INFLUENCIA DE UN ANÁLOGO DE BRASINOESTEROIDES EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN In Vitro DEL BANANO (Musa spp.) VARIEDAD GRAN ENANO

Tania Rodríguez, Miriam Núñez y H. Vento

ABSTRACT. The effect of different concentrations of a brassinosteroid analog comercially termed Biobras-6, on banano (*Musa* spp) multiplicative step was studied. "Gran enano" variety explants from the eighth subculture which were cultured in MS medium supplemented by vitamins and growth regulators were used and a randomized complete design with eight repetitions was employed. Two product doses -0.05 and 0.01 mg.L^{-1}- varying the 6 BAP concentration -2 and 4 mg.L^{-1}- were assayed at multiplicative step and the ratio 4 mg.L^{-1} 6 BAP and 0.65 mg.L^{-1} IAA was used as control. The plantlet height, shoot and root numbers and survival percentage were evaluated. Results showed that the best combination was the addition of 0.05 mg.L^{-1} BB-6 in two studied subcultures to recommended medium (0.65 mg.L^{-1} IAA and 4 mg.L^{-1} 6 BAP), although there was no statistically significant difference with the control.

Key words: brassinosteroids, *in vitro* culture, multiplicative step, musa

RESUMEN. Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de un análogo de brasinoesteroides denominado comercialmente Biobras-6 en la fase de multiplicación del banano (*Musa* spp.), para lo cual se utilizaron explantes provenientes del octavo subcultivo de la variedad "Gran enano" cultivados *in vitro* en un medio MS con el suplemento de vitaminas y reguladores del crecimiento, empleándose un diseño completamente aleatorizado con ocho repeticiones. Se probaron dos dosis del producto (0.05 y 0.01 mg.L^{-1}) variando la concentración de 6 BAP (2 y 4 mg.L^{-1}) en la etapa de multiplicación; como testigo se empleó una proporción de 4 mg.L^{-1} de 6 BAP y 0.65 mg.L^{-1} de AIA. Los indicadores evaluados fueron: altura de las plántulas, número de brotes, número de raíces y el porcentaje de supervivencia. Los resultados demostraron que la mejor combinación en los dos subcultivos estudiados fue la adición de 0.05 mg.L^{-1} de BB-6 al medio recomendado (0.65 mg.L^{-1} de AIA y 4 mg.L^{-1} de 6 BAP), a pesar de no diferir significativamente del testigo desde el punto de vista estadístico.

Palabras clave: brasinoesteroides, multiplicación *in vitro*, musa

1037

INTRODUCCIÓN

Los impactos más importantes y trascendentales en la aplicación de la biotecnología se están dando en el sector agropecuario, tanto en países desarrollados como en los menos desarrollados. Según Villalobos (1993), citado por Izquierdo, Ciampi y Eva de García (1995), las herramientas biotecnológicas han demostrado ser de gran utilidad para mejorar los cultivos agrícolas en la propagación masiva de plantas superiores; en este proceso se requiere de los reguladores del crecimiento, los cuales son costosos, por lo que se han dedicado serios esfuerzos al uso racional y efectivo de estas sustancias.

En este sentido, se ha demostrado el papel de algunos compuestos como los brasinoesteroides, los cuales según señalan Sakurai, Fujioka y Saimoto (1991), promueven el alargamiento en el cultivo de células vegetales en combinación con las auxinas.

Tania Rodríguez, Profesora Instructora y Dr. H. Vento, Profesor Titular del Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana, Apartado 18-19, San José de las Lajas; Dra. Miriam Núñez, Investigadora Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Desde el aislamiento y la identificación del brasinólido en 1979 por un grupo de investigadores norteamericanos, se han dedicado numerosos recursos a la síntesis de estas lactonas esteroidales y a la evaluación de sus actividades biológicas (Adam y Marquardt, 1986).

En los últimos años, el desarrollo de un grupo de investigaciones en Cuba ha permitido la obtención de varios análogos de estos compuestos, sobre los cuales se han llevado a cabo estudios biológicos con el fin de valorar su actividad como regulador del crecimiento, tanto en condiciones de campo como *in vitro*.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto se llevó a cabo el presente trabajo, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de un análogo de brasinoesteroides, denominado comercialmente como Biobras-6, en la fase de multiplicación *in vitro* del banano.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía del Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La

Habana entre 1997 y 1998, para lo cual se utilizaron explantes de banano de la variedad "Gran enano" del octavo subcultivo en fase de multiplicación, procedentes de la biofábrica de San José de las Lajas, La Habana. El medio de cultivo empleado fue el Murashige y Skoog (1962) con el suplemento de auxina, citoquinina y diferentes concentraciones de un análogo espirostánico de brasinoesteroides (BB-6). Se emplearon ocho frascos por tratamiento con 25 mL de medio semisólido y 10 explantes en cada uno. Los tratamientos empleados se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Tratamientos empleados

Tratamientos	Combinación de reguladores del crecimiento
T-1 Testigo	MS + 0.65 mg.L^{-1} AIA + 4 mg.L^{-1} 6 BAP
T-2	MS + 0.65 mg.L^{-1} AIA + 4mg.L^{-1} 6 BAP+0.01 mg.L^{-1} BB-6
T-3	MS + 0.65 mg.L^{-1} AIA + 4 mg.L^{-1} 6 BAP+0.05 mg.L^{-1} BB-6
T-4	MS + 0.65 mg.L^{-1} AIA + 2 mg.L^{-1} 6 BAP+0.01 mg.L^{-1} BB-6
T-5	MS + 0.65 mg.L^{-1} AIA + 2 mg.L^{-1} 6 BAP+0.05 mg.L^{-1} BB-6

Los explantes permanecieron 21 días en el medio de cultivo; se realizaron dos subcultivos consecutivos manteniendo la composición del medio en cada uno.

Los indicadores evaluados fueron: el número de brotes por explante, altura de las plántulas, número de raíces y porcentaje de supervivencia; los valores del número de raíces fueron transformados como $\sqrt{x+1}$, mientras que para el porcentaje de supervivencia se empleó la función 2 *arcsen* $\sqrt{\%}$ y luego se retransformaron para analizar los valores en por ciento. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza, utilizando un diseño completamente aleatorizado y las medias de los tratamientos se compararon mediante la dócima de rangos múltiples de Duncan en los casos necesarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento del número de brotes por explante. El número de brotes es uno de los aspectos más importantes en esta etapa, ya que de ahí depende la cantidad de descendientes totales a obtener, lo que puede estar influido por la especie, edad del tejido y combinación de reguladores del crecimiento en el medio, entre otros.

Los resultados sobre el número de brotes por explante se aprecian en la Figura 1; en el primer subcultivo el testigo mostró superioridad al compararlo con las demás combinaciones, a pesar de no diferir estadísticamente con el tratamiento 4; entre las restantes variantes no se observaron diferencias estadísticas significativas. Este resultado evidenció un comportamiento superior del testigo respecto a los tratamientos evaluados, a pesar de que no difirió de la baja concentración de BB-6 (0.01 mg.L^{-1}) en presencia de la mitad de la dosis normal de 6 BAP (2 mg.L^{-1}), lo cual pudiera estar dado por un posible efecto acumulativo que necesita el vegetal para estimular este proceso, teniendo en cuenta que en el subcultivo sucesivo el producto ejerció una mayor influencia en el número de brotes. En el segundo subcultivo, el mayor valor se obtuvo en el tratamiento 3 (0.05 mg.L^{-1} de BB-6 y 4 mg.L^{-1} de 6 BAP), aunque este no difirió significativamente del 2 (0.01 mg.L^{-1} de BB-6 e igual dosis de BAP) y del testigo; por otra parte, los tratamientos 4 y 5 difirieron de los anteriores, lo que pudiera deberse a la disminución de la concentración de 6 BAP y similar concentración del AIA, lo que acentúa el efecto auxínico de este brasinoesteroides y está en correspondencia con lo planteado por Silvia Montes *et al.* (1996), Agramonte *et al.* (1996) y Miriam Núñez (1996), quienes manifestaron que este tipo de producto biológico actúa de forma sinérgica con las auxinas. Analizando los dos subcultivos, se aprecia que, en general, disminuyó el número de brotes en el segundo subcultivo del experimento, que representa el décimo subcultivo de la fase de multiplicación, lo que concuerda con lo señalado por Norton y Orton (1986), citados por Pierik (1990), quienes observaron que la proliferación de vástagos era mayor en los primeros subcultivos y disminuía de forma gradual en los posteriores.

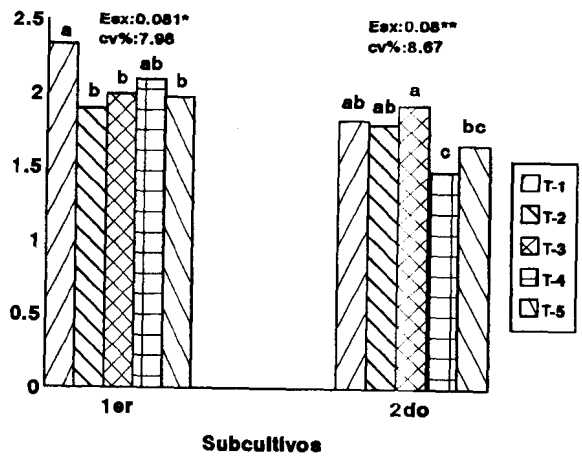


Figura 1. Número de brotes por explante

Comportamiento de la altura de las plántulas. En la Figura 2 se puede apreciar el efecto de las diferentes concentraciones del producto sobre la altura del tallo; en ella se observa que existió una influencia positiva de todas sobre esta variable, lográndose en el primer subcultivo incrementos entre un 14,51-69,35 %. El mayor valor correspondió al tratamiento 5 (0.05 mg.L^{-1} BB-6 y 2 mg.L^{-1} de 6 BAP) con diferencias estadísticas altamente significativas respecto al resto de las concentraciones, siendo muy superior al testigo; la tendencia en este resultado se mantuvo en el segundo subcultivo, donde se lograron incrementos entre 5.22 y 6.71 %, corroborándose la superioridad del tratamiento 5, a pesar de no diferir estadísticamente con los tratamientos 2, 1 y 3 y sí con el 4, lo cual pudiera deberse al efecto estimulador de este producto sobre el crecimiento celular. Esto corrobora los resultados de Carmen Mariña *et al.* (1996) y Aymé Rayas *et al.* (1996).

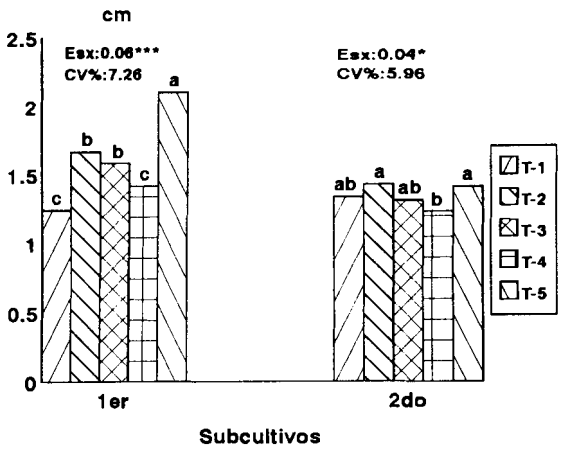


Figura 2. Altura de los explantes

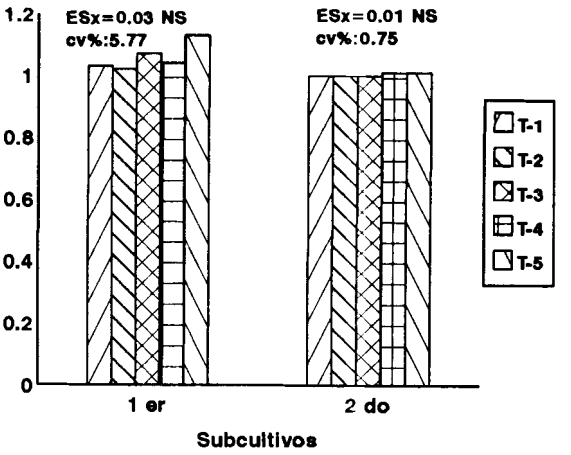


Figura 3. Número de raíces por explante

Influencia del BB-6 sobre el número de raíces por explante. En la Figura 3, al analizar el número de raíces, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados para cualesquiera de los subcultivos en estudio; aunque cabe señalar que en el primer subcultivo hubo un comportamiento uniforme en las diferentes concentraciones, con una tendencia al incremento de este indicador en las dosis más altas del bioestimulante (tratamientos 3 y 5), independientemente de la concentración de 6 BAP, lo que sugiere que con la combinación de bajas dosis de BB-6 se logra mayor efecto inhibitorio. En el segundo subcultivo existió una tendencia mayor en cuanto a la uniformidad de los resultados, lo que posiblemente está ocasionado porque el producto pudo dar lugar a un cierto estímulo en el primer subcultivo, al incorporarle al medio de cultivo el biorregulador que al parecer acentúa el efecto auxínico del AIA. Este resultado puede deberse a que el brasinoesteroides queda en contacto directo y de forma consecutiva en los subcultivos sobre el corte del cormo, lo cual provoca inhibición en la formación de las raíces y coincide con Roddick y Guan (1991). Por otra parte, Rönsch *et al.* (1993) informaron que las posturas tratadas con homobrasinólido aceleraron significativamente la formación de raíces adventicias, lo que demuestra que existen respuestas diversas en cuanto a este indicador en presencia de los brasinoesteroides.

Porcentaje de supervivencia. En la Figura 4 se observa que en el primer subcultivo se obtuvo un efecto positivo sobre este aspecto de los tratamientos 3, 4 y 5, con un 98.1, 97.8 y 98.7 % respectivamente; no se manifestaron diferencias significativas entre ellos y sí con los tratamientos 1 y 2, lo cual puede estar dado por la actividad biológica que presenta este tipo de regulador, que es capaz de incrementar a bajas concentraciones la actividad de las enzimas, la síntesis del ADN, ARN y las proteínas, lo cual fue señalado con anterioridad por Kalinich, Mandava y Todhunter (1985), citados por Miriam Nuñez (1996).

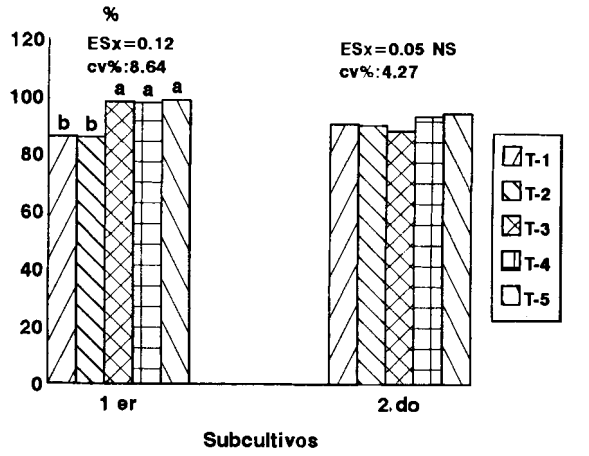


Figura 4. Porcentaje de supervivencia

En el segundo subcultivo, se observó una tendencia a la estabilidad al comparar los tratamientos, donde no se manifestaron diferencias significativas en los niveles de supervivencia de las vitroplantas, aunque pudiera destacarse que existió una tendencia a incrementarse este aspecto en el tratamiento 5 con un 94 %; cabe señalar que el testigo y el tratamiento 2 tendieron a elevar su valor respecto al primer subcultivo, mientras que el resto de los tratamientos declinaron.

CONSIDERACIONES GENERALES

Los resultados hasta aquí descritos demuestran que este análogo estimula el crecimiento de las plántulas en cualesquiera de las concentraciones aplicadas en estas condiciones, lo cual puede estar relacionado con el efecto estimulante de este producto sobre la elongación celular de los tejidos, debido a un posible incremento de las propiedades elásticas de la pared, lo que corrobora los resultados de Wang, Cosgrove y Arteca (1993).

Al analizar e integrar todos los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la importancia del número de brotes por explante en la fase de multiplicación, se puede señalar que la mejor combinación en los dos subcultivos analizados fue 4 $mg.L^{-1}$ de 6 BAP con 0.05 $mg.L^{-1}$ de BB-6 (tratamiento 3), a pesar de no detectarse diferencias estadísticamente significativas con el testigo; además, esta variante manifestó un buen comportamiento respecto a la supervivencia de las vitroplantas durante toda la etapa evaluada.

Estos resultados demuestran las potencialidades de este producto y recomiendan la necesidad de continuar investigando los efectos que estos ejercen en las plantas, con vistas a lograr en un breve plazo su utilización más racional y efectiva.

REFERENCIAS

Adam, G. y V. Marquardt. Brassinosteroids. Phytochem. 25: 1787-1799, 1986.

Efecto del DAA-6 en la micropropagación "in vitro" del plátano (Musa spp) clon FHIA-21. /D. Agramonte... /et al./.- En: Programas y resúmenes X seminario científico INCA. Cultivos Tropicales 17 (2): 158, 1996.

Efectos del DAA-6 en el medio de implantación para la micropropagación "in vitro" del banano (Musa spp.). /Ayme Rayas... /et al./.- En: Programas y resúmenes X seminario científico INCA. Cultivos Tropicales 17(2):158, 1996.

Influencia de análogos de brasinoesteroides en el crecimiento de plantas de arroz. /Carmen Mariña... /et al./.- En: Programas y resúmenes X seminario científico INCA. Cultivos Tropicales 17(2):155, 1996.

Izquierdo, J., L. Ciampi y Eva de García. Biotecnología apropiable: Racionalidad de su desarrollo y aplicación en América Latina y el Caribe. Redbio, 1995.

Núñez, Miriam. Los brasinoesteroides y su actividad biológica. /Miriam Núñez.- La Habana: INCA, 1996.- 35 p.

Pierik, R. L. Cultivo in vitro de plantas superiores.- p. 194, Madrid, 1990.

Roddick, J. Brassinosteroids and root development. /J. Roddick, M. Guan.- En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American Chem. Society, 1991.

Rönsch, H. /et al./. Influence of (22 S; 23S)-homobrassinolide on rooting capacity and survival of adult Norway spruce cutting. Tree Physiol. 12:71-80, 1993.

Sakurai, A. Production of brassinosteroids in plant- cell culture. /A. Sakurai, S. Fujioka, H. Saimoto.- En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American Chem. Society, 1991.

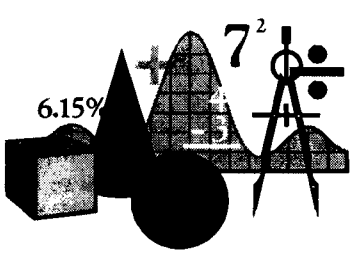
Uso de un análogo de brasinoesteroide DAA-6, en la micropropagación del clavel. /Silvia Montes... /et al./.- En: Programas y resúmenes X seminario científico INCA. Cultivos Tropicales 17(2):163, 1996.

Wang, T. W., D. J. Cosgrove y R. M. Arteca. Brassinosteroid stimulation of hypocotyl elongation and wall relaxation in pakchoi (Brassica chinensis cv. Lei Choi). Plant Physiol. 101: 965-968, 1993.

Recibido: 8 de mayo de 1998
Aceptado: 14 de mayo de 1998

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
CURSOS DE POSGRADO DE MATEMÁTICA APLICADA
1998

"Estadística y diseño experimental"



Noviembre
Duración: 80 horas
Precio: 150.00 USD

Para más información diríjase a:

Dr. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700
Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773
Fax: (53)(64)6-3867
e-mail: inca@ceniai.cu
inca@reduniv.edu.cu