

Efecto de la aplicación de un campo magnético sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Rosmarinus officinalis* L.

Y. Fung Boix^{1*}, C. Pimentel Victório², C. L. Salgueiro Lage², A. C. Alfarge Defaveri², R. Olivera Arruda³, A. Sato³. *Autor para correspondencia

¹Universidad de Oriente, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), Departamento de Bioelectromagnetismo, Ave. Las Américas s/n, Santiago de Cuba 4, CP 90 400. Cuba. e-mail: yilan@cnea.uo.edu.cu

²Universidad Federal de Rio de Janeiro. Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Av. Carlos Chagas Filho, s/n.RJ. CP 21941-902.

³Universidad de Rio de Janeiro (UNIRIO). Departamento de Botánica. Avenida Pasteur, 458 urca, RJ. CP 22240-540.

RESUMEN

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es una planta medicinal, muy empleada por debido a sus propiedades medicinales tales como: estimulante del sistema nervioso, antiespasmódica, antiséptica, entre otras. Sin embargo, florece esporádicamente, las semillas presentan poca viabilidad y el enraizamiento en la propagación por estacas es muy lento. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la aplicación de un campo magnético sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Rosmarinus officinalis* L. Para ello, se aplicó un tratamiento con 0.16 T de inducción magnética durante siete días a semillas de romero que luego se desinfectaron y se colocaron en medio de cultivo Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento (semisólido o líquido). Se cuantificó el número de semillas germinadas por cada tratamiento y se calculó el porcentaje de germinación. No se observó germinación de las semillas en medio de cultivo semisólido durante el periodo evaluado. Sin embargo, en medio de cultivo líquido a partir de los 21 días se comprobaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los porcentajes de germinación de las semillas sometidas al campo magnético con respecto a las no tratadas. A los 30 días de incubación se observó un incremento del 55% de germinación en las semillas tratadas.

Palabras clave: inducción magnética, plantas medicinales, romero

ABSTRACT

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a medicinal plant widely used due to its medicinal properties such as nervous system stimulant, antispasmodic, antiseptic, among others. However, blooms are sporadic, seeds viability is low and propagation by stakes is very slow. The objective was to determine the effect of applying a magnetic field on *in vitro* germination of *Rosmarinus officinalis* L. seeds. Rosemary seeds were treated with 0.16 T magnetic field during seven days. Then, they disinfected and placed in Murashige and Skoog medium without growth regulators (semi-solid or liquid). The number of germinated seeds per treatment was quantified and the percentage of germination was calculated. Seeds did not germinated in semisolid medium during the period evaluated. However, significant differences ($p < 0.05$) were found between the percentages of germination of seeds subjected to the magnetic field compared to the untreated ones after 21 days in liquid culture medium. After 30 days of incubation a 55% germination increment in the seeds treated was observed.

Key words: magnetic induction, medicinal plants, rosemary

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en la producción de plantas medicinales es alcanzar altos rendimientos de materia vegetal y elevados contenidos de principios

activos, lo que depende tanto de factores internos de la planta, como de la recolección y las condiciones climáticas, pues como seres vivos que son, las plantas están en constante interacción con el medio que las rodea. El clima es quien más influye en su

crecimiento y desarrollo, y en especial en la producción de sus metabolitos secundarios (Acosta, 2001).

Rosmarinus officinalis (romero) es un arbusto con ramas de hoja perenne, con una altura de aproximadamente de un metro, tallos derechos, flores blanquecino-azules y hojas verdes oscuras. Crece a lo largo de las costas norte y sur del mediterráneo, ha sido cultivado desde la antigüedad en Inglaterra, Alemania, Francia, Dinamarca y países escandinavos, Centroamérica, Venezuela y Filipinas. Se le atribuyen propiedades tónicas, estimulante, carminativas, antifebril, colagoga, antiespasmódicas, descongestionante de las vías respiratorias, antimicrobianas y diuréticas (Sereiti *et al.*, 1999; Fung *et al.*, 2010).

Tiene un amplio uso culinario (condimento) y cosmético (crecimiento del cabello), en países del mediterráneo, especialmente Italia y Francia. Su principio activo son los aceites esenciales. La especie está muy poco difundida en la naturaleza, es una de las plantas que por su gran utilización y demanda por la población, su propagación ha ido disminuyendo hasta el punto en que se encuentra escasa.

En los últimos años esta especie ha pasado a formar parte del listado de plantas priorizadas para el desarrollo de la medicina natural y tradicional, pues su difícil propagación en condiciones naturales y la presión del mercado a través de la gran demanda ha provocado la disminución de las poblaciones de esta especie.

La escasa información e investigación sobre el romero se debe a que es un cultivo en expansión; esto es una debilidad, pues dificulta la competitividad y la óptima explotación de este producto (Rivera, 2001).

El romero es una especie que florece esporádicamente y cuando lo hace, sus semillas presentan poca viabilidad. Del mismo modo, su propagación vegetativa en la mayoría de las ocasiones presenta dificultades en el enraizamiento de las estacas y cuando logran generar raíces su crecimiento es muy lento (Álvarez-Herrera *et al.*, 2007; Fung *et al.*, 2008).

Ensayos realizados con semillas de romero, refieren que 100 semillas pesan 0.1237 g. Estas tienen un 40% de germinación y generalmente se requiere de 154 g para sembrar una hectárea. Estos datos indican la baja eficiencia que tiene el propagar estas plantas sexualmente, ya que el porcentaje de germinación es muy bajo, la cantidad de semillas generadas por la planta es muy baja y su obtención muy dispendiosa, lo que dificulta la fase de reproducción del material vegetal para el establecimiento de este cultivo (Álvarez, 2003).

Las técnicas del cultivo de tejidos son útiles y ventajosas, ya que permiten obtener una producción rápida y continua de plantas asépticas y de genotipos seleccionados de difícil propagación, estas técnicas viabilizan la propagación a escala comercial e industrial (Santarém *et al.*, 1999; Rout *et al.*, 2006; Victorio *et al.*, 2007).

Evidencias de su uso para propagar romero son los resultados informados por Caruso *et al.* (2000) que regeneraron raíces y tallos a partir de segmentos nodales y hojas de *R. officinalis*, para obtener ácido carnósico, diterpeno con propiedades medicinales y antioxidantes. Otros autores han empleado las técnicas de callogénesis en *R. officinalis* para obtener mayor número de plántulas en menos tiempo (Misra, 2002).

Durante muchos años el efecto de los campos magnéticos estáticos (CMs) en las plantas ha sido temática de trabajos de investigación científica por numerosos autores. Hoy es conocido que los CMs tiene efectos positivos en procesos que ocurren en las plantas tales como: la germinación de la semilla, desarrollo del tallo, incremento de masa fresca, longitud de la planta, rendimiento de frutos por planta, y peso medio del fruto (Danilov *et al.*, 1994; Esitken, 2003; De Souza *et al.*, 2006). Se ha informado la inducción de la germinación en trigo (*Triticum aestivum* L.), la soja (*Glycine max*), algodón (*Gossypium barbadense*) (Phirke *et al.*, 1996), arroz (*Oryza sativa* L.) (Carbonell *et al.*, 2000), roble (*Quercus rober*) (Celestino *et al.*, 2000), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Reina *et al.*, 2001), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Martínez *et al.*, 2002), maíz (*Zea mays* L.) (Florez *et al.*, 2007) y

garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Vashisth y Nagarajan, 2008) por campos magnéticos.

También tienen efectos positivos sobre la biosíntesis de proteína, reproducción celular, actividad fitoquímica, respiración, actividad enzimática, contenido de ácidos nucleicos y periodos de crecimiento-desarrollo en plantas (Phirke *et al.*, 1996).

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la aplicación de un campo magnético sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Rosmarinus officinalis* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ).

Se emplearon semillas de *Rosmarinus officinalis* L. validadas por la firma ISLAR, Lote No. 23 324, con 70% de germinación y 99% de pureza.

Se colocaron 20 semillas, distribuidas de forma circular, en placas Petri de 9 cm de diámetro, que contenían papel de filtro humedecido con 10 -14 ml de agua destilada estéril. Así permanecieron durante 24 horas. Luego, se sometieron a un tratamiento magnético con una inducción de 0.16 T, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad, durante 7 días. Para ello, se colocaron las placas Petri sobre la cara norte de uno de los imanes, que se encontraban distribuidos al azar sobre una

superficie plana con un magnetizador de imanes permanentes (Figura. 1).

La caracterización magnética se realizó por tres métodos diferentes. Se efectuaron las mediciones con un Microweberímetro (192041) de error relativo menor de 5%, con un equipo de Resonancia Magnética Nuclear y con un Teslámetro del tipo 0.041 T (Lakeshore).

Después del tratamiento magnético las semillas se desinfectaron previo a la germinación *in vitro*.

Para la desinfección de las semillas se procedió según protocolo de Victorio *et al.* (2007) que se describe brevemente a continuación.

Las semillas se lavaron con detergente comercial durante 15 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril por más de tres minutos. Después, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (10%) durante 15 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Ya en la cabina de flujo laminar las semillas se sumergieron en etanol (70%) durante 3 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Posteriormente, se colocaron en tubos de ensayo (150 x 25 mm) con 15 ml medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), en estado líquido o semisólido, sin regulador de crecimiento, al que se adicionó 3% de sacarosa, 5 μM de tiamina, 2.4 μM piridoxina, 4.1 μM ácido nicotínico y 0.6 μM de mio-inositol.

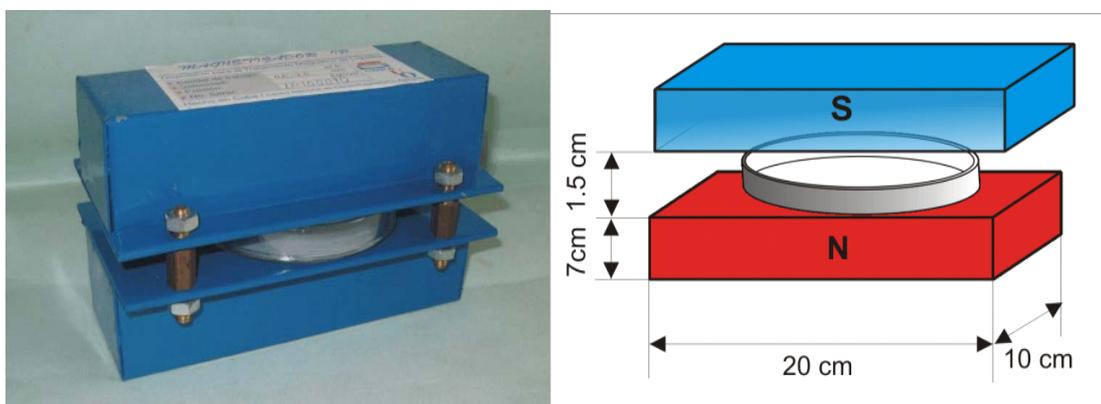


Figura 1. Magnetizador con placa Petri donde se colocaron las semillas de *Rosmarinus officinalis* L. para el tratamiento magnético.

A los tubos de ensayo que contenían medio de cultivo líquido se le colocaron soportes de papel de filtro en su interior para evitar la inmersión completa de las semillas. Al medio de cultivo en estado semisólido se le añadió 0.7% de agar - agar.

Se emplearon 60 tubos de ensayo para cada tratamiento que se colocaron en un cuarto de incubación a 25 ± 2 °C, iluminación con lámparas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz de día) con intensidad de $23.0 \mu\text{moles} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 16 horas de fotoperiodo.

Para el desarrollo experimental se establecieron cuatro tratamientos:

- Tratamiento I (control): semillas sin aplicación de campo magnético y germinación en medio de cultivo semisólido.
- Tratamiento II (control): semillas sin aplicación de magnético y germinación en medio de cultivo líquido.
- Tratamiento III: semillas sometidas a un campo magnético de 0.16 T y germinación en medio de cultivo semisólido.
- Tratamiento IV: semillas sometidas a un campo magnético de 0.16 T y germinación en medio de cultivo líquido.

Se realizaron observaciones diarias durante un período de 31 días, a partir del tercer día de colocadas las semillas en el medio de

cultivo. Se cuantificó el número de semillas germinadas por cada tratamiento y se calculó el porcentaje de germinación.

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza para un 95% de confianza, con la transformación log x y una prueba de Student, mediante el paquete estadístico Statgraphics v. 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existió una alta reproducibilidad entre los tres métodos utilizados para la caracterización magnética.

No se observó germinación de las semillas en medio de cultivo semisólido durante el periodo evaluado. Sin embargo, en medio de cultivo líquido a partir de los 21 días se comprobaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los porcentajes de germinación de las semillas sometidas al campo magnético con respecto a las no tratadas. A los 30 días de incubación se observó un incremento del 55% de germinación en las semillas tratadas (Figura 2).

El medio de cultivo líquido propicia mejor absorción de los nutrientes por las plantas y con eso contribuye a un rápido inicio y desarrollo *in vitro* (Victorio, 2004).

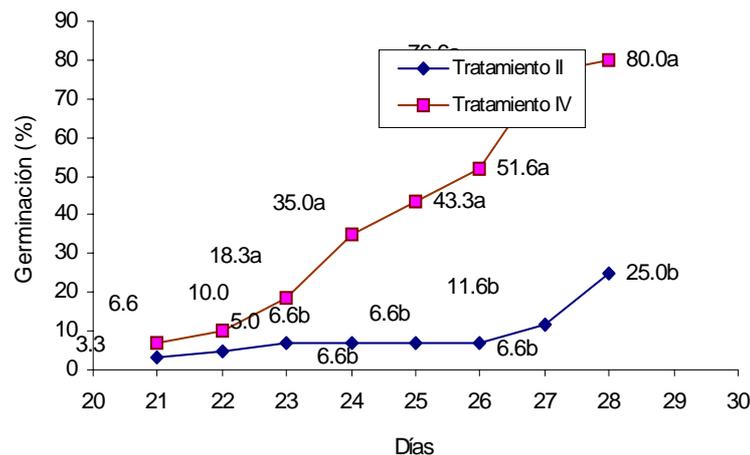


Figura 2. Influencia del tratamiento magnético (0.16 T) sobre la germinación de semillas de *Rosmarinus officinalis* L. Tratamiento II (control): semillas sin aplicación de magnético y germinación en medio de cultivo líquido. Tratamiento IV: semillas sometidas a un campo magnético de 0.16 T y germinación en medio de cultivo líquido. Medias con letras diferentes en cada tiempo difieren según la prueba de Student ($p \leq 0.05$).

En este trabajo se obtuvieron resultados similares a los planteados por otros autores, en relación con la aplicación del tratamiento magnético en la germinación o presembrado. El tratamiento magnético se realizó antes del establecimiento, para luego continuar con la germinación en condiciones *in vitro*.

Pérez (1993) coincide en que el tratamiento magnético permite el incremento del porcentaje de germinación de las semillas. Igualmente, Pietruszewski (1996) observaron mejor crecimiento en primavera de las semillas de trigo (*Triticum aestivum*) que habían sido embebidas en agua antes de exponerlas al campo magnético, en comparación con las semillas secas. Este fenómeno ocurrió por la movilidad más alta de los iones en las semillas húmedas. Por su parte, De Souza *et al.* (1999) estimularon semillas de *Lycopersicon esculentum* con diferentes tratamientos de inducción magnética (0.10; 0.14 y 0.17 T) y tiempos de exposición (1, 3, 5, 10, 15, 20 y 25 min). Con ello obtuvieron un porcentaje de germinación mayor.

Podelsny *et al.* (2005) mostraron que la inducción magnética de 2 mT influyó positivamente sobre la germinación y crecimiento de plantas de guisantes (*Pisum sativum* L.). También demostraron que el tratamiento presembrado con campo magnético en estas semillas, produce un aumento significativo en su rendimiento y calidad, una disminución del periodo de crecimiento e incremento en la emergencia del hipocótilo.

Recientemente, Cakmak *et al.* (2010) informaron efectos estimulantes del tratamiento crónico en diferentes dosis de inducción magnética sobre las primeras etapas de la germinación y crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y trigo (*Triticum aestivum*).

Otros autores como Atak *et al.* (2003) y Yacyli *et al.* (2005) han informado acerca del efecto positivo de los campos magnéticos de baja intensidad sobre los sistemas vivos e *in vitro*. Varios modelos han sido propuestos para estos efectos (Soja *et al.*, 2003), sin embargo, los mecanismos de acción que participan cuando las plantas y otros sistemas vivos son expuestos a campos magnéticos no pueden ser explicados por una simple hipótesis.

Se conoce muy bien que los campos magnéticos penetran los tejidos biológicos, que las reacciones bioquímicas tienen más de un electrón impar afectado por los campos magnéticos, y que los organelos y membranas celulares tienen diferentes propiedades electromagnéticas resultado de los diferentes aspectos moleculares de estos componentes (Reiter, 1993; Atak *et al.*, 2007).

Por ejemplo, Reina *et al.* (2001) examinaron los efectos de 1-10 mT de los campos magnéticos estáticos sobre la cantidad de rangos de absorción de agua en las membranas celulares de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), en orden de comparar los resultados experimentales y calculados. Los cálculos teóricos mostraron que los campos magnéticos estáticos inducen cambios en las concentraciones iónicas y presión osmótica; estos regulan la entrada de agua dentro de las semillas a la exposición a campos magnéticos. La exposición a campos magnéticos fue realizada aparte e inmediatamente las semillas fueron colocadas en el cuarto de aclimatación. Los resultados demostraron una estrecha correlación entre los cálculos teóricos y los resultados de la experimentación y que la exposición a los campos magnéticos estáticos alteran la absorción de agua en la semilla y el rango de crecimiento, así como la dependencia de la presión osmótica con la sacarosa o las sales. Todo ello conlleva a una aceleración significativa de la germinación.

CONCLUSIONES

Con los resultados de este trabajo se demostró que el tratamiento magnético (0.16 T) de semillas de *R. officinalis* incrementó en un 55% el porcentaje de germinación *in vitro* en medio de cultivo líquido.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de la Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ); especialmente al Laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto de Biofísica, así como la agencia financiadora CAPES por la bolsa de estudio concedida.

REFERENCIAS

Acosta L, C (2001) Principios Agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. V

- Simposio Internacional de Plantas Medicinales. Ciencias y Homeopatía. La Habana. Cuba
- Álvarez, M (2003) Ajuste y validación tecnológica en cultivo de plantas medicinales en Antioquia. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. Antioquia
- Álvarez-Herrera J, Rodríguez S L, Chacon E (2007) Efecto de diferentes tamaños de esqueje y sustratos en la propagación del romero (*Rosmarinus officinalis* L.). Agronomía Colombiana 25 (2): 224-230
- Atak Ç, Çelik Ö, olgun A, Alikamanođlu S, Rzakoulieva A (2007) Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. Biotechnol Biotechnol Eq 21:166-177
- Atak Ç, Emirođlu Ö, Aklimanođlu S, Rzakoulieva A (2003) Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max* L. Merrill) tissue cultures. J. Cell Mol Biol 2: 113-119
- Cakmak T, R Dumlupinar, S Erdal (2010) Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. Bioelectromagnetics 31:120-129
- Carbonell MV, Martínez E, Amaya JM. (2000). Stimulation of germination of rice (*Oryza sativa* L.) by a static magnetic field. Electro Magnetobiol 19:121-128
- Caruso JL, Callahan J, DeChant C, Jayasimhulu K, Winget GD (2000) Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. Plant Cell Reports 19: 500-503
- Celestino C, Picazo ML, Toribio M (2000) Influence of chronic exposure to an electromagnetic field on germination and early growth of Quercus Suber seeds preliminary study. Electro Magnetobiol 19:115-120
- Danilov V, Bas, T, Eltez M, Rzakoulieva A (1994) Artificial magnetic field effect on yield and quality of tomatoes. Acta Hort 366: 279-285
- De Souza A, Casate R, Porras E (1999) Effect of magnetic treatment of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on germination and seedling growth. Invest Agr. Prod. Prot. Veg. 14(3): 67-74
- Esitken A (2003) Effect of magnetic fields on yield and growth in strawberry 'Camarosa'. J. Hort. Sci. Biotechnol. 78(2):145 -147
- Florez M, Carbonell MV, Martínez E (2007) Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth. Environ. Exp. Bot. 59:68 -75
- Fung Y, E Isaac, A Ferrer, A Botta (2008) Riego con agua tratada magnéticamente en *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) como alternativa en la propagación convencional. Rev. Centro Agrícola 35 (1):23-27
- Fung Y, CP Victório, CL Lage, RM Kuster (2010) Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC growing in southeast coast of Brazil. Quim. Nova 33 (2): 255-257
- Martínez E, Carbonell MV, Florez M (2002) Magnetic biostimulation of initial growth stages of wheat (*Triticum aestivum* L.). Electro Magnetobiol Med 21:43-53
- Misra P (2002) Induced caulogenesis in long-term callus cultures of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 11 (2): 113-116
- Pérez, R (1993) Efecto del tratamiento magnético del agua de riego sobre el desarrollo del cultivo de Pepino (*Cucumis sativum* L) y la incidencia de plagas y enfermedades. II Forum Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Santiago de Cuba. Cuba
- Phirke PS, Patil MN, Umbarkar SP, Dudhe YH (1996) The application of magnetic treatment to seeds: Methods and responses. Seed Sci Technol 24:365-373
- Pietruszewski S (1996) Effect of magnetic bioestimulation of wheat sedes on germination, yield and protein. Int. Agrophysics 10: 51-55
- Podelsny J, S Pietruszewski, A Podelsna (2005) Influence of magnetic stimulation of seeds on the formation of morphological features and yielding of the pea. Int. Agrophysics 19: 61-68
- Reina FG, Pascual LA, Fundora IA (2001) Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part 2: Experimental results. Bioelectromagnetics 22: 596-602
- Rivera, A (2001) Plan de acción para la conservación, uso y comercio sostenible de plantas medicinales en Colombia. Memorias Primer Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. California
- Rout, GR, Mohapatra A, Jain SM (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances 4(6): 531-560
- Santarém, ER, Astarita LV (1999) Biotecnología vegetal: cultivo de tejidos *in vitro*. Revista Científica UNICRUZ, Cruz Alta 1(1):18-25

- Sereiti AMR, Abu-Amer KM, Sen P (1999) Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biology 37: 124-30
- Soja G, Kunsch B, Gerzabek M, Relchenaure T, Soja AM, Rippar G, Bolhar-Nordenkampf HR (2003) Growth and yield of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) near a high voltage transmission line. Bioelectromagnetics 24: 91-102
- Vashisth A, Nagarajan S (2008) Exposure of seeds to static magnetic field enhances germination and early growth characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Bioelectromagnetics 29: 571–578
- Victorio, C P (2004) Estudos Integrados: Biofísica, Biotecnología, Anatomía e Fitoquímica na Avaliação de Plantas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. Cultivadas *in vitro*. Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), UFRJ, Brasil
- Victorio, CP, Kuster RM, Lage CLS (2007) Detecção de flavonóides de *Alpinia purpurata* por CCD e CLAE. Jornal Brasileiro de Fitomedicina 5:137
- Yaycili O, Alikamanoglu S, (2005) The effect of magnetic field on *Paulownia* tissue cultures. Plant Cell tiss Org Cult 83: 109-114