

EFFECTO DEL ESTRÉS OSMÓTICO SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE PLÁNTULAS DE ALBAHACA *Ocimum basilicum* L.

Guerra-Cantú J.A.^a, Moreno-Limón S.^{a*}, Cárdenas-Ávila M.L.^b, González-Luna A.R.^a,

Salcedo-Martínez S.M.^a, Sánchez-Sánchez A.A.^a

Universidad Autónoma de Nuevo León. U.A.N.L.^aDepartamento de Botánica.
Departamento de Biología Celular y Genética Pedro de Alba s/n C.P. 66450. San Nicolás
de los Garza, N.L., México. *sergio.moreno@uanl.edu.mx

RESUMEN

Se prepararon medios de cultivo adicionados con Polietilenglicol (PEG) y solución salina (NaCl) correspondientes a los tratamientos de sequía (2%, 4% y 6% PEG 3350) y salinidad (25mM, 50mM y 75mM NaCl), en los cuales se colocaron semillas de albahaca previamente desinfectadas. Se colocaron en una Cámara Bioclimática (Lab-Line) bajo condiciones de 12 h luz y 27°C. A los 30 días de su siembra se evaluó el porcentaje de germinación, altura de plántula, longitud de raíz, número de hojas, tamaño de la hoja, peso fresco, peso seco y contenido de prolina libre como indicador de estrés. El porcentaje de germinación y el número de hojas no presentan diferencia significativa entre los tratamientos de sequía y salinidad. Mientras que en el resto de los parámetros, se presentó diferencia significativa entre los tratamientos. Evidenciando que las plántulas expuestas a deficiencias hídricas responden positivamente en su desarrollo a estas condiciones de estrés.

ABSTRACT

Medium cultures were prepared with polyethilenglicol (PEG) and saline solution (NaCl) corresponding to the treatments of drought 2%, 4% y 6% with PEG 3350 and for salinity 25mM, 50mM y 75mM NaCl, in wich disinfected basil seeds were placed. The cultures were located in a bioclimatic chamber (Lab-Line) under conditions of 12 light hours and 27°C. After 30 days of planting; germination rate, height of the seedling, length of the roots, number of leaves, leaf size, fresh weight, dry weight and free proline content as stress indicator, were evaluated. The germination rate, and number of leaves showed no significant difference, among the drought and salinity treatments. While the rest of the parameters, was observed a significant difference among the treatments. Showing that the seedlings exposed to water deficiencies respond positively in their growth under this stressing conditions

Palabras clave: *Ocimum*, estrés, *in vitro*

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales y aromáticas son económicamente importantes debido a la continua y creciente demanda de sus productos en los mercados locales y

extranjeros. Sin embargo desde etapas tempranas las plantas cultivadas deben enfrentar condiciones de estrés abiótico (sequía) que influye en la germinación y emergencia de la plántula (Mokhberdorán *et al.*, 2009). Otro factor al que están expuestas las plantas es a la salinidad, desarrollando tolerancia para mantener las funciones fisiológicas y el rendimiento de producción bajo tensión (Shannon y Grieve, 1999). La capacidad de soportar la concentración de sal elevada en la zona de la raíz y producir el producto agrícola comercializable define la resistencia o tolerancia a la salinidad (Steppuhn *et al.*, 2005). *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) es una de las plantas más importantes en este sentido, debido a que es considerada como una fuente de compuestos de aroma, y posee una amplia gama de propiedades biológicas y antioxidantes (Lee *et al.* 2005). Sin embargo, poca atención se ha puesto en conocer la respuesta de estas especies aromáticas y su adaptación a zonas áridas y semi-áridas en condiciones climáticas y edáficas adversas para su desarrollo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones de estrés hídrico y salinidad *in vitro* para identificar los efectos en su morfología y en el contenido de prolina libre como indicador de estrés en las plantas de *Ocimum basilicum* L.

MATERIAL Y MÉTODOS

Medios de cultivo y tratamientos. Se prepararon medios de cultivo adicionados con Polietilenglicol (PEG 3350) y salinidad (NaCl) como tratamientos de sequía y salinidad respectivamente. Para los tratamientos de sequía, se agregaron 4.4g de MS (Murashige y Skoog, 1962) en 1L de agua destilada, se ajustó a pH a 5.7 ± 0.02 (HCl 1N, KOH), y PEG 3350 en concentraciones de 2%, 4% y 6%. Para los tratamientos de salinidad el PEG se sustituyó por NaCl en concentraciones de 25mM, 50 mM y 75 mM antes de ajustar el pH. Finalmente ambos medios se calentaron a ebullición y se les adicionaron 4g de Fitogel. El medio se vació en frascos de cultivo, se taparon, se etiquetaron y se colocaron en una autoclave para su esterilización. **Siembra *in vitro*.** Semillas de *Ocimum basilicum* L (albahaca), fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 10% durante cinco minutos y etanol al 70% durante 20 segundos, finalmente se realizaron tres lavados con agua estéril. En una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas se colocaron 10 semillas por frasco con medio MS con diferentes concentraciones de PEG 3350 y NaCl. Los frascos se colocaron en una cámara bioclimática (Fotoperiodo de 12h a 27°C) por 30 días. Se realizaron siete repeticiones de cada tratamiento. Al final del bioensayo se evaluaron los siguientes parámetros: Porcentaje de germinación (PG), Altura de plántula (AP), longitud de raíz (LR), Número de hojas (NH), Largo de hoja (LH), Ancho de hoja (AH), Peso fresco de plántula (PFP), peso seco de plántula (PFP) y Contenido de prolina (CP).

Determinación de prolina. Primeramente se elaboró una curva de calibración a partir de stocks de prolina en concentraciones en el intervalo de 0.01 y 1000 ppm de esta manera se interpoló para cuantificar la concentración de prolina en plántulas de *Ocimum basilicum* L., de acuerdo a Bates *et al.*, 1973, prosiguiendo de la siguiente manera; de material vegetal previamente macerado, se tomaron 0.5 g y se adicionaron 10 mL de ácido 5-sulfosalicílico al 3%, se sónico con 3 pulsos de 30 segundos, se filtró y centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se tomaron 0.6 mL y se colocaron en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 0.6 mL de ácido 5-sulfosalicílico, 0.4 mL de ninhidrina al 1% y 0.4 mL de ácido acético glacial y se colocó en baño maría durante una hora a 97°C, después se paso a baño frio por 5 minutos, se atempera y en seguida se agrego 1 mL de tolueno y se homogenizó por 1 minuto en vortex (Vortex-Genie 2) y se dejo reposar por 5 minutos, se toma la fase del sobrenadante y se deposita en una celda de polietileno para a leer la absorbancia a 518 nm en un espectrofotómetro de luz visible y se realizaron los cálculos correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a través del análisis de varianza demostraron que para el porcentaje de germinación y el número de hojas no existe diferencia significativa ($P < 0.01$) tanto para los tratamientos de sequia como para los de salinidad mientras que para el resto de los parámetros evaluados si se mostró diferencia significativa entre los tratamientos de estrés (Tabla 1). En relación a la germinación, no se encontró diferencia significativa entre los diferentes tratamientos tanto de sequia como de salinidad, sin embargo los porcentajes de germinación obtenidos en los tratamientos de 6% PEG 3350 y 75 mM NaCl, son ligeramente superiores a los obtenidos en el control. Estos resultados coinciden con los reportados por Tavili *et al.* (2011) quienes utilizaron soluciones de PEG y NaCl para mejorar la germinación bajo estrés y aumentar el porcentaje de germinación y vigor de las plántulas.

Tabla 1. Valores promedio de los parámetros evaluados para determinar estrés osmótico *in vitro* en plántulas de *O. basilicum* L. de 30 días de desarrollo.

Parámetros evaluados	Tratamientos						
	Control	2% PEG	4% PEG	6% PEG	25mM NaCl	50mM NaCl	75mM NaCl
PG (%)	72±8.37a	68±17.89a	70±15.81a	74±15.17a	60±33.91a	56±11.40a	76±15.17a
AP (cm)	2.81±0.87ab	2.96±1.42b	2.29±0.88ab	1.96±0.56a	2.85±1.23b	2.48±0.83ab	2.54±0.60ab
LR (cm)	2.52±1.75a	3.81±2.64ab	2.56±1.42a	4.31±2.63abc	5.20±2.52bc	6.14±3.08c	5.44±2.56bc

NH	2.40±2.31a	2.80±4.62a	2.67±3.46a	2.80±5.77a	1.47±6.31a	1.87±6.62a	2.00±5.46a
LH (mm)	6.34±2.61c	6.12±3.30c	5.42±2.94bc	5.30±2.53bc	4.36±2.13abc	2.62±1.92a	3.53±2.25ab
AH (mm)	4.16±1.30bc	4.40±2.30c	3.70±2.08bc	3.80±1.81bc	3.29±1.60abc	1.94±1.38a	2.70±1.82ab
PFP (g)	0.34±0.03cd	0.38±0.06d	0.25±0.01c	0.11±0.04ab	0.13±0.02b	0.073±0.01ab	0.03±0.01a
PSP (g)	0.03±0.00c	0.03±0.01c	0.03±0.00c	0.01±0.00b	0.02±0.00b	0.015±0.00ab	0.01±0.00a
CP (ppm)	4.42±1.01c	1.76±0.33b	0.88±0.02a	13.96±0.02d	20.37±0.05e	57.37±1.08g	48.22±0.017f

PG (Porcentaje de germinación), AP (Altura de plántula), LR (Longitud de raíz), NH (Número de hojas), LH (Largo de hoja), AH (Ancho de hoja), PFP (Peso fresco de plántula), PSP (Peso seco de plántula) y CP (Contenido de prolina). NOTA: Letras diferentes en una misma fila indican diferencia significativa.

Varios autores han reportado cambios morfológicos inducidos por NaCl tales como el número de hojas, raíz longitud, altura de planta, área foliar y relación tallo/raíz, además, de que la reducción del crecimiento de la planta durante el estrés salino se ha correlacionado con los efectos osmóticos, que causan un déficit de agua (Hafsi *et al.*, 2007). En este sentido, se encontró que tanto la sequía como la salinidad muestran diferencia significativa en la altura de la plántula y en la longitud de la raíz, presentándose un mayor crecimiento radicular en los tratamientos de salinidad que en los de sequía. Esto es contradictorio a lo reportado por Blum (2005), quien observó que la longitud de la raíz principal se incrementa en condiciones de estrés hídrico. Así mismo, Bernstein y colaboradores (2009) al trabajar con plantas de *Ocimum basilicum* L. (variedad sweet) observaron que la salinidad de 1 a 100 mM de NaCl redujo la longitud de la raíz en un 47 % siendo evidente a partir de 25 mM de NaCl. El número de hojas verdaderas no mostró diferencia significativa, sin embargo, se observa una disminución en la formación de hojas verdaderas en los tratamientos de salinidad y una ligera promoción en la formación de hojas verdaderas en los tratamientos de sequía. En trabajos similares Tarchoune y colaboradores (2012) observaron que se mantiene el número de hojas de *O. basilicum* L. (variedad genovesa) tratadas con soluciones de 50 mM de NaCl. Por otra parte, los valores promedio de largo y ancho de las hojas mostró diferencia significativa, observándose que las tratadas con PEG 3350 al 2% tienden a ser de mayor tamaño, mientras que en las tratadas con soluciones de NaCl se observa un menor tamaño, siendo la concentración de 50 mM la que mayor expresa este comportamiento en el ancho (2.62 mm) y largo (1.94 mm) de sus hojas. Estos resultados son respaldados por lo reportado por Bernstein *et al.* (2009), quienes observaron que el área de las hojas se restringe por salinidad a 25 mM. Referente a la biomasa, tanto en peso fresco como seco se encontró diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Las muestras con mayor rendimiento en biomasa fresca fueron las tratadas con PEG 3350, en especial las concentraciones al 2% y 4%. Por el contrario, se observó que la salinidad redujo significativamente este parámetro. Respecto a la sequía, nuestros resultados coinciden con lo reportado por Ojeda-Silvera *et al.* (2013), quienes observaron que las variedades de *O.*

basilicum L., Sweet Dani y Dolly, bajo condiciones de estrés moderado con PEG 8000 (-0.75 MPa) producen mayor biomasa fresca de la parte aérea. Con respecto a la salinidad, nuestros resultados son similares a los reportados por Bernstein *et al.* (2009), al evaluar a diferentes concentraciones de NaCl (1 a 100 mM) plantas de *O. basilicum* L, observaron una reducción en la producción de biomasa de hierba fresca y seca.

En relación al contenido de prolina (Figura 1) se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, siendo los tratamientos de salinidad, los que reportaron los mayores valores principalmente el tratamiento con 50 mM de NaCl (57.37 ppm). Por otra parte sólo el tratamiento de PEG 3350 al 6% obtuvo el mayor valor de prolina con 13.96 ppm. La aparición de prolina libre (como indicador de estrés en plantas) es también confirmada por Cabello-Ruiz *et al.* (2010), quienes observaron que en soluciones bajas de NaCl en plántulas de *Lippia graveolens* se expresaba este aminoácido. En general, ante ciertos tipos de estrés (deshidratación y estrés salino) se produce una inhibición drástica de la actividad PDH donde la prolina podría actuar como un compuesto osmorregulador (Claussen, 2005).

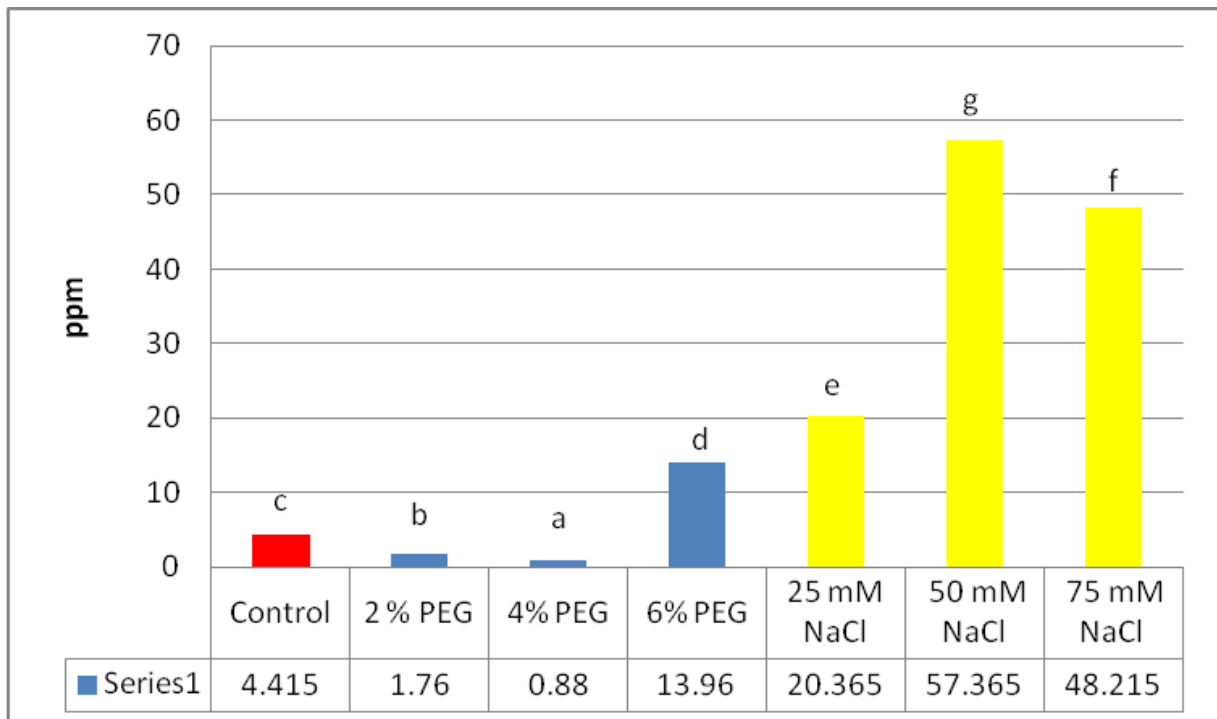


Figura 1. Contenido de prolina en muestras frescas de *O. basilicum* bajo diferentes tratamientos de estrés.

CONCLUSIONES

La respuesta fisiológica de *Ocimum basilicum*, al estrés osmótico es favorable, ya que algunos de sus parámetros morfológicos y bioquímicos se ven influenciados por las condiciones de sequía y salinidad aplicados. Mediante el empleo del PEG 3350 se detectó que la producción de prolina como osmorregulador le permite realizar el ajuste osmótico y por lo tanto presentar niveles de tolerancia al estrés impuesto. Con estos resultados y para continuar con nuestra línea de investigación es necesario conocer si respuesta positiva a este tipo de condiciones favorece la producción y calidad de los compuestos volátiles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bates L., Waldren R. P., Teare I. D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Bernstein N, Kravchik M, Dudai N. 2009. Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*) in relation to alterations of morphological development. *Annals of Applied Biology*. ISSN 0003-4746.
- Blum A. 2005. Drought resistance, water use efficiency, and yield potential- are they compatible, dissonant, or mutually exclusive. *Australian J. Agric. Res.* 56:1159-1168.
- Cabello-Ruiz ED, Valdés-Oyervides FJ, Benavides-Mendoza A, Núñez-González M.A, Báez JG, Moreno-Limón S, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Cárdenas Ávila ML. 2010. "Determinación de prolina libre como indicador de estrés en orégano (*Lippia graveolens*); XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Claussen W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plan Science* 168. Pp. 241-248.
- Hafsi C, Lakhdar A, Rabhi M, Debez A, Abdelly C, Ouerghi Z. 2007. Interactive effect of salinity and potassium availability on growth, water status, and ionic composition of *Hordeum maritimum*. *J Plant Nutr Soil Sci* 170:469–473.
- Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 91:131–137
- Mokhberdorran F, Nabavi KSM, Sadrabadi HR. 2009. Effect of temperature iso-Osmotic concentrations of NaCl and PEG agents on germination and some seeding growth yield components in rice (*Oryza sativa* L.). *Asian J. Plant Sci.* 8(6):409-416
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Ojeda-Silvera CM, Murillo-Amador B, Reynaldo-Escobar IM, Troyo-Diéquez E, Ruiz-Espinoza F y Nieto-Garibay A. 2013. Estrés hídrico en la germinación y crecimiento de plántulas de genotipos de albahaca *Ocimum basilicum* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4 (2):229-241.

- Shannon MC, Grieve CM. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulture*, 78: 5–38.
- Steppuhn H, van Genuchten MTh and Grieve CM. 2005. Root-zone salinity: I. Selecting a product-yield index and response function for crop tolerance. *Crop Science* 45: 209–220.
- Tarchoune I, Sgherri C, Izzo R, Lachaa IM, Navari-Izzo , Ouerghi Z. 2012. Changes in the antioxidative systems of *Ocimum basilicum* L. (cv. Fine) under different sodium salts. *Acta Physiol Plant* . 34:1873–1881
- Tavili A, Zare S, Moosavi SA, Enayati A. 2011. Effects of seed priming on germination characteristics of Bromus species under salt and drought conditions. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 10:163–168.