



PGTF
**THE PEREZ-GUERRERO TRUST FUND FOR ECONOMIC AND TECHNICAL
COOPERATION AMONG DEVELOPING COUNTRIES**



**“SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF
BIOPRODUCTS OF INDUSTRIAL APPLICATION (SCEBIA)”**

**“SINTESIS, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE
BIOPRODUCTOS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL (SCEBIA)”**

INFORME FINAL 2016-2018

Entidad Ejecutora:

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia – Universidad Nacional de Tucumán (FBQyF-UNT).

Contraparte Extranjera:

Universidad Autónoma de Coahuila (UAC), México
Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA),
Cuba

Noviembre, 2018

ÍNDICE

I – CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.....	3
II – INFORME TÉCNICO DE AVANCE DEL PROYECTO.....	4
<i>Act. 01. Gestión del Proyecto.....</i>	<i>5</i>
<i>Act. 02. Análisis del estado del arte en el mundo.....</i>	<i>10</i>
<i>Act. 03. Desarrollo y Ejecución. Gestión del conocimiento.....</i>	<i>13</i>
<i>Avance del proyecto</i>	
<i>a) Producción de metabolitos a escala de laboratorios</i>	
<i>b) Estudio y caracterización de los metabolitos</i>	
<i>c) Estudio de diferentes sustratos para la producción de metabolitos</i>	
<i>d) Evaluación de la aplicación de los bioproductos en las industrias alimenticia y farmacéutica.</i>	
III – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE.....	121

Se adjunta el Resumen de la situación financiera final en el presente documento.

El INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE FINAL consta de 2 (dos) archivos pdf. El primero de ellos corresponde a la Planilla enviada por PNUD que contiene el Resumen Financiero, el detalle de cada uno de los gastos realizados en cada una de las Actividades y el Resumen 2 que contiene el listado de todos los gastos realizados. El segundo archivo pdf contiene todas las facturas y tickets escaneados. Ambos archivos se adjuntan al INFORME TECNICO FINAL.

Todos los comprobantes inherentes a la ejecución del presente Proyecto serán conservados y archivados en la Secretaría de Control de Gestión Económica Financiera de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (FBQyF-UNT).

II – INFORME TÉCNICO FINAL DEL PROYECTO

El presente Proyecto comenzó su ejecución en Marzo de 2016 con la adjudicación de los fondos y concluyó en el mes de Octubre de 2018. Los avances realizados en las Actividades 1, 2 y 3 correspondientes los dos años de ejecución del mismo son los siguientes:

ACTIVIDAD 01. GESTION DEL PROYECTO

AÑO 2016

- Entre el 15 y 25 de Mayo de 2016, se realizó la primera reunión de investigadores del Proyecto en Tucumán, Argentina. Estuvo presente la responsable cubana, Dra. Michelena Alvarez y los integrantes argentinos. En esta reunión se planificaron las actividades a realizar por cada país integrante.

La comunicación y planificación con los integrantes de México se realizó via Skype. Se adjunta foto de la reunión donde participaron la Dra. Georgina Michelena Alvarez, Ing. Patricia Albarracin y la Directora del Proyecto, Dra. Graciela Cerutti.



- En el marco de esta visita, se dictó el Curso de Posgrado y Actualización **BIOPRODUCTOS DE APLICACION INDUSTRIAL** entre las Facultades de Bioquímica, Química y Farmacia y la Facultad de Ciencias Exactas de la UNT e ICIDCA (Cuba). El Curso tuvo una duración de 40 horas con evaluación final. Participaron todos los integrantes extranjeros y argentinos en calidad de organizadores y disertantes. Se realizó una amplia difusión del Curso y hubo numerosos participantes.

Se adjunta Programa del Curso y Resolución del mismo en ANEXO 1.

- Entre el 03 y 12 de Noviembre de 2016, la Ing. Patricia Albarracin asistió al Instituto CIEMAT de Madrid, España donde visitó este Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, sus laboratorios y plantas pilotos en la sede central y el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER) en Soria, provincia de Castilla, España. Además, realizó la presentación de las actividades de investigación del presente Proyecto y se acordó la asistencia y cooperación en tareas de investigación y desarrollo entre ambos grupos de investigadores.

Se adjunta el Informe y Certificado de la visita realizada por la Ing. Albarracin a CIEMAT en ANEXO 2.



AÑO 2017

- Durante el 03 y 19 de Junio de 2017, tres de las Integrantes del proyecto (Dra. Georgina Michelena Alvarez del grupo cubano de investigación, Dra. Norma Barnes y Dra. Graciela Cerutti del grupo argentino) participaron en el Instituto CIEMAT de Madrid de encuentros científicos a los fines de planificar Convenios de Asistencia y Cooperación en tareas de investigación y desarrollo entre ambos grupos de investigadores. Aprovechando este encuentro, se realizó una reunión de avance entre los integrantes cubanos y argentinos del Proyecto para consensuar los resultados obtenidos hasta el mes de Mayo de 2017 y planificar las actividades a seguir.



- Durante esta estancia en CIEMAT, se participó en el evento “**2ND BIOMASS RESOURCES FOR RENEWABLE ENERGY PRODUCTION – RESTOENE-2-CM WORKSHOP**” donde la Dra. Michelena Alvarez fue conferencista y las Dras. Barnes y Cerutti participaron de los distintos grupos de trabajo.

Se adjunta Certificados de Asistencia. ANEXO 3.

- Entre el 06 y 19 de Noviembre de 2017, tres investigadoras argentinas integrantes del Proyecto (Ing. Patricia Albarracin, Ing. Mónica Coronel y Dra.

Graciela Cerutti) realizaron una estancia de trabajo en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila en Saltillo, México. Durante la misma, además de llevar a cabo la Segunda Reunión de avance del proyecto junto al Dr. José Luis Martínez y su grupo de investigadores participantes, se realizaron las siguientes actividades:

- a) Reunión con el Sr. Rector y Secretarios Académico y de Posgrado de la Universidad Autónoma de Coahuila – UAdeC. Durante la misma, se informó a las autoridades de los objetivos y avances de ejecución del presente Proyecto. El Sr. Rector solicitó que se diera amplia difusión del mismo con los alumnos de grado y posgrado de la Universidad a los fines de estimular la investigación científica y el intercambio científico-tecnológico entre los países integrantes.



- b) Se realizaron tres Reuniones científico-académicas con los integrantes de distintos estamentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC: Autoridades (Decano y Secretario de Posgrado), Investigadores y Alumnos de Grado y Posgrado.
- c) Durante la estancia, se participó como Disertantes-Conferencistas en el **3 FORO INNOVACHEM – Innovación Científica**, en el marco del cual, las investigadoras argentinas disertaron sobre resultados obtenidos durante la ejecución del presente Proyecto. En el Foro participaron 150 asistentes entre los cuales se encontraban Docentes, Investigadores, estudiantes de posgrado y estudiantes de grado.



Se adjunta certificados. ANEXO 4.

- d) Además, se firmaron Actas Acuerdo de Cooperación y Asistencia Científica entre la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC y la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán – UNT (Unidad Ejecutora del Proyecto en Argentina).

Se adjunta Acta Acuerdo. ANEXO 5.

- En la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, se realizó la Segunda Reunión de Avance del Proyecto el día 14 de Noviembre de 2017 en el Salón Internacional de la UAdeC. Durante la misma, se informaron los avances realizados por los países integrantes del proyecto, se realizó el informe financiero y se acordaron las acciones a seguir hasta la finalización del mismo. Participaron de la misma, los Investigadores de México Dr. José Luis Martínez, Dra. Mayela Govea y Dr. Tirso Flores y las Investigadoras de Argentina: Dra. Graciela Cerutti, Ing. Patricia Albarracín e Ing. Mónica Coronel.

La comunicación y planificación con los integrantes de Cuba se realizó via Skype.

Se adjunta Acta de la Reunión en el ANEXO 6.



AÑO 2018

- Entre el 06 y el 19 de Junio de 2018, la Dra. Georgina Michelena Alvarez, coordinadora del Grupo Cubano de Investigadores que participan en el Proyecto, realizó una estancia en la UNT de Argentina.

- a) Durante la misma, se realizaron reuniones de avance y coordinación a los fines de cumplir con la planificación final del proyecto. Se acordó que la Reunión Final del Proyecto se realizaría en la ciudad de Saltillo, México durante el mes de Setiembre de 2018.



- b) Durante la estancia de la Dra. Michelena Alvarez y en el marco del Proyecto, el 14 de Junio de 2018 dictó la Conferencia “**BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL APLICADA AL SECTOR DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZUCAR**” donde mostró la visión integral del desarrollo de bioproductos de aplicación agrícola e industrial y las principales líneas de desarrollo y resultados del proyecto. En el Curso participaron 47 asistentes entre los cuales se encontraban presentes Docentes-Investigadores de la UNT, estudiantes de posgrado, doctorados y maestrías y alumnos de grado de las Carreras de Ingeniería, Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología.



- Entre el 06 y 23 de Setiembre de 2018, se realizó una estancia científico-académica en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila - UAdeC en Saltillo, México. Durante la misma, se realizaron las siguientes actividades:

- a) Reunión con las nuevas Autoridades del Rectorado de la UAdeC, donde participaron el nuevo Rector, el Decano de la Facultad de Ciencias Químicas, el Secretario Académico y el Secretario de Investigación y Posgrado.



- b) Las investigadoras argentinas participaron como Disertantes en el **SIMPOSIO DE BIOTECNOLOGIA** llevado a cabo el día 11 de Setiembre de 2018 y organizado por la Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación y la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC.



c) Además, se realizaron reuniones de avance relacionadas con el Acta Acuerdo de Asistencia y Cooperación firmada en el año 2017 y se planificaron futuras actividades a realizar entre los Grupos de Investigación de México y Argentina para dar continuidad al trabajo en equipo y publicaciones.

Se adjunta Acta de Avance en ANEXO 7.

- **REUNION FINAL DEL PROYECTO:** se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC en la ciudad de Saltillo, México. Estuvieron presentes Investigadores del Grupo mexicano integrante del Proyecto (Dr. José Luis Martínez, Dra. Mayela Govea y Dra. Anna Iliná) y los Investigadores argentinos: Dra. Norma Barnes, Ing. Constanza Arreguez, Ing. Daniel Borkosky y Dra. Graciela Cerutti.

Los Investigadores cubanos participaron via Skype.

Se presentaron los avances y resultados finales de los tres países integrantes. La Directora argentina del proyecto realizó una exposición detallada de todas las actividades realizadas durante la ejecución del Proyecto, los resultados obtenidos y el estado financiero final del Proyecto.

Se adjunta Acta de la REUNIÓN FINAL en ANEXO 8.



ACTIVIDAD 02. ANALISIS DEL ESTADO DEL ARTE EN EL MUNDO

Para satisfacer las necesidades humanas actuales en tanto se preserva el medio ambiente y los recursos naturales para las futuras generaciones, es necesaria una agricultura acorde con las actuales urgencias e intereses de nuestros países. Debido a esto, ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas, a través de metodologías seguras y con menor impacto ambiental, con el empleo de biofertilizantes y bioplaguicidas, los cuales pueden ser obtenidos a través de procesos biotecnológicos. Son productos que contienen un microorganismo como ingrediente activo o bien se extraen de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden estar constituidos por toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no a sustancias coadyuvantes.

Las consecuencias ambientales del desarrollo agrícola actual constituyen un motivo de preocupación para los agricultores, industriales y población en general. Los pesticidas químicos y nitratos residuales de la fertilización mineral sobre los alimentos están ganando cada vez más detractores, impulsándose el precio de los alimentos orgánicos.

La agricultura necesitará responder de una manera que va más allá del foco tradicional de lograr altos rendimientos. Deberá involucrarse en la protección de los recursos naturales, necesitará responder a los consumidores que cada vez están más preocupados por la seguridad y calidad de los alimentos, además, de la búsqueda de una mejor calidad de vida en los sectores rurales.

Por lo antes expuesto, ha venido cobrando fuerza la producción de alimentos libres de fertilizantes y pesticidas sintéticos, teniendo en cuenta que el uso de estos en los productos agrícolas de consumo humano comprometería la salud al quedar trazas de estos en los alimentos que llegan al consumidor final. Así, se han establecido prácticas tendientes al logro de una agricultura basada en el uso de agentes naturales para la fertilización y el control de plagas.

El sistema de práctica agrícola a partir de productos biológicos involucra la fertilización a partir del uso de inoculantes biológicos o compost excluyendo lo más posible la fertilización química, el manejo adecuado de plagas y control de enfermedades con el uso de biopesticidas y un perfil más amplio de uso de métodos de cultivo que conserven el suelo y el agua, el mejoramiento genético vegetal para resistir plagas y el uso de nutrientes más eficientemente, la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal que induzcan una respuesta agronómica en los cultivos, etc

Dentro de este marco se ha dedicado una buena parte al desarrollo de la biotecnología agrícola en los últimos años, que no se ha limitado al mejoramiento de especies, sino que también se ha enfocado a la potenciación y optimización del poder fertilizante, bioestimulador y biocontrolador de algunos agentes microbiológicos.

Los biofertilizantes son inoculantes bacterianos fijadores de nitrógeno atmosférico, que aumentan la densidad de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno o de

hongos que interactúan con las raíces, facilitando la captación de nutrientes por parte de las plantas, e incluso activando en ellas los procesos de resistencia inducida. Por otra parte, es conocido que algunas bacterias del suelo pueden ejercer un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas, como es el caso de la solubilización del fósforo mineral que se encuentra en forma insoluble en grandes proporciones en la mayoría de los suelos, así como del fósforo orgánico presente en forma de compuestos orgánicos no asimilables directamente por la planta.

Los bioplaguicidas forman parte de los mecanismos de control biológico de plagas y enfermedades de las plantas. Son agentes biológicos que parasitan o compiten con los patógenos bacterias, hongos, nematodos o insectos que afectan las plantas desde la raíz o que atacan directamente frutos, semillas y hojas, o pueden ser también los metabolitos producidos por estos agentes.

Los bioestimulantes, entre los que se encuentran, los reguladores del crecimiento de las plantas, también conocidos como fitohormonas, son sustancias químicas que participan en el control del normal desarrollo de la planta o un delicado balance entre el crecimiento y los factores que lo coordinan. Las auxinas es un término genérico de un grupo de compuestos que se caracterizan por inducir alargamiento celular, división celular e iniciación de la raíz.

Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, la tendencia en el mundo actual, es hacia el reemplazo al menos parcial de los fertilizantes y pesticidas químicos por los bioproductos correspondientes cuyo impacto en el mercado, depende esencialmente del desarrollo de las metodologías para producir biomasa y/o los metabolitos activos así como formulados que reúnan los requisitos de viabilidad si se trata de productos constituidos por la biomasa y en general que sean compatibles con las plantas hospederas y de eficacia probada.

La Biotecnología juega un papel primordial en la búsqueda de alternativas a los pesticidas químicos tradicionales, seguros al medio ambiente y económicamente viables. La Biotecnología puede ser usada para proteger los cultivos comerciales del ataque de plagas y enfermedades.

El empleo de la biotecnología agrícola ofrece grandes oportunidades no sólo para los agricultores, sino para instituciones y compañías que desean vender servicios de protección de plantas y biofertilización, así como productos para el público en general que demanda alimentos seguros.

La biotecnología no es, en sí misma, una ciencia; es un enfoque multidisciplinario que involucra varias disciplinas y ciencias (biología, bioquímica, genética, virología, agronomía, ingeniería, química, medicina y veterinaria entre otras). Hay muchas definiciones para describir la biotecnología.

En términos generales biotecnología es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre.

Tradicionalmente la biotecnología tiene muchas aplicaciones. Un ejemplo sencillo es el compostaje, el cual aumenta la fertilidad del suelo permitiendo que

microorganismos del suelo descompongan residuos orgánicos. Otras aplicaciones incluyen la producción y uso de vacunas para prevenir enfermedades humanas y animales. En la industria alimenticia, la producción de vino y de cerveza se encuentra entre los muchos usos prácticos de la biotecnología.

La palabra "biotecnología" es el resultado de la unión de otras dos: "biología" y "tecnología", y es que la biotecnología es exactamente eso: tecnología biológica. Los seres vivos pueden ser considerados maquinarias biológicas. La biotecnología consiste precisamente en la utilización de la maquinaria biológica de otros seres vivos de forma que resulte en un beneficio para el ser humano, ya sea porque se obtiene un producto valioso o porque se mejora un procedimiento industrial.

La Biotecnología además, tiene importantes aplicaciones en otros campos, entre ellos, la aplicación en diferentes industrias como lo son las industrias alimenticia y farmacéutica, donde los bioproductos son utilizados como aditivos en alimentos y como excipientes en la formulación de medicamentos.

La creciente demanda alimentaria genera la necesidad de crear nuevas tecnologías para la industria ganadera y avícola, ya que existen diversos factores que afectan la calidad del producto, principalmente la susceptibilidad de los animales a diversas enfermedades. El uso de antibióticos que han mostrado ser efectivos en la disminución de patologías y en la promoción del crecimiento animal. Sin embargo, se ha restringido el uso de algunos antibióticos debido al aumento de resistencia de las bacterias, además de que posee un efecto residual en el desarrollo del animal, lo que puede traducirse a pérdidas económicas por la baja calidad del animal de producción. También genera posibles desbalances bacterianos entéricos que merman su desarrollo por la insuficiente conversión de los alimentos, que reduce la producción del animal y por lo tanto, genera grandes pérdidas económicas.

En el presente Proyecto y en cumplimiento uno de los objetivos propuestos, se desarrollaron investigaciones en ambos campos a los fines de evaluar la utilización de los bioproductos obtenidos en las industrias alimenticia y farmacéutica.

ACTIVIDAD 3. DESARROLLO Y EJECUCIÓN. **GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO**

AVANCE DEL PROYECTO

Durante los dos años de ejecución del Proyecto (2016-2018) se ha trabajado fundamentalmente en la producción, síntesis, estudio y caracterización de metabolitos con aplicación fitosanitaria y de bioproductos con posible aplicación en las industrias alimenticia y farmacéutica.

Los principales avances, resultados obtenidos y publicaciones se presentan a continuación:

BIOCONTROL DE MALEZAS CON FITOTOXINAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PSS

INTRODUCCIÓN

El control de las malezas resulta de vital importancia para poder maximizar la producción agrícola. Para combatir las mismas se emplean diferentes métodos entre los que se encuentra el uso de herbicidas químicos, que si bien es efectivo, la tendencia es hacia su disminución debido a la contaminación ambiental y daños al hombre que producen, por lo que la tendencia en el mundo es hacia el desarrollo de un programa integrado de malezas donde se incluye el control biológico.

Existe una variedad de microorganismos, entre los que se encuentran hongos y bacterias patógenos de plantas, que reciben considerable atención con el fin de utilizarlos, junto a las fitotoxinas que ellos producen, como herbicidas biológicos (Duke y Abbas, 1994; Duke et al., 1991). En muchos aspectos los patógenos de plantas ejercen el mismo efecto sobre las malezas que las fitotoxinas producidas por ellos, por lo que potencialmente pueden emplearse como herbicidas uno u otro, sin embargo las toxinas ofrecen un espectro de acción más amplio que el patógeno que las produce, lo que resulta de mayor interés pues es conocido que los cultivos son atacados por distintos tipos de malezas que deben ser eliminadas (Abbas y Duke, 1995; Kremer, 1998).

Entre los microorganismos que pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las plantas indeseables e impedir la germinación de las semillas, y/o el desarrollo de las mismas, mediante la producción de fitotoxinas, se encuentran las del género *Pseudomonas* (Bender et al., 1999). La producción de bioherbicidas constituidos por las fitotoxinas producidas por cepas de *Pseudomonas*, ofrece una alternativa para su aplicación en el manejo integrado de malezas. La *Pseudomonas aeruginosa* PSS, produce metabolitos fitotóxicos en cultivos líquidos promisorios para el control de malezas (Díaz de Villegas et al., 2002).

El presente trabajo tuvo como objetivos la síntesis, caracterización y evaluación de la efectividad de las fitotoxinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* PSS para el control de malezas cubanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS de la colección de cultivos del ICIDCA aislada del suelo. Los fermentadores de 5 L que contenían 2.5 L de medio optimizado con glicerina, como fuente de carbono, y urea y fosfato de amonio, como

fueron inoculados con 250 mL de inóculo crecido en medio KB (King et al., 1954). Las condiciones de cultivo fueron: pH ajustado a 7 a inicio y después libre, temperatura 30°C agitación 250 rpm y aireación 0.2 vvm, durante 24 horas.

Procedimiento experimental

El crecimiento celular se estimó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda λ , de 600 nm en un espectrofotómetro PM 2A.

La concentración de fitotoxinas se expresa como mg/mL de proteína. La determinación se realizó en los sobrenadantes libres de células (SLC) por el método del microbiuret (Frankhauser, 2004).

Separación y caracterización de los metabolitos con actividad fitotóxica

Se realizaron los siguientes estudios para verificar la naturaleza peptídica de las fitotoxinas.

- Precipitación del SLC con TCA al 5, 10 y 20%
- Influencia de la temperatura sobre la actividad fitotóxica del SLC durante 60 min. de incubación a 28, 80, 100 y 1200°C.
- Separación de las fitotoxinas por filtración en gel (Sephadex G-50 y G-15).

Determinación de la actividad fitotóxica *in vitro*

La actividad fitotóxica expresada como % de inhibición del tamaño de la radícula (%ITR), se le determinó a los SLC por la prueba de semillas de lechugas en placas Petri.

Evaluación de la efectividad biológica en condiciones controladas

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Herbología del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Se evaluó el efecto del bioherbicida concentrado 10 veces, “*in vitro*” sobre la germinación de diferentes semillas en placas de Petri de 14 cm de diámetro, a temperatura ambiente entre 24–30 grados Celsius, y el efecto del producto sobre el suelo y el follaje de plántulas se realizó en pruebas con macetas plásticas de 12 cm de diámetro rellenas de suelo Ferralítico Rojo donde se sembraron semillas de malezas, para la aplicación posterior del producto a evaluar. Las semillas de las malezas empleadas para los ensayos fueron colectadas en el campo y beneficiadas para su utilización en el laboratorio. Las malezas empleadas en las evaluaciones aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1 Malezas empleadas en los experimentos de evaluación de la efectividad de las fitotoxinas

Maleza	Nombre vulgar
<i>Amaranthus dubius</i> Mart	Bledo
<i>Bidens pilosa</i> Lin	Romerillo
<i>Euphorbia heterophylla</i> L	Lechosa
<i>Euphorbia hirta</i> Lin	Lechera
<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link	Arrocillo
<i>Eleusine indica</i> L	Pata de gallina
<i>Parthenium hysterophorus</i> L	Escoba amarga
<i>Portulaca oleracea</i>	Verdolaga
<i>Oxalis violacea</i>	Vinagrillo

La evaluación del efecto del bioherbicida concentrado 10 veces, sobre cultivos económicos sobre el follaje de plántulas se realizó en pruebas con macetas plásticas de 12 cm de diámetro rellenas de suelo Ferralítico Rojo donde se sembraron

semillas de los cultivos, para la aplicación posterior del producto a evaluar. Los cultivos empleados aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2 Cultivos empleados en los experimentos de evaluación del efecto del bioherbicida sobre los mismos

Cultivo	Nombre vulgar
<i>Solanum melogena</i>	Berenjena
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga
<i>Cucumis sativus</i>	Pepino

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cinética de producción de fitotoxinas y el crecimiento celular en fermentadores de 5 L a la temperatura de 300 C y pH 7 ajustado al inicio y después libre, aparece en la Fig.1. La síntesis de fitotoxinas y el crecimiento celular tienen un comportamiento asociado, la velocidad específica de crecimiento máxima (μ max) alcanzada por el microorganismo, bajo las condiciones antes descritas fue de 0.73 h⁻¹.

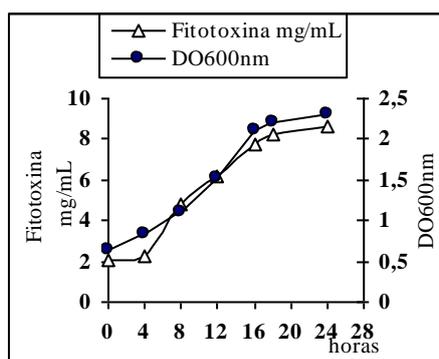


Fig. 1 Producción de fitotoxinas y crecimiento celular de la *Pseudomonas aeruginosa* PSS

Caracterización de las fitotoxinas

Los resultados obtenidos en el tratamiento térmico del SLC, que aparece en la Tabla 1, muestran una retención de la actividad después del tratamiento superior al 50% en todos los casos.

Tabla 3 Influencia de la temperatura sobre la actividad fitotóxica del SLC durante 60 min. de incubación.

Temp °C	%ITR
28	100
80	64.8
100	57.5
120	57.4

Se conoce que muchas proteínas solo retienen su actividad biológica dentro de una fluctuación muy limitada de temperatura ya que las proteínas solubles experimentan cambios conocidos como desnaturalización cuando se exponen a elevadas temperaturas (Lehninger, 1981). Solo los péptidos o proteínas de bajo peso molecular compuestas por cadenas polipeptídicas sencillas, son usualmente más estables al calor que las de alto peso molecular (Chávez y col., 1990).

Los resultados del tratamiento térmico al SLC que aparecen en la Tabla 1 sugieren que estamos en presencia de proteínas de bajo peso molecular o incluso pudieran tratarse de péptidos, ya que como se explica anteriormente hay una retención de la actividad biológica en más de un 50% a las diferentes temperaturas de incubación a que fue sometido el SLC, comparado con el control a 28°C que tiene un 100 % de ITR.

En la tabla 2 se muestra el resultado del tratamiento al SLC con TCA a diferentes concentraciones. Usualmente las soluciones de TCA son empleadas para desnaturalizar y precipitar proteínas. Solo péptidos pequeños son capaces de mantenerse en el sobrenadante a valores altos de TCA en solución (Lieske and Konrad, 1996). Se pudo observar que la concentración de proteínas y actividad fitotóxica no se afectaron significativamente, comparado con el control sin tratamiento (sobrenadante sin TCA), aún a valores de 20% de TCA añadido, por lo que se puede inferir que se está en presencia de péptidos biológicamente activos.

Tabla 4 Influencia del TCA sobre la concentración de proteínas y el % ITR

% TCA	pH	Pr(mg/ml)	%ITR
5	7	5.25	87
10	6.9	5.89	64
20	7	5.49	90
control	7	10.41	100

El perfil de elusión que aparece en la Fig. 2 corresponde a la aplicación en Sephadex G-15 de la muestra tratada al 20% de TCA. El mismo refleja tres picos, de los cuales el último que aparece señalado, mostró actividad fitotóxica. El Sephadex G-15 es empleado en separaciones de proteína o péptidos de bajo PM ya que su rango de exclusión es de 1500 Da, (Pharmacia) por lo que al haberse detectado un pico que mostró actividad herbicida al final del cromatograma, pudiéndose concluir que se tratan de moléculas muy pequeñas de PM por debajo de los 1500 Da.

Por otra parte, se puede considerar este ensayo como un paso de purificación al poder eliminar los contaminantes que corresponden a los dos primeros picos.

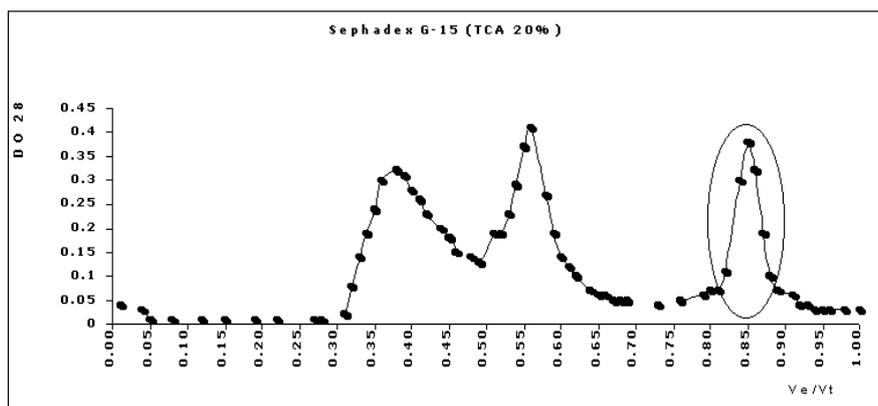


Fig. 2 Perfil cromatográfico de elución de las fitotoxinas presente en el SLC tratado con TCA al 20% en una columna de Pharmacia (35 x 2.5 cm) empacada con sephadex G-15. La columna se eluyó con agua.

CONCLUSIONES

- *Pseudomonas aeruginosa* PSS produce, producto de su metabolismo secundario, fitotoxinas de naturaleza peptídica de muy bajo peso molecular, las cuales pudieron ser purificadas parcialmente.
- El producto evaluado presenta efectividad in vitro sobre la germinación y el desarrollo de las semillas de malezas *A. dubius*, *B. pilosa*, *E. colonum*, *E. hirta* y *E. heterophylla*
- No se observó efectos de acción pre-emergente cuando se aplicó el bioherbicida al suelo infestado con semillas de malezas.
- En aplicaciones foliares el bioherbicida ha demostrado diferencia en cuanto al comportamiento sobre las distintas especies. Las dicotiledóneas han sido más sensibles que las gramíneas.
- Las aplicaciones de post emergencia mostraron efecto bioherbicida sobre las malezas aplicadas, con mayor efectividad sobre *E.indica*.
- Entre los cultivos económicos estudiados la lechuga y la berenjena mostraron ser más susceptibles que pepino.

Referencias

- Abbas, H.K. y S.O. Duke (1995).** Phytotoxins from plant pathogens as potential herbicides. *J Toxicol- Toxin Review*. 14: 523-543
- Bender, C.L.; F. Alarcón-Chaidez; D.C.Gross (1999).** *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Rev.* 63: 266-292
- Caseley J.C.** Herbicidas, Capitulo 10 <http://www.fao.org/docrep/T11475/t1147sOe.htm>
- Chávez P M., Brito, D J, López, P U, Garcías D. J. (1990). *Temas de Enzimología*. Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Tomo I.
- Díaz de Villegas, M E; L. Béress, A. Bell, R. Gallardo; E. Torres (2002).** Producción y separación de fitotoxinas a partir de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PSS con potencialidades como bioherbicida. *Memorias XIII Congreso Científico. INCA. BF-P.12, La Habana Nov.*
- Duke, S.O.; H.K. Abbas (1994).** Natural products with potential use as herbicides. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 582: 348-362
- Duke, S.O.; H.K. Abbas, C.D. Boyette, M. Gohbara (1991).** Microbial compounds with the potential of herbicidal use. *Brighton Crop Protection Conference, Weeds* 1: 155-164,
- Frankhauser, B.D (2004).** Protein assay by microbiuret standardization. *DBF's Hopkins*

Notebook III, p 102 and VI p. 75

Keates S E., Kostman,T.A., Anderson J. D,.. Bailey* B. A (2003) Altered Gene Expression in Three Plant Species in Response to Treatment with Nep1, a Fungal Protein That Causes Necrosis Plant Physiology, July 2003, Vol. 132, pp. 1610-1622

King E.O.; M.K. Ward, D.E. Raney (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307

Kremer, R.J. Microbial interactions with weed seeds and seedling and its potential for weed management. En J. L. Hatfield, D. D. Buhler, B. A. Steward (eds). Integrated Weed and Soil Management. Sleeping Bear Press. pp 161:179, 1998

Lehninger, A. L. (1981). Las proteínas y sus funciones biológicas: perspectivas. En Lehninger AL (Ed.). Bioquímica. pp 59-60.

Lieske, B and Korand, G. (1996). A new method to estimate casein macropeptide and glycomacropeptide from trichloroacetic acid filtrate. Milchwissenschaft. 6:431-435.

Pharmacia LKB. Gel filtration media. Product Profile . Pharmacia LKB Biotechnology.

SINTESIS Y CARACTERIZACION DE FERTILIZANTES ORGANICOS A PARTIR DE BIOPOLIMEROS

INTRODUCCION

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) constituye el cultivo sacarífero más importante del mundo, siendo responsable del 70% de la producción total de azúcar. En Argentina, la agroindustria azucarera se concentra en el noroeste (NOA), en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy, existiendo además un pequeño desarrollo en el Litoral del país. Tucumán es la principal productora de caña de azúcar, con el 62% de producción (Pérez *et al.*, 2007), un 37% le corresponde a las provincias de Salta y Jujuy; y un 1% a las provincias del Litoral (Centro Azucarero Argentino, 2012).

Además, en Tucumán la caña de azúcar tiene una significativa trascendencia económica y social, ya que es una de sus principales actividades, estimándose, en los últimos años, que su participación en el Producto Bruto Geográfico provincial es del 10,5% (3,1% caña y 7,4% azúcar) (Pérez *et al.*, 2007; Ordóñez, 2003).

El sector azucarero presenta dos actividades marcadas: la primera, representada por la producción de caña de azúcar y la segunda, por la elaboración de azúcar y subproductos. En el crecimiento y desarrollo del cultivo de la caña de azúcar intervienen numerosos factores externos que condicionan su producción y rendimiento, incidiendo sobre el resultado productivo (Fontana, 2010). Entre ellos, la presencia de microorganismos, los cuales al consumir el azúcar producen polisacáridos que elevan la viscosidad de las mieles y ocasionan la pérdida directa de azúcar en hasta un 4% (Michelena *et al.*, 2003). Entre los microorganismos principales se encuentran *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococos mutans*, que sintetizan un polímero, el dextrano, en un medio que contenga sacarosa (Vettori *et al.*, 2012).

Leuconostoc mesenteroides es la bacteria láctica que fundamentalmente agrede a la caña (Rodríguez Jiménez, 2005). Se clasifica como coco Gram positivo dispuesto de a pares o en cadenas cortas inmóvil, no esporulado, no produce indol, no reduce nitratos, heterofermentativo y facultativo. Carece de catalasa y citocromos, tolera concentraciones altas de azúcares, lo cual facilita su multiplicación en el jarabe y realiza una fermentación heteroláctica, convirtiendo la glucosa en D-lactato y etanol o ácido acético, por medio de la vía fosfocetolasa (Kandler, 1983; Sneath *et al.*, 1991).

El dextrano que se forma durante la producción de sacarosa es un polisacárido formado en condiciones no controladas, por lo que el peso molecular y la mayoría de las propiedades físicas y químicas no son homogéneas (Echeverría Valenzuela, 2006).

El problema de los polisacáridos ha cobrado un creciente interés y dentro de él quién ocupa un lugar destacado es el *dextrano*, considerado el principal enemigo de la cristalización y de la calidad de los crudos y responsable de las dificultades de la refinería (Michelena *et al.*, 2003).

Las propiedades de los dextranos pueden variar dependiendo de las condiciones en las que se producen y convertir las desventajas que provocan en la industria azucarera en propiedades favorables para otras industrias.

Como consecuencia de los grandes avances de la biotecnología en las últimas décadas, se han desarrollado estudios en la producción y caracterización de polímeros de origen microbiano (biopolímeros), destacándose los polisacáridos y particularmente los dextranos (Michelena *et al.*, 2007).

El desarrollo de una agricultura sustentable, basado en la preservación y/o mejoramiento de la calidad de suelo, agua, y atmósfera, (Delgado *et al.*, 2005), demanda un nuevo enfoque para el manejo de la fertilidad del suelo mediante la dosificación y empleo de enmiendas orgánicas naturales o químicas utilizadas para suplir los requerimientos de los cultivos (Castillo *et al.*, 2007; Thimmanagari *et al.*, 2010).

Los llamados bioproductos o bioinsumos agrícolas son productos económicos y ambientalmente aceptables, ya que además de reducir costos, contribuyen a la obtención de producciones inocuas así como a mejorar la fertilidad nativa del suelo. De ahí la importancia de potenciar su utilización agrícola (Terry Alfonso *et al.*, 2010).

Los fertilizantes son uno de los productos más importantes en la industria agroquímica. Sin embargo, la aplicación convencional de agroquímicos nunca alcanza su objetivo de producir la respuesta biológica deseada en el momento adecuado y en las cantidades específicas requeridas, debido a la no especificidad y a la aplicación periódica del agente activo. Estos factores además de aumentar el costo de tratamiento, producen efectos indeseables sobre las plantas y el medio ambiente (Dubey *et al.*, 2010).

La industria de fertilizantes enfrenta un desafío permanente para aumentar la eficacia de sus productos, mejorando los fertilizantes en uso o desarrollando nuevos fertilizantes específicos (Maene, 1995; Trenkel *et al.*, 1988).

Un *fertilizante* es todo producto que incorporado al suelo o aplicado a los vegetales, suministra en forma directa o indirecta sustancias requeridas por aquellos para su nutrición, crecimiento, aumento de productividad o para mejorar la calidad de la producción (CASAFE).

Uno de los fertilizantes orgánicos más utilizados es la *urea*, que puede ser empleado como fertilizante foliar ya que proporciona un alto contenido de nitrógeno, esencial para el metabolismo de las plantas, y se adapta a diferentes tipos de cultivos (Grant *et al.*, 2002). Su principal uso es en la industria agroquímica. El 90% de la urea producida industrialmente es utilizada como fertilizante por su elevada concentración de nitrógeno (N) por unidad de producto (46% de N₂).

Una de las limitaciones del uso de este fertilizante es su aplicación en superficie, ya que pueden ocurrir pérdidas de nitrógeno por volatilización del amoníaco (NH₃) (Acción enzimática) si no se incorpora en el suelo (Sangoi *et al.*, 2003; Rochette *et al.*, 2009). La cantidad de nitrógeno volatilizado después de la aplicación superficial de urea es muy variable y depende de numerosos factores. Entre ellos, las

condiciones climáticas y atributos relacionados con el suelo. Ese fenómeno puede ser pequeño, 1 a 15% (Sangoi *et al.*, 2003; Cantarella *et al.*, 2008) o alcanzar valores extremadamente altos, mayores a 50% de nitrógeno aplicado. Además puede producir efectos indirectos en el ecosistema, como por ejemplo la eutrofización, la contaminación del agua subterránea, la acidificación del suelo y la emisión de amoníaco a la atmósfera (Reyca Corredores, 2012).

A medida que ha aumentado la competencia en la industria de fertilizantes, ha avanzado también la diversificación, especialización y el agregado de valor a los productos. Estos fertilizantes permiten *la transferencia lenta, moderada o gradual, de un material activo, desde un sustrato de reserva, hacia otro medio*; es decir que estos fertilizantes no liberan el cien por ciento de los nutrientes disponibles al momento de su aplicación.

En este trabajo se desarrollan productos asociados a la agroindustria, mediante el uso de biopolímeros como los dextranos, que tienen excelentes propiedades tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y no-toxicidad; acompañados con minerales y/o compuestos orgánicos (urea) para ser utilizados como fertilizantes en la agricultura, logrando un impacto favorable en el medio ambiente.

MATERIALES Y METODOS

El dextrano utilizado para la síntesis fue provisto por ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar) de La Habana, Cuba en el marco de Convenios Bilaterales de Cooperación e Investigación.

En el Laboratorio de la Cátedra de Garantía de Calidad de Drogas y Medicamentos de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT se realizó en escala de laboratorio la síntesis de complejos constituidos por el biopolímero dextrano complejoado con compuestos orgánicos y/o inorgánicos.

Síntesis del Complejo Dextrano-Urea.

El dextrano de uso farmacéutico (5000 Dalton) obtenido biotecnológicamente fue complejoado con urea de tipo agrícola según procedimiento (Díaz *et al.*, 2005). El biocomplejo obtenido fue sometido a un proceso de molienda fina hasta la consistencia de polvo granular.

Para la síntesis del complejo que contiene hierro (complejo dextrano-hierro-urea), se procedió de manera similar, adicionando el hierro en forma de cloruro férrico (FeCl_3) Merk. El procedimiento de síntesis química se continúa de la misma manera que para el complejo dextrano-urea (Díaz *et al.*, 2005).

Determinación del contenido de dextrano.

Se utilizó el Método colorimétrico del Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) con final espectrofotométrico, empleando dextrano Sigma de Peso Molecular 9000 como patrón.

Determinación de Nitrógeno.

Se utilizó el Método de Kjeldahl (APHA, AWWA, WEF, 1999).

Determinación de Hierro.

Se utilizó el método modificado de Bell (1992).

Estudios de Estabilidad de los complejos.

Se realizaron estudios de estabilidad acelerada según se indica en FA VII Ed. (2013) a 35°C durante 180 días (6 meses). En periodos de tiempo predeterminados (0, 15, 45, 60, 120 y 180 días), se tomaron alícuotas de los complejos en estudio para su determinación física y química. En cada alícuota se determinó, dextrano nitrógeno, urea y hierro por la metodología antes mencionada.

Estudio de la solubilidad de los componentes dextrano y urea y de los complejos dextrano-urea y dextrano-hierro-urea empleando 3 solventes polares distintos: agua, etanol y ácido acético.

El propósito de estudiar la solubilidad de los componentes es determinar su alteración o no, durante la síntesis de los complejos y saber si dichos complejos son solubles a solventes polares como el agua para ser empleados como fertilizantes en fertirriego o aspersión (Ferreyra *et al.*, 2005). Las condiciones de ensayo contemplaron el control de la temperatura en 30°C y la agitación magnética a una velocidad de giro de 25 - 150 rpm durante 30 minutos (Farmacopea Argentina VII ed. 2013).

Estudio de los grupos funcionales presentes en los complejos.

La determinación de los grupos funcionales dentro de los complejos se realizó por espectroscopia infrarrojo utilizando un espectrofotómetro (marca Spectrum GX Perkin Elmer) por transformador de Fourier (FT-IR). Los espectros se registraron en un intervalo de 4000 – 400 cm^{-1} mediante la técnica de fase sólida utilizando pastillas de bromuro de potasio (KBr), cuya característica es su capacidad de ser transparente (no absorbe) a la radiación infrarroja utilizada.

Determinación del punto de fusión.

Para la determinación de la “Temperatura de Fusión” se empleó el método de superficie caliente, empleando un Microscopio de Fusión Ernst Leitz Wetzlar 350.

Evaluación del crecimiento vegetal.

Para el estudio de crecimiento (biomasa) de plantines de pimientos (*Capsicum annuum*) se utilizó un invernáculo en un rango de temperaturas de 30°C a 35°C, usando un diseño experimental exploratorio de 1 planta por tratamientos, empleando un control sin tratamiento (T1), urea de uso agrícola como testigo (T2) y los complejos dextrano-urea (T3) y dextrano-hierro-urea (T4). Se tomaron muestras cada 15 (quince) días desde el momento de la aplicación de los fertilizantes y hasta el primer fruto de 1 centímetro de diámetro, muestreo final (T_f). La experiencia tuvo una duración de aproximada de 80 días.

Se evaluó peso fresco y peso seco, para lo cual se extrajeron raíces, tallo y hojas de los plantines; el material fue llevado a estufa a 90°C durante 2 horas hasta peso constante.

RESULTADOS

Por primera vez en Tucumán, en la Cátedra Garantía de Calidad de Drogas y Medicamentos de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT, se formularon y sintetizaron dos complejos químicos a escala de laboratorio. El primero constituido por el biopolímero dextrano (PM 5000 Dalton), como vehículo y/o matriz inerte, y urea agrícola como fuente de nitrógeno. El segundo complejo posee igual composición al anterior, pero al mismo se ha adicionado un micronutriente de origen mineral, el hierro, dando lugar así a un nuevo bioproducto: dextrano-hierro-urea (Lizárraga *et al.*, 2011).

Los complejos se diseñaron con el fin de estudiar sus propiedades e investigar su posible aplicación como fertilizantes de mayor eficiencia en cultivos agrícolas de estación. La técnica de síntesis que se empleó fue la realizada por Díaz *et al.*, 2005 modificada. Entre las modificaciones realizadas, se procedió al secado de los productos en estufa termostaticada, en reemplazo del tambor de secado rotatorio termostaticado utilizado por Díaz. Éste cambio llevó a reducir los volúmenes de

complejos sintetizados a los fines de adecuarse a la capacidad de la estufa de secado empleada (Lizárraga *et al.*, 2011).

De la evaluación físico-química de los complejos, características organolépticas, los biocomplejos presentaron forma de polvo granular de consistencia mucilaginosa al tacto, de color marrón oscuro para el complejo con hierro y un marrón-beige para el complejo sin hierro, no mostraron un olor característico. (Lizárraga *et al.*, 2011). Estas cualidades difieren del producto obtenido por el ICIDCA, ya que el mismo presentó forma de polvo fino de consistencia seca al tacto, un color marrón mucho más oscuro y con olor característico (Díaz *et al.*, 2005).

Evaluación de solubilidad

La formación de complejos produce cambios en algunas de sus propiedades; entre ellas la solubilidad, lo que se manifiesta en una disminución de la misma en los biocomplejos obtenidos. Así, se determinó que los mismos son Poco Soluble (P.S.), según Farmacopea VII (2013), para los 3 solventes (agua; etanol y ácido acético glacial) ensayados en las condiciones de estudio (Lizárraga *et al.*, 2011) como se observa en la **Tabla 1**. Para comprobar la hipótesis del efecto observado en la solubilidad, se realizó una espectroscopia infrarroja (IR).

Tabla 1. Solubilidad de los bio-complejos. Comparación con la solubilidad del complejo ICIDCA, Cuba.

PRODUCTO	SOLVENTES		
	AGUA	ETANOL	Ac. ACÉTICO
DEXTRANO	M.S.	M.S.	M.S.
UREA	M.S.	M.S.	M.S.
DEXTRANO-UREA (CATEDRA)	P.S.	P.S.	P.S.
DEXTRANO-HIERRO- UREA (CATEDRA)	P.S.	P.S.	P.S.
DEXTRANO-HIERRO- UREA (ICIDCA)	P.S.	P.S.	P.S.

M.S: muy soluble; P.S: poco soluble

Evaluación Química

La evaluación química realizada a los biocomplejos arrojó para el complejo con hierro un contenido de dextrano que oscila entre 16 - 18% (mismo valor presentó el complejo sin hierro); en cuanto al contenido de nitrógeno osciló entre 20 - 21% y urea 43 - 45%; para el complejo sin hierro los valores fueron 22 - 23% para el nitrógeno y 47 - 49% para urea. Estas concentraciones son mayores a las obtenidas por Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar

(ICIDCA) para su complejo dextrano-hierro-urea (**Tabla 2**) (Lizárraga *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2005).

Tabla 2. Composición química de los biocomplejos sintetizados, expresados en g/100g de muestra. Comparación con el biocomplejo obtenido en Cuba.

COMPONENTES	COMPLEJOS		
	Dex-Urea	Dex-Fe-Urea	Dex-Fe-Urea (ICIDCA)
DEXTRANO	16 - 18	16 - 18	8 - 10
NITROGENO	22 - 23	20 - 21	11,5 - 18,5
UREA	47 - 49	43 - 45	25 - 40
HIERRO	–	1,2 - 1,5	0,4 - 2,5

Estudio de estabilidad

El estudio realizado permitió estipular un período de vida media de 6 meses (180 días), tiempo durante el cual no se evidenció cambios en el contenido de sus componentes (dextrano; nitrógeno y urea) (**Figuras 1 y 2**). Además mantuvieron las características físicas originales como ser: forma de polvo granular de color marrón oscuro para el biocomplejo con hierro y marrón-beige para el que no contiene hierro ambos de consistencia mucilaginosa al tacto (Lizárraga *et al.*, 2011; CECMED, 2005; Farmacopea VII, 2013).

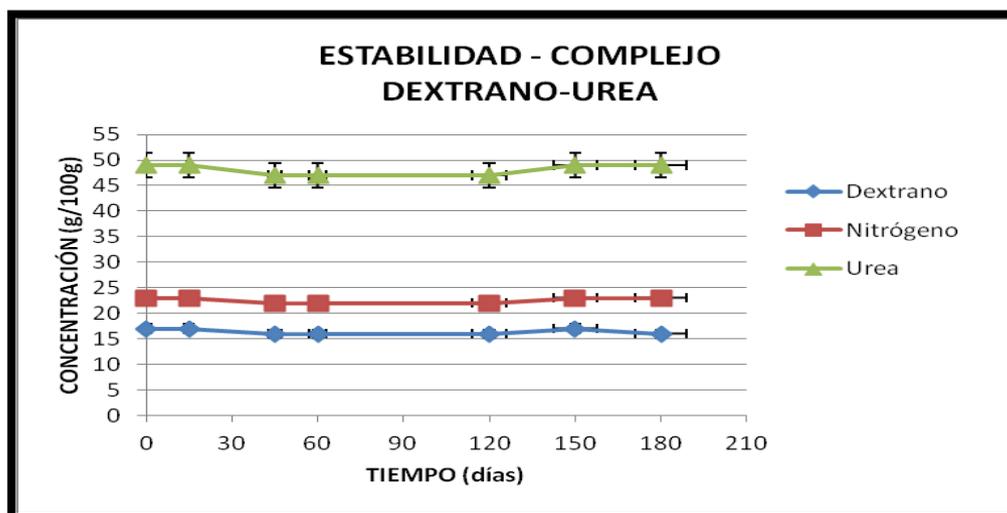


Fig. 1. Concentración química del complejo dextrano-urea en el tiempo

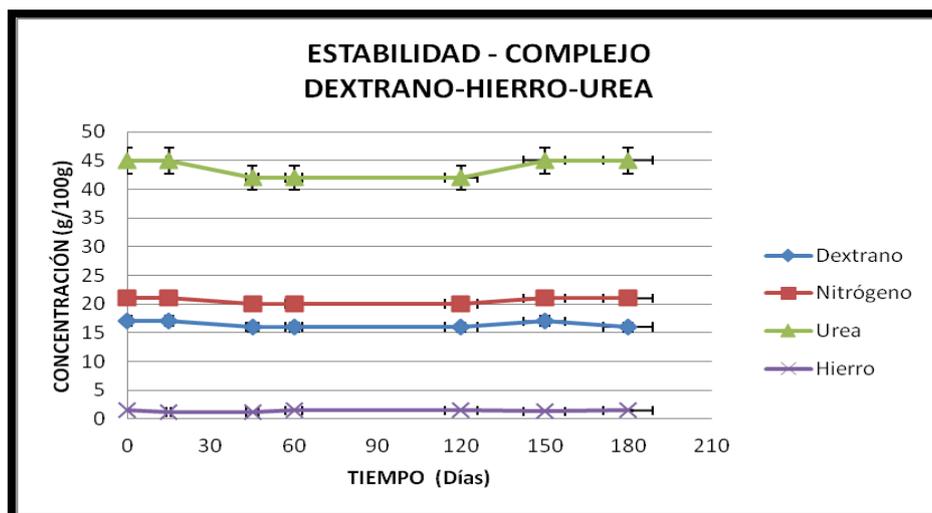


Fig. 2. Concentración química del complejo dextrano-hierro-urea en el tiempo

Espectroscopia Infrarrojo - Estudio de grupos funcionales

La determinación de grupos funcionales se realizó por una espectroscopia infrarrojo por transformador de Fourier, mediante la técnica de fase sólida utilizando pastillas de bromuro de potasio (KBr). Los espectros se registraron en un intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 3). Del estudio se infiere que el bio-complejo dextrano-urea presenta posibles grupos funcionales del tipo amina (-C-N-) (1155 cm^{-1}), entre el C del dextrano y el N de la urea. También enlaces formados entre el carboxilo-nitrógeno ($\text{O}=\text{C}-\text{N}-$) de la urea con el C del biopolímero en la región 1677 cm^{-1} o bien un enlace de tipo imino $\text{C}=\text{N}$, como lo indica García Chávez *et al.*, (2010) para su red híbrida de polímeros (1668 cm^{-1}).

Los resultados obtenidos por Ashraf Malik *et al.*, (2010) para su complejo formado por el biopolímero almidón y la urea, cuyo valor de frecuencia del carboxilo-nitrógeno es 1778 cm^{-1} y del enlace C-N 1250 cm^{-1} son similares a los observados para nuestros complejos.

La banda 2927 cm^{-1} corresponde al movimiento simétrico y asimétrico del metileno ($-\text{CH}_2$) en el dextrano. Esta región se asemeja a la expresada por Vettori *et al.*, 2012 para el dextrano (2926 cm^{-1}).

Para el bio-complejo con hierro, el enlace amina (-C-N-), presentó un desplazamiento de la banda de 1250 cm^{-1} a 1235 cm^{-1} , probablemente debido a la presencia del ión hierro, el cual realizaría un impedimento estérico entre los átomos de C y N.

A su vez, se destacan los enlaces formados entre el metal y el oxígeno (M-O) y metal y nitrógeno (M-N) en la zona de menor frecuencia del espectro (580 cm^{-1} y 555 cm^{-1} respectivamente) (Ashraf Malik *et al.*, 2010).

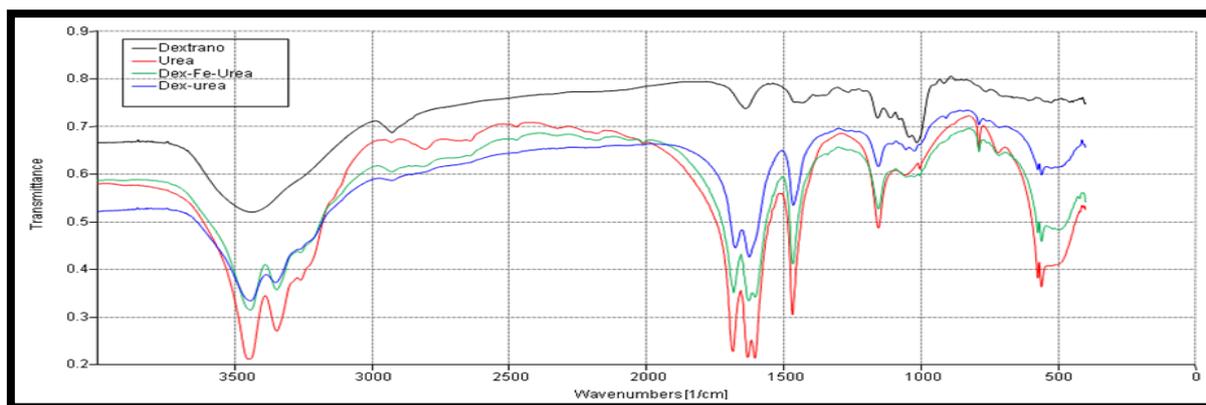


Fig. 3. Espectro IR de los componentes y de los bio-complejos. Se graficó Transmitancia vs frecuencia (cm^{-1}). Siendo las bandas más características las que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Bandas más características encontradas en los bio-complejos, dextrano y urea.

Muestras	-O-H	-C-O	-C-N	-CH ₂	O=C-NH	-N-H	M-O	M-N
Dextrano	3444	1151	—	2927	—	—	—	—
Urea	—	1680	1160	—	1635 -1605	3400	—	—
Dextrano-urea	3441- 3346	1880	1155	2920	1677	1475	—	—
Dextrano-Fe- urea	3444- 3348	1879	1160	2890	1682 - 1614	1466	580	555

C: carbono; O: oxígeno; N: nitrógeno; M: metal (Fe^{+2})

Evaluación del punto de fusión

Permitió utilizar la temperatura de fusión como criterio de pureza de las sustancias sólidas (dextrano y urea) y como criterio de identidad de compuestos orgánicos (bio-complejos) (Stanford Research Systems; Farmacopea VII, 2003). El ensayo se realizó por triplicado (**Tabla 4**). En el caso de las moléculas de urea en los tres ensayos se registraron temperaturas similares (134.5°C - 135°C - 134.3°C), indicando que la sustancia se encontraría pura. Según UNEP Publication, para urea, la misma tiene un valor de 135°C .

En las muestras de dextrano y de los complejos sintetizados no se observó moléculas cristalinas ya que son polímeros y se presentan como moléculas amorfas por que los resultados arrojaron rangos de temperatura de fusión amplios debido a la naturaleza de las moléculas. Para el biopolímero los valores de temperatura de

fusión oscilaron entre 190.6°C – 192.4°C; 180.3°C – 182.5°C y 224.8°C – 225.7°C (Lizárraga *et al.*, 2011).

Los complejos presentaron valores de temperatura por encima del determinado para urea y por debajo del registrado para el biopolímero dextrano los valores fueron 155.2-160.1°C; 158.5-164.7°C; 160.3 – 168.4°C para el complejo sin hierro y 138.2-142.6°C; 145.3-150.2°C y 155.4-158.2°C para el complejo con hierro.

Tabla 4. Rango de fusión hallado para cada muestra por triplicado.

MUESTRAS	Ensayo 1 Temperatura (°C)	Ensayo 2 Temperatura (°C)	Ensayo 3 Temperatura (°C)	Promedio Temperatura (°C)
DEXTRANO	190.6 - 192.4	180.3 - 182.5	224.8 - 225.7	199.38
UREA	134.5 - 134.8	135 - 135.5	134.3 - 134.8	134.82
DEX-UREA	155.2 - 160.1	158.5 - 164.7	160.3 - 168.4	161.20
DEX-Fe- UREA	138.2 - 142.6	145.3 - 150.2	155.4 - 158.2	148.32

Esto corroboraría la hipótesis que los complejos están formados por una estructura donde intervienen distintos componentes con distintos tipos de uniones entre los mismos, lo que permite concluir que los bioproductos sintetizados en este trabajo son nuevos complejos constituidos por nuevos enlaces entre urea, dextrano y hierro, formados durante el proceso de síntesis química de los mismos (Lizárraga *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Se realizó por primera vez en la Cátedra Garantía de Calidad de Drogas y Medicamentos de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia UNT la síntesis de 2 nuevos complejos formados por el biopolímero dextrano de peso molecular 5000 Dalton, urea agrícola y/o hierro (FeCl₃).

Se obtuvieron con una buena producción de síntesis acorde al equipamiento del laboratorio. Son poco solubles en agua, etanol y ácido acético.

Presentaron forma de polvo granular de color marrón oscuro para el complejo con hierro y marrón-beige para el complejo sin hierro, de consistencia mucilaginoso al tacto, sin olor característico. Los mismos son estables durante 6 meses en un rango de 25°C – 35°C de temperaturas, manteniendo sus características físicas y químicas originales.

El complejo dextrano-urea presentó una Temperatura de Fusión de 160.80°C mientras que para el complejo con hierro fue de 150.2°C.

La composición química mostró que el contenido del biopolímero (dextrano) fue igual para ambos complejos siendo su valor comprendido entre 16 – 18%, mientras que el contenido de nitrógeno y urea fue de 22 – 23% y 45 – 47% para el complejo sin

hierro. Para el complejo con hierro fue de 20 – 21% para el nitrógeno; de 43 – 45% para urea y 1,2 – 1,5% de hierro.

Concluyendo que los bio-complejos sintetizados en este trabajo, por sus características físicas y químicas prometen ser grandes candidatos para su uso en la agricultura como fertilizantes.

REFERENCIAS

Ashraf M., Shadma P., Tansir A., Saad M.A., Prabal K.S. & Nahid N. (2010). Coordination Polymer: Synthesis, Spectral Characterization and Thermal Behaviour of Starch-Urea Based Biodegradable Polymer and Its Polymer Metal Complexes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. Article ID 848130. Pp: 1 – 8.

Bell A. (1992). Manual de técnicas analíticas para la producción de hierro dextrano. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Anon (1967). Fisons Pharmaceutical Ltd, Analytical techniques for Quality Control of Aimposil “2000”.

Castillo G., Gregorí B.S., Michelena G., Díaz de Villegas M.E., Delgado G., Montano R., Cejas G. & Gálvez L.O. (2007). Bioproductos para la agricultura: surgimiento y desarrollo en el ICIDCA. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* ISSN 1025-3076. Vol. 41. N° 3, pp: 42-51.

Cerutti de Guglielmo G., Michelena G., Amoroso M.J. & Cárdenas G. (2004). Inhibición del Crecimiento de *Leuconostoc Mesenteroides* por la Acción de Metabolitos Microbianos. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, Vol. 80, pp: ISSN 0370-5405.

Cuervo Mulet R.A., Ledesma J.A., Duran Venegas J.A. & Argote Vega F.E. (2010). Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc. Mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. *Facultad de Ciencias Agrarias*, Vol. 8. N°2, pp: 31-40.

De Belder A.N. Dextran. *Handbooks from Amersham Biosciences*. 18-1166-12.

Díaz A., Michelena G., Bell A., Carrera E. & Hernández Y. (2005). Diseño de experimentos para obtención de un fertilizante químico, a partir de un complejo de ferridextrana, utilizando un secador de tambor. Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) la Habana, Cuba.

Dimc G.R. (2006). Characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain from fresh vegetables. *APTEFF* 37, pp: 1-192.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt Chem* N°28, pp: 350.

Echeverría Valenzuela E. (2006). Producción de dextrán, a nivel laboratorio, como derivado de la sacarosa, usando jugo de caña. Facultad de Ingeniería Química. Universidad San Carlos de Guatemala.

Eckelt J. & Sugaya Wolf B.A. (2006). *Carbohydr. Polym.* 63, pp: 205.

Eggleston G. & Mongeb A. (2005). Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochemistry* N°40. Pp: 1881–1894.

Eurofins Biolab. S.L.U. Estudios de Estabilidad.

Farmacopea Argentina. (2013). Vol. 1, 7^{ma} Edición.

Fontana P. D. (2010). Estrías Roja en Caña de Azúcar. Caracterización y análisis molecular del agente etiológico. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Gálvez, L. (2000). La producción diversificada de la agroindustria de la caña de azúcar. En: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar 3ra. Ed. pp: 3 - 17.

García Chávez R. & Mendoza Martínez A.M. (2010). Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizadas a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosan/dextrano. *Rev. Iberoam. Polím.*, 11(2). Pp: 88 – 109.

García F. & Darwich N. (2009). La Fertilización: Tecnología para sostener la productividad de nuestros suelos. Cap 9, pp: 419 – 421.

Michelena G., Bel A., Cerutti G., Carrera E., Coronel M. & Rivas Monte G. (2007). Estudio de la adición de estabilizantes y vitamina B12 al complejo inyectable de hierro dextrana. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar ISSN 1025-3076. Vol. 40. N°1. Pp: 32-38.

Michelena G., Martínez A., Cerutti G., Bell A., Carrera E. & Legrá S. (2003). Inhibición por métodos biológico de cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de la industria azucarera. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 8 a 12 de Septiembre, Puerto Vallarta, Jalisco.

Molecular Probes. (2006). Dextran conjugates. Invitrogen detection Technologies. Product information.

GLUTICID: FUNGICIDA BIOQUÍMICO PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS

El Gluticid es un fungicida de naturaleza bioquímica constituido por metabolitos a partir de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PSS, obtenido por vía biotecnológica mediante estudios realizados a escala de laboratorio y planta piloto, según diseño experimental y el ajuste de diferentes parámetros de fermentación. El medio de cultivo diseñado asegura la máxima expresión de los metabolitos (Villa et al. 2001, Frías y Villa 2007).

Características: Polvo blanco grisáceo fino, soluble en agua, pH 7 y un peso seco entre 93-95%.

Sustancias activas: Metabolitos secundarios antimicrobianos: monoacetilfloroglucinol, sideróforos del tipo pioverdin II y ácido salicílico.

El sideróforo pioverdin II, pigmento amarillo verdoso fluorescente, actúa como agente quelante específico del ion férrico. Está constituido por el grupo cromóforo, 2,3-diamino-6,7-hydroxiquinolina, unido a un péptido de 6 a 10 aminoácidos que contiene grupos hidroxamatos (Budzikiewicz 1999). El compuesto antibiótico monoacetilfloroglucinol, caracterizado por grupos fenólicos, se identificó mediante diferentes técnicas cromatográficas y de biología molecular (Frías et al, 2007). Ambos metabolitos se producen durante el proceso biotecnológico, a partir de las 6 horas comienza la excreción del monoacetilfloroglucinol y alcanza su valor máximo (100%) a las 24 horas, la producción de sideróforos esta asociada al crecimiento, con concentraciones cercanas a los 130 $\mu\text{M/L}$ al final del proceso (Villa et al. 2000, Díaz de Villegas 2007).

La identificación taxonómica de la cepa es resultado de pruebas bioquímicas y estudios moleculares por comparación con patrones reconocidos, la cepa fue seleccionada en la fase inicial por el efecto antagónico in vitro frente a diferentes hongos patógenos como *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotium rolfsii*, entre otros (Utra y Stefanova 1994), y por la elevada producción de sideróforos (Villa 1999, Díaz de Villegas 1999). El producto no es tóxico para las personas, animales y medio ambiente, según constan los resultados de las pruebas toxicológicas y ecotoxicológicas realizadas en instituciones especializadas.

La tecnología posee Certificado de Invención de la Oficina de Patentes y Marcas de Cuba: No.22805 Resolución No.1079/2002, Procedimiento de obtención de los metabolitos antifúngicos de *Pseudomonas aeruginosa* PSS por vía biotecnológica, y

el producto Certificado de Marca de la Oficina de Patentes y Marcas de Cuba No. 2000-1742 Resolución: 963/2002: Gluticid.

La eficacia del producto ha sido probada y demostrada en condiciones controladas y de campo durante varios años (Villa y Díaz de Villegas 1996, Villa et al. 2000a, Villa et al. 2000b, Stefanova et al. 2001a), algunos de los resultados obtenidos se exponen a continuación.

En las condiciones controladas de laboratorio, con una aplicación del producto biológico a 200 ppm, la infección en las plantas de tabaco por el moho azul (*Peronospora tabacina*) disminuyó en 50%, en comparación con el testigo, la eficacia resultó superior en la variante de 400 ppm (Figura 3). En pruebas de discos de hojas con la concentración de 100 ppm se redujo en un 50 % la infección por *P. nicotianae*.

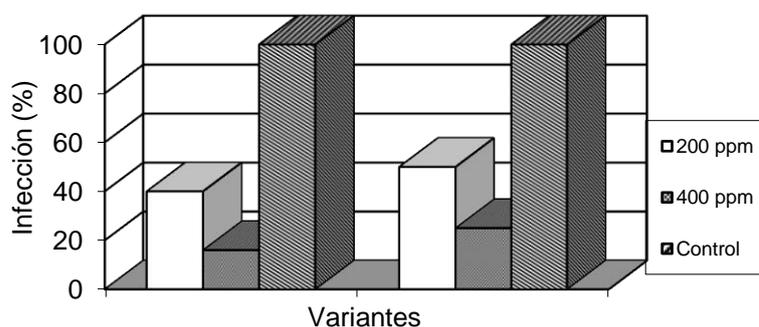


Figura 3. Efecto de Gluticid sobre *Peronospora tabacina* en condiciones de laboratorio

En condiciones de campo aplicado cada siete días a la dosis de 3,0 Kg/ha ofrece efecto igual sobre el moho azul que el tratamiento estándar de mancozeb, con la misma periodicidad de aplicación. Los resultados obtenidos en dos provincias señalan la posibilidad de utilizar el producto biológico al igual que el químico de contacto mancozeb, bajo una moderada incidencia de moho azul, dentro de la estrategia del manejo de la enfermedad.

El producto biológico reduce la incidencia del tizón temprano (*Alternaria solani*) en la papa en un 39,18 % con respecto al testigo sin tratamiento y con una efectividad técnica de 48,82 %. En la provincia de Matanzas (Cuba), introducido en un área de producción con manejo orgánico en el cultivo de la papa, disminuyó el ataque de *A. solani* y *P. infestans* con resultados similares obtenidos en las áreas de manejo convencional. En el cultivo del tomate se registró igualmente un buen control contra el tizón temprano (Almandóez 2001). En condiciones de cultivo protegido, en diversas variedades, la intensidad de ataque por *A. solani* resultó de 60.25% bajo tratamientos con mancozeb y de 58.25 % en la variante protegida con Gluticid a dosis de 3,0 kg /ha, sin diferencia significativa en la eficacia entre ambos tratamientos (Tabla 1). El producto biológico se mostró igualmente efectivo, para el control de *Cladosporium fulvum*, según los resultados el producto se considera una alternativa biológica, con efecto similar al mancozeb, para la lucha contra *A. solani* y *C. fulvum* en tomate (Castellanos et al. 2005).

Se registra un control alentador del mildiu vellosa (*Pseudoperonospora cubensis*) del pepino con la aplicación de Gluticid, donde su efecto fue igual al de zineb (Stefanova et al. 2001). El producto reduce las especies *Curvularia senegalensis* y *Curvularia gudauskasii* en la semilla botánica de la caña de azúcar entre el 90 y 100%.

Tabla 1. Resultados de las evaluaciones de la eficacia de Gluticid contra *Alternaria solani* en tomate protegido, variedad Aro 84-84

VARIANTES	Intensidad de ataque de <i>Alternaria solani</i>							
	60 días		80 días		100 días		120 días	
	%	2 arc sen vp	%	2 arc sen vp	%	2 arc sen vp	%	2 arc sen vp
Tebuconazol	37.25	1.30 b	39.0	1.35 b	39.1	1.42 c	47.1	1.51 b
Mancozeb	60.25	1.77 a	62.5	1.82 a	73.2	2.04 a	76.8	2.13 a
Gluticid	58.25	1.71 a	58.5	1.75 a	66.0	1.89 b	76.0	2.11 a
ET *		0.0331		0.28		0.24		0.30
CV (%)		4.26		3.30		27.4		31.2

Letras desiguales difieren para $p < 0,05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977)

El Gluticid resulta una opción promisoriosa para el control de hongos foliares en especies ornamentales, fundamentalmente en las cultivadas bajo condiciones protegidas, según la información en plantas de *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alpinia* sp, *Isora* sp, *Pandanus utilis*, *Crysalidocarpus* sp, *Gardenia* sp, y *Conotegia* sp, controla la afectación por el hongo *Capnodium* sp entre un 70 y 100 %, y en *Tithonia* sp., el hongo *Cercospora* sp en un 70% (Stefanova et al. 2001a).

Otro campo de aplicación del biofungicida es el cultivo de hongos comestibles, aplicado al sustrato agroindustrial de *Pleurotus ostreatus* reduce los contaminantes al 100 % con un incremento del rendimiento entre 28 y 33 % y una sustitución total del fundazol, siendo una práctica en las plantas de producción de esta especie en el país (Gutierrez y Villa 2000).

Ensayado para el control de patógenos fúngicos en postcosecha en bananos el Gluticid, a 200 ppm, registró resultados comparables con los alcanzados por el producto químico tiabendazol (TBZ) a 400 ppm, redujo el porcentaje de afectación aproximadamente en un 50 % en comparación con el testigo. Aplicado en áreas productivas dedicadas al cultivo de banano orgánico en la Península de Santa Elena en la República de Ecuador detuvo el desarrollo de la enfermedad, las nuevas hojas, que surgieron después de la aplicación del producto, no manifestaron síntomas visibles de la enfermedad, observándose en general un buen aspecto de las plantaciones plataneras tratadas (Piñón 2009).

Los resultados de los estudios realizados para el control de patógenos fúngicos demuestran la eficacia del producto biológico en prevenir, retardar y reducir la

incidencia en diversos cultivos, su efecto es comparable con los productos químicos de contacto, además se registra efecto colateral estimulante sobre las plantas y su resistencia, esta última inducida por el ácido salicílico. Se recomienda a dosis de 3,0 - 3,5 kg/ha., solo o en alternancia con productos químicos, dentro del manejo integrado de los cultivos.

El biofungicida Glutucid se obtiene mediante un proceso biotecnológico desarrollado en el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), en colaboración con el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Su producción a gran escala y comercialización, será asumida por el Grupo Empresarial LABIOFAM.

CARACTERIZACION Y BIOENSAYOS EMPLEADOS EN EL CONTROL DE LOS PRODUCTOS

La producción de productos biológicos para la agricultura, dentro de los que se encuentran los bionutrientes, requiere la implementación de métodos químicos y biológicos para el control de su calidad, entendida como el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que lo hacen apto para satisfacer las necesidades para lo cual fue creado.

Los tradicionales métodos químicos, permiten la caracterización de las materias primas y los productos obtenidos; los bioensayos con plantas, complementan estos análisis en la detección y control de los contaminantes tóxicos ambientales por los efectos que ejercen estos productos sobre los organismos estudiados, así como permiten conocer la efectividad de los bioproductos obtenidos, mediante ensayos in vitro y en condiciones controladas.

Los bioensayos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos.

La literatura reporta el empleo de bioensayos con semillas para conocer el efecto estimulador de diferentes productos biológicos dado por los indicadores del porcentaje de germinación, índice de vigor, y longitud del hipocotilo y radícula en las plántulas.

Por otra parte, los bioensayos se emplean también para detectar la presencia de metabolitos fitotóxicos en un producto aplicado en la agricultura, lo que puede provocar efectos negativos en las plantas, como ocurre cuando se aplica compost sin un adecuado grado de madurez, los que se deben a diversos factores, entre los cuales se encuentran los contenidos de amonio, ácidos volátiles orgánicos, metales pesados y sales. Estas sustancias, en elevadas concentraciones, pueden generar efectos perjudiciales en el desarrollo de las plantas, inhibiendo la germinación de semillas o el crecimiento de raíces por lo que es altamente riesgosa su utilización en los cultivos.

Diferentes especies modelo se emplean en los bioensayos, entre las que se encuentran: la lechuga (*Lactuca sativa* L.), por la alta sensibilidad de la especie, germinan rápido y uniformemente, bajos costos asociados, no requiere equipamiento sofisticado, alta disponibilidad y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta

prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general.

La variedad de semillas que se utilice debe tener un alto porcentaje de germinación, siendo recomendado por Sobrero y Ronco (2004) que el mismo sea superior al 90%.

Procedimiento experimental del bioensayo in vitro

En placas Petri esterilizadas, se ponen 20 semillas de lechuga por placa, sobre papel de filtro humedecido con 2.5 mL de cada variante y un testigo con 2.5 mL de agua destilada para cada variedad de lechuga, por triplicado. Las placas se ponen dentro de una bolsa plástica para evitar la pérdida de humedad, en incubadora a una temperatura entre 27 ± 2 °C, durante 3 días.

Efecto en la germinación

Terminado el período de exposición (3 días), se procede a registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, se procedió a congelar las placas Petri una vez terminada la incubación (Sobrero y Ronco 2004). Las plántulas con una consistencia blanda, se colocan sobre una lámina de vidrio transparente y se fotografían a una altura de la cámara de 32 cm.

Las mediciones de longitud de radícula e hipocotilo, se realizan de forma digital mediante el programa computacional Adobe Photoshop.

Cálculos

Los efectos estimuladores o fitotóxicos, se evaluaron mediante los siguientes indicadores: Porcentaje de Germinación Relativo (PGR), Crecimiento Relativo de Radícula (CCR), Crecimiento Relativo de Hipocotilo (CCH), Índice de Germinación (IG) (Tiquia 2000):

Porcentaje de Germinación Relativo (PGR)

$$\text{PGR} = \frac{\text{Promedio de semillas germinadas en la muestra}}{\text{Promedio de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

Crecimiento Relativo de Radícula (CCR)

$$\text{CRR} = \frac{\text{Promedio elongación de radícula en la muestra}}{\text{Promedio elongación radícula en el testigo}} \times 100$$

Crecimiento Relativo de Hipocotilo

$$\text{CRH} = \frac{\text{Promedio elongación de hipocotilo en la muestra}}{\text{Promedio elongación hipocotilo en el testigo}} \times 100$$

$$\text{IG} = \frac{\text{PGR} \times \text{CCR}}{100}$$

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL BIOHERBICIDA SOBRE MALEZAS APLICADOS EN CULTIVOS EN CAMPO

Ensayos a nivel de placa

Al evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento de la radícula de las semillas, en los ensayos a nivel de placas, se observó que el bioherbicida ocasionó la necrosis o el desarrollo atrofiado de las radículas que emergieron, mientras que los testigos presentaron un crecimiento y desarrollo normales (Figura 3). Este comportamiento es similar al producido por los herbicidas de tipo hormonal, los cuales atrofan el crecimiento y desarrollo de la radícula, cuando no lo inhiben completamente (Caseley).



Fig.3 Efecto del bioherbicida sobre la germinación de las semillas de malezas en condiciones de laboratorio.

Como puede observarse, se presentó una afectación total del producto sobre la germinación de las semillas, lo que implica que el bioherbicida, mostró efectos inhibitorios sobre la germinación de las malezas en placas y en condiciones de laboratorio.

Efecto del herbicida en aplicaciones al suelo

En tratamientos con aplicación al suelo, después de la siembra de semillas de malezas, no se observaron efectos sobre la germinación y brotación de las plántulas. El efecto de inhibición de la germinación y de la radícula observado “in vitro” pudiera estar dado por su acción de contacto directo con la testa y el embrión de las semilla, que no ocurre en las aplicaciones de pre emergencia, pues estas están a distintas profundidades de la superficie en que se aplica el producto, además de que debe tenerse en cuenta la posible interacción de los microorganismos del suelo, que actúan en la degradación de los productos en contacto con el mismo. (Abbas y Duke, 1995).

Efecto del herbicida en aplicaciones foliares en condiciones controladas

En tratamientos del producto puro al 100%, sobre malezas de 2 a 4 hojas, se observó una ligera quemazón en el borde de las hojas de *E. indica*, *P. oleracea* y *Oxalis* spp. En *A. dubius* el efecto sobre los bordes fue más pronunciado, con presencia de necrosis a partir de las 24 horas de la aplicación. Se pudo apreciar un fuerte efecto en dicotiledónea y ligero en gramínea, lo que indica una selección en la acción del mismo (Figura 4). Este comportamiento es similar al que se reporta por la

Nep1, que es una proteína extracelular producida por el hongo *Fusarium oxysporum* que produce necrosis en plantas dicotiledóneas en aplicaciones foliares con un efecto semejante al producido por los herbicidas de contacto (Keates y col , 2003).



Fig. 4 Efecto de la aplicación foliar del Bioherbicida sobre (1) *Eleusine indica*, (2) *Amaranthus dubius*, (3) *Portulaca oleracea*, (4) *Oxalis violacea*

Efecto fitotóxico sobre cultivos económicos (Fig. 6)

El efecto fitotóxico del bioherbicida sobre los cultivos económicos lechuga, berenjena y pepino comparado con el efecto sobre la maleza *Amaranthus dubius* se muestra en la Fig.6.

El bioherbicida se comportó de diferente modo al aplicarlo sobre distintas especies de plantas, ocasionó daños locales en los extremos y bordes de las hojas, o en algún punto interior de las mismas, pero de forma diferenciada.

La lechuga y la berenjena mostraron ser más susceptibles que pepino. Se corroboró su acción sobre el Bledo el cual mostró una buena susceptibilidad a la acción del bioherbicida. Evidentemente algún factor bioquímico, arquitectónico o fisiológico de la superficie foliar de las diferentes especies vegetales estudiadas, determina la posibilidad del efecto dañino del producto en unas u otras.

Esta experiencia preliminar, demuestra que la fitotoxicidad del producto puede estar determinada por la especie vegetal.

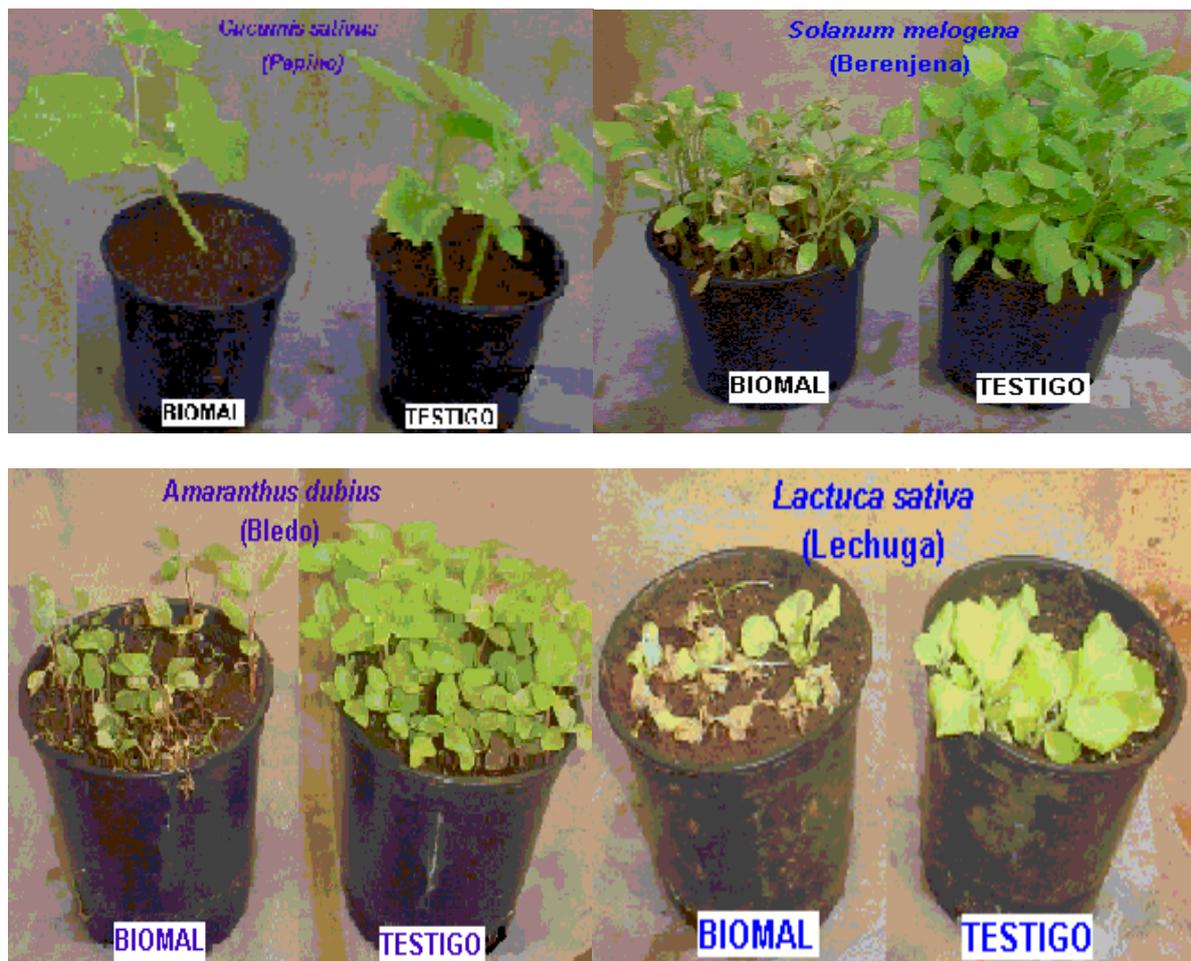


Fig. 5 Efecto fitotóxico del bioherbicida (BIOMAL) sobre los cultivos económicos lechuga, berenjena y pepino comparado con el efecto sobre la maleza *Amaranthus dubius*

Etapas comprendidas en el desarrollo de un bioproplaguicida

Una comercialización exitosa de los bioplaguicidas y biofertilizantes es el resultado de los procesos de desarrollo de los mismos y frecuentemente está limitada por la falta de conocimientos y experiencia en la producción y formulación de los microorganismos y/o sus metabolitos.

Miles de potenciales microorganismos, han sido aislados en campos y cosechas durante los últimos 80 años, pero son pocos los que se comercializan, debido fundamentalmente a las diversas etapas que comprende el desarrollo de estos bioproductos.

Etapas que comprende el desarrollo de estos bioproductos.

1. Aislamiento e identificación de microorganismos efectivos y que no dañe las cosechas. El aislamiento debe comenzar por las áreas donde ellos naturalmente crecen. La evaluación de un número mayor de microorganismos promisorios, incrementan las posibilidades de encontrar una cepa efectiva.
2. Desarrollar procesos de fermentación minimizando el costo con un máximo de rendimiento y calidad.

Los factores de calidad incluyen:

- ✓ Eficacia en el control de plagas y enfermedades
- ✓ Eficacia como biofertilizantes o bioestimulantes
- ✓ Estabilidad durante el secado y almacenamiento
- ✓ Compatibilidad con el hospedero
- ✓ Adecuada persistencia en campo

3. Generalización de la aplicación del producto y registro del mismo.

4. Comercialización

Selección de cepas comerciales para el biocontrol y la biofertilización

- El hecho de que solo una pequeña proporción de cepas hayan llegado a productos comerciales en parte se debe a diversas características comunes a la siguiente estrategia de selección
- Poco conocimiento de las características de la plaga, como su resistencia a los pesticidas químicos
- Evaluación de pocos microorganismos como candidatos a agentes de biocontrol
- Los microorganismos seleccionados por los resultados in vitro y en condiciones controladas, no replican en condiciones de campo.
- El aislamiento de las cepas debe comenzar en áreas donde ellos naturalmente están presentes. La evaluación de un número mayor de supuestos agentes de biocontrol, incrementa las posibilidades de encontrar una cepa efectiva.
- Las cepas que se emplearán para producir los inóculos biológicos para incrementar la productividad de los viveros y plantaciones no se encuentran fisiológicamente adaptadas a las condiciones de clima-suelo locales y por ende no logran competir efectivamente con la microflora de la rizosfera, impidiendo la colonización las raíces de las plantas en el lugar de establecimiento.

Estudio de las condiciones de cultivo para producir biomasa y/o metabolitos activos empleando las medidas de bioseguridad

- Optimización de los parámetros de fermentación: pH, temperatura, luz, aireación, agitación, tiempo y tamaño del inóculo.
- Tipo de fermentación a emplear : sumergida o en estado sólido
- Estudios de efectividad del producto en ensayos in vitro, condiciones controladas y campo
- Evaluación económica preliminar y del proceso tecnológico
- Escalado del procedimiento tecnológico cumpliendo las medidas de bioseguridad.
- Aislamiento e identificación de los metabolitos activos
- Evaluación técnico- económica y de mercado
- Pruebas toxicológicas
- Registro
- Comercialización

Desarrollo de formulaciones adecuadas

La aplicación exitosa de un microorganismo y/o los metabolitos que ellos producen, requiere del desarrollo de adecuadas formulaciones, adyuvantes y soportes.

En el caso de los microorganismos se requiere que el mismo se mantenga vivo y activo en el suelo, para lo cual es necesario encontrar y desarrollar apropiadas matrices sólidas y formulaciones líquidas para estabilizar las bacterias y hongos durante los procesos de almacenamiento y aplicación.

EFFECTOS DE LAS APLICACIONES DE ACIDO JASMONICO EN LA ACLIMATIZACION DE PLANTULAS DE CAÑA DE AZUCAR (SACCHARUM SP. HIBRIDO) PROVENIENTES DE BIORREACTORES DE INMERSION TEMPORAL

INTRODUCCION.

La caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) generalmente se clasifica como un cultivo que crece en áreas tropicales y subtropicales. Los productos que más se obtienen de ella son: alimentos, fibras, bagazo, combustibles y electricidad (Clarke y Leslie, 1996).

Este cultivo ha sido el principal renglón de la producción agrícola en Cuba. Las condiciones desfavorables en que se desarrolló la agricultura cañera en los últimos años, provocaron que la producción se haya limitado considerablemente. No obstante a la reestructuración que se lleva a cabo en la agro-industria azucarera cubana, la aplicación de las técnicas biotecnológicas seguirá siendo una poderosa herramienta para alcanzar en corto tiempo grandes cantidades de plantas, para el fomento de nuevas variedades, ya sean introducidas al país u obtenidas mediante el programa nacional de mejoramiento genético,.

La necesidad de obtener semillas con alta calidad, pureza genética y libre de enfermedades en un tiempo relativamente corto, ha permitido la introducción de las técnicas de micropropagación en diferentes especies. Esto motivó que la producción masiva de plántulas en varios laboratorios comerciales, así como la ejecución de proyectos científicos que generen nuevos protocolos de cultivo *in vitro*, con el empleo de la organogénesis, donde se destacan las tecnologías basadas en el uso de biorreactores de inmersión temporal (Lorenzo, 1998; Escalona, 1999; Etienne *et al.*, 1999; Escalona *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2000; Etienne y Berthouly, 2002) y a través de embriogénesis somática (Castillo, 2001; Nieves *et al.*, 2003).

Lorenzo (1998) desarrolló un protocolo para la propagación de caña de azúcar por organogénesis con el empleo de biorreactores de inmersión temporal que revoluciona en gran medida las técnicas de micropropagación convencional empleadas en Cuba, ya que aumenta de forma significativa los coeficientes de multiplicación. La aplicación de este protocolo a escala productiva es de suma importancia para la rápida introducción de las nuevas variedades existentes y la renovación de las cepas con bajos rendimientos a escala comercial.

El empleo de este nuevo protocolo incentiva un mayor esfuerzo en el estudio de los aspectos relacionados con las características eco-fisiológicas de las plántulas en condiciones *in vitro* y durante la etapa de aclimatización, para así lograr que las mismas alcancen altos porcentajes de supervivencia y la calidad comercial en un tiempo relativamente corto en esta fase. A pesar de la gran producción de plantas en

los laboratorios comerciales, la cifra que llega a los campos es baja por deficiencias en las metodologías precedentes de aclimatización, entre otras razones.

La metodología de aclimatización de plántulas de caña de azúcar que se comenzó a aplicar en los laboratorios comerciales cubanos desde 1994, ha presentado dificultades en los niveles de supervivencia, el sustrato empleado y el crecimiento de las plántulas. Por estas razones muchos laboratorios han buscado alternativas según sus posibilidades productivas y sus capacidades en las áreas *ex vitro*.

De la Fe *et al.* (1998) hicieron aportes a la metodología de aclimatización antes citada, al emplear bioestimulantes y biofertilizantes para aumentar el ritmo de crecimiento de las plántulas en esta fase. También se trabajó intensamente en el desarrollo de diferentes sustratos con vistas a aumentar la supervivencia y la calidad de las mismas (Ortiz, *et al.*, 1998 a,b), pero aún estas metodologías pueden ser mejoradas en algunos de sus componentes.

A pesar de los avances, en la aclimatización de la caña de azúcar no se han realizado estudios que profundicen sobre los efectos de las condiciones ambientales en los aspectos fisiológicos, anatomorfológicos y bioquímicos de las plántulas desde el momento de salida de las condiciones *in vitro* hasta la permanencia final en esta fase.

Por todo lo anteriormente planteado, se propone la siguiente hipótesis de trabajo: Elevar la eficiencia en la aclimatización de plántulas de caña de azúcar provenientes de biorreactores de inmersión temporal, con el empleo de ácido jasmónico para favorecer el cierre estomático y la supervivencia de las plántulas.

Para validar esta hipótesis se desarrolló este trabajo que persigue cumplir los siguientes objetivos:

- Determinar los efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre el cierre de estomas de plántulas de caña de azúcar propagadas en biorreactores de inmersión temporal.
- Establecer los porcentajes de supervivencia de las plántulas de caña de azúcar provenientes de biorreactores de inmersión temporal durante la aclimatización cuando previamente son asperjadas con ácido jasmónico.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Los experimentos se realizaron en el Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Para el desarrollo de los mismos se emplearon como modelo plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) var. C91-301 propagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT) según protocolo establecido por Lorenzo (1998). Las plántulas se transfirieron para las condiciones de aclimatización luego de ser sumergidas en una solución de Score 2% durante cinco minutos. Se empleó bandejas plásticas de 144 pocillos (52,5 cm de ancho x 29,5 cm de largo y 4,0 cm de alto) con una capacidad de 25 cm³ cada uno.

Se emplearon plántulas con más de 0,3 g de masa fresca y 4 hojas, que se colocaron en un sustrato constituido por cachaza + ceniza (1:1, v:v). Las condiciones de aclimatización fueron con control de la humedad relativa y luminosidad (90% HR y 1 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante los primeros 21 días, luego de esta fecha se trasladaron a condiciones de exteriores (80% HR y 2 000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), donde permanecieron otros 21 días.

En el momento de salida de los frascos de los BIT se aplicó ácido jasmónico (producido por ICIDCA) a razón de 1mg.L⁻¹ a 144 plántulas, mientras otras 144 plántulas sólo se asperjaron con agua.

Se evaluó la supervivencia en porcentaje y el comportamiento estomático. Para el análisis de los estomas se aplicó esmalte traslucido a la parte central de del envés de la hoja, pasados 15 minutos se retiró para a interpretación y toma de fotografías en un microscopio Nikon microphot-FX.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las aplicaciones de ácido jasmónico ejercieron influencias sobre el cierre de estomas de plántulas de caña de azúcar propagadas en biorreactores de inmersión temporal, como se muestra en la figura 1.

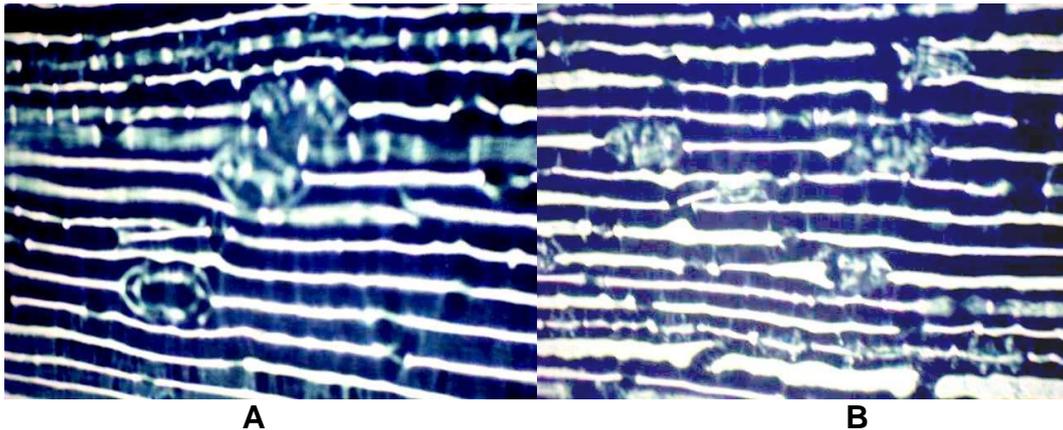


Figura 1. Comportamiento de estomas en hojas de plántulas de caña de azúcar. A. Estomas abiertos en el control. B. Estomas cerrados en el tratamiento con ácido jasmónico (1mg.L^{-1}).

En las hojas tratadas con ácido jasmónico los estomas estaban en su mayoría cerrados en comparación con los que sólo se asperjaron con agua (control). Este es un efecto deseado por muchos propagadores evitar la muerte masiva del material vegetal cultivado *in vitro* en el momento de salida a exteriores.

En general se reconoce que el tránsito de ambientes *in vitro* a *ex vitro* y variaciones en estas condiciones, provocan estrés en las plantas, expresados en términos de acumulación de ABA, prolina y especies activas del oxígeno (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995; Hronková *et al.*, 2003; Talbott *et al.*, 2003; González-Olmedo *et al.*, 2005). Como quiera que el primero influye en el cierre del estoma, el comportamiento del grupo control demostró que sus niveles fueron insuficientes y por ello se requirió de estímulos adicionales favorecidos por el ácido jasmónico exógeno.

En caña de azúcar se observó que en los primeros 14 días deben tomarse las medidas que eviten la transpiración descontrolada, característica del material que entra en esta fase proveniente de condiciones *in vitro* (Yue *et al.*, 1992; Ziv, 1995; Donnelly *et al.*, 1995), para lo cual es determinante la alta humedad relativa, unido a la adecuada selección y tratamiento del sustrato, de modo que evite las infecciones fatales de las plántulas. Sin embargo, se requiere su reducción gradual, unida al manejo de la luz, de modo que favorezcan la formación y funcionalidad de estructuras que se involucran en el control de las relaciones hídricas y en el incremento de la actividad metabólica conducente al autotrofismo (Desjardins *et al.*, 1996; Kozai y Zobayed, 2000).

De lo antes expuesto se desprende el valor del establecimiento de una tecnología que contemple todas las medidas que garanticen primero altos porcentajes de supervivencia, y luego dinámicas tasas de crecimiento.

La tecnología de aclimatización aplicada alcanzó niveles máximos de supervivencia con el empleo de ácido jasmónico. En la tabla 1 se puede observar el efecto del ácido jasmónico en la supervivencia de las plántulas de caña de azúcar durante la aclimatización.

Tabla 1. Efectos del ácido jasmónico sobre la aclimatización de plántulas de caña de azúcar provenientes de BIT.

Tratamientos	% supervivencia	Z _{,01} =2,58
Sin ácido jasmónico	95	Z _{,05} =1,96
Con ácido jasmónico (1mg.L ⁻¹)	99	Ze=5,26

La aplicación de ácido jasmónico incrementó aun más el porcentaje de supervivencia de las plántulas de caña de azúcar provenientes de BIT, con una diferencia significativa al nivel del 1% de error. Los resultados demuestran el valioso efecto de este nuevo bioproducto, similar a otros discutidos por Preece y Sutter (1991), basados en el cierre de los estomas y la reducción de la deshidratación de las plantas que se evita con esta regulación estomática.

Una vez más se demuestra la eficiencia de esta tecnología de aclimatización (Rodríguez, 2005) y la posibilidad de elevarla con el empleo un nuevo bioproducto de la industria azucarera cubana.

Efecto del ácido jasmónico como madurador de caña adulta en parcelas experimentales.

Para cumplir este resultado se planificó montar un ensayo en parcelas experimentales con la variedad C 87-51. En cultivos de inhibidores de la caña de azúcar CV CP 5243, se logró un incremento de la germinación de los embriones aumento del % de supervivencia en 4,5 veces con relación al control (ISACA).

REFERENCIAS

CASTILLO, R. 2001. La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. pp.105.

CLARKE, M. M.; A. E. LESLIE. 1996. Sugar beet and sugarcane as renewable resource. En: Fuller, G.; A. T. Mckee, D. Donald. (eds.). Agricultural materials as renewable resources. pp. 229-247.

DE LA FE, C. F.; R. ORTIZ; M. JIMENEZ. 1998. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas. Cultivos Tropicales. 19 (3): 45-48.

DESJARDINS, Y.; C. HDIDER; J. DE RIEK. 1996. Carbon nutrition *in vitro* regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. En: Aitken Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds). Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwers Academic Publishers. pp. 441-471.

DONNELLY, D. J.; W. E. VIDAVER; K. LEE. 1995. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 4: 43-50.

ESCALONA, M. 1999. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. pp.100.

ESCALONA, M.; J. C. LORENZO; M. DAQUINTA; J. L. GONZALEZ; M. CID; Z. FUNDORA; C. G. BORROTO. 2001. Factores relacionados con la propagación de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Libro de Reportes Cortos. 5to Coloquio Biotecnología Vegetal. Santa Clara. 160-162.

ETIENNE, E.; C. TEISSON; D. ALWARD; M. LARTAUD; M. BERTHOULY; F. GEORGET; M. ESCALONA; J. C. LORENZO. 1999. Temporary immersion for plant tissue culture. En: Altman, A.; M. Ziv; S. Izhav (eds.). *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st*. Kluwers Academic Publishes. pp. 629-632.

ETIENNE, H.; M. BERTHOULY. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.

GONZALEZ-OLMEDO, J.; A. CORDOVA; C. A. ARAGON; D. PINA; M. RIVAS; R. RODRIGUEZ. 2005. Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plantas de banano (*Musa* spp.) bajo estrés térmico. *INFOMusa* 8-12.

HRONKOVA, M.; H. ZAHRADNICKOVA; P. SIMEK; A. HEYDOVA. 2003. The role of abscisic in acclimation of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 46(4): 535-541.

JIMENEZ, E.; N. PEREZ; M. DE FERIA; R. BARBON; A. CAPOTE; M. CHAVEZ; E. QUIALA; J. C. PEREZ, 2000. Improved production of potatoes microtubers using temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 59: 19-23.

KOZAI, T.; S. M. A. ZOBAYED. 2000. Acclimatization. En: Spier, R. E., (ed.). *Encyclopedia of Cell Technology*. John Wiley & Sons, Inc, Vol. 1: 1-12.

LORENZO, J.C.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54(3):197-200.

NIEVES, H.; M. SEGURA-NIETO; M. A. BLANCO; M. SANCHEZ; A. GONZALEZ; R. CASTILLO. 2003. Biochemical characterization of embryogenic and no-embryogenic calluses of sugarcane. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 39 (3): 343-345.

ORTIZ, R.; C. DE LA FE; D. LARA. 1998 a. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. I. Sustrato más eficiente para la adaptación de vitroplantas. *Cultivos Tropicales*. 19 (2): 45-49.

ORTIZ, R.; C. DE LA FE; D. LARA. 1998 b. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. III. Uso de fertilizantes y manejos de las vitroplantas en la fase de adaptación. *Cultivos Tropicales*. 19(3): 49-53.

PREECE, J. E.; E. G. SUTTER. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C.; R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. pp. 71-93.

RODRIGUEZ R. 2005. Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila. pp.100.

TALBOTT, L. D.; E. RAHVEH; E. ZEIGER. 2003. Relative humidity is a key factor in the acclimation of the stomatal response to CO₂. *Journal of Experimental Botany*. 54(390):2141-2147.

VAN HUYLENBROECK, J. M; H. HUYGEN; P. C. DEBERGH. 1995. Photoinhibition during acclimatization of *Spahtiphyllum* Petite plantlets. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 31: 160-164.

YUE, D.; Y. DESJARDINS; M. LAMARRE; A. GOSSELIN. 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. *Scientia Horticulturae* 49: 9-16.

ZIV, M. 1995. *In vitro* acclimatization. En: Aitken-Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. pp. 493-516.

EFECTOS DE APLICACIONES DE BIOJAS® EN PLANTAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS.

INTRODUCCIÓN

La producción comercial de clones de *Musa* spp. es muy importante en numerosos países porque es un alimento básico para los pobladores y una fuente de ingreso por las exportaciones, sin embargo sus rendimientos se disminuyen por la presencia de enfermedades de origen fúngico. En la biotecnología el empleo de bioproductos como el ácido jasmónico para inducir respuestas de defensa en las plantas ante el estrés abiótico y biótico, permite utilizar alternativas que responden a tecnologías limpias que no afecten el ambiente. Con estas premisas se ejecutó esta investigación con el objetivo de determinar los aspectos fisiológicos y bioquímicos de la respuesta defensiva provocada por ácido jasmónico Biojas® en plantas de plátano (*Musa* AAB) clon CEMSA 3/4 durante la aclimatización y contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* raza 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas provenientes de biorreactores de inmersión temporal (BIT) y las evaluaciones se realizaron durante la aclimatización. Se determinó el efecto de aplicaciones exógenas de ácido jasmónico (1 y 2 mg L⁻¹) frente al estrés abiótico que representa la transición *in vitro-ex vitro* en indicadores fisiológicos y bioquímicos en las hojas, y la mejor dosis en la inducción de mecanismos de defensa en las plantas tratadas.

Procedimientos:

Material vegetal: plátano clon CEMSA 3/4 (*Musa* AAB), plantas micropropagadas a partir de las originalmente provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

Cultivo en BIT según resultados previos de Roels *et al.* (2005), Cejas *et al.* (2005) y Aragón *et al.* (2005), incluyendo 14 días en aclimatización.

Biojas®: nombre comercial del producto con ácido jasmónico producido por el ICIDCA a partir de fermentaciones por hongos *Botryodiplodia theobromae*. Se aplicó en tiempo considerado 0 en la investigación.

Aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) 0124 que se logró a partir de plantas enfermas del cultivar Burro CEMSA (grupo ABB, susceptible), procedentes del Banco de Germoplasma de Banano del INIVIT. El aislamiento del hongo se realizó a partir de la corteza exterior y del cilindro central de las plantas enfermas. La patogenicidad del aislado se comprobó en plantas cultivadas en campo según Sun y Su, 1984. La identificación de la raza y el grupo de compatibilidad vegetativa del aislado se llevó a cabo por especialistas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Se inoculó en raíces de las plantas seleccionadas a las 24 horas de iniciada la investigación, por lo tanto al día siguiente de aplicado el Biojas®.

Los indicadores fisiológicos: fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la transpiración total ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con el equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6 de 2.5 cm²). Fecha de medición: día 42 de la aclimatización (28 de la investigación) a las 09:00 horas.

Los indicadores bioquímicos: Actividad superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) (McCord y Fridovich, 1969). Actividad fenilalanina amonio-liasa (PAL) (EC 4.3.1.5)

(Jorin y Dixon, 1990). Contenido de proteínas solubles (Bradford, 1976). Fecha de medición: día 42 de la aclimatización (28 de la investigación) a las 09:00 horas. El análisis estadístico de los resultados se obtuvo con el empleo del utilitario “*Statistical Package for Social Science*” (SPSS) versión 11.5. En el pie de cada tabla aparecen los análisis y las transformaciones de los datos que se utilizaron en cada caso.

RESULTADOS

Los resultados relativos a los efectos de la aplicación del bioproducto durante la aclimatización se muestran a continuación. En primer lugar la tabla 1 refiere los datos relacionados con las dos dosis ensayadas sobre la supervivencia y comportamiento foliar.

Tabla 1 Efectos de las dosis de ácido jasmónico Biojas® sobre la supervivencia y comportamiento foliar.

Biojas® (1mg L ⁻¹)	% de Supervivencia*	Número de hojas
0	92 b	4.6 b
1	96 a	5.6 a
2	96 a	4.12 b
ES	0.12	0.05

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0.05$). $n=20$,
* dato transformado según $y' = 2 \arcsen ((y/100)^{0.5})$.

Como se aprecia el bioproducto elevó la supervivencia de las plantas en los primeros 28 días en la fase de aclimatización y la dosis más baja además favoreció la emisión de nuevas hojas. Es una evidencia más de la acción antiestresante del Biojas®. No obstante se reconoce que puede implicar cambios en elementos vinculados con la fotosíntesis no siempre favorables (Poonam *et al.*, 2013, Ananiev *et al.*, 2004), a tenor de ellos se interpretan los resultados de la tabla 2.

Tabla 2 Efectos de las dosis de ácido jasmónico Biojas® sobre el intercambio gaseoso foliar.

Biojas® (1mg L ⁻¹) ¹⁾	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ¹⁾	Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ¹⁾	Conductancia Estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
0	7 a	1 a	60 a
1	7 a	0.5 b	30 b
2	3 b	0.4 b	30 b
ES	0.11	0.14	0.11

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0.05$). $n=120$

Los resultados demuestran que los efectos dependen de la dosis. La más baja favoreció la mejor combinación de fotosíntesis/transpiración, fijación de asimilatos con menor pérdida de agua, también asociado con la más baja conductancia estomática. La mayor dosis parece que motivó cambios no favorables a pigmentos y fotosistemas que redujeron la actividad fotosintética. De esta forma se demuestra la utilidad de emplear el Biojas® a la dosis baja para evaluar además sus efectos ante situaciones estresantes bióticas, cuyos resultados se muestran en las tablas siguientes.

Tabla 3. Manifestaciones foliares en plantas de plátano clon CEMSA $\frac{3}{4}$ con cuatro combinaciones de dosis de Biojas® y de inoculaciones con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en el día 28 (42 de la aclimatización).

Biojas® (1mg L ⁻¹)	Inoculación	Hojas marchitas/planta	Plantas con hojas marchitas
0	NO	0	0
0	SI	2 a	1 a
1	NO	0	0
1	SI	0.5 b	0.4 b
ES		0.04	0.02

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0.05$). n=12

Biojas® redujo los valores de las hojas marchitas en las plantas inoculadas con el hongo después del día 14 según la evaluación realizada a los 21 días (día 35 en la fase de aclimatización). Aunque no se lograron igualar los niveles del testigo, la reducción es aún más notoria a los 28 días de experimentación.

No caben dudas del efecto positivo de este producto en el control de la marchitez que provoca en las hojas la presencia del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en las plantas de plátano previamente tratadas, lo que evidencia su empleo eficiente con acción protectora ante esta enfermedad fungosa, como antes se valoró ante plagas (Nabity *et al.*, 2013).

El significado de la disminución de la presencia de la patología en las hojas en términos del importante intercambio gaseoso que se desarrolla en estos órganos se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Intercambio gaseoso en plantas de plátano clon CEMSA $\frac{3}{4}$ con cuatro combinaciones de dosis de Biojas® y de inoculaciones con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en el día 28 (42 de la aclimatización).

Biojas® (1mg L ⁻¹)	Inoculación	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
0	NO	14 a	0.9 a
0	SI	1 d	0.4 b
1	NO	8 b	0.4 b
1	SI	5 c	0.2 c
ES		0.14	0.02

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0.05$). n=120

Las aplicaciones de Biojas® (ácido jasmónico, 1 mg L⁻¹) a plantas de plátano (*Musa AAB*) clon CEMSA $\frac{3}{4}$, disminuyeron los niveles de asimilación de CO₂ en las plantas que nunca fueron inoculadas. Esta respuesta se ha identificado previamente con la inducción de enzimas degradantes de clorofilas y su implicación en los fotosistemas involucrados en actividad fotosintética (Poonam *et al.*, 2013, Ananiev *et al.*, 2004). Sin embargo la manifestación de la enfermedad fungosa reduce mucho más este proceso vital para las plantas, mientras que las previamente tratadas con la formulación de jasmonatos atenuaron los efectos estresantes de la patología con una capacidad fotosintética seis veces superior a las de las plantas sin la acción protectora del producto.

La transpiración también se redujo en las hojas de los grupos de plantas tratadas con Biojas®, se hizo evidente que el intercambio gaseoso fue más eficiente al fijar más CO₂ con menores pérdidas de agua. En especial los efectos del producto fueron muy favorables en esta proporción en las plantas inoculadas con el hongo, justificando su acción protectora en este proceso fisiológico.

Las aplicaciones de Biojas® (ácido jasmónico, 1 mg L⁻¹) a plantas de plátano (*Musa AAB*) clon CEMSA ¾, atenuaron los efectos estresantes en esta etapa de transición *in vitro-ex vitro* porque también promueven hojas con un intercambio gaseoso más eficiente en cuanto a la fijación del CO₂ con menores pérdidas de agua.

La participación de enzimas involucradas en mecanismos de defensa puede ayudar a la interpretación de estos efectos, son los resultados expuestos en las siguientes tablas.

Tabla 5. Actividad de la superóxido dismutasa en plantas de plátano clon CEMSA ¾ con cuatro combinaciones de dosis de Biojas® y de inoculaciones con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en el día 28 (42 de la aclimatización).

Biojas® (1mg L ⁻¹)	Inoculación	Actividad Enzimática (U mg ⁻¹ MF)	Concentración Proteínas (mg prot g ⁻¹ MF)	Actividad Específica (U mg ⁻¹ proteína)
0	NO	2.2ab	10 b	0.2 b
0	SI	2.3ab	18 a	0.1 c
1	NO	1.1 b	12 b	0.08 c
1	SI	2.7 a	10 b	0.3 a
ES		0.07	0.47	0.02

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, p≤ 0.05). n=6

Tabla 6. Actividad de la fenilamoniom liasa en plantas de plátano clon CEMSA ¾ con cuatro combinaciones de dosis de Biojas® y de inoculaciones con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en el día 28 (42 de la aclimatización).

Biojas® (1mg L ⁻¹)	Inoculación	Actividad Enzimática (U mg ⁻¹ MF)	Concentración Proteínas (mg prot g ⁻¹ MF)	Actividad Específica (U mg ⁻¹ proteína)
0	NO	2.2ab	10 b	0.2 b
0	SI	2.3ab	18 a	0.1 c
1	NO	1.1 b	12 b	0.08 c
1	SI	2.7 a	10 b	0.3 a
ES		0.07	0.47	0.02

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, p≤ 0.05). n=6

La igualdad de los contenidos de las proteínas solubles en las plantas sin tratar con ácido jasmónico ni el hongo y aquellas con aplicaciones de ambos, permite la mejor comparación de las respuestas enzimáticas como mecanismos bioquímicos defensivos. Las actividades específicas de SOD y PAL fueron las mayores en el segundo grupo de plantas antes citado.

Biojas® indujo reacciones de defensa en las plantas de plátano de este estudio que justifican la reducción de los síntomas que se evaluaron en las mismas ante la inoculación del hongo. Estas son las primeras evidencias de la inducción de estos mecanismos en *Musa* producto de aplicaciones exógenas de ácido jasmónico. La

acción de enzimas como la PAL después de la inoculación fúngica, pudo provocar incrementos en fenoles involucrados en la lignificación de las células como antes se ha asociado también por elicitación con ácido jasmónico (Jalalpour *et al.*, 2014; Gadzovska *et al.*, 2007). Esta es considerada la primera línea de defensa contra un amplio rango de patógenos. Además la elevada actividad de enzimas oxidativas, en este caso la SOD, se asocia con mecanismos de defensa para detoxificar especies reactivas del oxígeno, rasgo común de condiciones estresantes y en específico ante el ataque patogénico. La actividad SOD superó cuantitativamente y ejerció efectos presumiblemente más tempranos (Hancock *et al.*, 2001) que la actividad PAL en defensa de las plantas de plátano ante el ataque de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2.

En la tabla 7 se completa la información relativa al comportamiento del metabolismo de fenoles.

Tabla 7. Compuestos fenólicos en plantas de plátano clon CEMSA ¾ con cuatro combinaciones de dosis de Biojas® y de inoculaciones con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en el día 28 (42 de la aclimatización).

Biojas® (1mg L ⁻¹)	Inoculación	Fenoles libres (mg g ⁻¹ MF)	Fenoles asociados a pared celular (mg g ⁻¹ MF)
0	NO	7 b	32 b
0	SI	4 c	20 c
1	NO	7.5 b	33 b
1	SI	10 a	42 a
ES		0.27	1.17

Letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, p≤ 0.05). n=6

Los datos corroboran que la acción de enzimas como la PAL después de la inoculación fúngica, pudo provocar incrementos en fenoles involucrados en la lignificación de las células como antes se ha asociado también por elicitación con ácido jasmónico (Jalalpour *et al.*, 2014; Gadzovska *et al.*, 2007), mientras enzimas como las polifenoloxidasas tendrían una menor actividad en el metabolismo donde catalizan la conversión de fenoles a sus correspondientes quinonas, que son compuestos altamente reactivos que finalmente se polimerizan a melaninas (Dávila *et al.*, 2016). En suspensiones celulares de *Taxas baccata*, el metiljasmonato estimuló la producción de compuestos fenólicos y en paralelo a ella, en las células elicidadas se apreció un incremento de la actividad enzimática PAL, lo que lo evidencia como un efectivo elicitor (Jalalpour *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

1. El Biojas® (ácido jasmónico, 1 mg L⁻¹) indujo respuestas defensivas que disminuyeron los síntomas en las hojas de plantas de plátano clon CEMSA ¾ provocados por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en condiciones de aclimatización.
2. Las aplicaciones de Biojas® (ácido jasmónico, 1 mg L⁻¹) a plantas de plátano (*Musa AAB*) clon CEMSA ¾, atenuaron los efectos estresantes en la transición *in vitro-ex vitro* porque promueven hojas con un intercambio

gaseoso más eficiente al fijar más CO₂ con menores pérdidas de agua y en especial en las inoculadas con el hongo.

3. La inducción de respuesta defensiva por Biojas® (ácido jasmónico, 1 mg L⁻¹) en plantas de plátano clon CEMSA ¾ inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 es un proceso multifactorial que incluye reacciones del metabolismo oxidativo catalizadas por SOD, y del metabolismo fenólico por la acción cuantitativamente inferior de la PAL.

REFERENCIAS

1. Ananiev E. D.; K. Ananieva; I. Todorov, 2004. Effect of Methyl Ester of Jasmonic Acid, Abscisic Acid and Benzyladenine on Chlorophyll Synthesis in Excised Cotyledons of Cucurbita pepo (Zucchini). Bulgarian Journal of Plant Physiology, Vol. 30: 51-63.
2. Aragón, C. E.; M. Escalona; I. Capote; D.Pina; I. Cejas; R. Rodríguez; M. J. Cañal; J. Sandoval; S. Roels; P. Debergh; J. González-Olmedo. 2005. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa AAB*) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant. 41: 550–554.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
4. Cejas, I.; I. Capote; M. Escalona; C. Noceda; R. Rodríguez; M. J. Cañal; J. Sandoval; S. Roels; P. Debergh. 2005. Protocolo para la proliferación del plátano (*Musa AAB*) clon CEMSA ¾ con el empleo de Meta-topolina en Biorreactores de Inmersión Temporal. Bioveg 2005. Biotecnología Vegetal y agricultura sostenible. ISBN 959-16-03300-2. 3-4.
5. Dávila, R. M.; R. Cortés; J. H. Gil. 2016. Cambios físicos y físico-químicos durante el almacenamiento en plátano impregnado al vacío con soluciones antioxidantes. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. 14 (2): 125-134.
6. Gadzovska S.; S. Maury; A. Delaunay; M. Spasenoski; C. Joseph; D. Hagège. 2007. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones Plant Cell Tissue and Organ Culture. 89(1):1-13.
7. Hancock, J.T., Desikan, R.; Neill, S.J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochem. Soc. Trans. 29:345-350.
8. Jalalpour Z.; L. Shabani; L. Afghani; M. Sharifi; S. A. Amini. 2014. Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalastatin on phenolic metabolism through induction of LOX activity in cell suspension culture. Turk J Biol (2014) 38: 76-82
9. Jorrin, J.; R. A. Dixon. 1990. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). II. Purification, Characterization, and Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase Isoforms from Elicitor-Treated Cell Suspension Cultures. Plant Physiology. 92:447-455
10. McCord, J.; I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. J. Inorg. Biochem. 244: 6049-6055.
11. Nabity, P. D.; J. A. Zavala; E. H. DeLucia. 2013. Herbivore induction of jasmonic acid and chemical defences reduce photosynthesis in *Nicotiana attenuata*. J. Exp. Bot. 2013 64(2):685-94.
12. Poonam, S.; H. Kaur; S. Geetika. 2013. Effect of Jasmonic Acid on Photosynthetic Pigments and Stress Markers in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Seedlings under Copper Stress. American Journal of Plant Sciences, Vol. 4 No. 4: 817-823.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ÁCIDO JASMÓNICO EN LA MICROPROPAGACIÓN Y EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLANTAS DE INTERÉS COMERCIAL

INTRODUCCIÓN.

El Ácido Jasmónico (AJ), su metil ester (metil jasmonato, MeJA) y su amino ácido conjugado son reguladores del crecimiento vegetal endógeno, sintetizados de manera natural por una gran variedad de plantas.

El MeJA fue descubierto e identificado como componente aromático de aceites esenciales de la flor del jazmín (*Jasminum grandiflorum*) (Demole *et al.*, 1962), mientras el AJ libre fue aislado en 1971 a partir de sobrenadantes de cultivos del hongo *Botryodiplodia theobromae* (Aldridge *et al.*, 1971).

Conocido por algunos como hormona del estrés (Witek *et al.*, 2002; Suhita *et al.*, 2004, Van Dam y Bezemer, 2006) y promotor de defensa y de la senescencia (Ueda y Kato, 1980; Chen *et al.*, 2004), el ácido jasmónico se ha convertido en uno de los reguladores de crecimiento más estudiados en los últimos años, aunque el conocimiento actual acerca de su papel, su modo de acción en las plantas y los mecanismos moleculares de transmisión de señales relacionados es aún muy limitado (Lorenzo y Solano, 2005)

En el marco del proyecto cubano "Producción y aplicación de jasmonatos producidos por hongos *Botryodiplodia* sobre cultivos de células y plantas de interés económico", se desarrolló la presente investigación con el objetivo de Establecer los efectos de jasmonatos en la micropropagación de plantas de interés comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. **PIÑA:** La investigación se realizó en el Laboratorio de Transferencia de Tecnologías BIOPLANT-EXPORT y en las áreas de Aclimatización del Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Cuba, durante el periodo comprendido entre el 23 de Noviembre de 2006 y el 23 de Mayo de 2007.

Técnicas y procedimientos generales.

- Selección del material vegetal.

Se utilizaron vitroplantitas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD-2, micropropagadas según la metodología propuesta por Daquinta y Benegas (1997) modificada con el empleo de la inmersión temporal en la fase de multiplicación (un mes) y en la preelongación (21 días).

- Composición de los medios de cultivo.

Se empleó como medio basal las sales MS propuestas por Murashige y Skoog (1962), con un suplemento especial constituido por: el mioinositol (0,1 g. L⁻¹), el ácido naftalenoacético (ANA) (0,5 mg. L⁻¹), la tiamina. HCl (1 mg. L⁻¹) y la sacarosa (30 g. L⁻¹). El pH se mantuvo en el rango de 5,7 a 5,8 en todos los casos.

Ácido jasmónico

El ácido jasmónico empleado en todos los casos se corresponde con el producto proveniente del proyecto: Producción y aplicación de jasmonatos producidos por hongos *Botryodiplodia* sobre cultivos de células y plantas de interés económico, coordinado por ICIDCA en el marco del PNCT en Biotecnología Agrícola. Las dosis empleadas se relacionaron al considerar resultados previamente logrados por González-Olmedo *et al.* (2002).

- *Condiciones de Cultivo*

Las manipulaciones se realizaron en un medio totalmente aséptico en una cabina de flujo laminar. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1.2 kg/cm² de presión según las indicaciones y el tiempo sugerido por Sigma (1992) de acuerdo al volumen del medio. El pH del medio se ajustó en todos los casos a 5,7 previo a la esterilización. Las vitroplantas fueron cultivadas en magentas plásticas transparentes (7,2 cm de diámetro inferior, 8,6 cm de diámetro superior y 9,2 cm de altura), con 35 mL de medio líquido en cada una. La fase de elongación y enraizamiento se llevó a cabo en una cámara de cultivo de luz artificial con un flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF) de 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 45 días.

- *Aclimatización.*

Para la adaptación de las plántulas, se aplicó el protocolo propuesto por Yanes *et al.*, (2000) con modificaciones, utilizando como sustrato la mezcla de zeolita + cachaza 1: 1 (v: v) en bandejas plásticas con 60 orificios ($V \cong 160 \text{ cm}^3$). No se utilizó ningún control biológico tal como *Trichoderma*, ni biofertilizante (Micorrizas o Azotobacter), ni cualquier otro fertilizante u hormona de aplicación foliar, propuestos por este autor.

Las vitroplantas se colocaron en cámaras experimentales protegidas, equipadas con un sistema automatizado de riego por nebulización automatizado. Durante los primeros 30 días, se mantuvo la intensidad lumínica promedio a $458 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, medidos a las 12:00 meridiano, y el intervalo de riego fijo de 30 minutos. El tiempo de riego fue variando: tres minutos en la primera semana, dos minutos en la segunda y 30 segundos en las dos últimas semanas. Pasados los 30 días se incrementó hasta el FFF de $920 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y el riego fue de una a dos veces al día a saturación del sustrato, siempre acorde con lo recomendado por Yanes *et al.* (2000).

- *Biología de Phytophthora nicotianae var. Parasítica.*

La cepa de *Phytophthora nicotianae var. parasítica* fue aislada de las plantas de piña en las áreas de la Empresa Piña de Ciego de Ávila. Se tomaron hojas que presentaban los síntomas típicos de la enfermedad, las lesiones se lavaron con agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%, durante 3 minutos, luego se pasaron por alcohol al 70% y se lavaron con agua destilada estéril. Las muestras se colocaron en agar papa-dextrosa (PDA) y se incubaron a 28 °C durante 48 horas, el micelio observado se transfirió a placas con agar papa-dextrosa (PDA) para obtener un cultivo puro de hongo.

Efectos del ácido jasmónico sobre la calidad de las vitroplantas de piña Ananas comosus (L.) Merr.) variedad MD2 cultivadas in vitro en la fase de elongación y enraizamiento.

El primer experimento se realizó en un diseño experimental de bloques al azar de tres tratamientos con diez réplicas cada uno.

Las vitroplantas se encontraban en la fase de multiplicación (listas para el enraizamiento) según la metodología anteriormente mencionada. Se llevaron a la fase III según el mismo protocolo, añadiendo al medio de cultivo el ácido jasmónico (AJ) a razón de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para el cultivo se utilizaron 30 magentas en total, es decir cada tratamiento con diez magentas (cada magenta representó una réplica). En cada una se colocaron diez plantas.

Los tratamientos fueron:

- Sin ácido jasmónico: Testigo.
- Con ácido jasmónico sin filtrar (1mg. L⁻¹): Tratamiento 1.
- Con ácido jasmónico filtrado(1mg. L⁻¹): Tratamiento 2.

En el tratamiento 1, el ácido jasmónico sin filtrar se añadió antes de la cocción del medio de cultivo. Los medios se cocinaron a 80°C antes de añadirle el G-1 como agente desinfectante. Para el tratamiento 2, se le adicionó la misma dosis previamente filtrada con el filtro Nalgene® de 2 µm después de cocinar el medio, y en la cabina de flujo laminar.

Se evaluaron:

- La contaminación y supervivencia *in vitro*.
- Las variables anatomo-morfológicas.
- La actividad fotosintética y la transpiración
- La concentración de las clorofilas
- La supervivencia *ex vitro*.

- *Contaminación y supervivencia in vitro.*

Una vez colocadas en la cámara de cultivo para la elongación y el enraizamiento, las plantas se evaluaron cada 24 horas durante los tres primeros días, y luego cada siete días hasta los 45 días. Se observaron para apreciar la presencia de contaminantes visibles: es decir cualquier colonia de hongos (esporas) o bacterias. Además se evaluó la posibilidad de plantas muertas o con necrosis.

Indicadores anatomo-morfológicos de la calidad de vitroplantas

Finalizada la fase de enraizamiento (a los 45 días), las plántulas se clasificaron para establecer su competencia. Se consideran competentes las plantas que miden más de 4 cm e incompetentes las de menos de 4 cm, según la metodología de micropropagación propuesta por Daquinta y Benega (1997) y Escalona *et al.* (1999). Se escogió de cada tratamiento un grupo de 20 plantas más representativas (competentes e incompetentes) de las cuales se evaluaron: el número de hojas, la longitud de la hoja mayor, la altura de las plantas, el diámetro del tallo, el número de raíces, la longitud de la raíz mayor, la masa fresca, la masa seca y la fotosíntesis. Las longitudes fueron medidas con una regla graduada en mm mientras la masa fresca se determinó con una balanza analítica Sartorio.

Para la determinación de la masa seca, se tomaron de las 20 plantas anteriormente pesadas con la balanza analítica, una muestra de 10 plantas, las cuales se envolvieron en papel y colocaron en una estufa a 105°C durante 72 horas para su secado, y se pesaron cada 24 horas con la misma balanza analítica hasta obtener el peso constante.

- *Actividad fotosintética y la transpiración.*

Para la evaluación de la capacidad fotosintética máxima, se escogieron dentro de las plantas de más de 4 cm de altura, cinco plántulas más representativas, de las cuales se tomaron las hojas totalmente extendidas, evaluadas entre 10:00 y 11:00 am. La capacidad fotosintética y la transpiración estomática se midieron con el empleo del equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6). El área de la cubeta se cubrió totalmente con las hojas jóvenes completamente expandidas (2.5 cm²). La concentración de dióxido de carbono, la humedad relativa y la luz fueron valores ambientales. Las variables determinadas fueron la fotosíntesis neta (FN) (µmol CO₂ m⁻².s⁻¹), la evapotranspiración (EVAP) (µmol H₂O m⁻².s⁻¹) y la conductancia estomática (CE) (µmol H₂O m⁻².s⁻¹).

- *Evaluación de la concentración de las clorofilas.*

Para esta evaluación se tomaron hojas (con características similares a las utilizadas para la determinación de la fotosíntesis) de 15 plantas (tres repeticiones de cinco plantas cada una) por tratamiento, para la extracción de las clorofilas a, b y totales. De ellas se tomó 1,0 g de hojas frescas, previamente maceradas en nitrógeno líquido, se utilizó como solvente extractivo acetona al 80%. La absorbancia de la solución extraída fue medida a longitudes de ondas de 663,2 y 646,8 nm según protocolo descrito por Porras (1991). El contenido de las clorofilas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) se calculó de la forma siguiente:

Clorofila a = $13,19 \times \text{Absorbancia a } 663,2 \text{ nm} - 2,57 \times \text{Absorbancia } 646,8 \text{ nm}$.

Clorofila b = $22,10 \times \text{Absorbancia a } 646,8 \text{ nm} - 5,26 \times \text{Absorbancia a } 663,2 \text{ nm}$.

Clorofilas totales = $7,93 \times \text{Absorbancia a } 663,2 \text{ nm} + 19,53 \times \text{Absorbancia a } 646,8$.

Supervivencia de las plántulas en condiciones de aclimatización.

Las plántulas provenientes del enraizamiento *in vitro* se plantaron en tres bandejas plásticas de 60 orificios ($V \cong 160 \text{ cm}^3$) en un sustrato compuesto por una mezcla de zeolita + cachaza 1: 1 (v: v). En la primera bandeja (Testigo) se colocaron plantas que venían del medio sin ácido jasmónico, en la segunda las que tenían el ácido jasmónico sin filtrar y la tercera la que tenían el ácido jasmónico filtrado.

Se plantaron sesenta plantas por tratamiento (tres repeticiones de veinte plantas cada una). Se evaluó el número de plantas muertas por tratamiento cada siete días durante 28 días.

Efectos del ácido jasmónico en la interacción de plantas de piña Ananas comosus (L.) Merr.) variedad MD2 con Phytophthora nicotianae var. parasitica en la fase de aclimatización.

Para evaluar la interacción con la *Phytophthora*, se consideraron dos casos: uno con las plantas provenientes del experimento anterior, es decir que habían recibido el AJ *in vitro*, y el otro con plantas que se propagaron sin JA.

El ácido jasmónico en la interacción piña- Phytophthora nicotianae var. parasitica en plántulas previamente cultivadas con él in vitro, a los dos meses en aclimatización.

Las plantas procedentes del primer experimento, después de haber cumplido dos meses en adaptación, se dividieron en seis grupos. Tres de ellos se asperjaron con el ácido jasmónico ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y a otros con agua potable sin AJ, 24 horas antes de inocularlas con *Phytophthora nicotianae var. parasitica*.

Los tratamientos fueron:

- Sin ácido jasmónico *in vitro* sin AJ en aclimatización + *Phytophthora*
- Sin ácido jasmónico *in vitro* + AJ en aclimatización + *Phytophthora*
- Con ácido jasmónico sin filtrar sin AJ en aclimatización + *Phytophthora*
- Con ácido jasmónico sin filtrar + AJ en aclimatización + *Phytophthora*
- Con ácido jasmónico filtrado sin AJ en aclimatización + *Phytophthora*
- Con ácido jasmónico filtrado + AJ en aclimatización + *Phytophthora*

El hongo se aisló de la misma forma antes descrita y fue multiplicado en placas de Petri con agar jugo de tomate picante. En ellas se sembraron discos de 10 mm de diámetro, colocando éstos en el centro de cada placa hasta 72 horas.

Para la inoculación, se utilizó la técnica de punción en la base de las hojas bajo condiciones estériles, y sumersión de las vitroplantas en una solución con una

concentración de 10^8 zoosporas. mL^{-1} , elementos de la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2002).

Se evaluaron y se determinó el porcentaje de las plantas muertas cada 24 horas hasta las 144 horas. Se utilizaron 18 vitroplantas por cada tratamiento (tres repeticiones de seis plantas cada una).

El ácido jasmónico en la interacción piña - Phytophthora nicotianae var. parasitica en plántulas de dos edades diferentes en aclimatización, con el empleo de diferentes dosis.

Se utilizaron dos grupos de vitroplantas de piña de diferentes edades que no habían recibido el ácido jasmónico *in vitro*: las primeras con tres semanas y las segundas con dos meses en aclimatización, según las metodologías previamente descritas en micropropagación y en aclimatización, respectivamente. Ambos grupos fueron asperjados con diferentes dosis del ácido jasmónico 24 horas antes de inocularlas con *Phytophthora nicotianae var. parasitica* según los siguientes tratamientos:

- Sin ácido jasmónico + *Phytophthora*: Tratamiento 0
- Con ácido jasmónico (1mg. L^{-1}) + *Phytophthora*: Tratamiento 1
- Con ácido jasmónico (2mg. L^{-1}) + *Phytophthora*: Tratamiento 2
- Con ácido jasmónico (3mg. L^{-1}) + *Phytophthora*: Tratamiento 3

Se utilizaron 15 vitroplantas por cada tratamiento (tres repeticiones de cinco plantas cada una).

El aislamiento, la siembra y la técnica de inoculación del hongo fueron realizados según el protocolo anteriormente descrito. Se evaluaron y se determinó el porcentaje de las plantas muertas cada 24 horas hasta las 144 horas.

- *Procedimiento estadístico*

El análisis estadístico de los resultados se desarrolló con el empleo del utilitario “*Statistical Package for Social Science*” (SPSS). Se realizaron análisis no paramétricos (ANOVA de clasificación simple, prueba C Dunnett $P < 0,05$) después de chequeada la distribución normal y la homogeneidad de las varianzas (Kruskall-Wallis, $P < 0,05$) para las variables anatomo-morfológicas, la competencia *in vitro*, y la supervivencia en aclimatización, luego de transformados los datos de estas dos últimas variables. Para el segundo experimento, se aplicó el ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey $P < 0,05$) después de transformados los datos. El tipo de procesamiento y transformaciones realizados en cada caso aparecen reflejados en las tablas y figuras de Resultados y Discusión. Las variables se transformaron sólo para el análisis estadístico, no para la presentación de los datos.

II. SPATHYPHILLUM

Los experimentos se desarrollaron en el Área de Adaptación del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Como material vegetal se emplearon plántulas de *Spathyphillum* ‘Sensation’.

Durante la fase de aclimatización se siguieron las labores que forman parte de los componentes de las Tecnologías de Aclimatización para las especies objeto de estudio, acorde a lo establecido en los Procedimientos Normalizativos de Operaciones (PNO) recogidos en el Manual de Aseguramiento de la Calidad (2002). Las generalidades de estos PNO son:

- Colocar las plantas en bandejas de 144 pocillos, los cuales contenía como sustrato la mezcla arena más cachaza, en la relación 1:1 (v:v).
- Colocar estas bandejas en las casas de aclimatización bajo túneles con $85\pm 5\%$ de humedad relativa y $\text{FFF} = 400\ \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por espacio de siete días. El

riego empleado en esta fase lo garantiza un sistema de microaspersores programado para regar cada 30 minutos por espacio de cinco minutos.

- Trasladar las bandejas a los siete días a espacios abiertos en estantes dentro de la casa de aclimatización que posee un FFF= $600 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y $70\pm 5\%$ de HR promedio, ambos medidos a las 12m. Bajo estas condiciones de cultivo se aplican dos riegos manuales en el día, que garantizan que el sustrato permanezca siempre húmedo.
- En los ambientes arriba descritos permanecen hasta alcanzar los indicadores de calidad exigidos para la comercialización según el Manual de Aseguramiento de la Calidad (2002) y que particulariza para la especie lo que a continuación se muestra:

Espece	Altura de la planta (cm)	Número de hojas
<i>Spathyphillum</i>	> 4.0	> 5,0

Los experimentos se diseñaron para evaluar los efectos del ácido jasmónico (JA) sobre variables de crecimiento y desarrollo de las plantas durante el tránsito por la fase de aclimatización. Se evaluaron tres tratamientos:

- Control (sin la aplicación del AJ).
- AJ a la concentración de 1.0 mg.L^{-1} .
- AJ a la concentración de 2.0 mg.L^{-1} .

Las aspersiones se realizaron en el momento de entrada a esta fase. Se aplicó por aspersión foliar, a razón de 200 mL cada 120 plántulas en horas tempranas de la mañana y posterior a que la superficie de las hojas se secase del agua del riego matutino. Las plántulas del grupo control se asperjaron sólo con agua.

Durante el desarrollo de los experimentos se realizaron las siguientes evaluaciones:

- a) Supervivencia, porcentaje, a 120 plántulas.
- b) Número de hojas.
- c) Área foliar de la planta.
- d) Área foliar de la hoja mayor.
- e) Área foliar de la hoja menor.
- f) Número de raíces.
- g) Longitud de la mayor raíz.
- h) Masa fresca.
- i) Fotosíntesis.
- j) Conductancia estomática.
- k) Evapotranspiración.

Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre la supervivencia de las plántulas de Spathyphillum ‘Sensation’ durante la aclimatización.

La variedad empleada fue ‘Sensation’ con un procedimiento sin modificaciones a lo establecido en el Instructivo Técnico antes mencionado. La calidad del material vegetal utilizado se correspondió con las exigencias del Manual de Aseguramiento de la Calidad (2002), o sea las plántulas alcanzaban una altura promedio de 1,5 cm en el momento de ser transferidas a la fase de aclimatización.

Las evaluaciones se realizaron durante un período de 28 días. El porcentaje de supervivencia (%) fue determinado en los primeros 7, 14, 21 y 28 días, incluidas las primeras 24, 48 y 72 horas.

Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre las variables anatomorfológicas de las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante la aclimatización.

En las mismas plantas se realizaron las siguientes evaluaciones de conteo del número de hojas. Esta variable se midió a 120 plántulas de cada uno de los tres momentos: 7, 14 y 28 días.

En el experimento, también se evaluó el área foliar de la planta, área foliar de la hoja mayor, área foliar de la hoja menor, número de raíces, longitud de la mayor raíz (cm) y masa fresca (g). El área foliar se determinó utilizando la fórmula $A = \frac{a+b}{2} \times h$. Estas se realizaron al final del experimento, a los 28 días. Se utilizaron veinte plantas representativas de cada tratamiento.

Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre las variables de intercambio gaseoso en las hojas de las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante la aclimatización.

Los indicadores que se midieron para conocer los efectos del ácido jasmónico fueron actividad fotosintética ($\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductancia estomática ($\mu\text{mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y transpiración ($\mu\text{mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14 y 28 días.

Para la evaluación de la actividad fotosintética y la transpiración se emplearon siempre hojas completamente expandidas y fotosintéticamente activas (completamente verdes). Las mismas se tomaron entre las 9:00 am y 10:00 am. Estas variables se midieron con el empleo de un Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europe, PP Systems, UK (CIRAS-2) acoplado a una cubeta universal (PLC6).

El área de la cubeta (PLC6) se cubrió totalmente (2.5 cm^2) con las hojas jóvenes completamente expandidas.

- Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el uso del utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versión 11.5 para Windows Copyright© SPSS, INC, 1998). Se comprobó la distribución normal y la homogeneidad de varianzas mediante las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA, Tukey, $p \leq 0,05$) y no paramétricas (Kruskall-Wallis y Dunnett's C, $p \leq 0,05$). El tipo de procesamiento realizado en cada caso aparece reflejado en las figuras y tablas del capítulo de Resultados y Discusión.

III PLÁTANO

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Se emplearon plantas de plátanos var. CEMSA $\frac{3}{4}$ procedentes de la fase de crecimiento *in vitro* en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) previamente seleccionadas como competentes para pasar a la fase de aclimatización como lo informó Aragón *et al.* (2005). Las mismas superaron los 0.3 cm del grosor del seudotallo y presentaron al menos dos hojas completamente expandidas y una altura mayor a los 2.5cm.

Se plantaron en sustrato compuesto por cachaza y suelo rojo (1:1 v:v) en bandejas de 40 pocillos con una capacidad de 95 cm^3 cada uno. Los ambientes de las casas de aclimatización se caracterizaron por temperaturas máximas promedio de 28-30°C, una humedad relativa de 80-90%, concentración de CO_2 de 375-400 $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ y fotoperíodo correspondiente a los ciclos naturales, con 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de

intensidad lumínica, donde permanecieron por 42 días. Luego se transplantaron a bolsas con 1.6 kg del sustrato antes citado y continuaron bajo las mismas condiciones ambientales.

Las plantas se asperjaron con ácido jasmónico a concentración de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ según González-Olmedo *et al.* (2002). A las 24 horas de asperjadas con ácido jasmónico o agua (en el testigo) se inocularon con solución de esporas del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 según la metodología establecida por Bermúdez *et al.* (2002), como sistema de selección. Los elementos básicos de estas son: solución de 3×10^5 esporas /mL del hongo, sumergir las raíces por 30 minutos, inoculación del sustrato con la solución y con restos de las plantas. Se evaluaron cada 7 días hasta los 28 días las siguientes variables morfológicas: número de hojas/planta, longitud de la hoja mayor, ancho de la hoja mayor, diámetro del tallo, y los indicadores fisiológicos: fotosíntesis neta expresada en μmol de $\text{CO}_2 \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la transpiración expresada en mmol de $\text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y conductancia estomática en mmol de $\text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Las mediciones de las variables fisiológicas se realizaron con el equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6 de 2.5cm^2), siempre entre 09:00 y 10:00 horas. Estas se hicieron a cuatro plantas por tratamiento con treinta repeticiones para un total de 120 valores, mientras que para variables morfológicas se utilizaron 11 plantas. Además se evaluaron el número de hojas enfermas por plantas y número de plantas enfermas.

El análisis estadístico de los resultados se desarrolló con el empleo del utilitario "Statistical Package for Social Science" (SPSS) versión 11.5. En el experimento las variables fueron evaluadas mediante análisis paramétricos (ANOVA, prueba Tukey, $P \leq 0,05$) después de chequeada la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $P \leq 0,05$) y la homogeneidad de las varianzas (Levene, $P \leq 0,05$).

En el experimento se le realizaron análisis bifactoriales que tuvo presente el factor ácido jasmónico con dos niveles (0.0 y $1:00 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y el factor *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 con los niveles plantas sin inocular y plantas inoculadas. En cuanto al número de hojas/planta, número de hojas enfermas por planta y número de plantas enfermas se consideró factor los tiempos ($0;7;14;21;28$ días) y el factor *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2. con y sin ácido jasmónico asperjado. Para estas últimas variables el tipo de transformación de datos aparece en el pie de la figura correspondiente, las variables se transforman solo para el análisis estadístico, no para la presentación de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

I. PIÑA

Efectos del ácido jasmónico sobre la calidad de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 cultivadas in vitro en la fase de elongación y enraizamiento.

- Contaminación y supervivencia *in vitro*.

Las plántulas cultivadas *in vitro* se evaluaron cada 24 horas durante los tres primeros días y luego semanalmente hasta 45 días para valorar su posible contaminación *in vitro*, es decir la aparición de cualquier colonia de bacteria o de hongos en el cultivo. Durante este periodo, no hubo ninguna contaminación. También se evaluó la supervivencia con la misma frecuencia, y durante los 45 días no hubo ninguna planta muerta por lo que la supervivencia fue de 100% en todos los tratamientos. Estos resultados confirman que la aplicación del ácido jasmónico ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en la fase de enraizamiento *in vitro* de las plantas de piña (*Ananas comosus* (L.)

Merr.) variedad MD2 no causa ni contaminación ni muerte de las plántulas cultivadas en los medios enriquecidos con él.

- Indicadores anatomo-morfológicos de la calidad de vitroplantas.

Cumplidos 45 días, las plántulas se clasificaron para establecer su competencia cuyos resultados se reflejan en la tabla 1: en los tratamientos con el ácido jasmónico, los porcentajes de plantas competentes, es decir aptas para adaptarse en condiciones *ex vitro* de aclimatización, fueron inferiores (82 y 87%) comparados con el tratamiento testigo donde todas las plantas fueron competentes.

En la tecnología de micropropagación de la piña, el tamaño mínimo de brotes potencialmente aptos para la aclimatización *ex vitro* está establecido a 4 cm y a 0,2 g de masa fresca (Daquinta y Benega, 1997; Escalona *et al.*, 1999), aunque los de cuatro a seis centímetros (4-6 cm) parecen requerir tratamiento adicional antes de entrar en aclimatización (Escalona *et al.*, 1999; Yanes *et al.*, 2000).

El menor grado de competencia registrado en las plántulas cultivadas con el ácido jasmónico demuestra el efecto inhibitor de la aplicación de este en el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

Tabla 1. Efectos del ácido jasmónico sobre la competencia de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 a los 45 días de cultivo *in vitro* en la fase de elongación y enraizamiento para el tránsito a la aclimatización.

TRATAMIENTOS	% Plantas competentes (Mas de 4 cm.)
TESTIGO	100 a
AJ NO FILTRADO (1mg. L ⁻¹)	87 b
AJ FILTRADO (1mg. L ⁻¹)	82 c
SIGNIFICACIÓN.	*
ET	0,98

Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(x/100)^{0,5}]$. Los datos representan las medias para N= 100. Las medias con letras diferentes indican la significación según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett, para valores de p< 0.05. * Significación. ET: error típico

La diferencia observada entre las plantas cultivadas con el ácido jasmónico filtrado y el ácido jasmónico no filtrado se puede deber a dos razones: a) que el ácido jasmónico sea termolábil, lo que hizo que el ácido jasmónico no filtrado tenga menor eficiencia porque se cocinó con el medio, mientras el ácido jasmónico filtrado fue añadido en el flujo laminar, después de la cocción; b) que el ácido jasmónico tenga un cierto grado de impureza, lo que influiría sobre la concentración de la solución en el medio suplementado por el ácido jasmónico no filtrado. El AJ filtrado tendría mayor grado de pureza, y por ende, mayor eficiencia.

La aplicación del ácido jasmónico influyó significativamente sobre las variables anatomo-morfológicas de las plántulas de piña cultivadas *in vitro* como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Efectos del ácido jasmónico sobre las variables anatómo-morfológicas de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 a los 45 días de cultivo *in vitro* en la fase de elongación- enraizamiento.

TRATAMIENTOS	VARIABLES				
	Número de hojas	Longitud de la hoja mayor (cm)	Número de raíces	Longitud de la raíz mayor (cm)	Altura de la plántula (cm)
TESTIGO	11,9	4,55 a	6,8 a	2,97 a	5,955 a
AJ NO FILTRADO (1mg. L ⁻¹)	11,5	3,45 b	2,45 b	0,9 b	4,69 b
AJ FILTRADO (1mg. L ⁻¹)	10,7	3,16 b	2,05 b	0,625 b	4,435 b
SIGNIFICACIÓN.	N/S	*	*	*	*
ET	0,20	0,13	0,36	0,17	0,15

Los datos representan las medias para N= 20. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett , para valores de $p < 0.05$, * significación, N/S no significativa, ET: error típico. En las plántulas cultivadas con el ácido jasmónico, la elongación tanto de las hojas, raíces o de la planta en general se redujo. Además, la emisión de raíces disminuyó 2,7 veces en el tratamiento con el ácido jasmónico no filtrado y 3,3 veces en el tratamiento con el ácido jasmónico filtrado, comparados con el tratamiento testigo.

En el estudio realizado con raíces aisladas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Bush Beefsteak) cultivadas *in vitro*, Tung *et al.*, (1996) demostraron que el AJ tiene un efecto inhibitorio de la elongación de las raíces. También, el metil jasmonato redujo el crecimiento del sistema radical en *Catharanthus roseus* (El-Sayed y Verpoorte, 2004). En un semillero de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), el crecimiento de las raíces primarias disminuyó en un 50% cuando se establecieron en un medio con 0,1 μ M MeJA. (Staswick *et al.*, 1992). Maksymiec y Krupa (2007) concluyeron que los jasmonatos, el etileno y la actividad del NADPH oxidasa pueden estar involucrados en la inhibición de raíces y hojas en *Phaseolus coccineus*, *Allium cepa* y *Zea mays*.

En esta función inhibitoria de la elongación de los brotes y la emisión de raíces, el ácido jasmónico pudo influir directamente sobre los patrones fisiológicos de las plántulas tales como la división celular, la fotosíntesis, las síntesis de proteínas, etc., o interactuar negativamente con el ambiente químico (las hormonas) del cultivo. En su estudio de los efectos *in vitro* del ácido jasmónico y la kinetina sobre la tuberización, Pelacho y Mingo-Castel (1991) informaron que el alto grado de tuberización inducido por el ácido jasmónico fue acompañado por la disminución de la habilidad radical.

Otros autores evocan una compleja interacción entre los efectos del ácido jasmónico con otros reguladores del crecimiento tales como el ácido abscísico, el ácido salicílico y el etileno (Genoud y Métraux, 1999; Anderson *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004) en la señalización de varias funciones metabólicas donde puede cooperar (Suhita *et al.*, 2004; Lorenzo y Solano, 2005) o antagonizar (Harms *et al.*, 1998). Por

otro lado, se ha comprobado que el ácido jasmónico puede bloquear el ciclo celular en ambas fases G1 y G2 (Swiatek *et al.*, 2002; Swiatek *et al.*, 2003; Swiatek *et al.*, 2004) y su aplicación exógena disminuye la biosíntesis de proteínas (Ananieva y Ananiev, 2000). Por su rol como promotor de la senescencia, el ácido jasmónico también pudo activar la acción de enzimas inhibitoras de la síntesis de proteínas, el desarrollo y elongación de las células y la división celular, reduciendo así la posibilidad de los órganos de expandirse.

El ácido jasmónico no tuvo efecto significativo ni en el número de hojas ni en el diámetro del tallo de las vitroplantas: las medias de diámetro del tallo obtenidas fueron de 0,475; 0,44 y 0,435 cm para los tratamientos testigo, con el ácido jasmónico no filtrado y filtrado respectivamente. Durante el crecimiento *in vitro* (en la fase de enraizamiento) no hay mucha expansión en diámetro y el grado de emisión de nuevas hojas es menor.

En cuanto a las masas fresca y seca (figura 2), la aplicación del ácido jasmónico redujo la primera, mientras los resultados de la masa seca no manifiestan diferencia significativa.

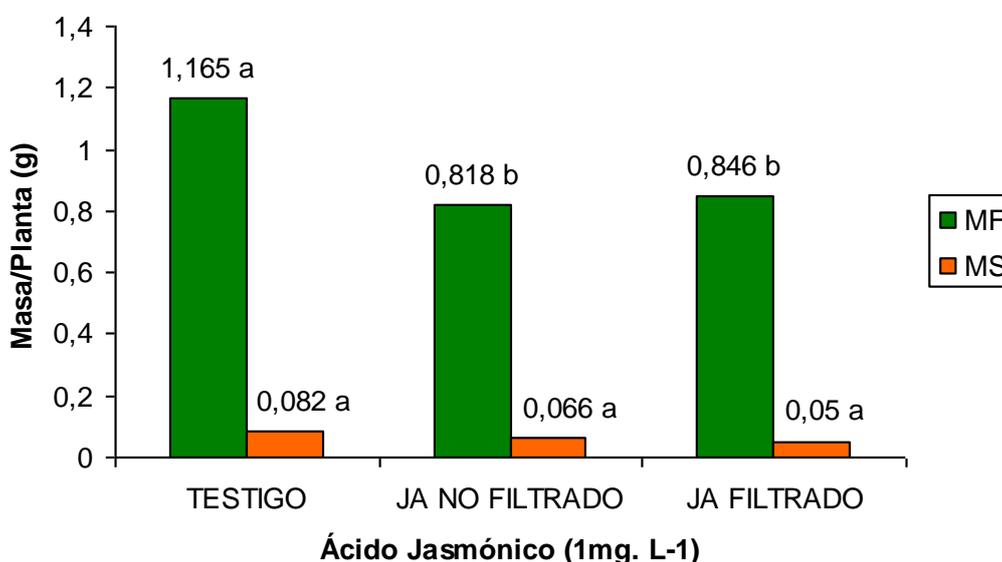


Figura 2. Comportamiento de la masa fresca (MF) y la masa seca (MS) de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 a los 45 días de cultivo *in vitro* en la fase de elongación- enraizamiento bajo efectos del ácido jasmónico.

Los números representan las medias de 20 plantas por tratamiento para la masa fresca, y 10 para la masa seca. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett, para valores de $p < 0.05$.

Se observa que en los tratamientos con el ácido jasmónico, la masa fresca disminuyó considerablemente, lo que corrobora los resultados con efectos similares obtenidos en otras especies. El tratamiento de cotiledones de calabacín (*Cucurbita pepo* L.(zucchini) con el ácido jasmónico disminuyó la masa fresca y la síntesis de proteínas *in vitro* mientras favoreció la síntesis de las proteínas inducidas por él. O sea las JIPs (Ananieva y Ananiev, 2000).

- *Actividad fotosintética y la transpiración.*

El ácido jasmónico ejerce una gran influencia en la actividad fotosintética de las plantas como se aprecia en la tabla 3.

Tabla 3. Efectos del AJ sobre las variables fisiológicas de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 a los 45 días de cultivo *in Vitro* en la fase de elongación- enraizamiento con el ácido jasmónico (AJ).

TRATAMIENTOS	EVP ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	CE ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	FN ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
TESTIGO	2,19 a	72,13 a	5,40 a
AJ NO FILTRADO (1mg. L ⁻¹)	2,17a	64,79a	2,93 b
AJ FILTRADO (1mg. L ⁻¹)	1,94b	57,18b	2,76 b
SIGNIFICACIÓN.	*	*	*
ET	0,04	1,44	0,17

EVP: evapotranspiración; CE: conductancia estomática; FN: fotosíntesis neta.

Los datos representan las medias para para N= 100. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett , para valores de $p < 0.05$, * significación, N/S no significativa, ET: error típico En los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo observar que los niveles de evapotranspiración (EVP) fueron menores en el tratamiento con el ácido jasmónico filtrado, lo que se explica por el cierre de estomas que debió ocurrir en las hojas de las plántulas que crecieron bajo estos efectos. El mismo comportamiento se manifestó en la conductancia estomática (CE). Cabe recordar que también en este tratamiento se registró el menor porcentaje de plantas competentes.

Se considera el ácido jasmónico como hormona del estrés por lo que sus efectos son muy similares a los de las otras condiciones estresantes como la temperatura, alta luz, ondas UV, estrés oxidativo, la herida, los vientos, el estrés hídrico o salino, ataque del patógeno o deficiencia de nutrientes (Ellis *et al.*, 2002, Schillmiller y Howe, 2005). Además se plantea que el ácido jasmónico tiene acción similar a la del ABA (Maslenkova *et al.*, 1995) en varias funciones, mientras su aplicación aumenta la síntesis del etileno (Franceschi *et al.*, 2002).

El incremento del cierre parcial o total de las estomas en el tratamiento con el AJ filtrado es otra evidencia de la mayor eficiencia de esta forma. Suhita *et al.* (2004) concluyeron que el cierre de estomas, en respuesta de la aplicación del ácido jasmónico y del ABA está acompañado por la alcalinización del citoplasma, la producción de las sustancias reactivas del oxígeno y los mecanismos de transporte. La acumulación de especies reactivas de oxígeno es una respuesta de las plantas a varios patógenos, y su principal fuente está en los cloroplastos dada la naturaleza fotoactiva de las clorofilas (Kariola *et al.*, 2005).

La fijación del CO₂ en los tratamientos con el ácido jasmónico fue menor que la del tratamiento testigo, lo que confirma que el ácido jasmónico inhibe la fotosíntesis neta en las plántulas de piña cultivadas *in vitro*.

La piña pertenece al grupo de plantas con actividad fotosintética de tipo CAM, es decir que puede fijar el CO₂ vía catálisis de la fosfoenolpiruvato carboxilasa durante la noche formando el ácido málico, que se descarboxila durante el día liberando el

CO₂ que se fija por la RUBISCO. Esta alternativa le confiere una adaptabilidad a condiciones estresantes y una alta eficiencia de uso hídrico.

Sin embargo, en condiciones *in vitro*, las vitroplantas de piña adopta el comportamiento de la planta C3 (Escalona *et al.*, 1999; González-Olmedo *et al.*, 2005 b); sus estomas son circulares en el lugar de elípticos y su actividad es muy baja, lo que disminuye su respuesta a los factores del estrés *in vitro* (Desjardins, 1995). Sin embargo los resultados de este trabajo, demuestra que el ácido jasmónico indujo respuestas al estrés, presumiblemente con mayor eficiencia como elicitador.

En hojas de cebada y tabaco tratadas con AJ, se observó una reducción en la síntesis de las subunidades de RUBISCO así como de otras proteínas (Weidhase *et al.*, 1987)

El ácido jasmónico disminuyó la pérdida del agua en general, sin embargo no favoreció el mejor uso de la misma por las células parenquimáticas. Se puede apreciar en la tabla 3 que las plantas cultivadas sin el ácido jasmónico tuvieron la mejor eficiencia de las relaciones hídricas en la asimilación del CO₂, casi el doble de las que tenían las plántulas tratadas con el ácido jasmónico.

Este comportamiento puede estar relacionado con la baja actividad del Rubisco y el bajo intercambio gaseoso por el cierre de las estomas. Los efectos de la aplicación prolongada de 10 µM de ABA y 50 µM JA-Me en el medio de crecimiento de los semilleros de chícharo (*Pisum sativum* L. cv. Ran) tuvo un efecto inhibitor sobre las reacciones fotosintéticas del fotosistema II y algunas alteraciones en la organización estructural de las membranas del cloroplasto, demostración de que los ambos reguladores del crecimiento inhiben el ciclo de Calvin, y ejercen un efecto directo sobre el complejo enzimático de la evolución del oxígeno (Maslenkova *et al.*, 1995). En este caso, la relación de gases intercambiados: CO₂ asimilado por H₂O evaporada, también manifestó inhibición en las plantas tratadas con AJ en especial cuando se agregó al medio de cultivo sin previa filtración.

La concentración de pigmentos clorofílicos también influye en la capacidad fotosintética de estas plantas.

- *Evaluación de la concentración de las clorofilas.*

Los contenidos de la clorofila a en las que crecieron en medios de cultivo enriquecidos con el AJ se muestran en la figura 3.

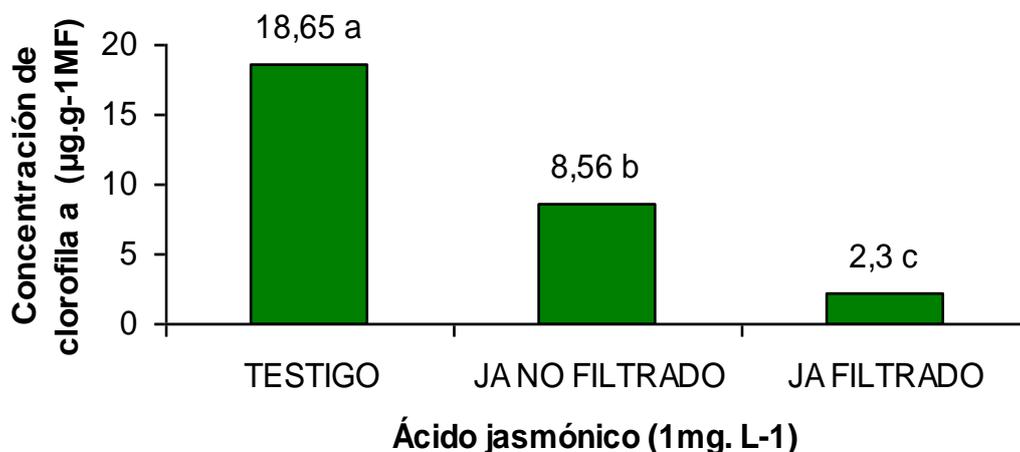


Figura 3. Contenidos de la clorofila a de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 para los diferentes tratamientos al final de la fase de elongación-enraizamiento *in vitro*.

Los datos representan las medias para para N= 30. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett , para valores de $p < 0.05$

La aplicación del ácido jasmónico inhibió la acumulación tanto de la clorofila a. La cantidad de este pigmento en el tratamiento testigo alcanzó más del doble de la del tratamiento con el ácido jasmónico no filtrado, mientras esta última superó 3,7 veces la del tratamiento con el ácido jasmónico filtrado.

Resultados similares se observan en el caso de la clorofila b y de las clorofilas totales como se muestra en las figuras 4 y 5.

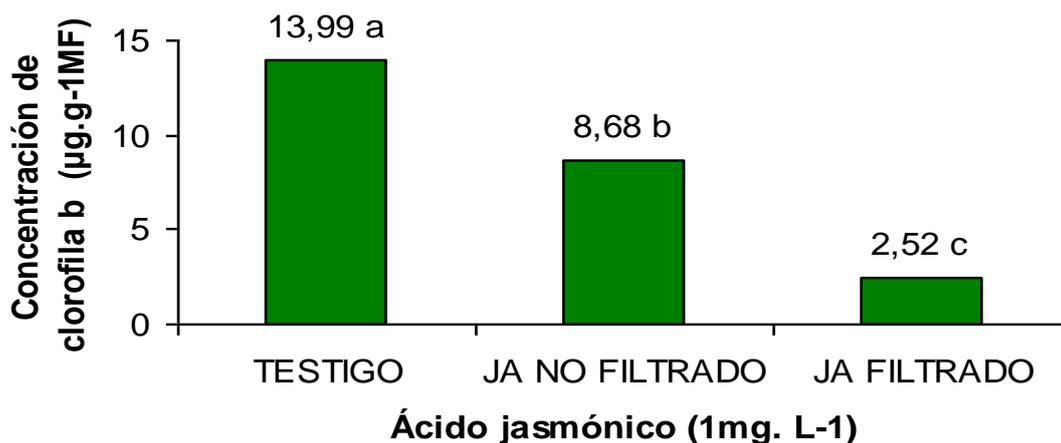


Figura 4. Contenidos de la clorofila b a de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 para los diferentes tratamientos al final de la fase de elongación- enraizamiento *in vitro*.

Los datos representan las medias para para N= 30. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett , para valores de $p < 0.05$.

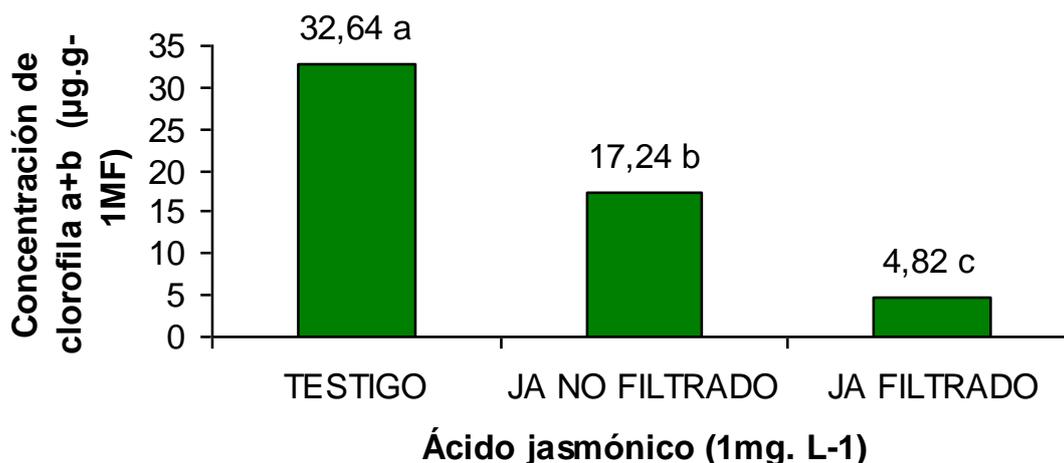


Figura 5. Contenidos de las clorofilas totales de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 para los diferentes tratamientos al final de la fase de elongación- enraizamiento *in vitro*.

Los datos representan las medias para para N= 30. Las letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis y C Dunnett , para valores de $p < 0.05$.

Un análisis integral de las tres figuras demuestra como en las plántulas del testigo predominan los contenidos de clorofila, ya que representan el 57,13% en las clorofilas totales. Sin embargo, en las plántulas tratadas con AJ la clorofila b representa 50,3% y 52,3% para los casos no filtrado y filtrado respectivamente.

Aunque ambos pigmentos se degradan como consecuencia de la asimilación del AJ, la clorofila a resultó proporcionalmente más afectada que la b. En las plantas con AJ no filtrado la clorofila a se redujo 2,18 veces, mientras que la b disminuyó 1,6 veces. Cuando el AJ se filtró previamente, la reducción de la clorofila a fue de 8,1 veces con respecto al control, mientras la de la clorofila b fue de 5,5 veces.

Se reconoce que los pigmentos considerados clorofilas a como el P680 y el P700 juegan importantes papeles en la fase luminosa de la fotosíntesis. La degradación de los mismos repercute negativamente en la fotoquímica de los fotosistemas en que participan y finalmente en la capacidad fotosintética, inferencia antes analizada según los datos expuestos en la tabla 3.

En otras especies, el ácido jasmónico disminuyó el contenido de la clorofila y la actividad fotosintética (Maslenkova *et al.*, 1995; Ananiev *et al.*, 2004; Lou *et al.*, 2005). Además de algunos cambios en la organización estructural de las membranas del cloroplasto: el incremento del número de los sitios PSII β en la regiones de lamelas estromáticas, la composición polipeptídica de las vesículas de las lamelas de estromas y granas (Maslenkova *et al.*, 1995). También ocurrió un aumento de la cantidad de amino-ácidos libres, la sacarosa y el contenido del hierro en las hojas (Lou *et al.*, 2005).

Ananiev *et al.* (2004) plantearon que aunque AJ y ABA inhibieron la acumulación de la clorofila y del ácido α -aminolevulinico (α -ALA), un compuesto relacionado con el contenido de la clorofila, el AJ tuvo más efectos sobre ésta que el ABA. Sin embargo, este no fue así en la primera fase de iluminación, sugiriendo que el MeJA ejerce su actividad inhibitoria a nivel de los precursores de la clorofila en la oscuridad mientras el ABA actúa sobre las reacciones de síntesis de la clorofila dependientes de la luz.

La mayoría de factores estresantes pueden provocar la liberación de la clorofila de las membranas de tilacoides y su degradación, y esto para evitar el daño de las células por acción fotodinámica, en caso contrario pueden aumentar las especies activas del oxígeno o la muerte de las células por intoxicación (Kariola *et al.*, 2005). En este experimento, AJ favoreció la movilización de clorofilas y su degradación, así pudo evitar los daños celulares provocados por la luz y a la vez inducir sistemas antioxidantes (Comparot *et al.*, 2002) que atenuaron los efectos negativos del cultivos *in vitro*. Esta capacidad puede favorecer el tránsito a exteriores.

- *Supervivencia de las plántulas en condiciones de aclimatización.*

Una de las metas seguidas por los propagadores, es lograr la mayor supervivencia posible del material vegetal propagado. No obstante, el transito de condiciones *in vitro* a condiciones de aclimatización causa generalmente el estrés a las plántulas, y por consiguiente muchas pérdidas por muerte de las mismas (González-Olmedo *et al.*, 2005 a, Aragón *et al.*, 2005).

En este trabajo, se alcanzaron los mejores niveles de supervivencia con el empleo del ácido jasmónico (tabla 4). En contraste a los resultados obtenidos en el crecimiento *in vitro*, el ácido jasmónico tuvo una influencia positiva en la protección

de las plántulas de piña contra el estrés, lo que confirma la hipótesis de que el ácido jasmónico aumenta la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización. Estos resultados puede estar relacionados con los cambios fisiológicos ocurridos en la fase anterior en cuanto al cierre de estomas y bajo nivel de gasto hídrico por transpiración, lo que permitió evitar las muertes por desecación. Es posible que el ácido jasmónico regula la turgencia y la manifestación de desordenes fisiológicos como hiperhidricidad y fotoxidación durante el tránsito del medio *in vitro* a los ambientes externos.

Tabla 4 . Comportamiento de la supervivencia de plántulas plántulas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 provenientes del cultivo *in vitro* con AJ durante los primeros 28 días de la aclimatización.

TRATAMIENTO	% DE SUPERVIVENCIA VS TIEMPO			
	7 días	14 días	21 días	28 días
TESTIGO	95 b	87 c	82 d	82 d
AJ NO FILTRADO	98 ab	97 ab	97 ab	97 ab
AJ FILTRADO	100 a	97 ab	93 b	93 b
SIGNIFICACIÓN.	*	*	*	*
ET	1,21	1,86	2,47	2,47

Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(x/100)^{0.5}]$. Los datos representan las medias para N= 60. Las medias con letras diferentes indican la significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$). * Significación. ET: error típico

Durante los primeros días de aclimatización de plántulas de plátano (*Musa AAB* cv. CEMSA 3/4) procedentes del cultivo *in vitro* en birreactores de inmersión temporal, se observó marcados cambios fisiológicos y bioquímicas tales como: el aumento la actividad fotosintética, de la fosfoenolpiruvato-carboxilasa y la disminución de la piruvato kinasa (Aragón *et al.*, 2005). Otros cambios bioquímicos relacionados con los descensos en los contenidos de clorofilas son los posibles sistemas antioxidantes presumiblemente inducidos por señales desencadenadas por el AJ.

El ácido jasmónico induce una respuesta bioquímica que regula la expresión de genes involucrados en los mecanismos de defensa. Dentro de los factores de estrés que pudieran haber ocurrido, están los agentes patógenos como la *Phytophthora* que es muy frecuente en las cámaras de aclimatización.

Se ha demostrado que el SA y el AJ pueden ser inducidos por el elicitador lectina enlazada a la celulosa, una glicoproteína de la pared celular producida por la *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* que induce la necrosis y las respuestas de defensa en el tabaco (Khatib *et al.*, 2004)

Hubo diferencia significativa entre los tratamientos con el ácido jasmónico y el tratamiento testigo durante las cuatro semanas, sin embargo no se observa diferencia significativa en relación con el tiempo ni entre los dos tratamientos con el ácido jasmónico filtrado y el no filtrado. A partir de los 21 días, la supervivencia se mantuvo constante.

Sin duda, el ácido jasmónico favoreció la eficiencia del protocolo de aclimatización empleado, ya que ambos tratamientos mantuvieron niveles de supervivencia

superiores a 90% al compensar influencias negativas que pudieron provocar las modificaciones al propuesto por Yanes *et al.* (2000) que siempre superó este porcentaje de supervivencia.

Efectos del ácido jasmónico en la interacción de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2 con *Phytophthora nicotianae* var. parasitica en la fase de aclimatización.

En este experimento, se evaluó la influencia del ácido jasmónico en los mecanismos de defensa de las plantas contra la *Phytophthora nicotianae* var. parasitica.

El ácido jasmónico en la interacción piña- Phytophthora nicotianae var. parasitica en plántulas previamente cultivadas con el in vitro, a los dos meses en aclimatización.

Como parte de la definición de los efectos del ácido jasmónico en la interacción de plántulas de piña con *Phytophthora nicotianae* var. parasitica, se muestran en la tabla 5 los resultados de la combinación de momentos de aplicación.

El número de plantas muertas fue muy bajo, casi nulo en los primeros dos días, y fue creciendo para alcanzar su máximo el cuarto día. El estudio histológico de la infección por *Phytophthora* demostró que cuatro días después de la inoculación, los micelios están presentes en los tejidos y tallos (Boher, 1974).

En los primeros tres días, los tratamientos que tenían el ácido jasmónico *in vitro* manifestaron mejor protección. Sin embargo a los cuatro días, hubo muertes masivas en todos los tratamientos. Rodríguez *et al.* (2002) plantean que el desarrollo del hongo se completa a las 72 horas y el mayor número de muertos se observa a las 120 horas.

De forma general, no hubo diferencia en la interacción entre los factores: tiempo, AJ *in vitro* y AJ en aclimatización. Sin embargo, los tratamientos con el ácido jasmónico *in vitro* registraron mayor grado de supervivencia mientras el AJ aplicado en aclimatización no tuvo efecto.

Tabla 5. Efecto del ácido jasmónico en la interacción de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Variedad MD2 con *Phytophthora nicotianae* var. parasitica en la fase de aclimatización según momentos de aplicación.

TRATAMIENTOS	% DE SUPERVIVENCIA VS TIEMPO					
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
Control Sin AJ acl + <i>Phytophthora</i>	100 a	68,4 cd	52,6 d	5,3 h	5,3 h	0 i
Control + AJ acl + <i>Phytophthora</i>	100 a	86,6 bc	63,3 cd	26,6 ef	0 i	0 i
AJ Sin Filtrar Sin AJ acl + <i>Phytophthora</i>	100 a	100 a	100 a	31 def	13,8 g	6,9 gh
AJ Sin Filtrar + AJ acl + <i>Phytophthora</i>	100 a	100 a	96,5 a	48 de	20,7 efg	10,3 g
AJ filtrado Sin AJ acl + <i>Phytophthora</i>	100 a	100 a	92,8 ab	28,6 ef	7,1 gh	7,1 gh
AJ filtrado + AJ acl + <i>Phytophthora</i>	100 a	100 a	96,4 a	35,7 def	10,7g	10,7 g

Para el análisis los datos se transformaron según $X=2 \arcsen \left[\left(\frac{X}{100} \right)^{0,5} \right]$. Los datos representan las medias para N= 18. Las madias con letras diferentes indican la significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$).

Las plantas tratadas con elicitores adquieren una resistencia inducida. En picea de noruega (*Picea abies* L. (Karst)) el Me-JA incrementó el flujo de resina y aumentó la resistencia al hongo de mancha azul (*Ceratocystis polonica*), dando lugar a la elevación de las principales características celulares relacionadas a la resistencia adquirida, que en otra ocasión habían sido inducidos por heridas, infección de hongos y escarabajos (Franceschi *et al.*, 2002). Por otra parte, los mutantes *jin1*, *myc2* y *aba2* insensibles al JA mostraron un aumento de la resistencia a los hongos necrotróficos *Fusarium oxysporum* (Anderson *et al.*, 2004).

Las plantas de tomate tratadas con el ácido jasmónico (Thaler, 1999) se destacaron por tener una resistencia a varios insectos herbívoros, lo que confirma la importancia del ácido jasmónico en el manejo de herbívoros y patógenos.

La capacidad del ácido jasmónico de inducir la síntesis y emisión de fenoles, y la presencia de éstos en la pared celular pueden justificar esta función de defensa que puede ser química, inhibiendo las enzimas del agente patógeno, o física, constituyendo una barrera mecánica por lignificación de la pared celular.

En las raíces de banana *Musa acuminata* 'Goldfinger' expuestas a los elicitores de la pared celular derivados de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.* Cubense, se estima que la acumulación de los fenoles solubles y de la cubierta de la pared celular fue asociada a la acumulación a los polímeros fenólicos y la lignina (De Ascensao y Dubery, 2003).

El ácido jasmónico en la interacción piña- Phytophthora nicotianae var. parasitica en plántulas de dos edades diferentes en aclimatización, con el empleo de diferentes dosis.

La diferencia de edad entre las plántulas y la dosis del ácido jasmónico asperjado en aclimatización no mostraron diferencias significativas en este experimento, excepto que en el caso de las plantas de dos meses pudieron sobrevivir tres plantas: una en el tratamiento con AJ (2mg. L⁻¹) y dos en el tratamiento con AJ (1mg. L⁻¹) (tablas 6 y 7).

Tabla 6. Efectos del ácido jasmónico en la interacción de plantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Variedad MD2 de 21 días de edad con *Phytophthora nicotianae var. parasitica* en la fase de aclimatización.

TRATAMIENTOS	% DE SUPERVIVENCIA VS TIEMPO					
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
AJ (0mg. L ⁻¹)	100a	100a	93b	33f	0g	0g
AJ (1mg. L ⁻¹)	100a	100a	87c	33f	0g	0g
AJ (2mg. L ⁻¹)	100a	100a	93b	60d	0g	0g
AJ (3mg. L ⁻¹)	100a	100a	93b	53 e	0g	0g

Para el análisis los datos se transformaron según $X=2 \arcsen [(\frac{x}{100})^{0.5}]$. Los datos representan las medias para N= 15. Las medias con letras diferentes indican la significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, p< 0,05).

Tabla 7. Efectos del ácido jasmónico en la interacción de plantas de piña *Ananas comosus* (L.) Merr.) Variedad MD2 de 2 meses de edad con *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* en la fase de aclimatización.

TRATAMIENTOS	% DE SUPERVIVENCIA VS TIEMPO					
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas
AJ (0mg. L ⁻¹)	100a	100a	93b	33e	33e	0g
AJ (1mg. L ⁻¹)	100a	100a	93b	47d	47d	13f
AJ (2mg. L ⁻¹)	100a	100a	100a	60c	60c	7f
AJ (3mg. L ⁻¹)	100a	100a	100a	47d	47d	0g

Para el análisis los datos se transformaron según $X' = 2 \arcsen [(X/100)^{0.5}]$. Los datos representan las medias para N= 15. Las medias con letras diferentes indican la significación (ANOVA de clasificación simple, prueba Tukey, $p < 0,05$)

La dinámica de manifestación de la infección con *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* muestra que las interacciones de este hongo con las plantas de piña durante la aclimatización tiene algunas diferencias.

Cuando las plántulas poseen solo 21 días la supervivencia es ligeramente inferior a las 72 horas con respecto a la registrada por las de dos meses. A las 96 horas en ambos grupos de plántulas según las edades se mostró tendencias similares en cuanto a los mínimos y máximos valores de supervivencia. Sin embargo, a las 120 horas todas las plántulas más jóvenes murieron, mientras las más adultas mantenían los mismos porcentajes de supervivencia que 24 horas antes.

Investigaciones sobre la vía de penetración de *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* demostraron que este patógeno sólo puede penetrar en la roseta por una herida o de los tejidos en desarrollo, y que en las partes diferenciadas de las hojas (zonas clorofílicas), el desarrollo de micelio se ve muy lento y las infecciones ocurridas vía heridas alcanzan raramente la planta completa (Boher, 1974)

Se considera hoy que el ácido jasmónico es un potente elicitor, componente clave de la ruta del octadecanoide en plantas que permite la inducción de los procesos químicos de defensa en las mismas (Agrawal, 2000; Clarke, 2000). El AJ así como las otras condiciones estresantes pueden provocar la síntesis de genes JRG o genes de respuesta a los jasmonatos, que codifican para proteínas específicas o proteínas inducidas por el ácido jasmónico (JIPs), entre las que pueden citarse inhibidores de proteasas, enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides, osmotinas y lipoxigenasas, y diferentes proteínas relacionadas a patogénesis (Wasternack *et al.*; 1998).

Basados en este trabajo y las demás investigaciones que se han desarrollado en relación al rol de los elicitores en la resistencia de las plantas, se puede reafirmar que estos, incluyendo el ácido jasmónico, juegan un papel clave en la regulación de mecanismos de defensa y respuesta a agentes estresantes (Clarke, 2000; Khatib, 2004) y son capaces de provocar una respuesta inducida en las plantas Thaler (1999).

A pesar de la alta letalidad que provocaron las infecciones con *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* los resultados de las aplicaciones con el AJ, sobretudo los

del primer ensayo donde las plántulas crecieron *in vitro* en medio suplementado por él antes de salir para la aclimatización, demuestra que fue capaz de mejorar la eficiencia de la protección ante el hongo.

En este trabajo, se pudo confirmar que, a pesar que inhibe la elongación y el enraizamiento *in vitro*, así como los demás procesos fisiológicos de las vitroplantas, el ácido jasmónico genera presumiblemente cascadas de señales para reacciones metabólicas en las plántulas de piña, cuando se aplica durante la fase III de la micropropagación.

Queda demostrada la importancia del uso del ácido jasmónico en la micropropagación de la piña, ya que permite disminuir las numerosas pérdidas de material vegetal durante los primeros días de adaptación *ex vitro*, y por consiguiente, una disminución de los costos de producción. Además, puede sustituir la utilización de productos químicos o biopreparados como complementos para mejorar la supervivencia ya que se pudo lograr los mismos niveles de supervivencia sin aplicarlos.

II. SPHATHYPHILLUM

Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre la supervivencia de las plántulas de Spathyphillum 'Sensation' durante la aclimatización.

Las evaluaciones realizadas a las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante los 28 días de aclimatización demostraron que el JA no ejerció influencias sobre este importante indicador del proceso productivo de los laboratorios comerciales.

Los porcentajes de supervivencia en cada momento de evaluación, 7, 14, 21 y 28 días, incluidas las primeras 24, 48 y 72 horas, siempre fueron los máximos. El 100% de las plántulas que lograron sobrevivir al tránsito desde los frascos de cultivo *in vitro* a las casas de aclimatización en los tres grupos experimentales es una evidencia de la alta eficiencia del protocolo de micropropagación existente en el Laboratorio *Bioplant Export*. Las generalidades son las siguientes:

- Colocar las plantas en bandejas de 144 pocillos, los cuales contenía como sustrato la mezcla arena más cachaza, en la relación 1:1 (v:v).
- Colocar estas bandejas en las casas de aclimatización bajo túneles con $85\pm 5\%$ de humedad relativa y $FFF = 400 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por espacio de siete días. El riego empleado en esta fase lo garantiza un sistema de microaspersores programado para regar cada 30 minutos por espacio de 5 minutos.
- Trasladar las bandejas a los siete días a espacios abiertos en estantes dentro de la casa de aclimatización que posee un $FFF = 600 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $70\pm 5\%$ de HR promedio, ambos medidos a las 12m. Bajo estas condiciones de cultivo se aplican dos riegos manuales en el día, que garantizan que el sustrato permanezca siempre húmedo.
- En los ambientes arriba descritos permanecen hasta alcanzar los indicadores de calidad exigidos para la comercialización según el Manual de Aseguramiento de la Calidad (2002).

Generalmente los porcentajes de supervivencia comienzan a disminuir en los primeros tres días, debido a la evapotranspiración descontrolada por la deficiente regulación del cierre estomático de las plántulas (Preece y Sutter, 1991). Esta insuficiencia al parecer no se manifestó en este experimento, pero posteriormente debe ser analizada en correspondencia con el comportamiento de las variables de intercambio gaseoso que también se midieron.

El tránsito de ambientes *in vitro* a *ex vitro* y variaciones en estas condiciones ambientales, provocan estrés en las plantas, expresados en términos de acumulación de ABA, prolina y especies activas del oxígeno (Van Huylenbroeck *et al.*, 1998; Horonková *et al.*, 2003; González-Olmedo *et al.*, 2005b). Como quiera que el primero influye en el cierre del estoma, el comportamiento de todos los grupos demostró que sus niveles fueron suficientes y por ello no se requirió de estímulos adicionales que pudiera favorecer las aplicaciones exógenas de ácido jasmónico, como previamente ocurrió en caña de azúcar (González-Olmedo, *et al.*, 2002).

En caña de azúcar se observó que en los primeros 14 días deben tomarse las medidas que eviten la transpiración descontrolada, característica del material que entra en esta fase proveniente de condiciones *in vitro* (Ziv, 1995; Donnelly *et al.*, 1995), para lo cual es determinante la alta humedad relativa, unido a la adecuada selección y tratamiento del sustrato, de modo que evite las infecciones fatales de las plántulas. Sin embargo, se requiere su reducción gradual, unida al manejo de la luz, de modo que favorezcan la formación y funcionalidad de estructuras que se involucran en el control de las relaciones hídricas y en el incremento de la actividad metabólica conducente al autotrofismo (Desjardins *et al.*, 1995; Kozai y Zobayed, 2000).

De lo antes expuesto se desprende el valor del establecimiento de una tecnología que contemple todas las medidas que garanticen primero altos porcentajes de supervivencia, y luego dinámicas tasas de crecimiento.

La tecnología de aclimatización aplicada alcanzó niveles máximos de supervivencia aun sin el empleo de ácido jasmónico, pero la aplicación exógena de este producto podría implicar la elevación de la calidad de las plantas en esta etapa crucial del proceso de propagación.

Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre las variables anatomorfológicas de las plántulas de Spathyphillum ‘Sensation’ durante la aclimatización.

En la tabla 8 se muestran los resultados de las evaluaciones de conteo del número de hojas en las plántulas de los tres grupos experimentales durante tres momentos de la fase de aclimatización.

Tabla 8. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre el número de hojas de las plántulas de *Spathyphillum* ‘Sensation’ durante la aclimatización.

AJ (mg.L ⁻¹)	Días	No. Hojas
0.0	0	4.27
0.0	14	4.95
0.0	28	5.3
1.0	0	4.57
1.0	14	5.54
1.0	28	5.96
2.0	0	4.7
2.0	14	5.23
2.0	28	5.79
EE X		0.03

Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para n =120.

En el momento de entrada a la fase de aclimatización las plántulas de los tres tratamientos poseían menos de cinco hojas según los promedios. Pasados 14 días sólo las plantas del grupo control mantenían el promedio de hojas por debajo de cinco, ya que los tratamientos con AJ a ambas dosis superaban esta cifra en el número de hojas por plantas. Al final del experimento, a los 28 días, todos los grupos poseían más de cinco hojas por planta como promedio.

Aunque este indicador no marcó diferencias entre los tres tratamientos durante todo el proceso evaluado, la calidad de las plantas tratadas con ácido jasmónico a la concentración de 1.0 mg.L⁻¹ fue superior. Se incluyen en estos indicadores de calidad, variables relacionadas con el follaje como las áreas foliares totales de las plantas, y las de las hojas mayores y menores respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre variables anatomorfológicas de las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante la aclimatización.

	Area foliar de la planta	Area foliar hoja mayor	Area foliar hoja menor	Número de raíces (cm)	Long. Raíz (cm)	Masa fresca tallo (g)
0.0	14.8b	4.21b	1.59b	6.40b	4.24b	0.42c
1.0	28.29a	7.81a	2.44a	9.51a	5.64a	0.82a
2.0	18.76b	5.01b	1.91ab	7.85ab	5.16ab	0.58b

En cada columna, medias con letras diferentes indican significación (Kruskall-Wallis y Dunnett's C, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para n=20.

Como se aprecia en la tabla anterior las aplicaciones de AJ a la menor dosis estimuló el desarrollo del área de las hojas de las plántulas que fueron asperjadas con 28 días de antelación. Sin embargo la dosis de 2.0 mg.L⁻¹ de AJ no favoreció el incremento significativo de las áreas foliares, aunque en el caso del área de la hoja menor igualó los resultados a los alcanzados en el grupo de plantas tratadas con AJ a la dosis más baja.

Las hojas como principal órgano encargado de la formación de fotosintetatos para el normal desarrollo de las plántulas, bajo las condiciones *in vitro*, se emplean sólo como almacén de sustancias carbonadas que son útiles en el crecimiento y desarrollo de las mismas luego que se transfieren a condiciones *ex vitro*. En estas condiciones se mantiene la función de reserva, hasta tanto no exista una nueva emisión foliar con mejores características anatomorfológicas que le garanticen funciones metabólicas más eficientes (Van Huylenbroeck y De Riek, 1995). El número de hojas verdes en plantas jóvenes es limitado, así se reconoce en especies como la caña de azúcar (Rodríguez, 2005). También la emisión foliar es influida por las condiciones de crecimiento y la variedad. La formación de las nuevas hojas tiene gran dependencia de la temperatura y a su vez el desarrollo que alcanzan está muy relacionado con la posición de las mismas en la planta (Van Dillewijn, 1951).

En el caso de las variables relacionadas con el sistema radical también el AJ (1.0 mg.L⁻¹) incrementó el número de raíces y la longitud de la mayor raíz con respecto al comportamiento registrado en las plántulas del grupo control. El AJ aplicado a la

mayor concentración no difirió en ninguna de las variables con ninguno de los otros dos tratamientos.

Con anterioridad se reconocen efectos del AJ sobre varios los procesos de defensa y respuesta a estrés, ya que la aplicación exógena del mismo o su metil ester, puede afectar muchos procesos fisiológicos, morfológicos (Harms *et al.*, 1998) y reproductivos (McConn y Browse, 1996; Sanders *et al.*, 2000; Stintzi y Browse, 2000) de las plantas, entre ellos el crecimiento de las raíces. Así quedó demostrado en los tratamientos de las raíces de tomate con NaCl (Abdala *et al.*, 2003) en las que mediaron señales de AJ. Aunque en muchos artículos que resumen los efectos de AJ en las plantas (Staswick *et al.*, 1992; Creelman y Mullet 1997; Swiatek *et al.*, 2002, Suhita *et al.*, 2004) se reitera su papel inhibitor del crecimiento de las raíces, para las plantas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante la aclimatización se demostró su influencia estimuladora, no sólo sobre el crecimiento de la raíz mayor también sobre la rizogénesis.

Previamente se demostró que el AJ en bajas concentraciones favorecieron la emisión de raíces laterales así como su elongación, sin muchos efectos sobre la elongación del eje central, mientras las altas concentraciones causaron una rápida e irreversible inhibición del crecimiento de la raíz, con una severa afectación de la elongación del eje central (Tung *et al.*, 1996).

Este es un importante resultado pues el desarrollo del sistema radical es una de las funciones más relevantes que cumple el proceso de aclimatización. Muchas de las raíces *in vitro* responden a patrones de enraizamiento indirecto, o sea sin conexión con los vasos y órganos aéreos, y en esta fase se induce la emisión de nuevas raíces ya con patrón directo y realmente funcionales (Geneve, 1991).

En plántulas de *Calathea* durante la fase de aclimatización se ha demostrado, que a medida que se incrementan los tratamientos de intensidad lumínica, las raíces se incrementaron y fueron de mayor longitud, mientras que en *Spathyphillum* se observó distinto comportamiento (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000). Los resultados demuestran que en las plantas de *Spathyphillum* 'Sensation' de este experimento existió un adecuado desarrollo en el sistema radical durante la aclimatización y se aprecia que fue mejor en las tratadas con AJ a diferencia del foto-efecto negativo mostrado en la investigación de Van Huylenbroeck *et al.*, 2000.

Finalmente en la tabla 9 se informa sobre la variable masa fresca. Esta siempre fue superior en los tratamientos con AJ, aunque nuevamente la menor dosis logró la mayor masa fresca de las plantas asperjadas. Según los datos previamente analizados las diferencias entre los promedios de esta variable en los dos grupos de plantas tratadas con ambas dosis de JA presumiblemente responden a los incrementos en las áreas de las mayores hojas y del área foliar total de las plantas.

Cuando de masa fresca se trata no puede descartarse en el análisis el control sobre los contenidos de agua. Estos parecen ser los responsables más involucrados en la diferencia entre las masas frescas registrada entre las plantas del grupo control y las del tratamiento con AJ (2.0 mg.L^{-1}). Por eso se hace evidente la importancia de determinar el intercambio gaseoso en las plántulas objeto de estudio.

Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre las variables de intercambio gaseoso en las hojas de las plántulas de Spathyphillum 'Sensation' durante la aclimatización.

Los resultados antes analizados demuestran el papel favorable de las aplicaciones de AJ sobre la calidad de las plantas de *Spathyphillum* 'Sensation', en especial la dosis de 1.0 mg.L^{-1} , durante la aclimatización. En las figuras 6, 7 y 8 se muestran los

resultados de variables vinculadas con el intercambio gaseoso, en este caso asimilación de CO₂ y pérdida de vapores de H₂O, involucrado en la interpretación de la calidad antes mencionada.

En la figura 6 se puede apreciar el comportamiento de la fotosíntesis, como indicador de la fijación de CO₂ por las plántulas de los tres tratamientos desde el momento cero de la aclimatización hasta los registros de las plantas al final de esta fase (28 días).

La fotosíntesis presentó un comportamiento irregular en todos los grupos experimentales. En el primer caso, grupo control, las plantas alcanzaron un nivel variable de asimilación de CO₂ durante toda la fase, ya que descendió a mediados del proceso y se recuperó al final. Por su parte en las tratadas con AJ a 2.0 mg.L⁻¹ la variabilidad en la fijación de este gas fue inversa a lo descrito en el tratamiento control durante todo el período evaluado. Además se distingue que el máximo alcanzado a los 14 días duplicó la capacidad fotosintética con relación a la mostrada finalmente por las plantas del control, pero en igual momento se redujo al máximo de todos los registros. Las plantas asperjadas con AJ a 1.0 mg.L⁻¹ mostraron actividades fotosintéticas semejantes en los primeros 14 días y finalmente promediaron mayor fijación de CO₂ que la registrada en el resto de los tratamientos del experimento, con elevada influencia del mayor valor alcanzado a los 28 días.

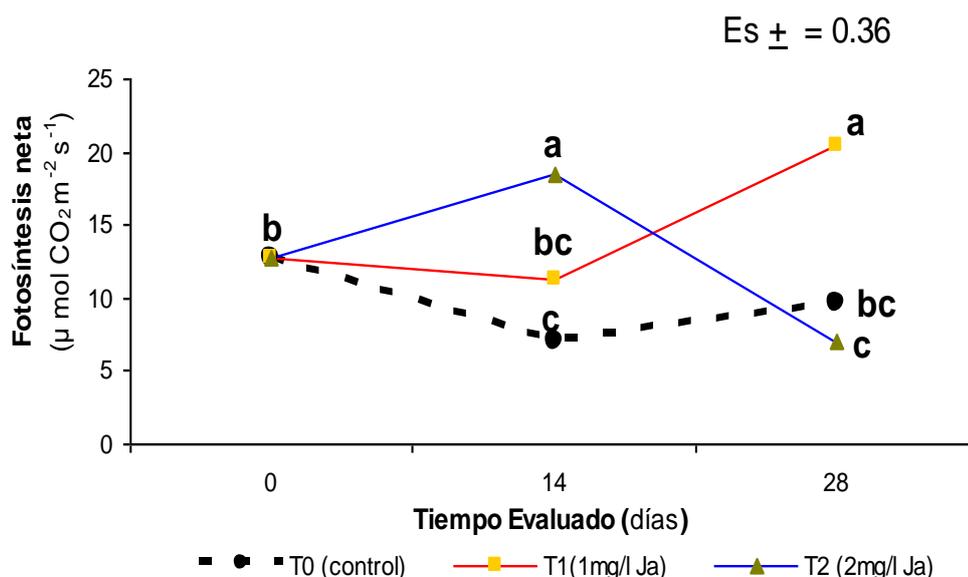


Figura 6. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre la variable fotosíntesis neta en las hojas de plántulas de *Spathyfillum* 'Sensation' durante la aclimatización.

Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n = 120$.

Los resultados precedentes con la aplicación prolongada de 10 µM de ABA y 50 µM JA-Me en el medio radical de los semilleros de chícharo mostraron un efecto inhibitorio sobre las reacciones fotosintéticas del foto-sistema II y acciones de bloqueo al ciclo de Calvin (Weidhase *et al.*, 1987; Popova y Vaklinova 1988; Maslenkova *et al.*, 1995). Sin embargo los registros de ambos tratamientos con AJ en este experimento demuestran efectos de promoción, a pesar de la marcada reducción provocada por la mayor dosis al concluir la aclimatización.

Nuevamente es meritorio señalar la novedad del resultado logrado por AJ (1.0 mg.L⁻¹) en el incremento de la fotosíntesis porque además de lo anteriormente planteado

sobre la inhibición de este proceso informado para AJ, se le atribuyen acciones promotoras de la senescencia en antagonismo con las citoquininas (Ueda y Kato, 1980; Weidhase *et al.*, 1987; Yeh *et al.*, 1995). También se reconocen acciones adversas sobre la estimulación de la fotosíntesis y de la síntesis y concentración de las clorofilas y otros pigmentos involucrados en ella (Saniewski y Czapski, 1983; Popova y Vaklinova, 1988; Popova *et al.*, 1988). En este caso la fotosíntesis del tratamiento con AJ 1.0 mg.L⁻¹ está en correspondencia con la mejor calidad de estas plantas según resultados de la tabla 9. En este intercambio gaseoso a través del estoma es valioso relacionar el comportamiento de la conductancia estomática que se informa en la figura 7.

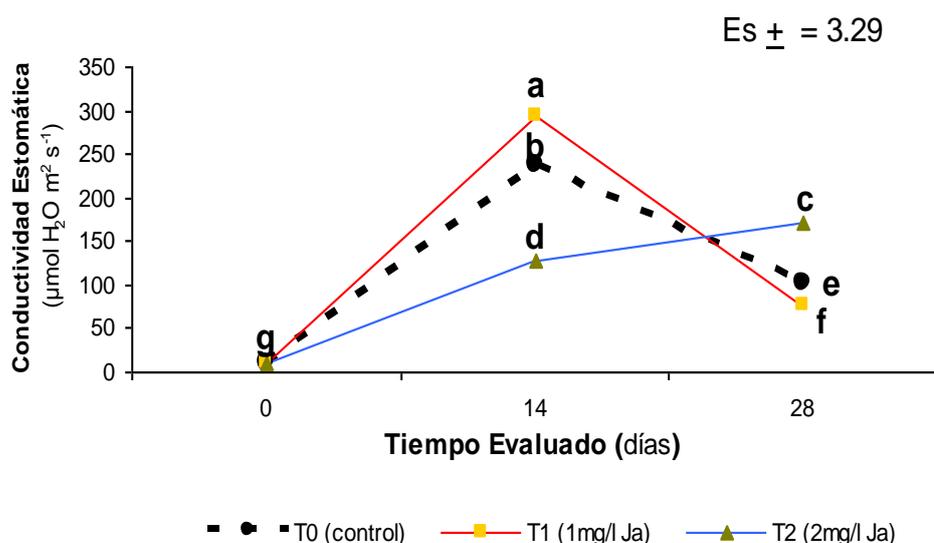


Figura 7. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre la variable conductividad estomática en las hojas de plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante la aclimatización.

Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n = 120$.

Las plántulas del grupo control y las del tratamiento con AJ (1.0 mg.L⁻¹) manifestaron todo el tiempo del experimento la misma tendencia en el comportamiento de la conductancia estomática. El máximo provocado por AJ (1.0 mg.L⁻¹) fue superior al del control, ambos a los 14 días, pero al concluir la fase las plantas con AJ a la menor dosis mostraron el menor valor de conductancia estomática de todas las evaluaciones finales. Por su parte AJ (2.0 mg.L⁻¹) mantuvo el ascenso de esta variable en los primeros 14 días pero no alcanzó la magnitud de ésta en los otros dos grupos de plantas. A diferencia de éstos al final de la aclimatización las plantas tratadas con la mayor dosis de AJ presentaron el mayor valor de esta variable. Esto justifica los resultados de fotosíntesis expuestos en la figura 1, ya que el registro más alto de ésta (en el tratamiento con AJ a 1.0 mg.L⁻¹ a los 28 días) coincidió con la menor conductancia de estas plantas al final de la fase de aclimatización.

Otra observación interesante está relacionada con el tratamiento con AJ a 1.0 mg.L⁻¹. Cuando la fijación de CO₂ no fue ascendente, la conductancia estomática fue alta en los primeros momentos de evaluación y finalmente se redujo al 26%, cuando fue superior a la de las plantas control con sólo una reducción al 44%.

La relación de esta variable con la fotosíntesis y la evapotranspiración es un indicador para valorar la eficiencia del proceso fotosintético, pero asociado al cierre estomático se hace fuerte sólo con la existencia de estudios histológicos que lo demuestren y que en esta ocasión no se realizaron.

No obstante se reconoce que el AJ interviene en la regulación del cierre de estomas pues se estudian comparativamente sus efectos con relación al ABA. Tanto el ABA como el AJ, inducen la expresión de efectores génicos como el AtMYC2 (Lorenzo *et al.*, 2004) y ésta inducción depende de COI1 en ambos casos, esto indica que la activación de AtMYC2 por ABA ha de estar mediada por la señalización de AJ, como ya se ha descrito en las respuestas a herida, donde el ABA induce tanto la síntesis como la señalización de AJ (Peña-Cortes *et al.*, 1995). Sin embargo, los dos reguladores son independiente en la inducción del cierre de estoma y la inducción de la producción de H₂O₂ como se evidencia en los experimentos realizados con *Arabidopsis* tipo salvaje y *Pisum sativum* (Suhita *et al.*, 2004).

El AJ y sus derivados desempeñan un papel importante en la adaptación de plantas al estrés, como sucede durante el tránsito de condiciones *in vitro* a exteriores (González –Olmedo *et al.*, 2005b) y así inhiben el crecimiento de las raíces, interfieren la germinación de semillas y el ciclo celular, induce el cierre de estomas regulando así la transpiración y la fotosíntesis e induce genes que codifican para el almacenamiento de proteínas (Staswick *et al.*, 1992; Creelman y Mullet 1997; Swiatek *et al.*, 2002, Suhita *et al.*, 2004). En la figura 8 se exponen los resultados del comportamiento de la evapotranspiración para completar la triada de variables asociadas con el intercambio gaseoso en el caso de este experimento, pues no existe total correspondencia con estas investigaciones previas como ya se ha explicado.

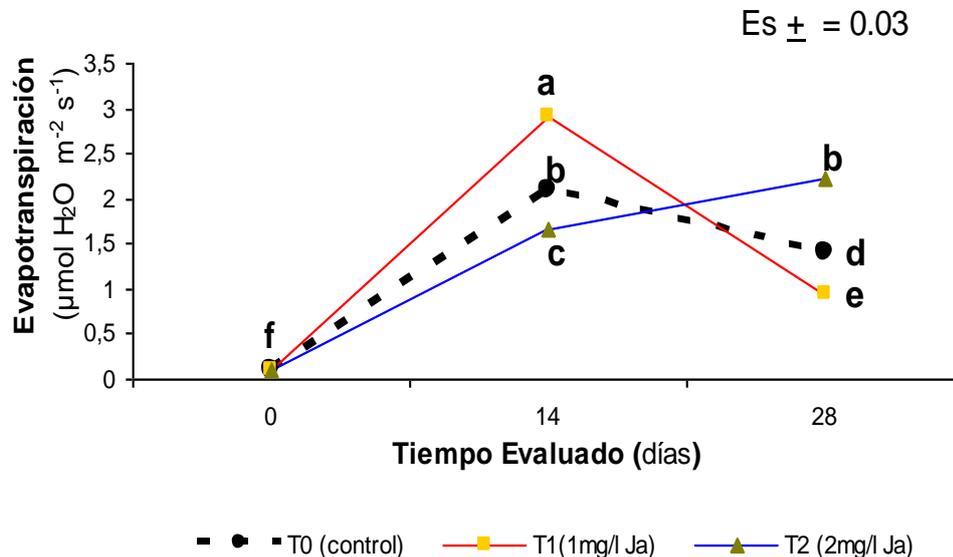


Figura 8. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico sobre la variable evapotranspiración en las hojas de plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' durante la aclimatación.

Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n = 120$.

La evapotranspiración de las plantas de los tres grupos mantuvo la misma tendencia que se describió para conductancia estomática en la figura 7, fue siempre la menor al inicio del experimento. Mientras los tratamientos control y con AJ (1.0 mg.L⁻¹) estimularon mayores valores en esta variable en los primeros 14 días, en las

plántulas asperjadas con la mayor dosis de JA continuó ascendiendo hasta el final de la aclimatización. Favorablemente en las plantas con AJ (1.0 mg.L^{-1}) a los 28 días la evapotranspiración se redujo a la vez que se incrementó la fotosíntesis, relación positiva para interpretar la calidad de las plantas de este tratamiento previamente expuesta y analizada en la tabla 9.

Los efectos de las aplicaciones de AJ a 1.0 mg.L^{-1} al final de la fase de aclimatización favorecieron un mejor equilibrio durante el intercambio gaseoso $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$. Esta mejor economía de los recursos hídricos de estas plantas justifica los mayores valores de las variables anatomorfológicas determinadas en ellas.

En las plantas, durante la ontogenia de las hojas se enmarcan dos fases fotosintéticas distintivas: la primera fase muestra incrementos continuos de la actividad fotosintética, la cual tiene estrecha relación con la expansión foliar, y una segunda fase de declinación de los rangos fotosintéticos, la que se asocia a la senescencia de las hojas, se reconoce además un máximo de fotosíntesis entre estas dos fases (Miller *et al.*, 1997). En este caso el proceso de aclimatización de las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' demostró las características descritas en la primera fase antes citada con énfasis en aquellas tratadas con AJ (1.0 mg.L^{-1}), lo que favorece la dinámica tasa de crecimiento requerida durante la aclimatización.

También Van Huylenbroeck *et al.* (1995) observaron que en plántulas de *Spathyphillum* micropropagadas convencionalmente y expuestas a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ existió una respuesta de la actividad fotosintética, las que lograron valores de $1,15 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ inmediatamente que se transfirieron a condiciones *ex vitro*. Este valor se incrementó a $1,23 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en sólo 10 días. A medida que el tiempo transcurrió bajo estas condiciones, la fotosíntesis alcanzó valores de $1,32 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Como se aprecia en la figura 1 estos valores son muy inferiores a los registrados en las plantas de *Spathyphillum* 'Sensation' de este experimento que estuvieron entre $7,01$ y $20,41 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Sin embargo, las plántulas de *Calathea* expuestas a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ al transferirse a exteriores, no presentaron actividad fotosintética alguna en los primeros tres días de aclimatización. Luego de los 10 días de permanencia en esta fase se apreciaron incrementos de $1,56 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$; ya a los 30 días los valores alcanzan niveles de $3,74 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, lo que denota un cambio metabólico de heterotrofismo a autotrofismo y la formación de un aparato fotosintético funcional (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995). De este modo en plantas de *Spathyphillum* y *Calathea* provenientes de un medio de cultivo semisólido, se encontraron altos incrementos en la masa seca después de los 20 días en la fase de aclimatización (Van Huylenbroeck *et al.*, 1998), lo que hace presuponer también ocurrió en las de este experimento acorde con las mayores capacidades fotosintéticas que mostraron y buen manejo de sus relaciones hídricas.

En plántulas de *Spathyphillum* durante la aclimatización se observó un incremento en los niveles de almidón, fructosa y glucosa, así como en la actividad enzimática de las invertasas ácidas y de la sacarosa sintasa en los primeros días en la fase de aclimatización (Van Huylenbroeck y De Riek, 1995). Esto evidencia la movilización de las reservas que poseían los órganos encargados de esta función. Cuando aparecieron las nuevas raíces y hojas disminuyeron estas movilizaciones, mientras disminuía la actividad de las invertasas. Por el contrario, estos factores favorecieron la actividad biosintética que motivó que la masa estuviese estrechamente relacionada con el número de nuevas raíces y hojas emitidas, estas últimas muy involucradas por la activación de los pigmentos fotosintéticos que poseen, en particular las clorofilas (Van Huylenbroeck y Debergh, 1992).

Aunque en esta ocasión no se realizaron estudios bioquímicos de carácter metabólico, este comportamiento precedente en esta especie hace suponer su reiteración en este experimento, tal vez incrementado a juzgar por los mayores niveles de fotosíntesis ya analizados. Además apoyan este enfoque, los máximos de supervivencia que se alcanzaron que demuestran una adecuada manipulación de las plántulas durante el tránsito, ya que las plantas que crecen bajo condiciones de poca luminosidad, tienen que adaptarse rápidamente cuando se transfieren a condiciones de aclimatización, muchas de ellas mueren en momentos tempranos por un mal manejo de las condiciones ambientales a que se exponen (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995).

La relación del AJ con las vías metabólicas ha sido suficientemente tratado. No obstante merece reiteración que los tratamientos de las hojas de la cebada con AJ o me-JA, condujeron a la síntesis de las llamadas proteínas inducidas por el ácido jasmónico (JIPs) de diferentes masas molares (Andresen *et al.*, 1992) y a la expresión de los genes de respuesta al jasmonato (JRGs) (Andresen *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). Este control molecular ejercido por AJ o su éster metilado es una evidencia muy valiosa para interpretar cabalmente los resultados de este experimento.

Las aplicaciones de AJ cuando favorecieron las respuestas morfogénicas respondían a un balance también favorable, de los reguladores involucrados y de las señales asociadas con el proceso. Esto se logró fundamentalmente en el tratamiento con la dosis de 1.0 mg.L⁻¹. La dosis superior desplazó ese balance y algunas de esas señales respondieron más a los efectos adversos que también se reconocen a las aplicaciones exógenas de AJ, como una rápida e irreversible inhibición del crecimiento de la raíz, con una severa afectación de la elongación del eje central (Tung *et al.*, 1996), la disminución de la expresión de genes en núcleos y en cloroplastos involucrados en la fotosíntesis (Weidhase *et al.*, 1987; Reinbothe, 1997), entre otros.

De este modo se demostró la utilidad de las aspersiones de AJ a 1.0 mg.L⁻¹ durante la aclimatización de plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' propagadas *in vitro* y la conveniencia de continuar con estudios que profundicen en las razones bioquímicas e histológicas que favorecen el proceso.

III. PLÁTANO.

Comportamiento de las variables anato-morfológicas en plantas de plátano (*Musa AAB*) var. CEMSA ¾.

A continuación se muestran los resultados de las variables anato-morfológicas en las plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2. En la tabla 10 se puede apreciar el comportamiento de la variable longitud de la hoja mayor.

Tabla 10. Comportamiento de la variable longitud de la hoja mayor (cm) en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, en condiciones de aclimatización.

Concentración Ácido Jasmónico (mg.L ⁻¹)	<i>Fusarium</i> 3x10 ⁵ esporas/mL	0 días	7días	14 días	21días	28días
		0	no	32,81	33,79	33,53b

0	si	32,53	34,01	32,51b	32,10c	31,52b
1	no	36,34	36,54	39,40a	39,93a	40,09a
1	si	33,48	32,15	33,81b	32,90bc	32,15b
ES \pm		0,61	1,03	0,74	0,75	0,818b
Sig.		ns	ns	*	*	*

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n=11$. El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

El ácido jasmónico incrementó la longitud de la hoja mayor en las plantas que no fueron inoculadas con el hongo. Esto se manifestó a partir del día 14 y hasta el día 21. Por su parte el *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 limitó el crecimiento de esta variable, cuando el ácido jasmónico no logró atenuar este efecto. Con una tendencia parecida se muestra en la tabla 11 el comportamiento de la variable ancho de la hoja mayor.

Tabla 11. Comportamiento de la variable ancho de la hoja mayor (cm) en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, en condiciones de aclimatización.

Concentración Ácido Jasmónico (mg.L ⁻¹)	<i>Fusarium</i> 3x10 ⁵ esporas/mL	0 días	7días	14 días	21días	28días
0	no	12,54	11,71b	13,35b	13,41b	14,90b
0	si	12,52	12,96b	12,61b	12,28c	12,01b
1	no	14,58	16,07a	16,36a	15,85a	16,44a
1	si	12,67	13,38ab	13,41b	12,56bc	12,76b
ES \pm		0,32	0,43	0,42	0,39	0,413
Sig,		ns	*	*	*	*

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n=11$. El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

Aunque en las plantas tratadas previamente con ácido jasmónico y sin inoculación del patógeno, el ancho de la hoja mayor siempre fue el de valor superior, este efecto se manifestó más precoz que en la variable anteriormente analizada, pues comenzó desde los primeros siete días.

En esta ocasión también *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 redujo los valores del ancho de la hoja mayor y el producto aplicado no consiguió reducir el efecto inhibitorio ejercido por el hongo sobre esta variable.

En cuanto a la variable diámetro del tallo el comportamiento de éste por los efectos de ambos factores y la manifestación en el tiempo fue similar al ancho de la hoja mayor (tabla 12).

Tabla 12. Comportamiento de la variable diámetro del tallo (cm) en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, en condiciones de aclimatización.

Concentración Ácido Jasmónico (mg.L ⁻¹)	<i>Fusarium</i> 3x10 ⁵ esporas/mL	0 días	7días	14 días	21días	28días
0	no	1,56	1,60b	1,78ab	1,83b	1,76b
0	si	1,5	1,45b	1,50b	1,66b	1,81b
1	no	1,93	1,94a	2,05a	2,20a	2,14a
1	si	1,58	1,64b	1,82ab	1,78b	2,02ab
ES±		0,03	0,04	0,05	0,04	0,045
Sig,		ns	*	*	*	*

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n=11$. El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

Desde los siete días las plantas tratadas con ácido jasmónico y sin inoculación del patógeno mostraron los más altos valores en el diámetro del tallo de las plantas. Sin embargo la presencia de *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 no influyó en el crecimiento del diámetro de los tallos de las plantas inoculadas con las esporas del hongo. Sólo en esta variable este factor no provocó efectos adversos.

El ácido jasmónico cumple múltiples funciones en el desarrollo y defensa de las plantas (Creelman y Mullet, 1995) razón que se valida con sus efectos sobre las variables anato-morfológicas antes analizadas. Probablemente estas acciones estuvieron relacionadas con la regulación que ejerce sobre el transporte de agua como en la formación floral de *Arabidopsis* demostraron Ishiguro *et al.* (2001). Los niveles de ácido jasmónico en plantas varían con el desarrollo, tipo de tejido, y presencia o ausencia de estímulos externos, porque entre los genes regulados por el ácido jasmónico se encuentran los que codifican enzimas para la biosíntesis de fitoalexinas para el almacenamiento vegetativo de proteínas y de las mayores subunidades de la rubisco (Creelman y Mullet, 1995).

Por otra parte la fase del proceso de infección puede terminar y no progresar a menos que la planta sea altamente susceptible o predispuesta por las condiciones de estrés ambiental imperantes (Beckman, 1987). Los resultados demostraron que la infección inducida fue eficiente, y que la interacción entre ambas entidades biológicas provocan pérdidas en la especie vegetal. La enfermedad es sintomática a partir de que las orillas de las hojas más viejas toman un color amarillo brillante y se comienzan a marchitar y la enfermedad se extiende a las hojas más jóvenes. Las hojas se colapsan en la zona del pecíolo y cuelgan alrededor del pseudotallo (Ploetz, 1994). Estas manifestaciones detectadas en este experimento causaron en los primeros 28 días las reducciones antes señaladas en las variables morfológicas medida en hojas y tallos.

La variable número de hojas es otro indicador anato-morfológico asociado con el crecimiento. En la figura 9 se muestran los resultados de su comportamiento y se relaciona con la manifestación de lesiones provocadas por la infección fungosa.

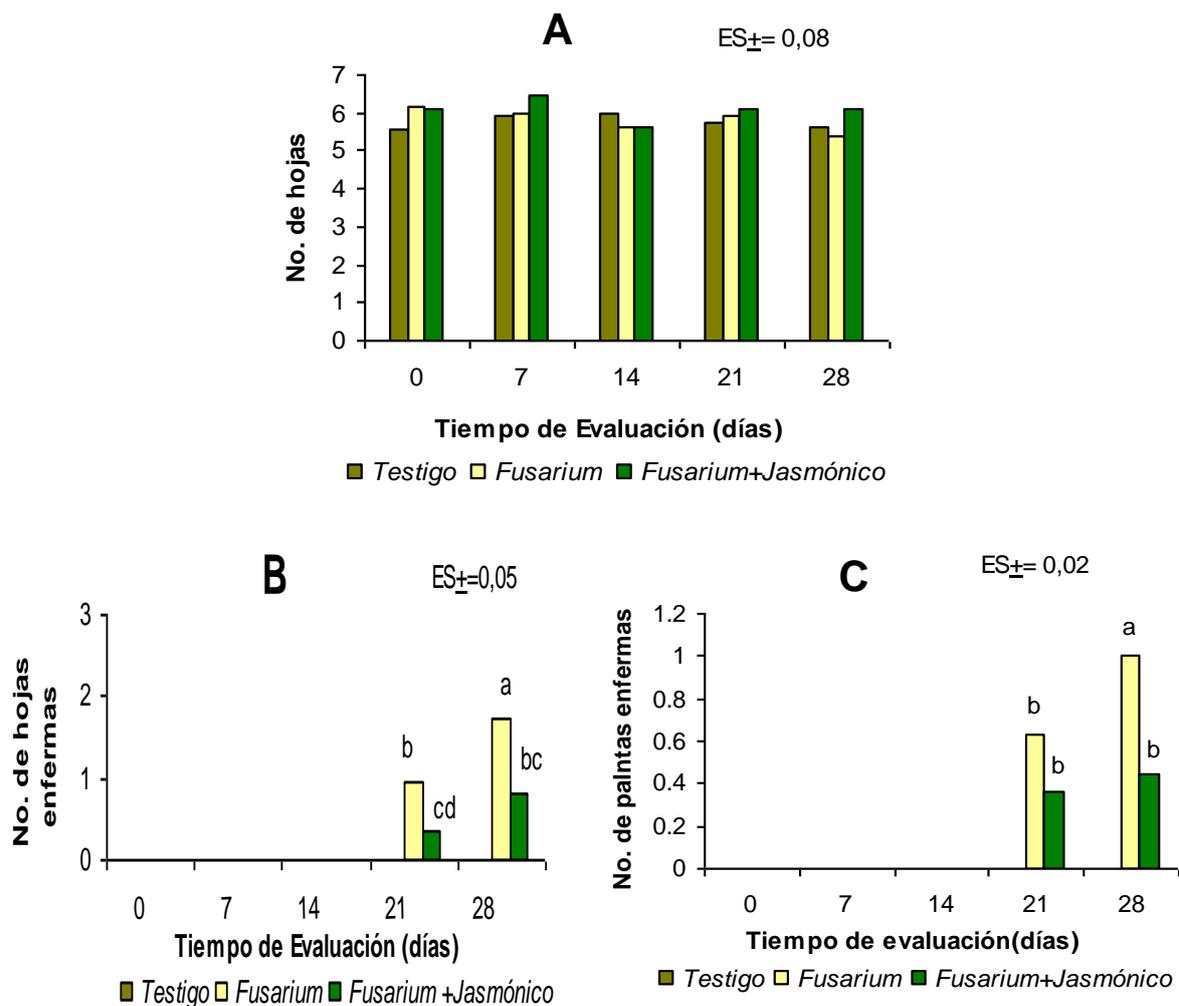


Figura 9. Comportamiento de las variables número de hojas, número de hojas enfermas y número de plantas enfermas en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, durante los primeros 28 días de aclimatización.

Medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$), cada dato representa la media para $n=11$. Para el análisis de la variable número de hojas, número de hojas enfermas y número de plantas enfermas los datos se transformaron según $X' = (x)^{0,5}$. Número (No.). El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

Las evaluaciones cada siete días demostraron que el número de hojas por plantas no difirió en los 28 días de experimentación como consecuencia de los tratamientos aplicados (figura 9A). El tiempo fue insuficiente para reducir el número de estas por la enfermedad.

La ausencia de hojas con lesiones por la presencia de *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2. en las plantas del testigo, es una evidencia de que a pesar de las condiciones de alta humedad relativa que impone la aclimatización en el ambiente no existieron agentes causales de estrés biótico, en especial los relacionados con esta enfermedad. En los grupos de plantas infestadas por la aplicación de las esporas del hongo, las lesiones en las hojas comenzaron a manifestarse a los 21 días y continuaron aumentando hasta los 28 días (figura 9B). El tratamiento con ácido jasmónico disminuyó la presencia de la enfermedad en ambas evaluaciones.

Al considerar el número de plantas enfermas (figura 9C) a los 21 días se precisan ligeras diferencias con respecto al comportamiento antes analizado para la variable número de hojas. A pesar de que en el tratamiento con sólo *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 se rebasa el 50% de plantas con síntomas de la enfermedad, cuando en las previamente asperjadas con ácido jasmónico no alcanzaban el 40%, la carencia de significación estadística no demuestra la acción protectora del producto en esa más temprana fecha de manifestación de la patología. Sin embargo siete días después, fecha final del experimento, también en esta variable el ácido jasmónico redujo los efectos del hongo en más de un 50% con respecto al grupo infestado sin previa protección que poseía la totalidad de sus plantas enfermas.

Los resultados expuestos en esta figura son una valiosa evidencia de la eficiencia del empleo de ácido jasmónico en la protección de plantas de plátano ante el riesgo de infección con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2.

Para aumentar la resistencia de *Arabidopsis* al hongo vascular *Fusarium oxysporum*, se requiere de etileno, y ácidos jasmónico y salicílico (Berrocal-Lobo y Molina, 2004). También en la inoculación en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con *Fusarium oxysporum* influyó la expresión de factores de transcripción relacionados con estas hormonas (Berrocal *et al.*, 2002).

Entre las interacciones descritas para las rutas de señalización de ácido salicílico y ácido jasmónico/etileno en la inducción de las respuestas de defensa tras la infección con patógeno, se expresa antagonismo y cooperación (Lorenzo *et al.*, 2004). También existen ejemplos de cooperación en la expresión de genes de defensa entre las rutas dependientes de estos tres compuestos, como lo demuestra la implicación de ellas en la resistencia de *Arabidopsis* a *Peronospora cucumerina* y *Peronospora parasitica* (Clarke *et al.*, 2000). Del mismo modo, en *Arabidopsis* el factor de transcripción específico de plantas WRKY70, puede explicar a nivel molecular el antagonismo entre las rutas de señalización de defensas mediadas por los ácidos salicílico y jasmónico (Li *et al.*, 2004).

El tratamiento con metil jasmonato en abeto rojo (*Picea abies* (L.) Karst.) incrementó el flujo de resina en tejidos del tallo y aumentó la resistencia al hongo de mancha azul (*Ceratocystis polonica*), manifestando las principales características celulares relacionadas con la resistencia adquirida, inducidas por heridas, infección de hongos y escarabajos (Franceschi *et al.*, 2002).

Comportamiento de las variables fisiológicas en plantas de (Musa AAB) var. CEMSA ¾.

Los efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico en las capacidades fotosintéticas, evapotranspirativas y de conductancia estomática en el estudio de la interacción plátano- *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 se muestran a continuación.

Tabla 13. Comportamiento de la actividad fotosintética en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, en los 28 días de aclimatización.

Concentración Ácido Jasmónico (mg.L ⁻¹)	<i>Fusarium</i> 3x10 ⁵ esporas/mL	0 días	7días	14 días	21días	28días
0	no	5,19a	5,25a	13,02a	14,31a	13,77a
0	si	1,29c	1,58b	5,26b	5,58b	0,78d
1	no	5,05a	2,31b	5,53b	4,28b	9,30b
1	si	3,56b	2,44b	4,69b	4,89b	6,12c
ES±		0,26	0,29	0,22	0,33	0,23
Sig,		*	*	*	*	*

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, $p \leq 0,05$). Cada dato representa la media para $n=120$. El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

Los mayores valores de fotosíntesis siempre pertenecieron a las plantas del testigo, sin aplicación de ácido jasmónico ni inoculación con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 (tabla 13). El reconocido efecto del ácido jasmónico de reducir inicialmente la capacidad fotosintética de las hojas tratadas, nuevamente se manifestó en esta especie (González-Olmedo *et al.*, 2006), pero en esta ocasión aun a los 28 días no se logró recuperar los niveles del testigo.

Tratamientos con ácido jasmónico redujeron la fijación del CO₂ y la actividad de la rubisco, incrementaron la tasa de fotorrespiración, el punto de compensación del CO₂ y la resistencia estomática (Popova y Vaklinova, 1988). Se demostró en plántulas de cebada que el ácido jasmónico tuvo un marcado efecto inhibitorio sobre el transporte electrónico en el fotosistema II y las reacciones evolutivas del oxígeno (Maslenkova *et al.*, 1995).

Por su parte el *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 redujo aun más marcadamente la fotosíntesis en las plantas infestadas con énfasis en aquellas sin previa protección con ácido jasmónico. Sin embargo esta actividad fisiológica no disminuyó por el hongo en las plantas previamente asperjadas con el producto, salvo a los 28 días como consecuencia de la máxima expresión de las lesiones provocadas por el patógeno como antes se discutió en las figuras 9B y 9C.

En correspondencia con la fotosíntesis se comportó la conductancia estomática (tabla 14).

Tabla 14. Comportamiento de la conductancia estomática en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, en los 28 días de aclimatización.

Concentración Ácido Jasmónico (mg.L ⁻¹)	<i>Fusarium</i> 3x10 ⁵ esporas/mL	0 días	7días	14 días	21días	28días
0	no	20,36a	20,69a	44,30a	37,45b	32,39a
0	si	0,65d	0,70c	23,30b	45,01a	17,51b
1	no	14,77b	1,66c	28,42b	45,83a	17,68b
1	si	10,70c	12,60b	13,86b	10,80c	10,41c
ES±		0,55	0,61	0,61	0,79	0,44
Sig.		*	*	*	*	*

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, p≤ 0,05). Cada dato representa la media para n=120. El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

La conductancia estomática generalmente fue mayor en las plantas del testigo, a excepción de la evaluación realizada a los 21 días. El ácido jasmónico probablemente disminuye la captación fotosintética del CO₂ por reducción de la conductancia estomática si en términos de cierre del estoma se interpreta, aunque en plantas de soya y cebada se plantea que él no está involucrado en el cierre estomático (Creelman y Mullet, 1995). Los efectos del *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 sobre esta variable fueron irregulares cuando las plantas se trataron con ácido jasmónico.

Como se sabe el comportamiento de la evapotranspiración mantiene una proporcionalidad directa con el de la conductancia estomática por la técnica de medición empleada, así se aprecia en la tabla 15.

Tabla 15. Comportamiento de la evapotranspiración en plantas de plátano asperjadas con ácido jasmónico e inoculadas con *Fusarium oxysporum f. sp cubense* raza 2 así como su interacción, en los 28 días de aclimatización.

Concentración Ácido Jasmónico (mg.L ⁻¹)	<i>Fusarium</i> 3x10 ⁵ esporas/mL	0 días	7días	14 días	21días	28días
0	no	0,47a	0,48a	1,03a	1,15b	32,39a
0	si	0,01d	0,01c	0,57c	1,19b	17,51c
1	no	0,35b	0,27b	0,71b	1,40a	17,68b
1	si	0,21c	0,04c	0,37d	0,35c	10,41d
ES±		0,01	0,01	0,01	0,02	0,44
Sig,		*	*	*	*	

En columna medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba Tukey, p≤ 0,05). Cada dato representa la media para n=120. El *Fusarium* se inoculó a las 24 h de iniciado el experimento.

Con excepción de la evaluación realizada a los 21 días, el ácido jasmónico disminuyó la evapotranspiración en las plantas de plátano. De esta forma la reducción de la conductancia estomática afectó tanto a la fotosíntesis como a la evapotranspiración, así mejoró la economía hídrica durante la fijación de CO₂.

El *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 también redujo la evapotranspiración, pero a diferencia del comportamiento de la fotosíntesis (tabla 4), el ácido jasmónico no logró controlar la pérdida de agua por esta vía en las hojas de las plantas enfermas.

La aplicación exógena del ácido jasmónico y su metil ester, afectan los procesos fisiológicos, morfológicos y reproductivos. Algunos de los procesos antes referidos son la maduración de frutos, la producción de polen, el crecimiento de las raíces, el almacenamiento de proteínas, la fotosíntesis, el cierre de estomas y el ciclo celular según Suhita *et al.* (2004).

En resumen el ácido jasmónico favoreció el incremento de variables morfológicas, pero redujo los valores de las variables fisiológicas que no lograron igualar los niveles del testigo a pesar del incremento numérico durante los 28 días de experimentación. Sin embargo este producto siempre redujo la presencia del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en las plantas de plátano previamente tratadas, lo que evidencia su empleo eficiente con acción protectora ante esta enfermedad fungosa. Los mecanismos bioquímicos que se desencadenan por la inducción del ácido jasmónico se requieren para profundizar en los efectos del producto en la interacción plátano-*Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 en condiciones de aclimatización.

CONCLUSIONES

- La aplicación del ácido jasmónico (1.0 mg.L⁻¹) en la fase del enraizamiento y elongación *in vitro* disminuye las variables morfológicas de las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2.
- El ácido jasmónico (1.0 mg.L⁻¹) inhibe la actividad fotosintética y disminuye la concentración de las clorofilas en las hojas de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variedad MD2.
- La aplicación del ácido jasmónico *in vitro* aumenta la supervivencia de las plántulas de piña en condiciones *ex-vitro*.
- El ácido jasmónico aplicado *in vitro* es más eficiente que el aplicado *ex vitro* en la inducción de mecanismos relacionados con la protección de las plántulas de piña contra *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*.
- La concentración de ácido jasmónico en la preparación de 1.0 mg.L⁻¹ estimuló e incrementó el desarrollo de las variables morfológicas de las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation'. La dosis de 2.0 mg.L⁻¹ aumentó la masa fresca de las plántulas.
- Con la aplicación del ácido jasmónico a la dosis de 1.0 mg.L⁻¹ se logró el mejor balance de incremento gaseoso (CO₂ asimilado/H₂O transpirada) durante la aclimatización de las plántulas de *Spathyphillum* 'Sensation' lo que favoreció la calidad de las mismas.
- En plantas de plátanos CEMSA ¾ en aclimatización el ácido jasmónico (1.0 mg.L⁻¹) favoreció el incremento de variables morfológicas, pero redujo los valores de las variables fisiológicas.

- En la interacción plátano-*Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 2 el ácido jasmónico (1.0 mg.L⁻¹) siempre redujo la presencia del hongo, demostrando acción protectora.

REFERENCIAS

- ABDALA, G.; O. MIERSCH; R. KRAMAL; A. VIGLIOCCO; E. AGOSTIN G. FORCHETTI; S. ALEMANO. 2003. Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Plant Growth Regulation* 40(1): 21-27.
- AGRAWAL, A. A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 3:329–335.
- ALDRIDGE, D. C.; S. GALT; D. GILES; W. B. TURNER. 1971. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society. Section C* 1623–1627.
- ANANIEV, E. D.; K. ANANIEVA; I. TODOROV. 2004. Effect of methyl ester of jasmonic acid, abscisic acid and benzyladenine on Chlorophyll Synthesis in Excised Cotyledons of *Cucurbita pepo* L. (Zucchini). *BULG. J. PLANT PHYSIOL* 30 (1-2): 51-63.
- ANANIEVA, K.; E. D. ANANIEV. 2000. Interaction between methyl ester of jasmonic acid and benzyladenine during the growth of excised greening cotyledons of *cucurbita pepo* L. (zucchini) *BULG. J. PLANT PHYSIOL* 26 (1–2): 48–57.
- ANDERSON, J. P.; E. BADRUZSAUFARI; P. M. SCHENK; J. M. MANNERS; O. J. DESMOND; C. EHLERT; D. J. MACLEAN; P. R. EBERT; K. KAZAN. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16:3460-3479.
- ANDRESEN, I.; W. BECKER; K. SCHLUTER; J. BURGESS; B. PARTHIER; K. APEL. 1992. The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Mol. Biol.* 19: 193–204.
- ARAGÓN, C. E.; M. ESCALONA; I. CAPOTE; D. PINA; I. CEJAS; R. RODRIGUEZ; M. J. CANAL; J. SANDOVAL; S. ROELS; P. DEBERGH; J. GONZALEZ-OLMEDO. 2005. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa AAB*) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41:550–554.
- BECKMAN, C. H. 1987. El nature of kilt Diseases of Plants APS. Press. St. Paul. MN. 175.
- BERMÚDEZ, I.; HERRERA, L.; ORELLANA, P.; VEITÍA, N.; ROMERO, C.; CLAVELO, J.; GARCÍA, L.; ACOSTA, M.; PADRÓN, Y. 2002. Estudio en condiciones de campo de poblaciones de los clones de banano “Manzano” (AAB) y Gros Michel (AAA) para la selección de plantas con posible resistencia al Mal de Panamá. *Infomusa*. 11(2):7-8.
- BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. 2004. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soil borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 763–770.
- BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. 2002. Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers enhanced resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal.* 29: 23-32.
- BOHER, B. 1974. La pourriture du coeur de l’ananas : Etude histologique de l’infection par *Phytophthora pulniuoru* (BUTL.) BUTL. *Fruits* 29 (11).
- CHEN, H.; B. C. MCCAIG; M. MELOTTO; S. YANG-HE; G. A. HOWE. 2004. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *J. Biol. Chem.* 44 (279): 45998-46007
- CLARKE, J.D.; S. M. VOLKO; H. LEDFORD; F. M. AUSUBEL; X. DONG. 2000. Roles of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *cpr*-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:2175-2190.
- COMPAROT, S. M.; C. M. GRAHAM; D. M. REID. 2002. Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light- and dark-grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots. *Plant Growth Regulation* 38 (21): 21–30.

- CREELMAN, R. A.; J. E. MULLET. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4114–4119.
- CREELMAN, R. A.; J. E. MULLET. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 266: 355-381.
- CREELMAN, A.; J. E. MULLET. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4114–4119.
- DAQUINTA, M.; R. BENEGAS. 1997. Brief review of tissue culture of pineapple. *Pineapple News.* 3: 7-9.
- DE ASCENSAO, A. R. F. D. C.; I. A. DUBERY. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. *Phytochemistry* 63: 679–686.
- DEMOLE, E.; E. LEDERER; D. MERCIER. 1962. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta XLV:* 675–685.
- DESJARDINS, Y.; C. HDIDER; J. DE RIEK. 1995. Carbon nutrition *in vitro*- regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. En: Aitcken Christie, J.; M. L. Smith (eds) *Automation and environmental control in plant tissue culture.* pp. 441 - 471.
- DONNELLY, D. J.; W. E. VIDAVER, K. LEE. 1995. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 4: 43-50.
- ELLIS, C.; I. KARAFYLLIDIS; C. WASTERNAK; J. G. TURNER. 2002. The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell* 14: 1557-1566.
- EL-SAYED, M.; R. VERPOORTE. 2004. Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* 44: 53–58.
- ESCALONA, M.; J. C. LORENZO.; B. GONZÁLEZ.; M. DAQUINTA.; J. L. GONZÁLEZ-OLMEDO; Y. DESJARDINS. C. G. BORROTO. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18: 743-748.
- FRANCESCHI, V. R.; T. KREKLING; E. CHRISTIANSEN. 2002. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. *American Journal of Botany* 89:578-586.
- GAO, X.; X. ZENG; K. XIA; T. YOSHIHARA; X. ZHOU. 2004. Interactive effects of methyl jasmonate and salicylic acid on floret opening in spikelets of Sorghum. *Plant Growth Regulation* 43: 269–273.
- GENEVE, R. L. 1991. Patterns of adventitious root formation in English Ivy. *J. Plant Growth Reg.* 10(1): 215-220.
- GENOUD, T.; J-P. MÉTRAUX. 1999. Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends in plant science* 12(4).
- GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L.; M. ESCALONA; M. CID, D. PINA; R. RODRÍGUEZ. 2002. Bioproductos en la aclimatización de plántulas de la cana de az Ed. ICIDCA, La Habana. Tomo III: 459-462.
- GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L.; MORENO, A.; PINO, Y.; PINA, D.; ARAGÓN, C.; ESCALONA, M.; CID, M.; RODRÍGUEZ, R. 2006. Efectos de las aplicaciones de ácido jasmónico en la aclimatización de plántulas de especies de interés comercial. En: Educación Cubana (ed). *Proceedings Bisse in Memoriam.* ISBN: 959-18-0088-6.
- GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L.; Z. FUNDORA; L. A. MOLINA; J. ABDULNOUR; Y. DESJARDINS; M. ESCALONA. 2005b. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:87–90.

- GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; A. CORDOVA; C. A. ARAGON; D. PINA; M. RIVAS; R. RODRIGUEZ. 2005a. Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plantas de banano (*Musa* spp.) bajo estrés térmico. *InfoMusa* 14 (1): 18-20.
- HARMS, K., I. RAMIREZ; H. PEÑA-CORTÉS. 1998. Inhibition of Wound-Induced Accumulation of Allene Oxide Synthase Transcripts in Flax Leaves by Aspirin and Salicylic Acid. *Plant Physiol.* 118 (3): 1057–1065.
- HORONKOVA. M.; H. ZAHRADNICKOVA; P. SIMEK; A. HEYDOVA. 2003. The role of abscisic in acclimation of plants cultivated *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum.* 46(4): 535-541.
- ISHIGURO, S.; A. KAWAI-ODA; J. UEDA; I. NISHIDA; K. OKADA. 2001. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191–2209.
- KARIOLA, T.; G. BRADER; J. LI; E. T. PALVA. 2005. Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *The Plant Cell* 17:282-294.
- KHATIB M. ; C. LAFITTE ; M-T. ESQUERRE-TUGAYE, A. BOTTIN; M. RICKAUER. 2004. The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. *New Phytologist* 162 (2): 501- 510.
- KOZAI, T.; C. KUBOTA; S. M. A. ZOBAYED; Q. T. NGUYEN; F. AFREEN-ZOBAYED; J. HEO. 2000. Photoautotrophic (Sugar-free medium) micropropagation. *Proc. Of Workshop on Contamination and Acclimatization Management in Plant Cell and Tissue Culture.* pp. 5-19.
- KOZAI, T; S. A. ZOBAYED. 2000. Acclimatization. En: Spier, R. E., (ed.). *Encyclopedia of Cell Technology.* John Wiley Sons, Inc, Vol. 1: 1-12.
- LEE, J.; B. PARTHIER; M. LOBLER. 1996. Jasmonate signalling can be uncoupled from ABA signalling in barley – identification of jasmonate-regulated transcripts that are not induced by ABA, *Planta* 199: 625–632.
- LEE, J.; T. VOGT; B. HAUSE; M. LOBLER. 1997. Methyl jasmonate induces an O-methyl transferase in barley, *Plant Cell Physiol.* 38: 851–862.
- LI, J.; BRADER, G.; PALVA, T. 2004. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defence. *Plant Cell.* 16:319-331.
- LORENZO, O.; J. M. CHICO; J. J. SANCHEZ-SERRANO; R. SOLANO. 2004. Jasmonate-Intensive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defence responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, en prensa. 1: 2-6.
- LORENZO, O.; R. SOLANO. 2005. Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *biojournal.net* 1: 1-16
- LOU, Y.-G ; M-H. DU; T. C. J. TURLINGS ; J-A. CHENG; W-F. SHAN. 2005. Exogenous application of jasmonic acid induces volatile emissions in rice and enhances parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae*. *Journal of Chemical Ecology.* 31 (9).
- MAKSYMIEC, W.; Z. KRUPA. 2007. Effects of methyl jasmonate and excess copper on root and leaf growth. *Biologia Plantarum* 51(2): 322-326.
- MANUAL DE ASEGURAMIENTO de la Calidad. (2002). Laboratorio Bioplant Export. Micropropagación de *Spathyphillum* ‘Sensation’. Centro de Bioplasmas, UNICA Pp2.
- MASLENKOVA, L.; S. TONCHEVA; Y. ZEINALOV. 1995. Effect of abscisic acid and jasmonic acid (or JA-Me) on the photosynthetic electron transport and oxygen evolving reactions in pea plants. *BULG. J. PLANT PHYSIOL.* 21 (4): 48–55.
- McCONN, M.; J. BROWSE. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant, *Plant Cell* 8: 403–416.

- MILLER, A.; C. TSAI; D. HEMPHILL; M. ENDRES; S. RODERMEL; M. SPALDING. 1997. Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny. A new perspective on acclimatization. *Plant Physiology*. 119: 1195-1200.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15: 473-487.
- PELACHO, A. M; A. M. MINGO-CASTEL. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 97 (3): 1253-1255
- PEÑA-CORTÉS, H.; J. FISAHN; L.WILLMITZER. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4106–4113.
- PLOETZ, R. C. 1994. *Fusarium* kilt and IMTP Phase II. In the Improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. INIBAP. Montpellier France.57-69.
- POPOVA, L. P.; S.G. VAKLINOVA. 1988. Effect of jasmonic acid on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Plant Physiol.* 133, 210–215.
- PREECE, J. E.; E. G. SUTTER. 1991. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C.; R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic publishers. pp 71-93.
- REINBOTHE, C.; B. PARTHIER; S. REIBOTHE. 1997. Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. *Planta* 201 : 281–287.
- RODRÍGUEZ, R. 2005. Aclimatización de Caña de Azúcar (*Saccharum sp.* Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en Ciencias Agrícolas. Pp.100.
- RODRIGUEZ, Y.; M. MOSQUEDA; B. COMPANIONI; M. ARZOLA; O. BARRAS; M. C. PÉREZ; J.C. LORENZO; R. SANTOS. 2002. Bioassay For *in vitro* Differentiation of Pineapple Cultivar Resistance Levels to Herat Rot Disease. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 613-616.
- SANDERS, P. M.; P. Y. LEE; C. BIESGEN; J. D. BOONE; T. P. BEALS; E. W. WEILER; R. B. GOLDBERG. 2000. The Arabidopsis delayed dehiscence1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12: 1041-61.
- SANIEWSKI, M.; J. CZAPSKI. 1983. The effect of methyl jasmonate on lycopene and b-carotene accumulation in ripening red tomatoes. *Experientia (Basel)* 39: 1373–1374.
- SCHILMILLER, A. L.; G. A. HOWE. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 369-377
- SIGMA. 1992. *Cell Culture Catalogue*. Sigma chemical Company. ST. Louis. MO USA.pp. 216.
- STASWICK, P. E.; W. SU; S. H. HOWELL. 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6837–6840.
- STINTZI, A; J. BROWER. 2000. The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10625-10630.
- SUHITA, D.; A. S. RAGHAVENDRA; J. M. KWAK; A. VAVASSEUR. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-Induced stomatal closure. *Plant Physiology* 134:1536-1545.
- SWIATEK, A.; A. AZM; E. WITTERS; H. VAN ONCKELEN. 2003. Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. *BULG. J. PLANT PHYSIOL. SPECIAL ISSUE*: 172–178
- SWIATEK, A.; M. LENJOU; D. VAN BOCKSTAELE; D. INZE; H. VAN ONCKELEN. 2002. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol.* 128: 201-211.
- SWIATEK, A.; W. VAN DONGEN; E. L. ESMANS; H. VAN ONCKELEN. 2004. Metabolic fate of jasmonates in tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiol.* 135 (1): 161–172.
- THALER, J. S. 1999. Induced resistance in agricultural crops: Effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato Plants. *Environ. Entomol.* 28 (1): 30-37.

- TUNG, P.; T. S. HOOKER; P. A. TAMPE; D. M. REID; T. A. THORPE. 1996. Jasmonic acid: Effects on growth and development of isolated tomato roots cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Sciences*. 157 (6): 713-721.
- UEDA, J.; J. KATO. 1980. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Phys.* 66: 246–249.
- VAN DAM N. M.; T. M. BEZEMER. 2006. Chemical communication between roots and shoots. Towards an integration of aboveground and belowground induced responses in plants. En: Dicke, M.; W. Takken (eds.). *Chemical ecology: from gene to ecosystem*: 127-143.
- VAN DILLENWIJN. 1951. *Botánica de la Caña de Azúcar*. Ed. Revolucionaria. pp. 435.
- VAN HUYLENBROECK, J. M.; J. DE RIEK. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathyphillum* Petite plantlets. *Plant Science*. 111: 19-25.
- VAN HUYLENBROECK, J. M.; A. PIQUERAS; P. C. DEBERGH. 1998. Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*. 134: 21-30.
- VAN HUYLENBROECK, J. M.; A. PIQUERAS; P. C. DEBERGH. 2000. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*. 155: 59-66.
- VAN HUYLENBROECK, J. M.; P. C. DEBERGH. 1992. Acclimatization of micropropagated *Gerbera jamesonii* use of chlorophyll fluorescence. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. 57/4a: 1575-1579.
- WASTERNAK, C.; O. MIERSCH; R. KRAMELL; B. HAUSE; J. WARD; M. BEALE; W. BOLAND; B. PARTHIER; I. FEUSSNER. 1998. Jasmonic acid: biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Fett/Lipid* 100 (4-5): 139-146.
- WEIDHASE, R. A.; J. LEHMANN; H. KRAMELL; G. SEMBDNER; B. PARTHIER. 1987. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. *Physiologia Plantarum* 69 (1): 161–166.
- WITEK, A.; M. LENJOU, D. V. BOCKSTAELE, D. INZÉ; H. V. ONCKELEN. 2002. Differential Effect of Jasmonic Acid and Abscisic Acid on Cell Cycle Progression in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiol.* 128: 201-211.
- YANES, E.; J. L. GONZÁLEZ-OLMEDO; R. RODRÍGUEZ. 2000. A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Newslett. Pineapp. Int. Soc. Hort. Sc.*7: 24.
- YEN, C. C.; H. S. TSAY; J. H. YEHH; F. Y. TSAI; C. Y. SAHIIH; C. H.; KAO. 1995. A comparative study of the effects of methyl jasmonate and abscisic acid on some rice physiological processes. *J. Plant Growth Regul.* 14: 23–28.
- ZIV, M. 1995. *In vitro* acclimatization. En: Aitken- Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, pp 493 – 516.

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MICROBIANOS DE INTERÉS COMERCIAL PARA LA INDUSTRIA ALIMENTICIA

PARTE1: PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE INTERES COMERCIAL POR *ASPERGILLUS NIGER* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.

INTRODUCCIÓN.

La degradación de diversos materiales naturales llevada a cabo por microorganismos como *Aspergillus spp.* dá como resultado la producción de diversos metabolitos, los cuales son utilizados por el microorganismo para la degradación de los compuestos presentes en estos materiales. El interés en el metabolismo de los microorganismos ha ido en aumento debido a su importancia industrial para la producción de enzimas de una forma económica y con altos rendimientos mediante procesos de fermentación utilizando como sustrato principalmente diversos residuos agroindustriales, lo que tiene como ventajas la reducción de la contaminación generada por éstos y el mejoramiento de los costos de producción enzimática.

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos (Abarca, 2000). Ello conlleva a que este género de hongo produzca diversas sustancias, las cuales se han aprovechado en el sector industrial. Su papel destaca principalmente en su aplicación en la industria de alimentos, en donde se utilizan para la producción de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico y ácido láctico (Krishna, 2005; Ward, 1989), en la producción de numerosas enzimas (Krishna, 2005; Ward, 1989), entre las que destacan fitasas, xilanasas, celulasas, proteasas, amilasas y lipasas.

Las fitasas pertenecen a la subfamilia de las fosfatasas ácidas histidina, las cuales catalizan la hidrólisis de las uniones fosfomonoéster del fitato (sales de mio -inositol hexakisfosfato) o del mio - inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexakisdihidrógeno fosfato (ácido fítico), produciendo derivados penta, tetra, tri, di y monofosfato del mioinositol y fosfato inorgánico (Pi)(Duvnjak y Al - Asheh, 1994; Krishna, 2005). Los animales no rumiantes, como los cerdos, no son capaces de utilizar el fosfato presente en el ácido fítico que es el mayor reservorio de fósforo en vegetales, debido a la ausencia de fitasa en sus intestinos. Este ácido fítico es eliminado en las heces, generando contaminación del suelo y eutroficación del agua por fosfatos. Suplementando la dieta de los animales monogástricos con fitasas se reducen los efectos contaminantes ya que estos animales pueden tener una mayor biodisponibilidad de fosfato para sus necesidades fisiológicas (Roopesh *et al.*, 2006; Walsh y Casey, 2003).

Las endoxilanasas o xilanasas actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos $\beta(1\rightarrow4)$ entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacaridos de diferentes tamaños. El uso de las xilanasas ha sido propuesto para optimizar los procesos de clarificación de vinos y jugos, para extraer café y aceite de plantas (Krishna, 2005; Zhaoxin *et al.*, 2008), para la producción de hidrolizados de desechos agroindustriales y para la biodecoloración de la pulpa de papel (Zhaoxin *et al.*, 2008).

Las celulasas son capaces de degradar celulosa, un polisacárido formado por moléculas de glucosa, unidas entre sí por enlaces $\beta - 1,4$ (Krishna, 2005; Yamamoto *et al.*, 1995). Esta enzima se usa en la producción de glucosa y de etanol, también para extraer componentes del té verde, para producir jarabe de fructosa y para el tratamiento de materiales que contienen lignocelulosa (Blandino *et al.*, 2005; Krishna, 2005).

Las proteasas son enzimas de gran importancia debido a su rol fisiológico ya que son necesarias para los organismos vivientes tales como plantas, animales y microorganismos, así como a sus aplicaciones comerciales (Boer y Peralta, 2000). Además su producción abarca cerca del 60% del total de enzimas producidas industrialmente en el mundo (Krishna, 2005). Las aplicaciones de estas enzimas son muy variadas, destacándose su uso en la industria del cuero y la seda, en alimentos, medicamentos, también como componente de detergentes y para recuperar la plata usada en películas de rayos X, entre otras (Tunga *et al.*, 2003).

Las lipasas se encargan de hidrolizar triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y en algunos casos bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Algunas de estas enzimas son también capaces de catalizar reacciones de transesterificación e hidrólisis enantioselectivas (Pokomy *et al.*, 1994). Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas, animales y microorganismos (Scmid *et al.*, 1998).

Las amilasas catalizan reacciones de hidrólisis del almidón, lo cual es de gran importancia en diversas operaciones industriales, principalmente en la producción de alimentos y biocombustibles. Estas enzimas rompen la molécula de almidón en fracciones cortas (dextrinas), actuando directamente sobre los enlaces α -1,4 (Fennema, 2000).

Objetivo General

Detectar la producción de enzimas hidrolíticas de importancia industrial presentes en un extracto obtenido de la fermentación en estado sólido, empleando triticale como sustrato para la producción de fitasas.

MATERIALES Y METODOS

Propagación de la cepa:

Se utilizó la cepa 7A-1 de *Aspergillus niger*, la cual se activó en agar PDA por picadura y se incubó durante 5 días a 25° C.

Terminado el tiempo de incubación se realizó la cosecha de esporas utilizando 50 ml de Tween 80. Una vez obtenida la solución de esporas se procedió a colocar una alícuota de esta en una cámara de Neubauer para su conteo en el microscopio, obteniendo una concentración de 1.41×10^7 esporas/ml.

Finalmente se procedió a inocular 2.26×10^7 esporas/ml en caldo de activación (bactodextrosa y extracto de levadura) y se incubó durante 36 h a 25°C a 180 rpm para obtener una suspensión de micelio en forma de pellet con un tamaño aproximado de 3 a 5 mm.

Fermentación en estado sólido:

El sustrato para la FMS se preparó en mezclando dos partes de la fracción tamizada de triticale inmaduro (600 μ m) y una parte de la fracción sin tamizar, una vez obtenida esta mezcla se colocaron 50 gr de ella en cada matraz de 250 ml para su fermentación con una proporción tanto de la espiga como el tallo de cada cereal (25:75 espiga:tallo), haciéndolo por duplicado. Una vez colocado el sustrato en el matraz se le colocó el tapon para evitar la absorción de humedad durante su esterilización.

Se añadió sulfato de amonio 0.20 g/ml como fuente de nitrógeno y se inoculó cada caja con 25 ml de micelio en forma de pellets, para obtener así una humedad del 62%, los matraces fueron incubados por 4 días a una temperatura aproximada de 25°C, al cuarto día se realizaron las distintas pruebas de actividad enzimática.

Proceso de obtención del extracto crudo a partir de las muestras de SSF

La muestra del cultivo se mezcló con Tritón X-100 al 0.1% (1 g de muestra/5 ml de Tritón) y se agitó a 180 rpm y 25°C por 1 h. Después se centrifugó a 7,500 xG y 4°C por 10 min y el sobrenadante obtenido fue el extracto crudo que se empleó para los estudios posteriores

Detección de enzimas hidrolíticas.

- *Detección de actividad celulasa.* Se empleó el método de placa propuesto por Magnelly *et al.*(1997) basado en la degradación de la celulosa.
- *Detección de actividad xilanasas.* El método utilizado fue el de placa propuesto por Magnelly *et al.* (1997), en el cual las xilanasas se encargan de hidrolizar los enlaces internos $\beta(1\rightarrow4)$ del xilano.
- *Detección de actividad amilasa.* Se utilizó la técnica de Ponchon & Tardieux (1965) con modificaciones del método de placa propuesto por Magnelly *et al.*(1997) evaluando la hidrólisis del almidón.
- *Detección de proteasas.* Se empleó la técnica en placadescrita por Kim *et al.* (2007).
- *Detección de actividad fitasas.* Se utilizó el método en placa propuesto por Barnett *et al.* (1972), Samson *et al.* (1988), con algunas modificaciones propuestas por Yetti *et al.* (2010).
- *Detección de actividad lipasa.* Se utilizó la técnica en placadescrita por Kim *et al.* (2007) con modificaciones, en la cual las lipasas hidrolizan los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol.

Cuantificación de enzimas hidrolíticas.

- *Cuantificación de celulasas.* Para la determinación de celulasas se empleó el método propuesto por Miller (1959) modificado por Torres (2009).
- *Cuantificación de xilanasas.* Se usó el método propuesto por Miller (1959) modificado por Torres (2009).
- *Cuantificación de fitasa.* Para determinar la actividad fitasa se utilizó el método descrito por Harland y Harland (1980) modificado por Torres (2009).
- *Cuantificación de Proteasas.* Para determinar la actividad proteasa se usó el método descrito por Xu *etal.* (2000) modificado por Torres (2009).
- *Cuantificación de amilasas.* Se empleó el método colorimétrico descrito por Bernfeld (1955) para detectar α -amilasas.
- *Cuantificación de lipasas.* Se agregaron en un tubo 0.2 ml de extracto con 2.5 ml de solución tampón fosfato sódico 25 μ M y 20 μ l pmp 50 μ M la temperatura se mantuvo a 37 °C, se agitó en vortex para mezclar bien los reactivos y las lecturas se realizaron a 348 nm cada 5 minutos hasta los 25 min.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Detección de enzimas hidrolíticas.

Los resultados de la medición de los halos de hidrólisis de las diferentes enzimas analizadas se muestran en la Figura 1

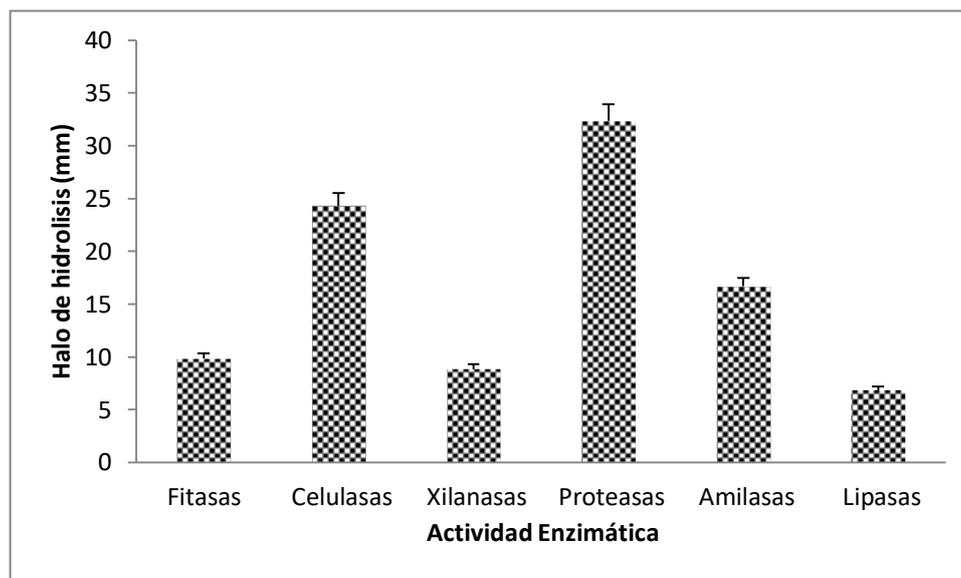


Figura 1. Halos de hidrólisis que presentó el extracto relacionado con las diferentes actividades enzimáticas evaluadas.

El mayor halo de degradación lo presentó la actividad proteasa seguido por las actividades celulasa y amilasa. Peteira *et al.* (2006), detectaron proteasa por *Pochonia chlamydosporia* en medio sólido, los cuales comparaban el medio que se utilizó en este trabajo con otros medios añadiéndoles colorantes, obtuvieron un resultado similar, que con el medio sin la necesidad del colorante si se lograba apreciar la degradación del halo.

Diorio *et al.* (2003), detectaron una actividad elevada de CM Casa entre los días 2 y 4 de desarrollo, actividad producida por *Saccobolus saccoboloides*, un resultado similar al presente en este trabajo. Diorio *et al.* (2003) detectaron una degradación similar debido a la presencia de amilasas a la obtenida en el presente trabajo pero por *Saccobolus saccoboloides* y al día 21. En cambio en el medio para detectar actividad de xilanasas el halo de inhibición no era muy notorio. Diorio *et al.* (2003) encontraron una degradación alta de xilanasas pero al octavo día, no al cuarto día.

Cuantificación de enzimas hidrolíticas.

Al cuarto día de la fermentación se llevó a cabo la cuantificación de las enzimas que presentaron degradación con los diferentes métodos de detección en placa (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad enzimática presente en un extracto de una SSF de triticale a las 72 horas.

Enzima	Cantidad	unidades	Act especifica. U/mg prot.
Celulasas	84.154±2.3	U/g	6731.811
Xilanasas	17.180±0.0002	U/g	1374.32525
Fitasas	0.376±0.007	U/ml	0.5838689
Lipasas	100.849±5.04	UI/ml	
Amilasas	0.007±0.006	U/ml	
Proteasas	0.363±0.139	U/ml	29.0857 U/mg prot.

La cuantificación de celulasa llevada a cabo mediante SSF mostró después de 4 días de cultivo, un nivel de enzima elevado (84.1542 U/g) en las condiciones de cultivo realizadas, resultado similar al obtenido por Kang *et al.*(2004), a partir de una SSF con *A. niger* sobre medio basado en salvado de trigo y paja de arroz (100 U/g) pero entre el quinto y sexto día de fermentación. Por otro lado, Costa *et al.* (2010) obtuvo un máximo de producción neta al segundo día (62,33 U/ gSs).

En la SSF en triticale después de 4 días presentó una actividad de xilanasas de 17.18 U/g, actividad que resultó un poco similar a la obtenida por Prasertsan *et al.* (1997) en SSF. Con *A. niger* en un medio que contenía torta de palmacon un 50% de humedad, obtuvieron una producción de 14,79 U/g solo que al tercer día de fermentación.

Para proteasas se encontró una actividad de 29.0857 U/mg proteína resultado que se encontró similar al de Torres (2009) el cual encontró una actividad de proteasa de 22,32 U/mg proteína, mediante SSF en pomaza de cranberry pero la presentó después de 14 días de cultivo, por lo tanto utilizando triticale como sustrato obtenemos un nivel mayor de actividad de proteasa en menos tiempo.

La cantidad de fitasa encontrada mediante SSF en triticale mostró después de 4 días del proceso de fermentación un nivel de enzima de 30.12 FTU/mg proteína en las condiciones de cultivo realizadas, un nivel mayor que el que encontró Torres (2009) el cual tuvo como resultado una cantidad de 13,58 FTU/mg proteína, procedimiento que se llevó a cabo mediante SSF en torta de canola, y ese resultado lo obtuvo al tercer día del proceso de fermentación, por lo tanto al utilizar triticale como sustrato para producción de fitasa obtenemos un mejor resultado.

CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se encontraron enzimas de interés industrial en un extracto obtenido del cuarto día de una fermentación en estado sólido por *Aspergillus niger* teniendo como soporte triticale. Bajo estas condiciones de cultivo se determinó que las lipasas presentan mayor actividad que el resto de las enzimas, de igual manera celulasa y xilanasas presentaron actividad enzimática característica, en cambio el resto de las enzimas cuantificadas (fitasas, proteasas, amilasas) presentaron muy poca actividad.

REFERENCIAS.

1. Abarca, M.L (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17 (3), S79 - S84.
2. Krishna, C. (2005). Solid State Fermentation Systems - An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology.*, 25, 1 - 30.
3. Duvnjak, Z. y Al - Asheh, S. (1994). Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnologica*, 14 (3), 223 - 233.
4. Roopesh, K., Ramachandran, S., Nampoothiri, K.M., Szakacs, G. y Pandey, A. (2006). Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology.*, 97, 506 - 511.
5. Walsh, G. y Casey, A. (2003). Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technology.* 86, 183 - 188.
6. Zhaoxin, L., Fengxia, L., Mei, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z. y Yi, W. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF - 98. *Bioresource Technology.*, 99, 5938 - 5941.
7. Yamamoto, K., Akiba, S., Kimura, Y. y Kumagai, H. (1995). Purification and characterization of a protease - resistant cellulase from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.*, 79 (2), 125 - 130.
8. Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C. y Cantero, D. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal.*, 26, 100 - 106.
9. Boer, C.G y Peralta, R.M. (2000). Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. *J. Basic Microbiol.*, 40 (2), 75 - 81.
10. Tunga, R., Shrivastava, B. y Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry.*, 38, 1553 - 1558.
11. Pokorny D, Friedrich J, Cimermam A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotech Lett* 1994;16:363.6.
12. Schmid RD, Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed* 1998;37:1608.33
13. Fennema, O. 2000. Química de los Alimentos. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1258p.
14. Kim, E. Y., Y. H. Kim, M. H. Rhee, J. C. Song, K. W. Lee, K. S. Kim, S.P. Lee, I.S. Lee, and S.C. Park. 2007. Selection of *Lactobacillus* sp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:111–117
15. Magnelli PE, Martinez A, Mercuri OA. Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. *Rev Arg Microbiol* 1997; 29: 210-214.
16. H. L ,Barnett, and B. B, Hunter.. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3° Ed. 1972, Burgess Publishing Company. USA.
17. R. A Samson, and E. S. van Reenen-Hoekstra. *Intoduction to Food- Borne Fungi*. 1988, Centraalbureauvoor Schimmelcultures. Wageningen.
18. Yetti Marlida , Rina Delfita , Neni Gusmanizar, and Gita Ciptaan. Identification Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungi. 2010. World Academy of Science, Engineering and Technology. Vol. 65. Pág. 1043-1044.
19. POCHON J & P TARDIEUX (1965) Técnicas de análisis en microbiología de suelo. Editorial Técnica e Investigación, Burgos, España.
20. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.*, 31 (3), 426 - 428.
21. Harland, B.F. y Harland, J. (1980). Fermentative reduction of phytase in rye, white, and whole wheat breads. *Cereal Chem.*, 57 (3), 226 - 229.
22. Marcelo Andrés Torres Montes. (2009) Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *aspergillus ficuum* mediante fermentación en medio sólido. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Págs. 16-28.

23. Taussky, H. y Shorr, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *Journal of Biological Chemistry.*, 202 (2), 675 - 685.
24. Xu, J., Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. y Moo - Young, M. (2000). Increased heterologous protein production in *Aspergillusniger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. *Biotechnol. Prog.*, 16, 222 - 227.
25. Bernfeld, P. (1955) *Methods in Enzymology* 1, 149-158.
26. Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillusawamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal* 26: 100-106.
27. Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., Kim, S. W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillusniger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 91: 153-156.
28. Marcia Costa, Marcelo Torres, Haroldo Magariños, Alejandro Reye. (2010) Production and partial purification of *Aspergillusficuum* hydrolytic enzymes in solid state fermentation of agroindustrial residues
29. Diorio *et al* (2003). Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina
30. Prasertsan, P., Kittikul, A. H., Kungphae, A., Maneesri, J., Oi, S. 1997. Optimization for xylanase and cellulose production from *Aspergillusniger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 555-559.
31. Belkis Peteira , Ivania Esteves y L. Hidalgo-Díaz (2006), Detección de proteasas producidas por *Pochonia chlamydosporia* en medio sólido, *Rev. Protección Veg.* Vol. 21 No. 3, 186-190

PARTE 2: SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA CON CAPACIDAD PROBIÓTICA PARA EL DESARROLLO DE UN ADITIVO ALIMENTARIO

INTRODUCCION.

La creciente demanda alimentaria genera la necesidad de crear nuevas tecnologías para la industria ganadera y avícola, ya que existen diversos factores que afectan la calidad del producto, principalmente la susceptibilidad de los animales a diversas enfermedades. El uso de antibióticos que han mostrado ser efectivos en la disminución de patologías y en la promoción del crecimiento animal (Milián *et. al.*, 2008).

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del hospedador” (Collins *et. al.*, 2009). La adición de ciertos microorganismos probióticos permite el mantenimiento de un determinado tipo de flora. Una vez ingeridos por el animal, y debido a su alta concentración, los microorganismos contenidos en el probiótico colonizan el intestino creando el ambiente necesario de flora útil y homogénea. Estas bacterias son fundamentalmente productoras de ácido láctico, lo que garantiza un pH en el intestino lo suficientemente bajo para evitar el desarrollo de patógenos. Además de presentar múltiples efectos que causan beneficios al animal hospedador (Sánchez *et. al.*, 2011).

La introducción de un probiótico es un evento natural que beneficia las interacciones naturales y complejas de la microbiota intestinal. Sus efectos positivos se reflejarán también en resultados zootécnicos, como son la ganancia de peso vivo y la conversión alimentaria (Milián *et. al.*, 2008).

Se presume que los probióticos modulan la flora intestinal indígena y mejoran la salud mediante mecanismos potenciales de acción, tales como inmunomodulación, antagonismo directo o exclusión competitiva. También pueden inhibir el crecimiento de patógenos entéricos al disminuir el pH luminal, la secreción de péptidos/proteínas bactericidas o la estimulación de la producción de defensinas (proteínas ricas en cisteína, efectoras de la inmunidad innata) por las células epiteliales. Además son capaces de bloquear la adhesión o la invasión de los patógenos al epitelio intestinal, bloqueando los receptores de la superficie epitelial o por la inducción de mucinas, moléculas de carbohidratos que forman una barrera a lo largo de la monocapa epitelial (Patterson *et. al.*, 2003).

Los probióticos están encaminados, fundamentalmente, a favorecer la microbiota intestinal, que es esencial para descomponer sustancias alimenticias no digeridas previamente y para mantener la integridad de la mucosa intestinal. También son importantes en la producción de vitaminas (sobre todo las del complejo hidrosoluble) y de ácidos grasos de cadena corta. Intervienen además, en la reducción del nivel de colesterol y triglicéridos en sangre. Al mantener la estabilidad intestinal, logran aumentar la respuesta inmune (Milián *et.al.*, 2008).

Ante el incremento de la demanda actual de la industria ganadera y avícola se deben reducir los costos de producción y mantenimiento, además de mejorar el producto implementando nuevas tecnologías para incrementar el aprovechamiento de los nutrientes y la protección inmunológica de los animales ante posibles enfermedades enterogástricas.

El empleo de los prebióticos como aditivos zotécnicos representa una posible solución a los problemas antes mencionados. Sin embargo hacen falta mayores estudios en cuanto a la elección del mejor microorganismo probiotico a emplear como aditivo alimentario y conocer si éste actúa de forma adecuada.

OBJETIVO.

Selección de una cepa nativa con capacidad probiótica similar a las cepas comerciales.

MATERIALES Y METODOS

ETAPA I.

Reactivación de las cepas *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis*.

Se reactivaron cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis* proporcionadas por el Departamento de Investigación de Alimentos de la UA de C en medio MRS (Rogosa 1951), ya que este medio es selectivo en el aislamiento de lactobacilos, y por favorecer el crecimiento de *Bacillus subtilis*, además evita el crecimiento excesivo de mohos y estreptococos. Todos los microorganismos fueron incubados en anaerobiosis a 37°C por 2 días.

Activación de las cepas *Bacillus Clausii* y *Lactobacillus acidophilus* cepa *boucardii* de productos comerciales

Se activaron las dos cepas de productos comerciales y se valoró su capacidad prebiótica, los microorganismos se activaron de la siguiente manera:

Para el aislamiento del probiótico *Bacillus clausii* se agregaron 20 µl de la suspensión Enterogermina (Sanofi aventis) en 5 ml de caldo MRS en un tubo vacutainer rojo, se extrajo el aire por medio de una jeringa de 5 ml por el tapón de goma para generar la anaerobiosis. El *Lactobacillus acidophilus* cepa *boucardii* se extrajo del medicamento Lacteol fort (CARNOT). Se vació el contenido de un sobre

de 5 g en 1 ml de Tween 80 al 0.1%. De la mezcla anterior se tomaron 20 µl y se procedió a cultivar como se describió anteriormente.

Ambas cepas se incubaron por 2 días a 37°C.

ETAPA II

Evaluación de la capacidad probiótica de las cepas reactivadas.

Actividad antagónica de las cepas.

Preparación de sobrenadantes de cultivo. Se siguió la metodología descrita por Schillinger (1989) con algunas modificaciones. Las cepas fueron incubadas en caldo MRS durante 24 horas a 37°C en anaerobiosis. Posteriormente la solución libre de células se obtuvo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min, seguido de una filtración del sobrenadante a través de un poro 0.2 µm de tamaño.

Detección de actividad antagonista. Para la detección de la actividad antagonista se realizó una prueba de difusión en agar que fue una modificación descrita Schillinger *et. al.* (1989). Las condiciones anaerobias se utilizaron para minimizar la formación de peróxido de hidrógeno y ácido acético. Para la realización del ensayo, placas de agar MRS fueron cubiertas con 7 ml de agar MRS suave (0.7% de agar en caldo MRS) inoculado con 300 µl de un cultivo de 12 h de *E. coli*. Se realizaron pozos de 3 mm de diámetro en estas placas, y a cada pozo se le añadieron 30 µl del sobrenadante del cultivo de la cepa a ensayar.

Las placas, con sus pozos sin sellar, fueron incubadas anaeróticamente durante 24 horas a 37°C y se examinaron posteriormente para observar las zonas de inhibición.

Actividad enzimática.

Se estudió la producción de diferentes enzimas (amilasas, proteasas, lipasas y fitasas) por las cepas probióticas utilizando las técnicas descritas por Kim y col. (2009) con algunas modificaciones hechas por Lertworapreecha *et. al.* (2011). Todos los cultivos se incubaron en anaerobiosis a 37°C.

Prueba de hidrofobicidad de la superficie celular.

La hidrofobicidad de la superficie de las bacterias se valorará según la técnica de Rosenberg *et.al.* (1980).

Prueba de tolerancia a sales biliares.

La habilidad de sobrevivir a la acción de las sales biliares es una necesidad básica de los microorganismos probióticos, y es generalmente uno de los criterios para seleccionar cepas probióticas potenciales. Para ello se empleó la técnica descrita por (Garriga et al., 1998).

Prueba de tolerancia a pH ácido.

Se siguió la metodología propuesta por Ávila *et. al.* (2010) con algunas modificaciones en los volúmenes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Actividad antagónica de las cepas.

Este ensayo demuestra la habilidad de las cepas para prevenir la colonización de *E. coli* en el intestino de los animales. Las 5 cepas probadas, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus clausii* y *Bacillus subtilis*, mostraron inhibición del crecimiento de *E. coli* (Tabla 1), lo que es comparable con los resultados reportados por Kizerwetter-Swida y Binek (2005) quienes encontraron

que los lactobacilos tienen efecto antibacterial en contra de *E.coli*. Además Taheri *et. al.* (2009) reportaron que el grado de inhibición de los probióticos es debido al pH en que se encuentre el sobrenadante, por lo que demuestra que hay una inhibición en el pH 6.8.

Bacillus clausii presentó la mayor actividad antibacterial en comparación con las otras cepas, alcanzando el doble del diámetro del halo del resto de las cepas.

Diversos estudios demuestran la eficacia de la ingesta de esporas de *Bacillus* para la exclusión competitiva de *E. coli* (Guo *et. al.*, (2006); La Ragione *et. al.*, 2001).

Prueba de hidrofobicidad para la superficie celular

Debido a que la colonización es una característica importante para una cepa probiótica se realizó este ensayo por la estrecha relación que presenta con la adhesión por parte de las bacterias al epitelio del intestino del animal. Esto significa que un porcentaje alto de hidrofobicidad muestra una buena adhesión al mucus intestinal (Taheri y col., 2009). Los resultados a este ensayo son presentados en la Tabla 1, donde se observa que 2 de las 5 cepas presentan una hidrofobicidad mayor al 90% lo que significa buena adhesión al epitelio intestinal. *B. subtilis* fue la cepa nativa con mayor porcentaje de hidrofobicidad (90.2%), lo que concuerda con lo reportado por Wiencek y col. (1990). Los valores obtenidos para las cepas de *Lactobacillus ssp* son comparables a lo mostrado por Kmet y Luchini (1997) quienes reportaron una hidrofobicidad de los lactobacilos no mayor a 70%, sin embargo esto no ocurre del todo con el *Lactobacillus acidophilus* quien presentó una mayor porcentaje (75%) debido probablemente a la utilización de diferentes solventes orgánicos para realizar la prueba o a la utilización de una cepa mejorada por ser de origen comercial, según con lo reportado por Vadillo-Rodríguez *et. al.* (2004).

Tabla 1. Prueba antibacterial y porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas analizadas.

	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. clausii</i>	<i>B. subtilis</i>
Actividad antagónica*	7mm	7mm	8mm	14mm	7 mm
% de hidrofobicidad	57.4	66.8	90.9	49.7	90.2

*probada contra cepas de *E.coli*.

Tolerancia al pH

Se midió la tolerancia de las 5 cepas hacia diferentes pH, característica importante para su sobrevivencia durante su paso al intestino, ante ambientes desfavorables como el pH del estómago (pH 2), el intestino delgado (pH 6.2) y grueso (pH 6.3), esta resistencia tiene la finalidad de que llegue al sitio en el que brindará los beneficios al animal (Church y Pond, 1974).

La mayoría de las cepas presentó tolerancia al pH 2 (Tabla 2), con excepción de *L. plantarum* lo que infiere una total inhibición del microorganismo a pH ácidos. Bajo pH 3.5 se observó crecimiento por parte de los *Lactobacillus*; sin embargo no se detecta crecimiento en ninguno de los *Bacillus*, mientras que para el pH 6 todas las cepas muestran crecimiento, lo que indica una buena supervivencia a este pH.

Esto es concordante con lo reportado por Klayraung *et. al* (2008) que observaron tolerancia a pH a 2 ,3 y 7 de parte de los *Lactobacillus spp*.

Tabla 2. Cuenta en placa¹ de las 5 cepas ensayadas después de mantenerse 90 min en las condiciones del ensayo a 37°C por 24 h en anaerobiosis.

	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. clausii</i>
supervivencia en pH*	0	3.8	4.1	3.9	4.1
supervivencia en pH**	4.1	4.1	4.0	nd	nd
supervivencia en pH***	3.7	3.4	3.1	3.4	3.6
tolerancia en sales biliares ²	3.5	3.3	3.5	3.6	+++
tolerancia en sales biliares ³	nd	nd	nd	+++	nd

*se utilizó el pH de 2 para medir la tolerancia acida dejándolo 90 min.

**se utilizó pH de 3.5 para medir la tolerancia acida dejándolo 90 min

*** Se utilizó pH de 3.5 para medir la tolerancia acida dejándolo 90 min

¹ La cuenta se convirtió a log₁₀ ufc/ml; el medio en el que se realizó el crecimiento de las cepas es el agar MRS.

²Se utilizó una concentración de 0.1 % de sales biliares para observar la tolerancia.

³ Se utilizó una concentración de 0.3 % de sales biliares para observar la tolerancia

+++ Pruebas positivas con crecimiento superior notable.

Tolerancia a las sales biliares.

Junto a los medios ácidos fuertes en el estómago, los microorganismos probióticos por vía oral tienen que defenderse contra la sal de bilis en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, la tolerancia a sales biliares se considera que es una de las propiedades importantes que se requieren para la alta supervivencia y, como consecuencia de una actividad probiótica.

No existe un consenso sobre la concentración precisa a la que la cepa seleccionada debe ser tolerante. La concentración fisiológica de las sales biliares en el intestino delgado es de entre 0,2 y 2,0% (Gunn, 2000). En este estudio se midió la tolerancia de las 5 cepas hacia una concentración de sales biliares de 0.1% (Tabla 2). Todas las cepas crecieron, lo que indica la tolerancia a la sales biliares a esta concentración, tal como lo descrito por Klayraung (2008). Por otra parte, no se observó crecimiento de la mayoría de las cepas a la concentración de 0.3%, con excepción de *Bacillus subtilis* (Tabla 2). Esto es concordante con el trabajo realizado por Guo (2005) que muestra que *Bacillus subtilis* es tolerante a la sales biliares de 0.1 % y 0.3% de concentración.

Actividad enzimática

Se midió la actividad enzimática de las 5 cepas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus clausii* y *Bacillus subtilis*, Los resultados de la actividad enzimática se resumen en la Tabla 3.

El tamaño del halo que rodeaba al pocillo con el sobrenadante en la placa da un aproximado de los niveles de producción de las enzimas extracelulares de las cepas. Todas las cepas mostraron halos de hidrólisis de proteínas similares (Tabla 3), al igual que actividad fitasa, a excepción de *B. clausii*, lo que concuerda con lo reportado por Kim *et. al.* (2007) respecto a la producción de proteasas y fitasas por

cepas de lactobacilos. Kumar *et.al.* (2012) obtuvieron fitasas a partir de *Bacillus subtilis*, lo que explica la presencia de halo de hidrólisis para esta cepa.

En cuanto a la producción de lipasas, ninguna de las cepas produjo un halo de hidrólisis en el medio con aceite de oliva, probablemente debido a la falta de lipasas extracelulares, lo que coincide con lo descrito por Oterholm *et. al.* (1968), quienes no encontraron producción de lipasas extracelulares por cepas de lactobacilos. En cuanto a la falta de actividad lipasa por parte de *Bacillus subtilis* y *Bacillus clausii* posiblemente se deba a la pérdida de actividad durante las 48 horas de incubación, ya que según Lesuisse *et.al.* (1993) la producción de lipasa de *Bacillus* decrece a partir de 12 h de crecimiento celular. Asimismo no se detectó producción de amilasa en ninguna cepa eso posiblemente a una baja producción de la enzima debido a que las condiciones que se practicó el ensayo no fueron las óptimas. Las pruebas fueron realizadas a 37°C en un pH de 6.8 según con lo reportado por Martine Cham *et. al.* (1983) donde se encontró producción muy baja de algunas cepas de *Lactobacillus*.

Tabla 3. Actividad enzimática cualitativa de las 5 cepas (Diámetro en mm)

Ensayo	CEPA				
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. clausii</i>
Actividad fitasa	7	8	7	8	Nd ¹
Actividad proteasa	11	11	9	13	11
Actividad amilasa	nd	nd	nd	nd	nd
Actividad lipasa ²	nd	nd	nd	nd	nd
Actividad lipasa ³	nd	nd	nd	nd	nd

¹no detectado.

² Se utilizó una concentración de 0.1 % de sales biliares para observar la tolerancia

³ Se utilizó una concentración de 0.3 % de sales biliares para observar la tolerancia

CONCLUSIONES.

Las cepas de origen silvestre presentan características similares respecto a las cepas de origen comercial, además se plantea la elección de *Bacillus subtilis* como el mejor probiótico silvestre debido a su resistencia los a diferentes pH y sales biliares, además de presentar características de adhesión al intestino y producción de enzimas que ayuden a favorecer la digestión, el sistema inmune y que en general resulte ser benéfico para el animal monogástrico.

REFERENCIAS.

1. Ávila J., et al. (2010) "capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja" 20:2; 161-169.
2. Champ Martine *et.al.*(1983) "Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop" *Journal of Applied Bacteriology*,55,487-493
3. Collins James W., ET. al. (2009). Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. Prebiotics and Probiotics Science and Technology p. 1123-1182.

4. Church, D. C., and W. G. Pond. 1974. The gastrointestinal tract and nutrition. Pages 25–4 in *Basic Animal Nutrition and Feeding*. Albany Printing. Albany, NY.
5. Denkova Z., et al. (2007) “the effect of the immobilization of probiotic lactobacilli in chitosan on their tolerance to a laboratory model of human gut” p 442-450.
6. Ehrmann, M. A., P. Kurzak, J. Bauer, and R. F. Vogel. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.* 92:966–975.
7. Garriga, M., M. Pascual, J. M. Monfort, and M. Hugas. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol.* 84:125–132.
8. Gunn JS. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes Infect.* 2000; 2: 907–913.
9. Guo X. et.al. (2006). Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. National Key Laboratory on Animal Nutrition, China Agricultural University.
10. Klayraung S. et. al. (2008) “Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Thai Traditional Food” *Sci Pharm.*; 76: 485–503.
11. Kim, E. Y., Y. H. Kim, M. H. Rhee, J. C. Song, K. W. Lee, K. S. Kim, S. P. Lee, I. S. Lee, and S. C. Park. 2007. Selection of *Lactobacillus* ssp. PSC101 that produces active dietary enzymes such as amylase, lipase, phytase and protease in pigs. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53:111–117.
12. Kizerwetter-Swida, M., and M. Binek. 2005. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Pol. J. Microbiol.* 54:287–294.
13. Kmet V., Lucchini F. (1997) Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immunol Med Mic* 19:111–4.
14. La Ragione R.M., Casula G., Cutting S.M., Woodward S.M. (2001). *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* 070:K80 in poultry. *Vet Microbiol.* 79: 133-142.
15. LESUISSE Emmanuel y col.(1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216, 155-160.
16. LutfulKabir S. M. (2009). The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 3531-3546.
17. MILIÁN, Grethel; PÉREZ, M. y BOCOURT, R.. Empleo de probióticos basado en *Bacillus* spp y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola [en línea]* 2008, vol. 42 [citado 2012-06-28]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=193015494001>. ISSN 0034-7485.
18. Mukesh Kumar D. J. et al.(2012). Extracellular production of Phytases by a Native *Bacillus subtilis* Strain. *Scholars Research Library Annals of Biological Research*, 3 (2):979-987.
19. Oterholm, A., Z. J. Ordal, and L. D. Witter. 1968. Glycerol ester hydrolase activity of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.* 16:524–527.
20. Patterson J. A., et. al.(2003). Application of Prebiotics and Probiotics in Poultry Production. Department of Animal Sciences, Purdue University *Poultry Science* 82:627–631.
21. Reniero R., Cocconcelli P., Bottazzi V., Morelli L. (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation promoting factor. *J Gen Microbiol.* 138: 763 – 768.
22. Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:929–937.
23. Sánchez, Lilian et al. (2011) Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidato a probióticas. *Rev Salud Anim.* [online]., vol.33, n.3, pp. 154-160. ISSN 0253-570X.

24. Schillinger U., Lucke F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 55: 1901-1906.
25. Taheri H. R. et. Al.(2009). "Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic" *Poultry Science* 88 :1586–1593.
26. Vadillo-Rodríguez Virginia et. al. (2004). Dynamic Cell Surface Hydrophobicity of *Lactobacillus* Strains with and without Surface Layer Proteins. *Journal Of Bacteriology*, Oct. 2004, p. 6647–6650.
27. Vargas E. M. (2004). producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno. *Revista de ingeniería # 20 Facultad De Ingeniería Universidad de los Andes* p 23-33.
28. WIENCEK K. MARK y col. (1990) "Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* Spores" *Applied and Environmental Microbiology* p. 2600-2605

PARTE 3: ESTABILIZACIÓN Y ESTUDIO DE DIGESTIBILIDAD

Esta etapa se encuentra aún en estudio. Los resultados preliminares obtenidos se informan a continuación.

Una de las ventajas del secado por aspersión es el prolongar la vida útil del biocompuesto que se está encapsulando. La temperatura, la humedad, la luz, entre otros factores afectan la estabilidad disminuyendo la actividad del producto.

La microencapsulación le puede brindar esta estabilidad al producto y así poder tener productos competitivos en los mercados actuales.

El uso de residuos de la industria lechera como el suero de leche ha demostrado que es un material favorable para ser usado como material encapsulante, y en combinación con la goma guar, un polímero que también se ha usado como material de encapsulación, han demostrado ser una buena alternativa como materiales encapsulantes.

Las fitasas son un grupo de enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas que van a hidrolizar el fósforo presente en los cereales que conforman las dietas de animales monogástricos, y que se encuentra en forma de fitato, un compuesto anti nutricional que afecta la biodisponibilidad del fósforo. Llevando a la necesidad de la adición de fósforo inorgánico proveniente de recursos no renovables. Esto afecta en términos económicos y de contaminación, ya que este fósforo es excretado en las heces de los animales causando eutroficación del suelo.

Es por esto que se está llevando a cabo un estudio de estabilidad para los microcapsulados de suero de leche y goma guar obtenidas bajo las condiciones seleccionadas en etapas anteriores, en donde se encapsuló fitasa producida de *Aspergillus niger* a una temperatura de 110 °C, un bombeo del 10% y una concentración de goma guar de un 1%.

Este estudio consideró los contenedores en lo que actualmente se comercializan para tomar la simetría del mismo en pequeños contenedores. Los tubos Eppendorf para simular los contenedores tipo botes, y las bolsas tipo Ziploc para los productos comercializados en empaques o bolsas. El tiempo del estudio fue de ocho semanas y considerando tres temperaturas diferentes: 4°C, lo que representaría un almacenamiento en condiciones de refrigeración, 25°C para una temperatura ambiente y 35°C la cual se recomienda en estudios de estabilidad para evaluar su comportamiento a temperaturas un poco elevadas.

El estudio demostró que para los dos tipos de contenedores utilizados, la actividad fitasa remanente es estable hasta en 85% para los 4°C, un 70% de actividad remanente para 25°C y un 55% para 35°C. Sin embargo, se observó el mismo comportamiento para los dos contenedores evaluados respecto a la actividad enzimática.

Debido a que en estudios anteriores se observó que los microencapsulados pasaban de un tono beige a una ligera coloración amarilla, se evaluó el color en las muestras almacenadas sobre las ocho semanas. Se observó que a diferencia de la actividad enzimática, el color si varió en ambos contenedores. Para el caso de los contenedores tipo Eppendorf, el color se mantiene en el mismo valor para las tres temperaturas evaluadas. No obstante, para las bolsas tipo Ziploc, el color variaba semana a semana. Esto se relaciona con las reacciones de Maillard, en la cual se oxida los azúcares presentes en la muestra, que en este caso es lactosa, y se torna a estas tonalidades.

Esta diferencia en el cambio de color relacionado con el tipo de empaque puede estar dada por el material y diseño del contenedor. Los tubos Eppendorf cierran más herméticamente que las bolsas y el material con el que están fabricados disminuye la porosidad del mismo y evita que la humedad del ambiente promueva este tipo de reacciones, situación que no sucede con las bolsas tipo Ziploc.

Cabe resaltar que al comparar el comportamiento del color de las muestras y la actividad enzimática, no se observó la relación entre el color y la actividad, lo cual nos lleva a considerar que cualquier tipo de contenedor es viable para su almacenamiento, sin dejar a un lado la necesidad algún estudio que pueda evaluar factores diferentes con el propósito de considerar dichos factores en la estabilidad del producto.

Por todo esto, se pudo observar que el suero de leche en combinación con la goma guar, proveen una buena estabilidad bajo condiciones de refrigeración posterior a las ocho semanas de evaluación.

Además de esto, es importante un estudio de digestibilidad de los microencapsulados para poder predecir hasta cierto punto, la viabilidad del proyecto y evaluar las propiedades protectoras del suero de leche y de la goma guar.

Por esta razón, se utilizó una simulación de un sistema gastrointestinal *in vitro* para animales monogástricos mediante el uso de enzimas gástricas como α -amilasa, pepsina y enzimas pancreáticas, ajustando el pH para simular las condiciones salivales, estomacales e intestinales durante 120 minutos y tomando muestra en diferentes puntos del experimento.

Los resultados observados mostraron que para la fase intestinal aún era posible retener el 90% de la actividad enzimática, lo cual representa una ligera pérdida pero que se puede considerar como mínima. Durante la fase estomacal existe la posibilidad de que enzimas proteolíticas como la pepsina, desnaturalicen la proteína inactivando la misma. Por tal motivo, observar esta protección durante esta fase y hasta la fase intestinal, donde se liberará para poder liberar fósforo, permitiría tener una buena digestibilidad y biodisponibilidad de la misma.

Actualmente se ha utilizado la goma guar en la liberación de principios activos hasta la fase intestinal y en algunos casos el colon. Esto demuestra el potencial de la goma guar para brindar protección bajo condiciones gastrointestinales. Además, la proteína de suero de leche asilada se ha utilizado para encapsular y han demostrado que es viable su uso bajo estas condiciones. Estudios han demostrado que el suero de leche con la goma guar crean una cubierta alrededor de la enzima que evita el desdoblamiento de la proteína y a su vez, las cavidades en las estructuras

cuaternarias y terciarias son protegidas, evitando así el efecto de enzimas proteolíticas sobre la proteína.

Este estudio nos permitió tener resultados que podemos tomar en cuenta en una aplicación *in vivo* en animales monogástricos, y de este modo poder inferir si que los microencapsulados pueden ser usados en animales monogástricos como una alternativa para el aprovechamiento del fósforo presente en los cereales.

UTILIZACION DE BIOPRODUCTOS EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

DISEÑO DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS ORALES UTILIZANDO BIOPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AZUCARERA

INTRODUCCIÓN

La industria de los derivados de la dextrana ha tenido en los últimos años un desarrollo vertiginoso fundamentalmente debido a la utilización de estos productos en el tratamiento clínico-terapéutico de animales y humanos. Los elevados precios en el mercado internacional convierten a estos productos en una línea importante cuyo principal objetivo es el desarrollo de tecnologías de síntesis que permitan la producción dirigida y controlada de dextranas de pesos moleculares preestablecidos. En este sentido una de las limitantes mayores es disponer de cantidades suficientes de dextransucrasa purificada que permita la síntesis controlada de la dextrana mediante procesos económicos.

El conjunto de trabajos comprendidos en este resultado constituye un aporte al conocimiento dentro de la temática de las dextranas y más aún dentro de los polímeros como vía de aumentar el valor agregado de estos y de revitalizar la industria de los derivados del azúcar (Bell García A, en prensa).

El **dextrano** es un subproducto de la industrialización de la caña de azúcar. Es un polisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa unidas en cadenas de longitud variable (de 10 a 150 kilodaltons)(Figura 1). Es usado como antitrombótico (antiplaquetario) y para reducir la viscosidad de la sangre. El dextrano es sintetizado a partir de la sacarosa por bacterias ácido lácticas, de las cuales las más conocida es *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 2). (Vettori et al, 2012; Rodriguez Jimenez, 2005)

El hierro en estado libre es sumamente reactivo, por lo que en general se encuentra ligado o encapsulado por proteínas; además existen múltiples y muy finos mecanismos para regular su absorción y utilización celular. Es fundamental para el buen funcionamiento del organismo. Su carencia nutricional produce anemia ferropénica frecuentemente en niños, ancianos y embarazadas. La depleción de hierro disminuye la capacidad muscular, baja las defensas y la capacidad de atención.

Las medidas preventivas deben iniciarse precozmente y entre ellas se destacan el aporte complementario de hierro en mujeres gestantes y la alimentación exclusiva con leche materna durante 6 meses. Los lactantes sanos y con peso correcto tienen suficientes reservas de hierro a partir del nacimiento, para sus necesidades durante aproximadamente los primeros 4 a 6 meses de vida. Desde ese período el niño depende de la dieta para mantener un balance adecuado de hierro. Por lo tanto, en la mayoría de los casos la anemia ferropénica en el lactante y en la primera infancia está determinada por una dieta insuficiente o mal balanceada. El hierro tiene que incrementarse considerablemente después de los 4 a 6 primeros meses de vida, la adición de polvos de micronutrientes en alimentos complementarios de preparación casera o el suministro de gotas de hierro son las estrategias preventivas más eficaces en lactantes destetados.

Para estos pacientes, se debe buscar la forma de administrar Fe de manera agradable y aceptable, a través de una formulación eficaz, segura, estable y fácil de administrar.

En los últimos años hay una tendencia mundial orientada a mejorar tecnológicamente diferentes polímeros acomplejados al hierro, lo que revolucionó las técnicas ya existentes y aumentó las posibilidades de aplicación en el tratamiento clínico de animales y humanos.

El complejo dextrano-hierro en inyectables se emplea para la prevención y terapia de anemia causada por deficiencia de hierro en mamíferos. Dicho complejo garantiza que el hierro sea asimilado en forma de ión férrico, de fácil y rápida absorción.

En trabajos previos se informó la elaboración de inyectables con dextrana-Fe como principio activo para el tratamiento de anemia en cerdos (Michelena y col, 2000). Actualmente, se estudia el uso de este complejo como vehículo eficaz de hierro, en estado férrico, en humanos.

Algunos autores analizaron las propiedades fisicoquímicas de dextranos naturales y comerciales en formulaciones farmacéuticas sólidas (Gil y col, 2008) y demostraron su estabilidad y compatibilidad con diferentes principios activos y otros excipientes.

La pre formulación implica la realización de diferentes estudios destinados a conocer la compatibilidad de los componentes de una forma farmacéutica, que frecuentemente está supeditada a exigencias clínicas. Todos los componentes se eligen de manera intencionada para obtener el producto final, de acuerdo a su función específica determinada.

El objetivo del presente trabajo fue diseñar y formular preparaciones farmacéuticas anti anémicas sólidas y líquidas de uso oral a partir de dextrano, subproducto de la industrialización de la caña de azúcar. Controlar las características de los productos según exigencias de Farmacopeas nacionales e internacionales. Estudiar la estabilidad de dichos productos a corto y mediano plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El complejo dextrano-Fe se obtuvo por la vía química a partir de los subproductos de la caña de azúcar. La caracterización se realizó por difracción de rayos X, espectrometría infrarroja y de Mossbauer. El dextrano se determinó por el método Fenol- Sulfúrico. El Fe se valoró según USPXXIV empleando Absorción Atómica.

Se realizaron estudios de preformulación en formas farmacéuticas sólidas y líquidas, analizando interacciones principio activo y excipientes.

Se elaboraron jarabes y gotas orales empleando el complejo dextrano-Fe como vehículo de sales férricas. En las formulaciones se empleó agua estabilizada adicionada con distintos excipientes autorizados. Se realizaron controles físicos, químicos y microbiológicos según los siguientes parámetros: características organolépticas, pH, contenido de dextrano y hierro, estudios de estabilidad física-química a corto y mediano plazo y de liberación del Fe. Como controles positivos se utilizaron productos disponibles en el comercio.

Se diseñaron y obtuvieron comprimidos por granulación por vía húmeda y en tableteadora excéntrica a nivel semiindustrial. Se utilizaron excipientes (disgregantes, aglutinantes, diluyentes, lubricantes) autorizados. Se determinaron los controles físicos y farmacotécnicos (diámetro, espesor, peso, dureza, disgregación, friabilidad, disolución)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las formas farmacéuticas orales, jarabes y gotas tienen sabor dulce y frutado, teniendo en cuenta las preferencias de los niños; poseen pH 4 a 6; no presentan sedimentación ni alteración física luego de 100 días de preparación. Los ensayos microbiológicos revelaron ausencia de *Pseudomonas*, *Enterobacterias* y *Escherichia coli*, según lo exigido por Farmacopeas. La Tabla 1 muestra las formulaciones realizadas comparadas a las formulaciones comerciales.

FORMULACIONES	CONCENTRACION DE HIERRO	pH	Caracteres organolépticos
FORMULACION 1	2,99 %	2,4	Color ámbar Olor frutado
FORMULACION 2	3,39 %	3,6	Color ámbar Olor frutado
FORMULACION 3	4,08 %	5	Color ámbar Olor frutado
FORMULACION 1 patrón	2,40 %	2,2	Color ámbar Olor frutado
FORMULACION 2 patrón	2,49 %	2,45	Color ámbar Olor frutado
FORMULACION 3 patrón	5,13 %	4,77	Color ámbar Mentolado

Tabla 1. Formulaciones comerciales y propuestas

Los preparados se mantuvieron estables física-química y microbiológicamente durante el período de control. Los ensayos microbiológicos revelaron ausencia de *Pseudomonas*, *Enterobacterias* y *Escherichia coli*, según lo exigido por Farmacopeas y se mantuvieron estables microbiológicamente durante el período de ensayo (Tabla 2).

FORMULACIONES	MICROBIOLÓGICOS	FÍSICOS
FORMULACION 1	SIN CRECIMIENTO	SIN SEDIMENTO
FORMULACION 2	SIN CRECIMIENTO	SIN SEDIMENTO
FORMULACION 3	SIN CRECIMIENTO	SIN SEDIMENTO
FORMULACION 1 patrón	SIN CRECIMIENTO	SIN SEDIMENTO
FORMULACION 2 patrón	SIN CRECIMIENTO	SIN SEDIMENTO
FORMULACION 3 patrón	SIN CRECIMIENTO	SIN SEDIMENTO

Tabla 2. Controles microbiológicos

Los comprimidos elaborados con las primeras muestras de complejo, presentaban un olor característico a fenol (sustancia incorporada como conservante de la solución). Los controles de calidad físicos y químicos se muestran en la Tabla 3

Lote N°	Caracteres organolépticos			Uniformidad de peso		Forma - Tamaño		Pruebas de dureza		Disgregación
	Olor	Sabor	Color	Desv individual %	Desv lote %	Diámetro	Espesor	Friabilidad	Resistencia	
1	Persistente a fenol	Amargo	Marrón con puntos blancos	2 comp. exceden el 5% y ninguno el 10%	2,71	Uniforme 1,220 cm	Uniforme 0,530 cm	Pérdida 2,25 g% (1 comp. se rompe)	5,00 Kg fuerza	8,5 min.
2	Persistente a fenol y frambuesa	Amargo	Marrón con puntos blancos	Más de 2 comp. exceden el 10 %	4,14	Uniforme 1,220 cm	Uniforme 0,530 cm	Pérdida 2,46 g% (1 comp. se rompe)	8,88 Kg fuerza	10 min.
3	Leve a fenol y frambuesa	Amargo	Marrón con puntos blancos	Ningún comp. excede el % especificado	2,50	Uniforme 1,220 cm	Uniforme 0,530 cm	Pérdida 2,20 g%	7,00 Kg fuerza	15 min.

Tabla 3. Controles físico químicos

Posteriormente se mejoró la metodología de obtención del complejo y se elaboraron otros lotes, cuyos controles se registran en Tabla 4. Se observó que en cuanto al diámetro y espesor son constantes con respecto a los lotes anteriores, desaparece el olor a fenol y se disminuye la pérdida por disgregación (Figura 1).

PESO Do%	DIÁMETRO	ESPESOR	DUREZ A	FRIABILIDAD	DISGREGACIÓN
2,71%	1,220 cm	0,530 cm	5,6 Kg fuerza	menor al 1%	8-9 min

Tabla 4

En cuanto a las formulaciones líquidas orales diseñadas con el complejo dextrano-Fe tienen la misma naturaleza química y el producto elaborado no difiere estructuralmente de los patrones de referencia.

Los estudios de estabilidad entre 40°C y 60°C hasta 180 días fueron estables tanto para la concentración de Dextrano, aproximadamente 100% como para la del Hierro de aproximadamente 5%.

El complejo posee 93 mg/ml de Dextrano y 76 mg/g de Fe. En base a los resultados obtenidos, se diseñó una formulación conteniendo 36 mg de Fe elemental por comprimido, cuya posología permite administrar hasta tres tomas diarias (Figura 2).

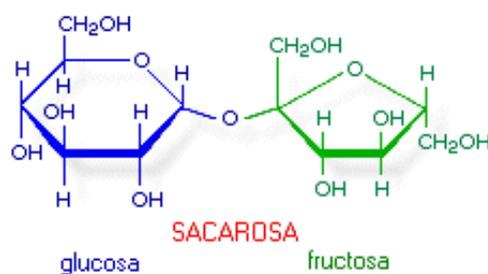


Figura 1: Estructura química del Dextrano



Figura 2: *Leuconostoc mesenteroides*

CONCLUSIONES

Se puede inferir que el complejo dextrano-Fe, vehiculizado en formas farmacéuticas orales líquidas y sólidas constituye una alternativa para el tratamiento de las anemias ferropénicas y sería un medicamento eficaz, estable y seguro. Se continúan los ensayos de estabilidad a largo plazo.

Por otro lado cabe destacar que constituiría un aprovechamiento de subproductos de la industria azucarera, generando fuentes de trabajos para Tucumán y otras regiones de Argentina y Cuba.

REFERENCIAS

- Blanco, M.D., Bernardo, M. V., Gómez, C., Muñiz, E., Teijón J.M. (1999) *Biomaterials*, 20 1919.
- Buckley P. (1992) Dextran 50 years. *Abstract Journal. Internat. Scientific Sevices*. 26 th annual volume, 1/1992.
- Chu, B. (1995) *Langmuir*, 11 414-421.
- Ecobichon D.J. *The Basic of Toxicological testing* CRC. Press Inc., USA, 1992.
- *Farmacopea Argentina* VI Ed. 1978.
- *Farmacopea Argentina* VII Ed. 2003.
- Ferrofax, Crookes Exports Limited, Basingtoke Hampshire, England, 1977.
- Iraizoz A., Bilbao O., Barrios M.A., (1990), *Tecnología farmacéutica*, 359, 363-4
- Michelena G., Bell A., Carrera E., Reyes A., Iraizoz A. (2000) *Acta Farm. Bonaerense* (4): 285-8
- Pavanetto, F., Conti, B., Genta, I., Giunchedi, P. (1992) *Int. J. Pharm.*, 84 151.
- Sáez V., Hernández E., Sanz L. (2004) *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(2).
- Remington's *Farmacología*. 17 ed. México, DF: Editorial Médica Panamericana, 1987; t 2: 2240-4.
- Sánchez, A., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. (1993) *Int. J. Pharm.*, 99 263.
- *United State Pharmacopoeia Convention*. 24 Ed.
- Eddy Castellanos Gil, Antonio Iraizoz Colarte , Abdelsam El Ghzaoui , Denis Durand , Jean Louis Delarbre , Bernard Bataille *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68 (2008) 319–329
- Genaro Alfonso. R, *Reminton's Pharmaceutica Sciences*. Editorial Mack Publishing Company, 18 edición, USA 1990. Pag: 1435-1450.

ANEXO 1

PROGRAMA Y RESOLUCION CURSO DE ACTUALIZACION Y POSGRADO

PRODUCCIÓN DE BIOPRODUCTOS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL

Objetivo:

El objetivo principal de este curso es actualizar los avances sobre los procesos y aplicaciones industriales de los bioproductos, especialmente en las industrias agroquímica, agroalimentaria y farmacéutica.

Profesor:

Dra. Georgina Michelena Álvarez (Investigador Titular, Profesor Titular)

Doctorado en Ingeniería Química, por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba.

Coordinadores:

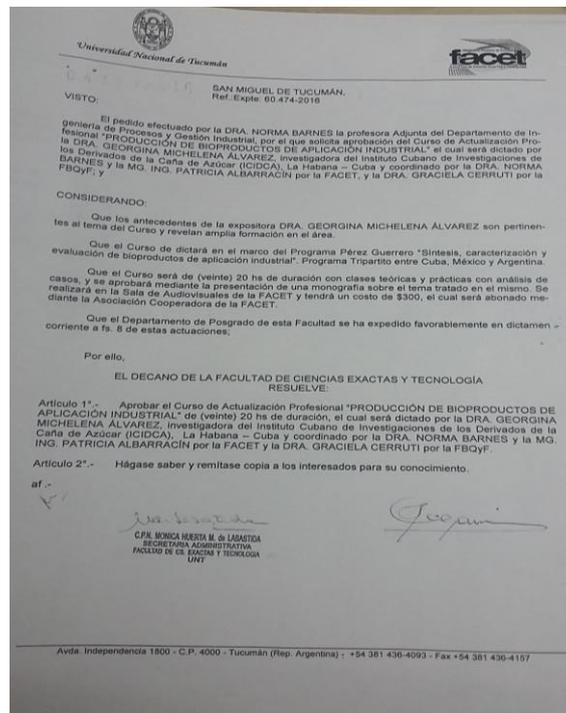
Dra. Graciela Cerutti – FBQyF - UNT

Mg. Ing Patricia Albarracín – FACET - UNT

Ing. Norma Barnes – FACET – UNT

Lugar de Realización:

FACET – Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología - UNT



PROGRAMA DEL CURSO	
Primer día - Miércoles 18 de Mayo	
Hora	Actividad
2:00 p.m. – 2:30 p.m.	Apertura. Presentación Dra. Graciela Cerutti. Palabras de inicio.
2:30 p.m. – 4:00 p.m.	Aplicación de los microorganismos a la industria. Sistemas biológicos usados en la microbiología industrial y biotecnología. Producción de bioproductos.
4.00 p.m. – 4.30 p.m	Receso
4:30 p.m. – 5:30 p.m.	Presentación ICIDCA – Líneas de Investigación Sesión de preguntas y respuestas. Discusión en colectivo.
Segundo día – Jueves 19 de Mayo	
Hora	Actividad
2:00 p.m.– 3:30 p.m.	Producción biotecnológica de dextranas a partir de la industria azucarera.
3:30 p.m.–4:00 p.m.	Receso
4:00 p.m. – 5:30 p.m.	Obtención y aplicación de microorganismos eficientes
	Sesión de preguntas y respuestas..
Tercer día – Viernes 20 de Mayo	
Hora	Actividad
2:00 p.m.– 5:30 p.m.	MESA PANEL BIOPRODUCTOS Dra. Georgina Michelena Mg. Ing Patricia Albarracin – Conservación de frutas y enriquecimiento proteico Esp. Farm. Bettina Heredia Alemán – Biofertilizante de liberación lenta con dextrano-urea Esp. Farm. Paola Muratore – Formulaciones farmacéuticas con dextrana-hierro
	Sesión de preguntas y respuestas.
5:30 p.m. - 6:30 p.m.	Cierre del curso.

ANEXO 2

INFORME Y CERTIFICADO DE LA VISITA A CIEMAT, ESPAÑA.

Mg. Ing. Patricia Maria Albarracin

Participantes: Mg Ing Patricia M. Albarracin- Dra. Ing. Dora Paz-

Período: 03/11/16 al 20/11/16.

Motivo del viaje:

- Visitar el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas CIEMAT, (de Madrid, España), sus laboratorios y plantas pilotos en la sede central.
- Visitar el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER), situado en Soria, en la provincia de Castilla, España.
 - Presentación de las actividades de Investigación y servicios realizadas en el marco de los Proyectos Perez Guerrero
 - **Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas CIEMAT**

Fuimos recibidos por la Dra Mercedes Ballesteros, de la División de Energías Renovables, junto con el Dr. José María Sanchez, quienes nos acompañaron en nuestra estancia en CIEMAT y en CEDER.

El CIEMAT es un organismo público de investigación adscrito al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través de la Secretaría de Investigación, Desarrollo e Innovación, de España. Está focalizado en los ámbitos de la energía y el medioambiente, y las tecnologías relacionadas con ambos. Ocupa una posición intermedia en la cadena que va desde la creación de conocimiento hasta la aplicación industrial, busca servir de puente entre la I+D+i y los objetivos de interés social.

Atiende 12 aéreas científicas-técnicas: energías renovables y ahorro energético; fisión nuclear; fusión nuclear; combustibles fósiles (valorización energética); partículas elementales y astropartículas; biología y biomedicina; medioambiente; radiaciones ionizantes; instrumentación científica y física médica; caracterización y análisis de materiales; ciencias de la computación y tecnología informática, y estudios de sistemas energéticos y medioambientales.

La sede del CIEMAT en Madrid concentra en sus 71.000 m² la mayoría de los recursos humanos y materiales del Organismo y buena parte de los diferentes laboratorios e instalaciones experimentales empleados en los proyectos de I+D+i. Alberga a la Dirección General, las áreas de gestión y servicios comunes y las infraestructuras de apoyo a las actividades del Centro.

Para la ejecución de sus actividades científico-técnicas, el CIEMAT cuenta con un conjunto de recursos que gestiona de forma eficiente, siendo aprox 1300 los empleados del Centro, a diciembre de 2015, integrada por personal funcionario, personal laboral fijo, personal contratado y personal en formación.

Durante la estancia, se visitó fundamentalmente los Laboratorios de Biotecnología, la Unidad de ENERGÍAS RENOVABLES Y AHORRO ENERGÉTICO, y la Unidad de COMBUSTIBLES FÓSILES (VALORIZACIÓN ENERGÉTICA), ambas del Departamento de Energía.

Los laboratorios de Biotecnología desarrollan tareas de investigación y servicios a terceros, cuentan con equipamiento de última generación como cromatografos liquido-liquido, gaseosos y espectrómetros de masa donde se pone énfasis fundamentalmente a proyectos medioambientales.

La Unidad de ENERGÍAS RENOVABLES es una de las áreas de investigación más importantes del CIEMAT, donde se trabaja para lograr el desarrollo y optimización de nuevas tecnologías energéticas sostenibles y más respetuosas con el medioambiente. Se investiga sobre las principales formas de energía renovable: energía solar (fotovoltaica y concentración solar), energía eólica, bioenergía (biocarburantes y biomasa sólida) y energía marina así como en eficiencia energética y ahorro energético y tecnologías emergentes como las pilas de combustible.

En la Unidad de COMBUSTIBLES FÓSILES (VALORIZACIÓN ENERGÉTICA) se analiza la combustión y la gasificación, con objeto de lograr procesos más limpios y eficaces mediante el desarrollo de sistemas avanzados de combustión y gasificación, así como el análisis, la separación y la limpieza de los gases procedentes de la gasificación. Estos procesos se aplican a combustibles fósiles (carbón), biomasa y residuos (procedentes de procesos industriales, aguas residuales, etc.).

En gasificación se ha realizado la caracterización físico-química y térmica de residuos (bagazo de cerveza de dos productores de cerveza diferentes, astilla de pino de un productor de pellets y fangos) procedentes de empresas ubicadas en la Comunidad de Madrid para evaluar su viabilidad como combustibles. Además, se han analizado las posibilidades de utilización de los gasificadores disponibles para los ensayos con dichos residuos, seleccionando el de lecho fluidizado burbujeante como el más adecuado.

Centro de Desarrollo de Energías Renovables CEDER

Fuimos recibidos por la Ing. Raquel Ramos, jefa de la unidad de Procesos de Conversión Térmica, y por el Ing. Miguel Fernández Llorente, responsable del Laboratorio de Caracterización de Biomasa.

El Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER), ubicado a escasos kilómetros de Soria capital, nace en la década de los ochenta como centro nacional para la investigación, desarrollo y fomento de las energías renovables. Dependiente del CIEMAT y adscrito al Departamento de Energía de este Organismo Público de Investigación, está considerado como centro pionero en España en el campo del aprovechamiento energético de la biomasa, además de ser referencia nacional y europea en energía minieólica.

El CEDER, como entidad territorial del CIEMAT en Soria, así como instrumento prestador de servicios a entidades públicas y privadas del ámbito empresarial y de investigación, lleva más de veinte años facilitando, potenciando y atrayendo actividades de I+D+i. En las cerca de 700 hectáreas con las que cuenta se han construido más de 13.000 m² de edificaciones ocupadas por laboratorios, servicios administrativos y generales, naves de plantas piloto y almacenes. Este conjunto de instalaciones tecnológicas avanzadas, todas ellas dotadas de los equipos e instrumental adecuado, están destinadas a la realización de actividades de investigación aplicada en 3 áreas relacionadas con las energías renovables:

- Energía de la biomasa y residuos sólidos
- Energía minieólica

- Arquitectura bioclimática y Eficiencia Energética en la Edificación

La Unidad de Biomasa realiza en el CEDER actividades de investigación aplicada en cultivos energéticos, evaluación de recursos, logística de suministro y almacenamiento, así como en la preparación y acondicionamiento de la biomasa. En las instalaciones del Centro hay distintas áreas destinadas a campos de cultivo, una planta de tamizado y trituración, una instalación de secado de biomasa por convección forzada y otra para la producción de pellets, plantas piloto con equipos de gasificación en lecho fluido a escala industrial, así como un laboratorio dotado del equipamiento necesario para la caracterización físico-química y energética de la biomasa, considerado en la actualidad como Laboratorio de referencia nacional en la materia.

En la figura siguiente se muestra la planta piloto de gasificación de 100 kWt.



Planta piloto de gasificación con lecho burbujeante de 100kWt (CEDER)

El Laboratorio de Caracterización de Biomasa, además de prestar apoyo a los diferentes proyectos de investigación que se desarrollan en el CEDER, analiza también un número importante de muestras remitidas por otras instituciones públicas y privadas. Además se verifican, estandarizan y desarrollan nuevos métodos para la caracterización energética de la biomasa y los biocombustibles, lo que le convierte en unos de los más avanzados del país en este campo.

Sus actividades se centran en tres líneas de investigación principales:

- Desarrollo de métodos de caracterización energética, física y química de la biomasa y en especial de los biocombustibles sólidos.
- Investigación de toma de muestra y calidad de la biomasa y de su ceniza.
- Investigación y desarrollo experimental sobre la sinterización y formación de escorias de la biomasa en procesos termoquímicos, a nivel laboratorio, planta piloto y planta industrial.

La Unidad de Procesos de conversión Térmica, es la unidad responsable de la puesta a punto y operación de las plantas de combustión y gasificación.

Entre los objetivos de esta Unidad están generar conocimiento para apoyar el desarrollo de sistemas avanzados de combustión y gasificación, con especial énfasis en los sistemas basados en tecnologías de lecho fluidizado. Esta

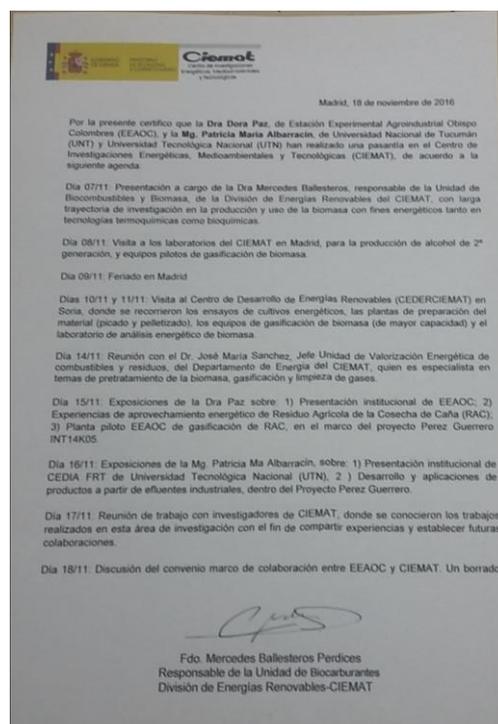
tecnología, en sus diferentes variantes, permite la combustión o gasificación de una gran variedad de combustibles (carbón, residuos biomásicos, residuos industriales, residuos líquidos) de manera "limpia" y eficaz, lo que hace que se esté usando de forma creciente para la eliminación, respetando los límites medioambientales establecidos, de todo tipo de residuos con aprovechamiento energético.

Presentación de Mg Albarracín

Se realizó una reunión con investigadores del área Biomasa y Mediambiente del CIEMAT. Primero la Mg. Albarracín hizo la presentación institucional de los avances realizados en UNT y UTN, mostrando los planes de investigación propios y los proyectos externos que lleva adelante, con especial énfasis en los Proyectos Perez Guerrero, cuyos fondos han financiado esta misión. Se describió los datos de las experiencias realizadas con *Candida Utilis* en un reactor de laboratorio con cascara de naranja como lecho sólido y alimentado con vinaza como nutriente, y los resultados de las aplicaciones de microorganismos eficientes en diferentes mezclas con esteres de sacarosa como coberturas de frutas y hortalizas. La Dra Mercedes Ballesteros , especialista en biotecnología , ofreció su apoyo técnico para caracterizar genéticamente a los microorganismos usados en los diferentes procesos .

También se discutió una posible cooperación en base a tareas de investigación conjunta sobre tratamientos de aguas residuales .

Mg. Ing. Patricia M. Albarracín



ANEXO 3



ANEXO 4



ANEXO 5

ACUERDO DE COLABORACIÓN QUE CELEBRAN, POR UNA PARTE, EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN, ARGENTINA, REPRESENTADO POR DRA. GRACIELA INES CERUTTI, POR LA OTRA, EL CUERPO ACADÉMICO DE NANOBIOCIENCIA (UACOH-CAC-91) REPRESENTADO POR SU RESPONSABLE DRA. ANNA ILINÁ

ANTECEDENTES

1. El el Grupo de investigación de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, es un grupo de investigación consolidado que cuenta con varios investigadores reconocidos por su productividad académica.
2. El CA de Nanobiociencia es un CA Consolidado que forma parte de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A. de C. Los miembros de CA de Nanobiociencia son: Dra. Elda Patricia Segura Ceniceros, Dr. José Luis Martínez Hernández, Dra. Mónica Lizeth Chavez González, Dra. Mayela Govea Salas, M.C. Maria Elena Ramos Aguiñaga, Dra. Anna Iliná y colaborador Dr. Rodolfo Ramos Gonzalez.
3. Que ambos grupos de trabajo tienen experiencia: en el manejo de sistemas biológicos y procesos biotecnológicos por lo que pretenden realizar las investigaciones enfocadas a su aplicación para la solución de problemas de la sociedad, así como formar recursos humanos a nivel de licenciatura y Postgrados.

“LAS PARTES” suscriben el presente Acuerdo Específico de Colaboración al tenor de las siguientes:

CLÁUSULAS

PRIMERA. OBJETIVO.

El presente convenio tiene como objetivo el acuerdo de la cooperación entre el el Grupo de investigación del Centro de Investigación de Ingeniería Ambiental (CEDIA) de la Facultad Regional Tucumán de la U.T.N., Argentina, y el CA de Nanobiociencia de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A. de C.

Meta general:

Promover la investigación en conjunto, cooperar en el uso de infraestructura, formar los recursos humanos de calidad, apoyando los PE de licenciatura y Postgrado.

SEGUNDA. ACTIVIDADES

- Participar en las investigaciones en conjunto enfocadas a aprovechamiento de recursos naturales renovables para el desarrollo de nuevos productos y procesos.
- Seguir en cooperación proporcionando el apoyo mutuo en la formación de recursos humanos mediante asesoría, arbitraje de los trabajos de tesis, así como uso de infraestructura.

- Promover colaboración y formación de redes de colaboración a nivel nacional e internacional.

TERCERA. VIGENCIA

El presente acuerdo tendrá una vigencia de cinco años a partir del día 16 de Noviembre de 2017. La duración del presente acuerdo de colaboración podrá extenderse de común acuerdo por las partes.

CUARTA. MODIFICACIONES

El presente acuerdo entrará en vigor a partir de la fecha establecida en la tercera clausula del presente instrumento, pudiendo adicionarse o modificarse de común acuerdo por las partes, siempre que quien tenga una nueva propuesta avise a su contraparte con 15 días de anticipación.

Enteradas las partes del contenido y alcance legal de este instrumento, se firma de conformidad y por duplicado, en la Ciudad de Saltillo, Coahuila, al 17 de Noviembre del año dos mil diecisiete.

POR EL GRUPO DE FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN, ARGENTINA

POR CA DE NANOBIOCIENCIA


DRA. GRACIELA INES CERUTTI
Miembro y Representante del Grupo


DRA. ANNA ILINÁ
Responsable de CA de Nanobiociencia

ANEXO 6



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Noviembre 14, 2017
Saltillo, Coahuila, México

THE PEREZ-GUERRERO TRUST FUND FOR ECONOMIC AND TECHNICAL COOPERATION
AMONG DEVELOPING COUNTRIES

"SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF BIOPRODUCTS OF INDUSTRIAL
APPLICATION (SCEBIA)"

"SINTESIS, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE BIOPRODUCTOS DE APLICACION
INDUSTRIAL (SCEBIA)"



MINUTA DE LA SEGUNDA REUNION DE TRABAJO

Entidad Ejecutora:
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia – Universidad Nacional de Tucumán (FBQyF-UNT).

Contraparte Extranjera:
Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC), México. Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Cuba

1

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP25280, Coahuila, México.





UNIVERSIDAD AUTONOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Se convoco a la segunda reunión de trabajo a las entidades que participan en el proyecto "SINTESIS, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE BIOPRODUCTOS DE APLICACION INDUSTRIAL (SCEBIA)" para llevarse a cabo el día 14 de noviembre del 2017 en la Ciudad de Saltillo, Coahuila, México, siendo anfitrión la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC).

La reunión se llevo a cabo en la Sala Internacional del Campus Arteaga, de la UAdeC. En la reunión participaron:
Dra. Graciela Cerutti (Arg)
M.C. Patricia Albarracin (Arg)
Ing. Mónica Coronel (Arg)
Dr. José Luis Martínez (Mex)
Dra. Mayela Govea (Mex)
Dr. Tirso Flores (Mex)

La reunión se dio inicio con la presentación de los participantes, para posteriormente presentar los resultados de los avances hasta la fecha del proyecto, abordándose de la siguiente manera:

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP25280, Coahuila, México.





UNIVERSIDAD AUTONOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

La Dra. Graciela Cerutti hizo un resumen de los puntos que se avanzaron y que conforman el segundo reporte del proyecto.

- a) Producción de metabolitos a escala de laboratorios
- b) Estudio y caracterización de los metabolitos
- b) Estudio de diferentes sustratos para la producción de metabolitos.

En cada uno de los punto se indicaron los puntos más fuertes del proyecto, y también se revisaron algunos aspectos posibles a fortalecer. De igual forma se presentaron los últimos resultados por la M.C. Patricia Albarracin de Argentina y el Dr. José Luis Martínez de México, el cual se comprometió a enviar los aportes más sobresaliente de sus avances a la fecha.

En el último de los puntos se abordó sobre la situación financiera, se revisaron las partidas ejercidas y finalmente se abordó por los miembros las posibles moviidades del grupo mexicano" a la Argentina, y se estableció como posible lugar de reunión la Habana, Cuba, reunión que previamente se consulto con la Dra. Georgina

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP25280, Coahuila, México.





UNIVERSIDAD AUTONOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Michelena del ICIDCA y con la cual vía electrónica se realizó una reunión y se converso sobre los avances del proyecto.

Se concluye la reunión y firman los participantes.

Dra. Graciela Cerutti _____

M.C. Patricia Albarracin _____

Ing. Mónica Coronel _____

Dr. José Luis Martínez _____

Dra. Mayela Govea _____

Dr. Tirso Flores _____

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP25280, Coahuila, México.



ANEXO 7



14 de Septiembre del 2018

Saltillo, Coahuila

CONSTANCIA DE REUNIÓN

En el marco de Acta de Acuerdo de Colaboración entre Cuerpo Académico de Nanobiociencia y la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, se reunieron, por parte de grupo mexicano, Dra. Anna Iliná, Dr. José Luis Martínez Hernández, Dra. Elda Patricia Segura Ceniceros, Dra. Mónica Chávez González, Dra. Mayela Govea Salas, Dr. Rodolfo Ramos González, y por parte de grupo de Argentina, la Dra. Graciela Inés Cerutti, profesora titular de la Cátedra de Garantía de Calidad de Drogas y Medicamentos, con la participación de Dra. Norma Graciela Barnes, Ing. Biomédica Constanza Arreguez e Ing. Daniel Borkosky.

Durante la reunión se evaluaron los avances de las investigaciones en conjunto realizadas en el periodo 2017 y 2018. Se establecieron las acciones a seguir y responsabilidades de cada parte. Se consideró importante la práctica de intercambio de ideas, uso optimizado de infraestructura, así como papel de colaboración para la formación de recursos humanos con la experiencia en la investigación.

Se extiende la presente constancia en la ciudad de Saltillo, Coah., a los catorce días del mes de septiembre del año dos mil dieciocho, para los fines y usos legales que a los interesados convengan.

Atentamente

“En el bien fincamos el saber”

Dra. Anna Iliná

Responsable del CA de Nanobiociencia

UACOAHCAC-091

Dr. José Luis Martínez Hernández

Subcoordinador de Coordinación de Estudios
de Postgrado e Investigación de la UA de C.

Dra. Graciela Inés Cerutti

Responsable del Proyecto

Dra. Norma Graciela Barnes

Profesora participante del proyecto

Bosilésari Verónica Carrasco C. Ing. Ana Cárdenas Velasco, Coloma
Reposón, Saltillo, CP25280, Coahuila, México
Tel. +52-56-57-52 y 415-70-15 Fax 415-99-84

@quimicasuadec Facultad de Ciencias Químicas UACoC
<http://www.quimicas.uadec.mx>

ANEXO 8



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE COAHUILA



FACULTAD
DE CIENCIAS
QUÍMICAS



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE COAHUILA



FACULTAD
DE CIENCIAS
QUÍMICAS

Septiembre 11, 2018
Saltillo, Coahuila, México

THE PEREZ-GUERRERO TRUST FUND FOR ECONOMIC AND TECHNICAL COOPERATION AMONG
DEVELOPING COUNTRIES

"SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF BIOPRODUCTS OF INDUSTRIAL
APPLICATION (SCEBIA)"

"SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOPRODUCTOS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL
(SCEBIA)"



MINUTA DE LA REUNION FINAL DE TRABAJO

Entidad ejecutora:
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia – Universidad Nacional de Tucumán (FBQyF-UNT).

Contraparte extranjera:
Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC), México. Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Cuba

1

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP23280, Coahuila, México.
Tels. 415-15-57-52 y 415-70-15 Fax 415-95-34

<http://www.uapec.edu.mx>



@QuimicoUadec Facultad de Ciencias Químicas UAdeC

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP23280, Coahuila, México.
Tels. 415-15-57-52 y 415-70-15 Fax 415-95-34

<http://www.uapec.edu.mx>



@QuimicoUadec Facultad de Ciencias Químicas UAdeC

El Dr. José Luis Martínez Hernández convocó a la reunión final de trabajo a las entidades que participan en el proyecto "SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BIOPRODUCTOS DE APLICACIÓN INDUSTRIAL (SCEBIA)" para llevarse a cabo el día 11 de septiembre del 2018 en la Ciudad de Saltillo, Coahuila, México, siendo anfitrión la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC).

La reunión se llevó a cabo en la Sala de Reuniones del Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UAdeC. En la reunión participaron:

Dra. Graciela Cerutti (Arg)

Dra. Norma Barnes (Arg)

Ing. Daniel Borkosky (Arg)

Ing. Constanza Arreguez (Mex)

Dr. José Luis Martínez (Mex)

Dra. Anna Iliná (Mex)

Dra. Mayela Govea (Mex)

La reunión se dio inicio con la presentación de los participantes, para posteriormente presentar los resultados de los avances hasta la fecha del proyecto, abordándose de la siguiente manera:

En primera instancia se da lectura a los avances que presentó la contraparte cubana que es representada por la Dra. Georgina Michelena del ICIDCA, que no estuvo presente por motivos de fuerza mayor.



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE COAHUILA



FACULTAD
DE CIENCIAS
QUÍMICAS

Destacándose los resultados referente a la caracterización y bioensayos realizados en el control de la producción de bioproductos para la agricultura y de fungicidas bioquímicos para el control de fitopatógenos.

En el caso de la contraparte mexicana se presentan los últimos resultados relacionados con la producción, recuperación y estabilización de fitasa, como producto para su aplicación en la industria agroalimentaria, bajo el título "Producción de metabolitos microbianos de interés comercial para la alimentación animal".

La Dra. Graciela Cerutti por otro lado hizo un resumen de los puntos que concluyeron relacionados con la síntesis, caracterización y pruebas de campo de biofertilizantes orgánicos de liberación controlada obtenidos a partir de bioproductos.

Durante el proyecto de colaboración en el año 2018, se realizaron dos actividades académicas de difusión, uno en Tucumán, Argentina realizado en el mes de junio y otro más en Septiembre en Saltillo, Coahuila, donde se presentaron resultados alcanzados durante la ejecución del proyecto.

Se concluye la reunión y firman los participantes.


Dra. Graciela Cerutti


Dra. Mayela Govea


Dra. Anna Iliná


Dr. José Luis Martínez


Dra. Norma Barnes


Ing. Constanza Arreguez


Ing. Daniel Borkosky

Boulevard Venustiano Carranza e Ing. José Cárdenas Valdés, Colonia República, Saltillo, CP23280, Coahuila, México.
Tels. 415-15-57-52 y 415-70-15 Fax 415-95-34

<http://www.uapec.edu.mx>



@QuimicoUadec Facultad de Ciencias Químicas UAdeC

III – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE

Resumen de la situación financiera.

III – INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE: Rendición de Gastos Proyectos Financiados con Fondos Perez Guerrero								
(a) Institución: FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA UNT								
(b) Nro de Proyecto: 14/INT/K06 Nombre del Proyecto: "SINTESIS, CARACTERIZACION Y EVALUACION DE BIOPRODUCTOS DE APLICACION INDUSTRIAL (SCEBIA)"								
(c) Período de rendición: <u>(desde) Marzo 2016</u> <u>(hasta) OCTUBRE 2018</u>								
(d) Moneda: PESOS ARGENTINOS								
RESUMEN GENERAL								
			Actividad 1	Actividad 2	Actividad 3	Actividad 4	Total Proyecto	
Total Recibido			304321,29	0,00	152.040,00	0,00	456.361,29	
Gastos del proyecto			429.892,79	0,00	107.952,16	0,00	537.844,95	118%
Saldo a devolver al PNUD / (Saldo a recibir)			-125.571,50	0,00	44.087,84	0,00	-81.483,66	-18%
Responsable del Proyecto:			 Dra. Graciela J. Cerutti Cdt. Profesora Titular de Drogas y Medicamentos FB Q y F - UNT					
Firma:								
Nombre: DRA. GRACIELA INES CERUTTI								
Fecha: 01 DE NOVIEMBRE DE 2018								

En archivos pdf adjuntos al presente INFORME TECNICO FINAL, se adjunta el Informe Administrativo Contable de Ejecución emitido por el Sr. Secretario de Control de Gestión Económica Financiera de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT, CPN Christian Simesen de Bielke.

Nombre: Dra. Graciela Inés Cerutti
Jefe de Proyecto

Firma:
Fecha: 01/11/2018



Dra. Graciela J. Cerutti
Profesora Titular
Cdt. Profesora Titular
de Drogas y Medicamentos
FB Q y F - UNT