

ANÁLOGOS DE BRASINOESTEROIDES REVIERTEN PARCIALMENTE EL IMPACTO DEL ESTRÉS SALINO EN EL CRECIMIENTO INICIAL DE LAS PLÁNTULAS DE DOS GENOTIPOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Miriam Núñez✉, L. M. Mazorra, Lisbel Martínez, María C. González y Caridad Robaina

ABSTRACT. The effect of two formulations based on spirostane brassinosteroid analogs known as BIOBRAS-6 (BB6) and BIOBRAS-16 (B16) on seedling growth of two rice varieties under saline conditions was studied in the present paper. Seeds of J-104 and INCA LP-7 varieties were dipped in water, 100 mM NaCl or 100 mM NaCl supplemented with different concentrations (1, 0.5, 0.05 and 0.005 mg.L⁻¹) of B16 or BB6 for 24 hours. Later, seeds were placed in Petri dishes with filter paper dampened with distilled water for germination and maintained in a growth chamber at darkness during 48 hours. Germinated seeds were transferred to pots containing the different assayed solutions and placed in a growth chamber with 16 hour- photoperiod and 25±2°C temperature for seven days. At the end of the experiment, shoot and root lengths as well as fresh and dry weights were evaluated. Results showed that, in general, 0.005 mg.L⁻¹ of B16 was the most effective treatment to revert adverse effects induced by salinity in both varieties, whereas the response to BB6 depended on the variety.

Key words: brassinosteroids, growth, rice, salinity

INTRODUCCIÓN

Los brasinoesteroides son compuestos esteroidales naturales, que juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas (1, 2). Particularmente, en arroz, se ha demostrado recientemente, que los genes *OsBLE1* y *OsBLE3* están involucrados en los procesos de crecimiento regulados por la brasinólida (3, 4). Por otra parte, diversos estudios han revelado que la aplica-

Dr.C. Miriam Núñez, Investigador Titular; Ms.C. L. M. Mazorra, Investigador y Lisbel Martínez, Especialista del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal; Dra.C. María C. González, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Dra.C. Caridad Robaina, Investigadora del Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ mnunez@inca.edu.cu

RESUMEN. En el presente trabajo se estudió el efecto de dos formulaciones a base de análogos espiroestánicos de brasinoesteroides conocidas como BIOBRAS-6 (BB6) y BIOBRAS-16 (B16) en el crecimiento de las plántulas de dos variedades de arroz en condiciones salinas. Semillas de las variedades J-104 e INCA LP-7 fueron imbibidas durante 24 horas con soluciones de agua, 100 mM de NaCl ó 100 mM de NaCl suplementados con diferentes concentraciones (1, 0.5, 0.05 y 0.005 mg.L⁻¹) de B16 ó BB6. Posteriormente, las semillas se pusieron a germinar en placas Petri con papel de filtro humedecido en agua destilada y se colocaron en la oscuridad en una cámara de crecimiento durante 48 horas. Las semillas germinadas se transfirieron a potes, se les adicionaron las soluciones de ensayo y se colocaron en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas y temperatura de 25±2°C durante siete días. Al final del experimento se evaluaron las longitudes del vástago y de las raíces, así como las masas fresca y seca de la parte aérea y las raíces. Los resultados mostraron que, de forma general, el tratamiento con 0.005 mg.L⁻¹ de B16 fue el más efectivo en revertir los efectos adversos de la salinidad en ambas variedades, mientras que la respuesta al BB6 estuvo en dependencia de la variedad.

Palabras clave: brasinoesteroides, crecimiento, arroz, salinidad

ción exógena de estos compuestos contrarrestan los efectos adversos que provocan los estrés abióticos en las plantas (5, 6, 7), aunque los mecanismos por los cuales ellos actúan están aún por dilucidar (8).

Uno de los primeros efectos fisiológicos que provoca el estrés salino en las plantas es la reducción del crecimiento, debido a una disminución en la capacidad de absorción de agua de estas (9); por lo que este se convierte en un buen indicador para evaluar la capacidad de algunos productos de proteger a las plantas contra este tipo de estrés.

En Cuba, se ha demostrado que algunas formulaciones que tienen como ingredientes activos análogos espiroestánicos de brasinoesteroides, como son las conocidas como BIOBRAS-6 y BIOBRAS-16 pueden ser utilizadas como estimuladores de los rendimientos agrícolas en cultivos de importancia económica (10); sin embargo, existe muy poca

información publicada relacionada con la posible protección que estas formulaciones puedan ejercer ante condiciones de estrés. Resultados previos han demostrado que el BIOBRAS-16 fue capaz de estimular la actividad de algunas enzimas antioxidantes de plántulas de arroz ante condiciones de estrés salino (11), aunque no se evaluó si este comportamiento estaba asociado a la protección contra el estrés.

El propósito fundamental del presente trabajo fue evaluar la capacidad del BIOBRAS-6 o del BIOBRAS-16 de revertir los efectos adversos que la salinidad provoca en el crecimiento de plántulas de dos variedades de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

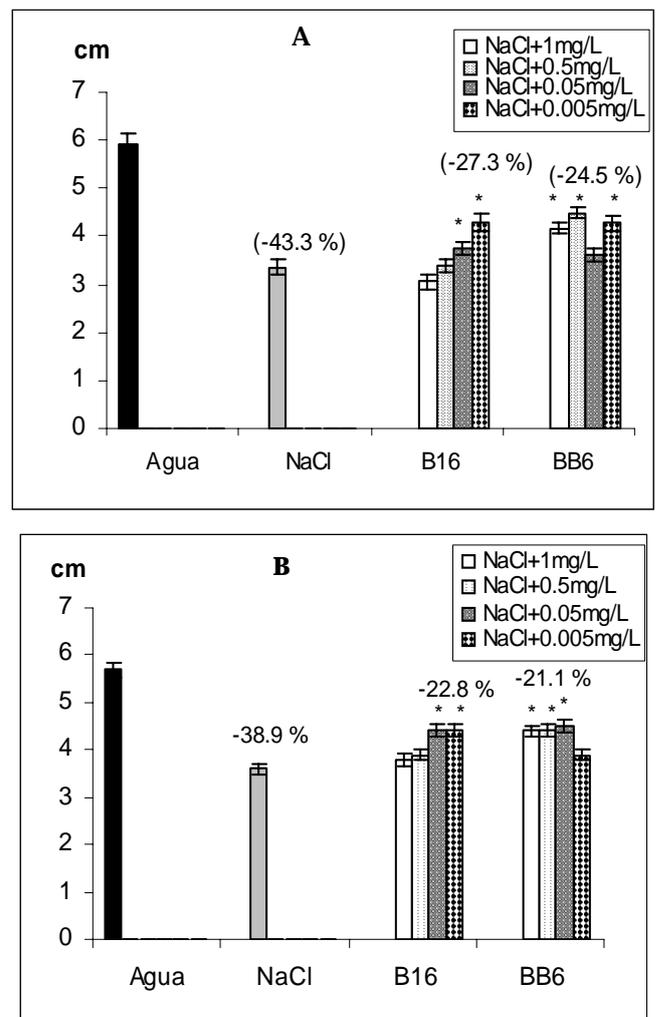
Semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) de los cultivares J-104 e INCA LP-7 se imbibieron durante 24 horas con soluciones de agua, NaCl 100 mM ó NaCl 100 mM suplementadas con diferentes concentraciones (1, 0.5, 0.05 y 0.005 mg.L⁻¹) de BIOBRAS-6 (BB6) o BIOBRAS-16 (B16). Una vez culminada la imbibición, las semillas se colocaron en placas Petri (25 semillas por placa y cinco placas por tratamiento) con papel de filtro humedecido con agua destilada y se colocaron en cámara de crecimiento en la oscuridad a 25±1°C para propiciar la germinación. A las 48 horas, las semillas germinadas (aquellas con una longitud de la radícula mayor de 2 mm) se transfirieron a potes (20 semillas por pote y dos potes por tratamiento) que contenían las diferentes soluciones de ensayo y se colocaron en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas y temperatura de 25±2°C. Siete días después, se midieron las longitudes del vástago y las raíces de todas las plantas y se conformaron ocho muestras de cinco plantas para evaluar las masas fresca y seca de la parte aérea y las raíces.

El experimento se repitió en dos ocasiones. El análisis estadístico efectuado a todos los datos obtenidos fue el cálculo de las medias y los intervalos de confianza a $\alpha=0.05$ de cada variable evaluada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se debe señalar que la concentración de NaCl utilizada no afectó el porcentaje de germinación de las semillas (datos no mostrados); sin embargo, hubo una reducción en el crecimiento de las plántulas de ambos cultivares.

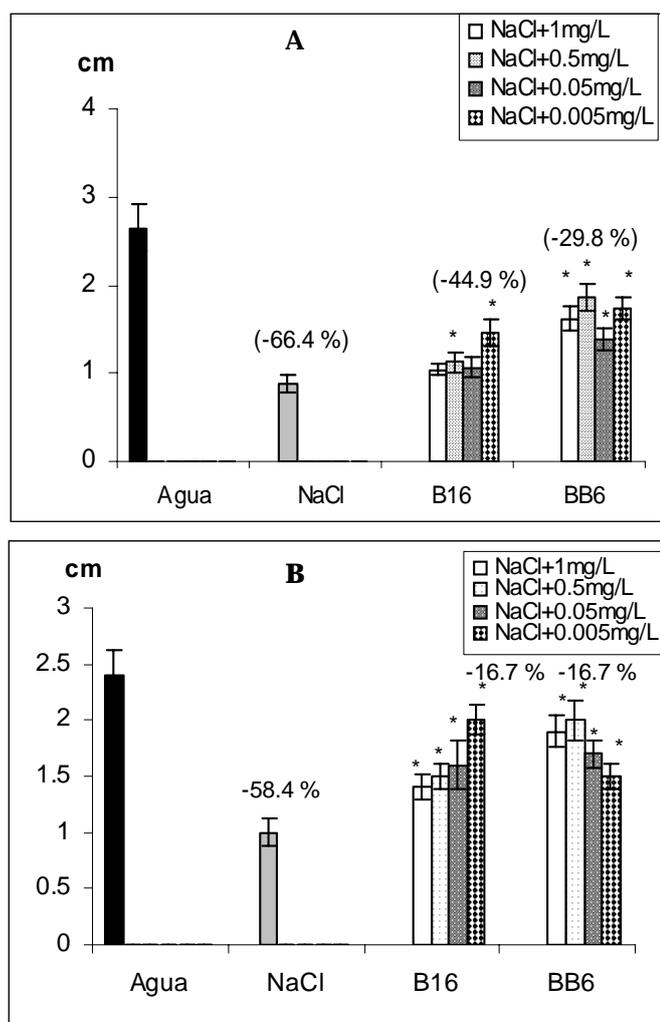
La reducción en el alargamiento del vástago y de las raíces que provocó la concentración de 100 mM de NaCl se observa en las Figuras 1 y 2. En primer lugar, se debe notar que la sal afectó más la longitud de las raíces que la del vástago en ambos cultivares, encontrándose reducciones en las raíces de 66.4 y 58.4 %, para J-104 e INCA LP-7, respectivamente, mientras que en el vástago estas solo fueron de 43.3 y 38.9 %. La adición de los análogos de brasinoesteroides favoreció el alargamiento del tallo y de las raíces en esas condiciones y este efecto estuvo muy relacionado con el tipo de análogo y la concentración de este.



Las barras representan los intervalos de confianza a $\alpha=0.05$ y los asteriscos las medias que difieren significativamente del tratamiento con NaCl

Figura 1. Influencia de la adición de diferentes concentraciones de BIOBRAS-16 (B16) y BIOBRAS-6 (BB6) en la longitud del vástago de plántulas de arroz de las variedades J-104 (A) e INCA LP-7 (B) crecidas en solución de 100 mM de NaCl

De forma general, se observa que en el caso del BIOBRAS-16 (B16), las concentraciones menores (0.05 y 0.005 mg.L⁻¹) tuvieron un efecto más protector de la elongación de ambos órganos que las mayores concentraciones, destacándose la de 0.005 mg.L⁻¹, con la cual se obtuvieron las menores reducciones de la longitud del vástago y las raíces en ambas variedades. Sin embargo, la respuesta de las plántulas a la presencia de BIOBRAS-6 (BB6) fue diferente, ya que, de forma general, las mejores respuestas se obtuvieron con las concentraciones más altas, destacándose la concentración de 0.5 mg.L⁻¹ como la más efectiva para ambas variedades.



Las barras representan los intervalos de confianza a $\alpha=0.05$ y los asteriscos las medias que difieren significativamente del tratamiento con NaCl

Figura 2. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de BIOBRAS-16 (B16) y BIOBRAS-6 (BB6) en la longitud de las raíces de plántulas de arroz de las variedades J-104 (A) e INCA LP-7 (B) crecidas en solución de 100 mM de NaCl

Las masas fresca y seca tanto de la parte aérea como de las raíces también se afectaron por la presencia de NaCl en el medio, resultando la masa fresca de las raíces más afectada que la parte aérea en ambas variedades; sin embargo, la reducción de la masa seca de ambos órganos fue de similares magnitudes, 38.1 y 39.5 %, en J-104, y 28.2 y 31.8 %, en INCA LP-7, para las raíces y parte aérea, respectivamente (Tabla I).

La adición de los análogos de brasinoesteroides al NaCl favoreció la acumulación de masas fresca y seca de los órganos, aunque la respuesta no solo estuvo en función del tipo y de la concentración del análogo sino también de la variedad en cuestión (Tabla I). En el caso del BIOBRAS-16, las mejores respuestas para ambas variedades, en general, se obtuvieron con la concentra-

ción de 0.005 mg.L⁻¹ del análogo; sin embargo, en el caso del BIOBRAS-6 las mejores respuestas, en las variedades J-104 e INCA LP-7, se obtuvieron con las concentraciones de 0.5 y 0.005 mg.L⁻¹ y 0.05 mg.L⁻¹, respectivamente.

Tabla I. Comportamiento de las masas fresca y seca de la parte aérea y las raíces de plántulas de dos variedades de arroz crecidas en solución de NaCl 100 mM suplementadas o no con diferentes concentraciones de dos análogos de brasinoesteroides (medias±intervalos de confianza a $\alpha=0.05$)

Tratamientos	Masa fresca (mg)		Masa seca (mg)	
	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces
Variedad J-104				
Agua	20.9±1.50	24.6±3.67	4.3±0.40	4.2±0.41
NaCl	13.3±0.83	11.6±0.98	2.6±0.15	2.6±0.21
NaCl+1 mg.L ⁻¹ B16	11.1±0.97	12.2±1.42	2.4±0.26	2.9±0.42
NaCl+0.5 mg.L ⁻¹ B16	14.1±0.70	11.0±0.80	2.9±0.30	3.0±0.21
NaCl+0.05 mg.L ⁻¹ B16	14.4±0.77	13.0±0.95	3.0±0.14*	3.0±0.28
NaCl+0.005 mg.L ⁻¹ B16	15.9±1.09*	15.2±0.79*	3.3±0.25*	3.5±0.18*
NaCl+1 mg.L ⁻¹ BB6	13.0±0.83	10.8±1.08	2.8±0.14	2.8±0.26
NaCl+0.5 mg.L ⁻¹ BB6	16.6±0.92*	15.0±1.01*	3.5±0.17*	3.6±0.07*
NaCl+0.05 mg.L ⁻¹ BB6	14.6±0.82	12.7±0.95	3.0±0.17*	3.2±0.18*
NaCl+0.005 mg.L ⁻¹ BB6	15.8±0.59*	17.2±1.08*	3.5±0.15*	4.2±0.17*
Variedad INCA LP-7				
Agua	17.6±0.80	24.1±1.3	4.4±0.30	3.9±0.26
NaCl	13.6±1.29	12.7±0.8	3.0±0.25	2.8±0.29
NaCl+1 mg.L ⁻¹ B16	13.5±1.33	13.6±1.0	3.0±0.15	2.9±0.15
NaCl+0.5 mg.L ⁻¹ B16	14.2±0.41	14.6±1.0*	3.5±0.16*	3.2±0.16
NaCl+0.05 mg.L ⁻¹ B16	15.0±0.88	16.4±1.7*	3.7±0.28*	3.4±0.30*
NaCl+0.005 mg.L ⁻¹ B16	16.3±0.71*	15.0±0.9*	3.7±0.18*	3.4±0.13*
NaCl+1 mg.L ⁻¹ BB6	13.9±0.77	11.1±2.6	3.1±0.26	2.7±0.58
NaCl+0.5 mg.L ⁻¹ BB6	14.3±1.41	12.9±1.9	3.5±0.31	3.3±0.20*
NaCl+0.05 mg.L ⁻¹ BB6	16.1±1.04*	15.6±0.7*	3.6±0.22*	3.5±0.13*
NaCl+0.005 mg.L ⁻¹ BB6	14.8±1.31	14.2±1.1	3.3±0.24	3.3±0.27

Los asteriscos representan las medias que difieren significativamente del tratamiento con NaCl

Analizando la respuesta de todos los indicadores evaluados, se puede plantear que la concentración de 0.005 mg.L⁻¹ de BIOBRAS-16 fue la más efectiva en la protección contra el estrés salino en los dos cultivares estudiados, mientras que las concentraciones de 0.5 y 0.05 mg.L⁻¹ de BIOBRAS-6 resultaron las mejores para J-104 e INCA LP-7, respectivamente.

De estos resultados se desprende que la efectividad del BIOBRAS-16 fue mejor que la del BIOBRAS-6, pues se necesitó mucha menor concentración para la protección de las plántulas y esta fue independiente del genotipo en cuestión.

Diversos investigadores han estudiado el efecto de los brasinoesteroides en la protección a las plantas ante condiciones de estrés abióticos. En arroz, se ha demostrado que el tratamiento a las semillas durante 24 horas con soluciones de 3 μM de brasinólida, 24-epibrasinólida u homobrasinólida fue capaz de reducir considerablemente el efecto adverso que en el crecimiento de las plantas (evaluado a los 20 días) causa la adición a la solución nutritiva de 150 mM de NaCl. Este efecto estuvo relacionado con un incremento en la actividad de la enzima ni-

trato reductasa y en la concentración de clorofilas en las hojas inducido por los brasinoesteroides en condiciones salinas (12). Otros autores trabajando con una variedad sensible a la salinidad (13) encontraron que semillas tratadas por 24 horas con 120 mM de NaCl + 3 μ M de 24-epibrasinólida (EBL) y colocadas a las 96 horas en un medio con la misma solución, mejoraron su crecimiento de la parte aérea pero no el de las raíces, siete días después, en comparación con semillas tratadas con 120 mM de NaCl y crecidas en esa misma solución. Esta respuesta diferente al tratamiento con EBL puede estar asociada no solo a la sensibilidad de la variedad al estrés sino también al momento en que se efectuaron las evaluaciones, a la forma de realizar los tratamientos y a la duración del estrés, pues en el primer caso las semillas fueron tratadas con la EBL solamente y crecieron en solución nutritiva con suministro en días alternos de 150 mM de NaCl; mientras que en el segundo caso, las semillas se trataron y las plantas crecieron durante siete días con 120 mM NaCl+EBL. Esto demuestra que la respuesta al tratamiento con brasinoesteroides puede depender de muchos factores, por lo que se hace necesario continuar profundizando en la actividad antiestrés de estas nuevas hormonas vegetales.

En este trabajo se utilizan análogos espiroestánicos de brasinoesteroides, compuestos obtenidos por síntesis química que son análogos de la castasterona y que han demostrado tener una actividad similar a los brasinoesteroides (10). Los resultados mostraron que 0.005 mg.L⁻¹ (0.01 μ M) de BIOBRAS-16 fue la concentración más efectiva para reducir el impacto del estrés salino en el crecimiento inicial de las plántulas de ambas variedades y que se necesitó como máximo una concentración de 0.5 mg.L⁻¹ (1 μ M) de BIOBRAS-6 para obtener igual efecto. Estas concentraciones resultan inferiores a las de brasinoesteroides utilizadas por otros autores (14) para reducir el impacto del estrés salino en arroz; sin embargo, hay que considerar que en este trabajo se utilizó 100 mM de NaCl, mientras que ellos utilizaron una mayor intensidad de estrés (150 mM NaCl).

Por otra parte, se debe destacar que aunque en este estudio se utilizaron dos cultivares de arroz, que, a nivel de campo, responden de manera diferente al estrés salino (15), no resultaron muy contrastantes en sus respuestas a la concentración de 100 mM de NaCl en la fase inicial de crecimiento.

Se debe notar que la J-104, que resultó ligeramente más sensible a la salinidad pues redujo la longitud, masas fresca y seca de las raíces en 66.7, 52.8 y 38.1%, respectivamente, fue capaz de revertir parcialmente estas reducciones con el uso de la concentración más baja (0.005 mg.L⁻¹) de BIOBRAS-16 ó de BIOBRAS-6, recuperándose totalmente, con este último análogo, la masa seca de las raíces (Tabla I). Sin embargo, la INCA LP-7, cuyas raíces resultaron ligeramente más tolerantes (re-

ducciones en presencia de 100 mM NaCl de 50.3, 47.3 y 28.2 % para la longitud, masas fresca y seca, respectivamente) requirió de mayor concentración (0.05 mg.L⁻¹) del análogo BB6 para revertir significativamente el impacto que provocó dicho estrés en el crecimiento de este órgano. Esto sugiere que la efectividad de la concentración de estos análogos puede estar relacionada con la tolerancia del genotipo al estrés salino; por lo que sería de gran interés científico evaluar estos análogos en genotipos de respuestas más contrastantes a este tipo de estrés.

Es conocido que la respuesta de las plantas a la aplicación exógena de brasinoesteroides en condiciones de estrés está en dependencia de la tolerancia de la variedad, ya que algunos autores trabajando con maíz y estrés hídrico demostraron que mientras la variedad tolerante respondió satisfactoriamente a la aplicación de brasinólida, la susceptible no lo hizo (16).

En cuanto a la efectividad de ambos análogos, en este trabajo se demostró que a pesar de que ellos son isómeros, pues su diferencia radica en la posición de uno de los grupos hidroxilos del anillo esteroide (10), el BIOBRAS-16 resultó más efectivo.

Existe muy poca información acerca de las potencialidades antiestrés de estos análogos de brasinoesteroides y menos aún de los posibles mecanismos por los cuales ellos pueden actuar. No obstante, estudios anteriores han revelado que concentraciones de 0.001 y 0.01 mg.L⁻¹ de BIOBRAS-16 fueron capaces de estimular las actividades de algunas enzimas antioxidantes de plántulas de arroz crecidas *in vitro* en un medio suplementado con 75 mM de NaCl (11); sin embargo, no se conoce si esta respuesta del sistema antioxidante está asociada o no a una protección contra el estrés. Por otra parte, se han informado las potencialidades del BIOBRAS-6 para proteger a las plántulas de tomate ante un choque térmico moderado (17) y de otro análogo espiroestánico (MH-5) para proteger a las plántulas de arroz contra un período corto de déficit hídrico (18).

Aunque los resultados de este trabajo revelaron las potencialidades de estos análogos para revertir de forma parcial los efectos adversos que la salinidad provoca en el crecimiento de las plantas de dos genotipos de arroz, hay que tener en cuenta que en este estudio el estrés salino se impuso en la fase inicial del crecimiento de las plantas y por un período relativamente corto (siete días); por lo que se hace necesario continuar profundizando en este sentido, evaluando, por ejemplo, períodos más prolongados de imposición del estrés, otras fases fenológicas del cultivo, otras formas de aplicación de los productos, entre otras, lo que permitirá, en un futuro, tener una visión mucho más amplia de la actividad antiestrés de estos análogos sintetizados en Cuba, dada la importancia que esta tiene para la agricultura de nuestro país.

REFERENCIAS

1. Clouse, S. D. Brassinosteroids. *Current Biology*, 2001, vol. 11, p. 904.
2. Sasse, J. M. Physiological actions of brassinosteroids: An update. *J. Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 22, p. 276-288.
3. Yang, G.; Komatsu, S. Molecular cloning and characterization of a novel brassinolide enhanced gene *OsBLE1* in *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 2004, vol. 42, p. 1-6.
4. Yang, G.; Nakamura, H.; Ichikawa, H.; Kitano, H.; Komatsu, S. *OsBLE3*, a brassinolide-enhanced gene, is involved in the growth of rice. *Phytochemistry*, 2006, vol. 67, p. 1442-1454.
5. Dhaubhadel, S.; Chaudhary, S.; Dobinson, K. F. y Krishna P. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 40, p. 333-342.
6. Vardhini, B. V. y Rao, S. S. R. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 41, p. 25-31.
7. Upreti, K. K. y Murti, G. S. R. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content, and nitrogenase activity in French bean under water stress. *Biol. Plant.*, 2004, vol. 48, no.3, p. 407-411.
8. Krishna, P. Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 22, p. 289-297.
9. González, L. M. Apuntes sobre la fisiología de las plantas cultivadas bajo estrés de salinidad. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 23, no. 4, p. 47-57.
10. Núñez, M. Synthesis and practical applications of brassinosteroid analogs. En: *Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity*. Netherlands:Kluwer Academic Publishers, 2003.
11. Núñez, M.; Mazzafera, P.; Mazorra, L. M.; Siquiera, W. J. y Zullo, M. A.T. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.*, 2003-2004, vol. 47, p. 67-70.
12. Anuradha, S. y Rao, S. S. R. Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 40, p. 29-32.
13. Ösdemir, F.; Bor, M.; Demiral, T. y Türkan, I. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.*, 2004, vol. 42, p. 203-211.
14. Anuradha, S. y Rao, S.S.R. Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul.*, 2001, vol. 33, p. 151-153.
15. González, M. C.; Cristo, E.; Pérez, N. y Delgado, P. INCA LP-7, nueva variedad de arroz para suelos afectados por la salinidad. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no.3, p. 89.
16. Li, L. y Van Staden, J. Effects of plant growth regulators on the antioxidant systems in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.*, 1998, vol. 24, p. 55-66.
17. Mazorra, L. M. Inducción de respuestas antioxidantes y tolerancia al choque térmico por los brasinoesteroides y sus análogos en plántulas de tomate. [Tesis de Maestría]. Universidad de La Habana, 2004.
18. García, A.; Rodríguez, T.; Héctor, E. y Núñez, M. Efecto del análogo de brasinoesteroide MH-5 en el crecimiento del arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de déficit hídrico. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 26, no. 1, p. 87-91.

Recibido: 17 de noviembre de 2006

Aceptado: 6 de julio de 2007