Valdés, M. Caracterización citogenética e isoenzimática de haploides y un dihaploide de género *Nicotiana*. [Tesis de Maestría]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 1997. 46 p.
9. González, C. Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas, Capítulo 2, En: Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. La Habana : Edit. Félix Varela. 2002. p. 36-76.
10. Guedes, M. y Rodríguez, C. I. Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffee cultivars. Sep. the Portugal. *Acta Biológica. Serie A*, 1974, vol. 13, p. 169-177.
11. Orstein, L. Disc electrophoresis II. Background and theory. *Ann. Ny. Acad. Sci.*, vol. 121, p. 321-349.
12. 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.
13. González, C. y González, J. A. Estudio de patrones para la lima Persa III. Caracterización isoenzimática. *Cienc. Téc. Agríc.*, 1981, vol. 4, no. 2, p. 102-108.
14. Brewer, G. J. y Singh, C. F. Introduction to Isozymes Techniques. New York:Acad. Press. 1971. 186 p.
15. Rohlf, F. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 3.2. New York : Exeter Software Setauket.
16. Dice, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 1945, vol. 26, p. 297-330.
17. Pérez, E. L. Caracterización morfoagronómica, citogenética e isoenzimática de ocho variedades de tabaco negro (*Nicotiana* sp.) de interés económico. Resumen. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 2002.

18. Betancourt, L. Análisis de la variabilidad isoenzimática en variedades de tabaco negro (*Nicotiana tabacum* L.) en Cuba. [Trabajo de Diploma]. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 1991. 42 p.
19. Solano, R. Jasmonate signalling and its role in the activation of plant defences. Centro Nacional de Biotecnología. http://www.cnb.uam.es/groups/DGMP/lineas_dpto3/roberto_solano, 2006.
20. Alonso, M. Estudio de la variabilidad genética en especies clones y el primer híbrido cubano de plátano fruta (*Musa* ssp.). [Tesis de Maestría]. Facultad de Biología, UH. 2002. 65 p.
21. Goupy, P.; Macheix, J. J.; Nicolas, J. y Varoquaux, P. Partial purification and characterization of endive (*Cichorium endivia* L.) polyphenoloxidase. *Sciences des Aliments*, 1994, vol. 14, no. 6, p. 751-762.
22. Dixon, R. A.; Achnine, L.; Kota, P.; Lu, Ch-J.; Reddy, M. S. S. y Wang, L. The Phenylpropanoid pathway and plant defense. A genomic perspective. *Molecular Plant Pathology*, 2002, vol. 3, no. 5, p. 371-390.
23. Saka, H. y Maeda, E. Changes in some hydrolytic enzymes associated with the redifferentiation of shoot in rice callus tissues. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan*, 1974, vol. 43, p. 207-218.
24. Pinares, A. Caracterización morfoagronómica, citogenética y genético-bioquímica de accesos de Conchita azul (*Clitoria ternatea* L.). [Tesis de Diploma]; Facultad de Biología, Universidad de La Habana. 2001, 51 p.

Recibido: 23 de noviembre de 2006

Aceptado: 1 de agosto de 2007

Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

Las Oligosacarinas reguladoras de los mecanismos de defensa, del desarrollo y la diferenciación de las plantas

**Coordinador: Ms.C. Humberto Izquierdo Oviedo
Ms.C. Alejandro Falcón**

**Fecha: agosto
Duración: 40 horas**

SOLICITAR INFORMACIÓN

**Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (47) 86-3773
Fax: (53) (47) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu**