

Efecto de brasinoesteroides sintéticos en la inducción de callos de arroz

Lisbet Rodríguez Machado^{1*}, José B. Rodríguez Soria² y Miriam Prede Rodríguez². *Autor para correspondencia.

¹ Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Autopista Nacional, Km. 246, Villa Clara, Cuba. epica@civc.inf.cu

² Facultad de Biología, Universidad de la Habana. J y 25, Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como propósito evaluar el efecto de los brasinoesteroides sintéticos BIOBRAS 6, ME y BIOBRAS 16 en la inducción de callos de arroz (*Oryza sativa* L) de las variedades comerciales J-104 y Pokkali. Para ello se utilizaron semillas maduras de ambas variedades, empleándose el medio de cultivo MS suplementado con 10^{-5} mg.l⁻¹ de brasinoesteroide, sólo o combinado con 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (2 mg.l⁻¹) y Kin (Kinetina) (1 mg.l⁻¹). Ambas variedades formaron callos compactos de apariencia nodular y color blanco, amarillo-amarillo pálido; alcanzándose en los mejores tratamientos un 90 y 50% de inducción en Pokkali y J-104 respectivamente. El BIOBRAS 6 resultó ser un sustituto de la Kin en la inducción de callos de ambas variedades mientras que el ME tuvo el mismo efecto en J-104, el BIOBRAS 16 fue inhibitorio.

Palabras clave: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, callogénesis, kinetina

ABSTRACT

The present work shows the effect of the synthetic brassinosteroids BIOBRAS 6, ME and BIOBRAS 16 in the induction of callus of rice (*Oryza sativa* L) of the commercial varieties J-104 and Pokkali. Mature seeds were used from both varieties, using MS medium supplemented with 10^{-5} mg.l⁻¹ of brassinosteroid alone or combined with 2.4 D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (2 mg.l⁻¹) and Kin (kinetin) (1 mg.l⁻¹). Both varieties formed compact calluses of nodular appearance and white color, light yellow-yellow; achieving in the best treatments 50 and 90 percent of induction in Pokkali and J-104 respectively. Showing a possible cytokinin behavior of the brassinosteroids studied in the process of calluses induction. The BIOBRAS 6 turned to be a substitute of the Kin in the induction of callus of both varieties while the ME had the same effect in J-104, on the other hand the BIOBRAS 16 was inhibitory.

Key words: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, callogenesis, kinetin

INTRODUCCIÓN

Los reguladores del crecimiento constituyen uno de los componentes nutricionales fundamentales del medio de cultivo, pues conjuntamente con otras sustancias modulan el comportamiento de los tejidos en condiciones *in vitro* (González, 1996). Entre ellos, los brasinoesteroides conforman una familia de reguladores descubierta hace relativamente poco tiempo. Estos compuestos de estructura esteroide poseen una marcada actividad biorreguladora y su modo de acción es similar al de las auxinas, citoquininas y giberelinas (Arteca, 1995). Su obtención por vía extractiva resulta un proceso extremadamente laborioso e incostrable debido a la baja concentración en que están presentes en las plantas, es por ello que, después del descubrimiento del brasinólido, se han sintetizado un gran número de análogos de brasinoesteroides con el objetivo de estudiar su relación estructura - actividad y para su uso como patrones en el análisis de brasinoesteroides naturales (Adam y Marquardt, 1986). En este sentido el cultivo *in vitro* brinda la posibilidad de utilizar modelos biológicos para validar la actividad biorreguladora de los mismos. En el

presente trabajo se evaluó el efecto de los brasinoesteroides sintéticos BIOBRAS 6 (BB 6), ME y BIOBRAS 16 (BB 16) en la inducción de callos de arroz de las variedades J-104 y Pokkali.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron semillas maduras de arroz de las variedades comerciales J-104 y Pokkali suministradas por el Instituto de Investigaciones del Arroz.

Brasinoesteroides sintéticos utilizados

BB 6, BB 16, ME. Todos producidos en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana.

Inducción de callos

Para este experimento fue utilizado el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g.l⁻¹ de

sacarosa y 9 g.l⁻¹ de agar, al cual se le adicionó, según la variante empleada, 2.0 mg.l⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), 1 mg.l⁻¹ de kinetina

(Kin) y los brasinoesteroides (Br) BB 6, BB 16 y ME a una concentración de 10⁻⁵ mg.l⁻¹ (Tabla 1). El pH fue ajustado a 5.7.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para la inducción de callos en arroz.

Tratamientos	Medio de cultivo: MS (Murashige y Skoog, 1962)		
	2,4-D (2 mg.l ⁻¹)	Kin (1 mg.l ⁻¹)	Br (10 ⁻⁵ mg.l ⁻¹)
i-1 (control)	+	+	-
BB 6			
	BB 6	ME	
i-2	i-6	i-10	+
i-3	i-7	i-11	-
i-4	i-8	i-12	+
i-5	i-9	i-13	-

+ : Con adición del producto. - : Sin adición del producto.

Las semillas fueron colocadas en tubos de ensayo con 15-20 ml de medio de cultivo: una semilla por tubo y 10 réplicas por tratamiento. Se sometieron a un período de incubación en la oscuridad a 23° C de temperatura. Al término de una semana se realizó la escisión del brote y las semillas fueron devueltas al mismo tubo de procedencia bajo iguales condiciones de incubación hasta cumplirse el mes de sembradas, fecha en la cual se realizó la evaluación de las siguientes:

Inducción de callos

Se evaluaron las características de los callos formados mediante las variables: formación de callos (%), textura, color y dimensiones de los mismos (ancho).

Efecto de los brasinoesteroides en la callogénesis

Se comparó la actividad mostrada por estos compuestos con la de la auxina y citoquinina empleadas.

Los datos fueron tratados mediante un análisis no paramétrico según la prueba de Kruskal-Wallis, que de ser significativo, a la suma de rangos se le aplicó la prueba de Student-Newman-Keuls. En todos los casos el nivel de significación utilizado fue del 5%. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico TONYSTAT (Sigarroa, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callos

Según se muestra en la tabla 2, existieron diferencias entre ambas variedades en cuanto al porcentaje de formación de callos, siendo Pokkali la de mejor comportamiento al alcanzar valores mucho más elevados que J-104 para los mismos tratamientos. Es de resaltar que los valores más altos obtenidos en la

frecuencia de inducción en Pokkali fueron entre un 60-90%, resultados relativamente altos si se tiene en cuenta que ésta subespecie ha sido caracterizada como de bajos porcentajes en la frecuencia de inducción así como en el potencial regenerativo (Ravi y Minocha, 1993a); aunque este comportamiento podría ser modulado si se probaran otras combinaciones de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo que proporcionen un balance de auxinas/citoquininas más favorable.

Aquellos tratamientos donde no hubo formación de callos para ninguna de las dos variedades coincidieron con los medios de cultivo donde no estaba presente la auxina 2,4 D; la cual ha sido referida por varios autores como un biorregulador imprescindible para inducir la callogénesis, principalmente en el cultivo de cereales (Krikorian, 1995; Ravi y Minocha, 1993, Mitsuoka *et al.*, 1994).

En general, ambas variedades formaron callos compactos, de apariencia nodular y con coloraciones que variaban desde el blanco al amarillo-amarillo pálido, de acuerdo con lo planteado por Vasil y Vasil (1993) con dimensiones entre 0.3 y 0.5 cm. Luego del periodo de multiplicación llegaron a alcanzar desde 0.6 hasta 1.0 cm de ancho.

Efectos de los brasinoesteroides en la callogénesis

Los brasinoesteroides, ya sean sintéticos o naturales, han sido evaluados en diferentes especies vegetales con el fin de dilucidar su posible actividad sobre la fisiología de las plantas. Entre los brasinoesteroides sintéticos, el BB 6 despunta como uno de los más estudiados, incorporado en múltiples experiencias como sustancia reguladora del crecimiento, a diferencia del BB 16 y el ME, utilizados en menor medida. Moré *et al.* (1996) encontraron que 0.25 mg.l⁻¹ de BB 6 favoreció la callogénesis en papa (*Solanum tuberosum*), brindando una mayor desagregación en suspensiones celulares y promoviendo el desarrollo

de células meristemáticas y estructuras embrionales. En callos de café inducidos con concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.001 de BB 6 mg.l⁻¹ y transferidos a un medio de cultivo embriogénico se observó una marcada estimulación sobre la evolución de los mismos (García *et al.*, 1996). El BB 16 aumentó el crecimiento de los callos de soya William a 10⁻⁴ y 10⁻⁶ mg.l⁻¹ (Echemendía, 1996).

Como muestra la tabla 3, los mejores resultados obtenidos para cada brasinoesteroide se lograron con los tratamientos que combinaron dicho compuesto

con el 2,4 D (i-4, i-8, i-12). El BB 6 no mostró ningún efecto en la variedad Pokkali ya que su mejor tratamiento, i-4, no presentó diferencias significativas con el control, mientras que el BB 16 (i-8) y el ME (i-12) tuvieron efectos inhibitorios sobre el parámetro evaluado. Sin embargo, en la variedad J-104 tanto el BB 6 como el ME mostraron iguales resultados que el control; el BB 16 mantuvo su efecto inhibitorio. Esta ligera diferencia entre ambas variedades es explicable si se tiene en cuenta que la respuesta de cada variedad es específica para cada tratamiento, de acuerdo con la interacción entre el genotipo y el biorregulador.

Tabla 2. Porcentaje de inducción de callos en dos variedades de arroz con el uso de diferentes brasinoesteroides sintéticos.

	Tratamiento	Variedades.	
		Pokkali	J-104
Control	i-1	90	50
BB 6	i-2	30	30
	i-3	0	0
	i-4	90	50
	i-5	0	0
BB 16	i-6	40	0
	i-7	0	0
	i-8	60	20
	i-9	0	0
ME	i-10	50	40
	i-11	0	0
	i-12	70	50
	i-13	0	0

Tabla 3. Efecto de los brasinoesteroides BB 6, BB 16 y ME en la inducción de callos en dos variedades de arroz.

Brasin.	Variedad Pokkali		Variedad J-104	
	Tratamientos	Suma de rangos	Tratamientos	Suma de rangos
BB 6	i-1 i-4	1025 a	i-1 i-4	860 a
	i-2	635 f	i-2	730 c
	i-3 i-5	440 g	i-3 i-5	535 e
	BB16	i-1	1025 a	i-1
i-8		830 c	i-8	665 d
i-6 i-7 i-9		440 g	i-6 i-7 i-9	535 e
ME	i-1	1025 a	i-1 i-12	860 a
	i-12	895 b	i-10	795 b
	i-10	765 d	i1-1 i-13	535 e
	i-11 i-13	440 g		

Letras diferentes indican diferencias significativas para la prueba de Student-Newman-Keuls con un nivel de significación del 5%.

Llama la atención que los mejores tratamientos para cada brasinoesteroide, aun cuando éstos fueran inhibitorios, se obtuvieron cuando éste sustituyó a la Kin (1 mg.l⁻¹) en presencia del 2,4 D (2.0 mg.l⁻¹), lo

que nos indicó una posible tendencia de éstos compuestos a un comportamiento similar al de las citoquininas. Este criterio se refuerza si se analiza que, en ambas variedades y para todos los

brasinoesteroides, la combinación en que están presentes los dos reguladores del crecimiento (2,4 D, 2mg.l⁻¹ y Kin, 1mg.l⁻¹) y el brasinoesteroide correspondiente manifestaron una respuesta significativamente menor con respecto al control y a los mejores tratamientos; debido posiblemente a un incremento en la relación citoquininas/auxinas desfavorable para la formación de callos en correspondencia con lo planteado por Mitsuoka *et al.* (1994). Las variantes en las que la auxina fue sustituida por el brasinoesteroide (i-3, i-7, i-11) así como aquellas donde éste estaba sólo (i-5, i-9, i-13) no dieron respuesta.

En este sentido, han sido varios los investigadores que señalan a los brasinoesteroides como posibles sustitutos de los reguladores del crecimiento. García *et al.* (1996) lograron una alta efectividad en la callogénesis de café cuando utilizaron 0.01 mg.l⁻¹ de BB 6 en sustitución de la Kin. Por otra parte, Ikekawa y Zhao (1991) destacan que los brasinoesteroides en combinación con las auxinas estimulan el crecimiento de los callos más eficientemente que las auxinas y el BAP en un gran número de plantas. Estudios de la actividad biorreguladora del BB 16 en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) apuntan que dicha actividad está relacionada con la Kin. Otros autores indican que los brasinoesteroides pueden sustituir a la Kin y al BAP en el proceso de formación de callos de anteras y semillas de arroz respectivamente (Pérez *et al.*, 1996).

CONCLUSIONES

- El BB 6 (10⁻⁵ mg.l⁻¹) demostró ser un sustituto eficaz de la Kin (1 mg.l⁻¹) en presencia del 2,4 D (2 mg.l⁻¹) en la inducción de callos de arroz de las variedades Pokkali y J-104. El ME, a igual concentración, surtió el mismo efecto pero sólo con la variedad J-104.
- EL BB 16 mostró una acción inhibitoria para el parámetro evaluado en todas las combinaciones.
- Se constató el posible comportamiento citoquinínico de los brasinoesteroides estudiados en el proceso de inducción de callos.

REFERENCIA

Adam, G y Marquardt, V (1986). Brassinosteroids. *Phytochemistry* 25: 1787-1799

Arteca, RN (1995) Brassinosteroids. En: David, J D (Ed) *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp 206-213, Kluwer Academic Press

Echemendía, D (1996) Optimización del cultivo *in vitro* y evaluación de brasinoesteroides sintéticos en callos de *Glycine max* L. Merr., Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana

García, D, Marrero, MT, Núñez, M y Santana, M (1996) Efecto del DAA-6 sobre la formación y calidad del callo en café, pp 157. X Seminario Científico del INCA

González, S (1996) Conferencia sobre medios de cultivo. 1er Simposio Internacional de fruticultura Tropical. La Habana, 6 pp.

Ikekawa, N y Zhao, Y (1991) Application of 24-epibrasinolide in agriculture. pp 281-284, American Chemical Society

Krikorian, AD (1995) Hormones in tissue culture and micropropagation. En: David, JD. (Ed) *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd edition. Kluwer Academic Publishers, London

Mitsuoka, K, Honda H, Xing XH y Unno H (1994) Effect of intracellular 2,4 D concentration on plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L) callus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 364-366

Moré, O, Hernández, MM, García, D y Núñez, M (1996) Efecto del DAA-6 sobre la callogénesis y formación de estructuras embrioidales en papa, pp 162. X Seminario Científico del INCA

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497

Narvaez, J y González J (1983) Cultivo de tejidos de arroz (*Oryza sativa* L.). Inducción de callos y regeneración de plantas. *Acta Agronómica.* 33 (1): 5-34

Pérez, M, Núñez, M, Castro, R, Díaz, GS, González, MC y Torres, W (1996) Uso de brasinoesteroides en el cultivo *in vitro* de tejidos de arroz y micropropagación de la caña de azúcar, pp 163. X Seminario Científico del INCA

Ravi, DS y Minocha JL (1993) Efficiency of different explants and media for callus induction and plant regeneration in Basmati rice. *Crop Improv.* 20 (2): 139-142

Ravi, HB y Minocha JL (1993a) Genotypic response for callusing and regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). *Jour. Pl. Sci. Res.* 9: 19-20

Sigarroa, A (1987) Manual de prácticas de biometría y diseño experimental. La Habana. Cuba

Vasil, K y Vasil, V (1993) Embriogenic callus, cell suspension and protoplast culture of cereals. En: Lindsey, K (Ed) *Plant Tissue Culture Manual. Supplement 3*, pp 1-16. Kluwer Academic Publisher. Dordrech