

# INFLUENCIA DE LA 24-EPIBRASINÓLIDA Y UN ANÁLOGO ESPIROSTÁNICO DE BRASINOESTEROIDES EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE DOS VARIEDADES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EN MEDIO SALINO

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

**ABSTRACT.** Saline stress reduces water-absorbing capacity of plants, causing a quick growth reduction. Brassinosteroids are involved in plant tolerance to this kind of stress. This paper presents the effect of treatments with a natural brassinosteroid (24-epibrassinolide, EBR) and a brassinosteroid spirotanic analog (MH5) on seedling growth of two rice varieties in a culture medium supplemented with or without NaCl. Seeds from J-104 and INCA LP-7 germinated in a MS medium supplemented with EBR or MH5 for seven days. Seedlings were later transferred to a single MS medium or supplemented with 100 or 150 mM NaCl for 12 days. The presence of NaCl in the culture medium proved to differently affect seedling growth of those varieties and, even though treatments with EBR were capable of significantly promoting the cumulative fresh weight rate of leaves from INCA LP-7 seedlings grown in a medium supplemented with 100 mM NaCl and of roots from J-104 seedlings grown in a saline medium, absolute values of these indicators did not differ from the ones of the control treatment.

*Key words:* rice, growth, saline stress, plant growth regulators, brassinosteroids

**RESUMEN.** El estrés salino reduce la capacidad de las plantas de absorber agua, causando una rápida reducción en el crecimiento. Se ha informado que los brasinoesteroides están implicados en la tolerancia de las plantas a este tipo de estrés. Este trabajo estudió el efecto de los tratamientos con un brasinoesteroide natural (24-epibrasinólida, EBR) y un análogo espiroestánico de brasinoesteroide (MH5) en el crecimiento de plántulas de dos variedades de arroz y crecidas en medios de cultivo suplementados o no con NaCl. Semillas de las variedades J-104 e INCA LP-7 fueron germinadas en la presencia de medio MS suplementado con EBR o MH5 durante siete días. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a medio MS solo o suplementado con 100 ó 150 mM de NaCl durante 12 días. Se constató que la presencia de NaCl en el medio de cultivo afectó de forma diferenciada el crecimiento de las plántulas de ambas variedades y que, aunque los tratamientos con EBR fueron capaces de estimular significativamente la tasa de acumulación de masa fresca de la parte aérea de las plántulas de la variedad INCA LP-7 crecidas en medio suplementado con 100 mM de NaCl y la masa fresca de las raíces de las plántulas de la variedad J-104 crecidas en medio salino, los valores absolutos de estos indicadores no difirieron de los del tratamiento control.

*Palabras clave:* arroz, crecimiento, estrés salino, sustancias de crecimiento vegetal, brasinoesteroides

## INTRODUCCIÓN

El estrés salino es uno de los factores ambientales que más limita la productividad de los cultivos. La salinidad, además de provocar la degradación del suelo agrícola (1), reduce la capacidad de las plantas de absorber agua, causando una rápida reducción de la velocidad

de crecimiento (2) y disminución del rendimiento y la calidad de las cosechas (3).

En Cuba, el 14 % del área agrícola nacional se encuentra afectada por salinidad y el cultivo del arroz es uno de los más afectados por esta causa (4), por lo que resulta de gran importancia elaborar estrategias que permitan no solo incrementar la producción de los cultivos en estas áreas, sino además conservarlas como áreas productivas.

Los brasinoesteroides (BR), sustancias de estructura esteroideal ampliamente distribuidas en el reino vegetal, han estado implicados en la tolerancia al estrés salino (5). De esta forma, se ha demostrado que la aplicación de BR a semillas redujo el impacto del estrés salino en la germinación, el crecimiento y metabolismo de

Dr.C. Miriam Núñez, Investigador Titular; L. M. Mazorra, Investigador y Lisbel Martínez, Reserva Científica 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; Dra.C. Caridad Robaina, Investigadora del Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.

✉ mnunez@inca.edu.cu

plántulas de arroz (6, 7). Estos efectos pueden ser de gran interés para la agricultura (8); por tal motivo, hace más de una década se han venido desarrollando diversos análogos (9, 10), incluyendo los análogos espiroestánicos de BR (11), con el propósito de reducir los costos de producción y lograr productos con una actividad biológica más estable a nivel de campo. Uno de estos análogos espiroestánicos es el denominado MH5, el cual tiene la característica de poseer tres grupos OH en los anillos A y B del núcleo esteroide (11) y se ha demostrado que su adición a los medios de cultivo es efectiva en diferentes procesos biotecnológicos (12, 13, 14), así como en el incremento de las actividades de algunas enzimas antioxidantes en plántulas de tomate ante condiciones de estrés térmico (15).

En este trabajo, se ha querido probar si la germinación y el crecimiento inicial en medios de cultivo suplementados con 24 epibrasinólida o MH5 es capaz de reducir el impacto que el estrés salino provoca en el crecimiento posterior de las plántulas de dos variedades de arroz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas descascaradas y previamente esterilizadas de arroz (*Oryza sativa* L.) de las variedades J-104 e INCA LP-7 se colocaron en placas Petri que contenían medio basal MS (16) suplementado con inositol 100 mg.L<sup>-1</sup>, tiamina 10 mg.L<sup>-1</sup>, piridoxina 2.5 mg.L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 1.85 mg.L<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.L<sup>-1</sup> y agar 0.6 %. Además, se añadió al medio 24-epibrasinólida (EBR, *CIDtech Research Inc.*) o MH5 (formulación que tiene como ingrediente activo al análogo espiroestánico 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\alpha$ -espirostan-6-ona, suministrado por el Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana) en dos concentraciones (0.1 y 1.0  $\mu$ M). Se utilizó un medio de cultivo sin EBR ni MH5 como control. El pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de ser sometido a la autoclave (20 min, 121°C, 1.25 kg.cm<sup>-1</sup> de presión). Las placas se mantuvieron en la oscuridad a 25°C durante 96 horas para promover la germinación de las semillas y luego fueron transferidas a un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad suministrado por tubos fluorescentes (48  $\mu$ mol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y temperatura de 25  $\pm$  2°C.

A los siete días, a 15 plántulas por tratamiento (cinco muestras de tres plantas cada una) se les realizaron las evaluaciones de crecimiento y doce plántulas por tratamiento fueron transferidas a tubos de cultivo que contenían 15 mL de medio basal MS suplementado con NaCl en tres concentraciones (0, 100, 150 mM) y se colocaron durante 12 días en un cuarto de crecimiento con condiciones similares a las descritas anteriormente. Al final del experimento, se conformaron seis muestras de dos plantas cada una por tratamiento para realizar las evaluaciones.

Las evaluaciones de crecimiento fueron: masas fresca y seca de la parte aérea y las raíces. Se calculó, además, la tasa absoluta de crecimiento de las plántulas

(TAC) en función de estos indicadores, durante su exposición a las tres concentraciones de NaCl y para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$TAC = (X_f - X_i) / t$$

Donde:

X<sub>f</sub> = valor de la variable al final del experimento

X<sub>i</sub> = valor de la variable en el momento de la transferencia a los tubos

t = tiempo de permanencia de las plántulas en los tubos

Los análisis estadísticos realizados fueron los cálculos de la media, la desviación estándar y el intervalo de confianza a p < 0.05, usando como mínimo n = 5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que los brasinoesteroides son hormonas que juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas (17), primeramente se determinó la influencia que la presencia en el medio de cultivo de la EBR y el MH5, a las concentraciones seleccionadas, ejercieron en el crecimiento de las plántulas.

En la Tabla I se presentan los resultados de esta primera evaluación y se puede apreciar que, en general, la concentración más alta de EBR fue capaz de inhibir el crecimiento de las plántulas de las dos variedades de arroz, siendo esto más notable en la variedad J-104.

**Tabla I. Influencia de la 24-epibrasinólida y el análogo espiroestánico de brasinoesteroide MH5 en el crecimiento *in vitro* de plántulas de dos variedades de arroz (Medias  $\pm$  Intervalo de confianza, n=5)**

Tratamientos	Masa fresca (mg.planta <sup>-1</sup> )		Masa seca (mg.planta <sup>-1</sup> )	
	Parte aérea	Raíces	Parte aérea	Raíces
INCA LP-7				
Control	45.51 $\pm$ 7.62	56.51 $\pm$ 9.16	6.47 $\pm$ 0.85	7.63 $\pm$ 0.98
0.1 $\mu$ M EBR	51.62 $\pm$ 5.84	<b>42.66 <math>\pm</math> 3.56*</b>	6.96 $\pm$ 0.74	6.56 $\pm$ 0.19
1.0 $\mu$ M EBR	<b>30.09 <math>\pm</math> 1.55*</b>	<b>36.02 <math>\pm</math> 6.36*</b>	<b>4.44 <math>\pm</math> 0.43*</b>	6.73 $\pm$ 0.83
0.1 $\mu$ M MH5	55.20 $\pm$ 7.92	45.75 $\pm$ 4.59	7.47 $\pm$ 1.06	7.19 $\pm$ 1.04
1.0 $\mu$ M MH5	41.48 $\pm$ 4.62	47.10 $\pm$ 4.56	5.87 $\pm$ 0.69	7.53 $\pm$ 0.70
J-104				
Control	67.02 $\pm$ 2.69	48.89 $\pm$ 3.66	8.72 $\pm$ 0.37	6.31 $\pm$ 0.39
0.1 $\mu$ M EBR	<b>58.43 <math>\pm</math> 2.78*</b>	<b>34.55 <math>\pm</math> 3.78*</b>	8.15 $\pm$ 0.49	5.67 $\pm$ 0.38
1.0 $\mu$ M EBR	<b>49.89 <math>\pm</math> 4.66*</b>	<b>39.11 <math>\pm</math> 2.50*</b>	<b>7.47 <math>\pm</math> 0.65*</b>	<b>7.39 <math>\pm</math> 0.34*</b>
0.1 $\mu$ M MH5	76.62 $\pm$ 9.57	48.69 $\pm$ 3.07	<b>10.49 <math>\pm</math> 0.90*</b>	6.89 $\pm$ 0.22
1.0 $\mu$ M MH5	63.84 $\pm$ 1.56	49.93 $\pm$ 4.58	8.98 $\pm$ 0.21	<b>7.62 <math>\pm</math> 0.36*</b>

Estos resultados demostraron la respuesta diferenciada de los dos genotipos a la aplicación exógena de la EBR, además de que reveló la importancia de la concentración utilizada. No obstante, los resultados revelaron que la presencia de la EBR, en cualquiera de las dos concentraciones en el medio de cultivo, limitó la absorción de agua por las raíces en ambas variedades, al reducir significativamente la masa fresca y el transporte o retención de agua por la parte aérea en el caso de la variedad J-104.

Existen evidencias que demuestran el papel de los brasinoesteroides en la elongación celular y se ha sugerido que estos compuestos afectan las propiedades me-

cánicas de las paredes celulares, ya sea por vía genómica o no genómica, para permitir que proceda la expansión celular manejada por la turgencia (18). En el caso particular del arroz, se ha demostrado que los BR y las giberelinas sobre-regulan los genes *OsXTR1* y *OsXTR3* que codifican para enzimas endotransglicosilasas de xiloglucano, que son preferencialmente expresadas en las zonas de elongación de los entrenudos y se sugirió que los BR son esenciales para la sensibilidad a la giberelina y que existe interacción en las señales de estas dos hormonas vegetales (19).

No obstante, aunque es evidente el papel de los BR en el crecimiento de las plantas, fundamentalmente en la elongación celular, la respuesta a las aplicaciones exógenas de estos compuestos depende de la concentración aplicada. Así, por ejemplo, en el cultivo de la soya, se observaron efectos inhibitorios en las longitudes y masas secas del tallo y las raíces cuando estas últimas fueron tratadas con concentraciones que oscilaron entre 0.1 y 10  $\mu\text{M}$  de EBR (20); sin embargo, en raíces de posturas de sorgo tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de EBR, se obtuvieron incrementos significativos en las masas frescas de la parte aérea y las raíces (17). En el caso particular del arroz, se ha informado que no solo la concentración, sino además el momento de aplicación y la longitud de exposición a la brasinólida, influyeron notablemente en la respuesta de crecimiento de las plántulas (21). En el presente trabajo, se utilizaron concentraciones relativamente altas de EBR (0.1 y 1.0  $\mu\text{M}$ ) y una exposición de las semillas a ellas por siete días, lo cual pudiera explicar la inhibición encontrada en la acumulación de las masas frescas de las plántulas, que se hizo más evidente en el caso de la variedad J-104.

En cuanto al análogo MH5, los resultados mostraron que este compuesto, en las concentraciones ensayadas, no inhibió significativamente el crecimiento de las plántulas de arroz, sino por el contrario, en el caso de la variedad J-104, la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  y la de 1.0  $\mu\text{M}$  estimuló la masa seca de la parte aérea y las raíces, respectivamente.

En un estudio realizado en otra gramínea (caña de azúcar), utilizando otro análogo espiroestánico (DAA-6 o BIOBRAS-6), se determinó que la estimulación de la longitud del vástago y las raíces era dependiente de la concentración, encontrándose un efecto estimulante de los vástagos a concentraciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que la longitud de las raíces respondió a concentraciones aún más bajas ( $10^{-6}$ - $10^{-3}$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (22).

En el presente trabajo, se utilizaron concentraciones equivalentes a 0.05 y 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de MH5, que son superiores a las encontradas como adecuadas para estimular la elongación en caña de azúcar. No obstante, los indicadores evaluados (masas fresca y seca) no solo reflejan el efecto en la elongación celular sino el crecimiento integral de la plántula, por lo que se requieren investigaciones encaminadas a determinar las concentraciones más adecuadas de este análogo, para lograr una estimulación del crecimiento utilizando este tiempo de

exposición al producto. Por otra parte, se evidenció que la actividad biológica de la EBR y del MH5 es diferente.

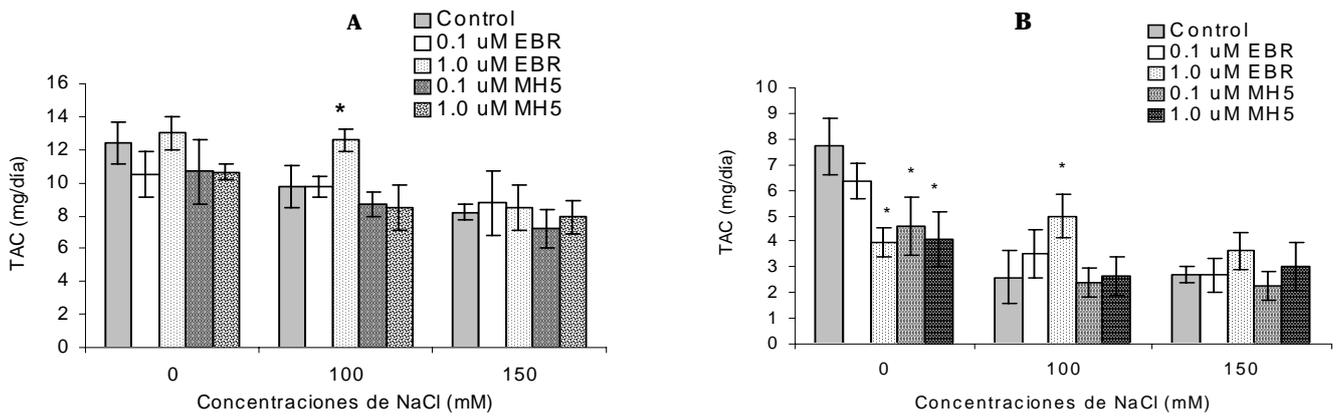
A pesar de la respuesta encontrada en el crecimiento de las plántulas con las concentraciones ensayadas, se ha informado que el tratamiento de semillas y plántulas con concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  o superiores de EBR han sido capaces de inducir tolerancia a estrés abióticos en plantas (6, 21, 23). Luego, se debe esperar que al menos la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de EBR reduzca el impacto que la inclusión del NaCl en el medio de cultivo provoca en el crecimiento de las plántulas.

Teniendo en cuenta que uno de los primeros efectos de la salinidad es reducir la capacidad de absorción de agua de las plantas, en las Figuras 1 y 2 se presentan los resultados de las tasas absolutas de crecimiento en función de las masas frescas de la parte aérea y las raíces de las plántulas de ambas variedades en las tres concentraciones de NaCl ensayadas.

Primeramente, se debe notar la diferente respuesta de las tasas absolutas de crecimiento de las variedades en estudio ante el incremento de las concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. Así, en la variedad INCALP-7, la presencia de 100 mM de NaCl en el medio de cultivo afectó más el crecimiento de las raíces que de la parte aérea, provocando una reducción significativa de la TAC de 66.4 %, mientras que en la parte aérea no hubo afectación desde el punto de vista estadístico, aunque sí una reducción de 21.3 % en este indicador (Figura 1). Sin embargo, en la variedad J-104, esta intensidad del estrés no provocó reducciones en las tasas absolutas de crecimiento de ninguno de los órganos de la planta evaluados (Figura 2).

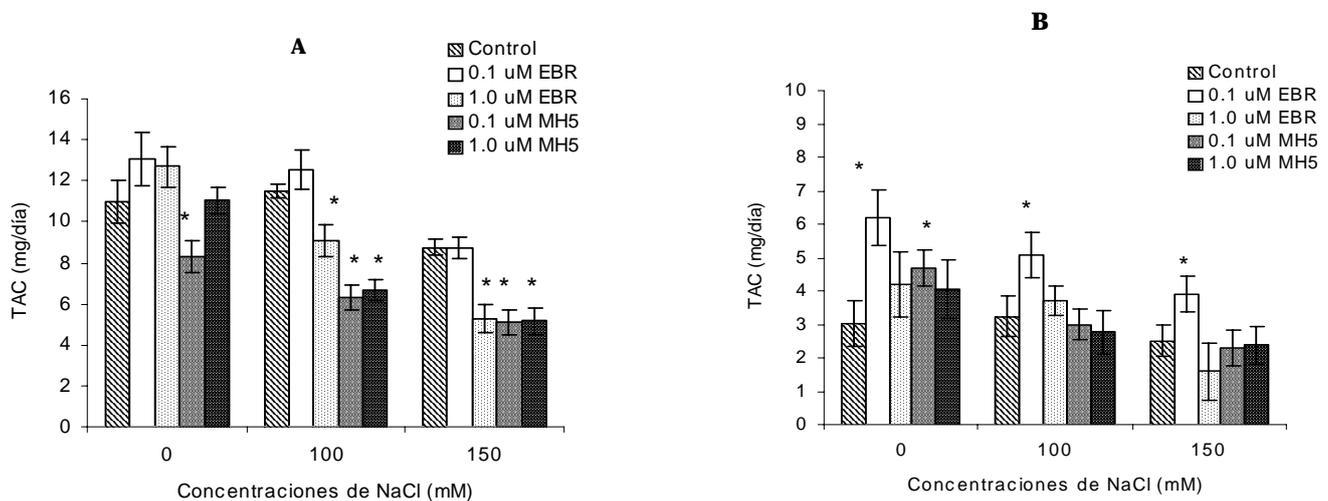
Al incrementarse la intensidad del estrés, se encontró una reducción significativa de las TAC en función de las masas frescas de la parte aérea de las dos variedades y la TAC en función de la masa fresca de las raíces en la variedad INCA LP-7 se redujo a niveles similares al encontrado en 100 mM de NaCl (Figura 1). En la variedad J-104, con esta concentración de NaCl en el medio de cultivo (150 mM), no hubo una reducción significativa en la TAC (Figura 2).

Estos resultados demostraron que, en las condiciones en que se realizó este estudio, las plántulas de la variedad J-104 fueron menos afectadas en su capacidad de acumular masa fresca que las de la variedad INCA LP-7, cuando se adicionó NaCl al medio de cultivo. Cabría preguntarse, entonces, si el tratamiento previo con EBR o MH5 fue capaz o no de modificar el comportamiento de las TAC de las plántulas en medio salino. En la Figura 1 se aprecia que en el caso de la variedad INCA LP-7 y en la menor intensidad de estrés (100 mM de NaCl), el tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de EBR fue capaz de incrementar las TAC en función de las masas frescas de la parte aérea y las raíces, logrando niveles similares a los de las plántulas control sin tratamiento con BR crecidas en medio sin adición de NaCl, en el caso de la masa fresca de la parte aérea, mientras que se obtuvo solo una reducción de 35.5 % en el caso de las raíces, en comparación con la reducción de 66.4 % presentada por el tratamiento sin BR.



(Las barras representan los intervalos de confianza a  $p < 0.05$  y los asteriscos los tratamientos que difieren significativamente del control en cada concentración de NaCl)

**Figura 1. Influencia de los tratamientos con EBR y MH5 en las tasas de crecimiento en función de las masas frescas de la parte aérea (A) y las raíces (B) de plántulas de arroz de la variedad INCA LP-7, en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de NaCl**



(Las barras representan los intervalos de confianza a  $p < 0.05$  y los asteriscos los tratamientos que difieren significativamente del control en cada concentración de NaCl)

**Figura 2. Influencia de los tratamientos con EBR y MH5 en las tasas de crecimiento en función de las masas frescas de la parte aérea (A) y las raíces (B) de plántulas de arroz de la variedad J-104, en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de NaCl**

La respuesta de la variedad J-104 fue totalmente diferente, ya que el tratamiento previo de las plántulas con 0.1  $\mu\text{M}$  de EBR fue el único capaz de incrementar significativamente la TAC de las raíces en las tres concentraciones de NaCl ensayadas. Sin embargo, esta concentración aumentó ligeramente pero no significativamente la TAC de la parte aérea en el medio suplementado con 100 mM de NaCl (Figura 2).

La velocidad de crecimiento en medio salino de las plántulas que fueron previamente tratadas con el análogo MH5 fue similar al de las plántulas no tratadas en el caso de la variedad INCA LP-7 (Figura 1). En la J-104, este análogo redujo significativamente la TAC de la parte aérea mientras no afectó la de las raíces, incrementando la sensibilidad de la variedad al estrés salino.

Luego, se puede resumir que la respuesta de las plántulas de arroz al estrés salino estuvo en dependencia de la variedad estudiada, la intensidad del estrés impuesto y del tipo y la concentración de BR empleado en el tratamiento previo a la imposición del estrés. Así, en la variedad INCA LP-7, que se comportó como la más sensible al estrés salino en este estudio, el mejor tratamiento fue el de 1  $\mu\text{M}$  de EBR, ya que fue capaz de incrementar significativamente las velocidades de crecimiento de la parte aérea y las raíces de las plántulas en comparación con el tratamiento control sin BR, cuando se adicionó 100 mM de NaCl al medio de cultivo. En cambio, en la variedad J-104, el tratamiento con 0.1  $\mu\text{M}$  de EBR resultó el mejor, pero este solo incrementó significativamente la TAC en función de la masa fresca de las raíces en cualquiera de las dos intensidades de estrés estudiadas.

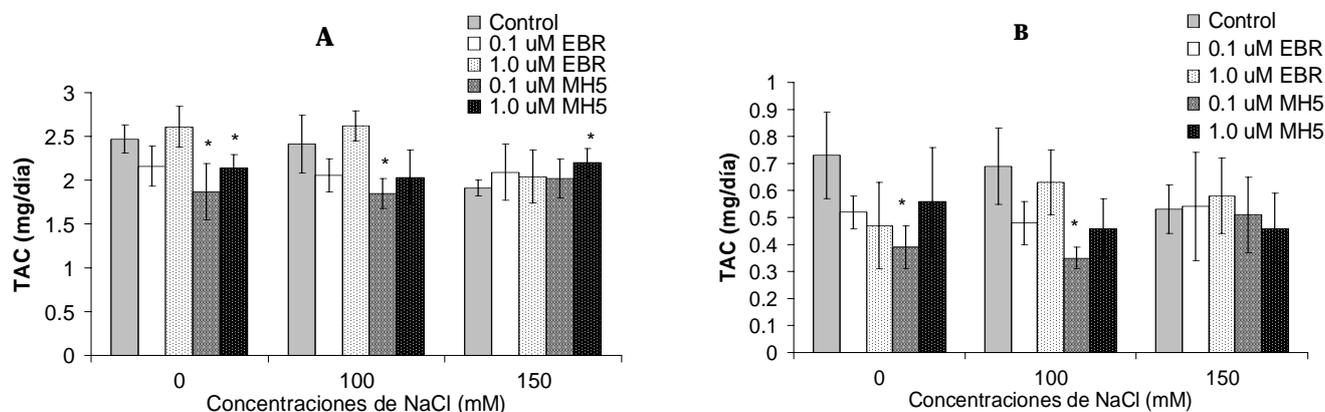
Con estos resultados, es arriesgado aún afirmar que estos tratamientos de EBR, 12 días después de mantenerse creciendo las plántulas en medios de cultivo suplementados con NaCl, las protegieron del impacto provocado por el estrés salino, ya que los tratamientos de 1 y 0.1  $\mu\text{M}$  de EBR redujeron significativamente el crecimiento inicial de las plántulas de las variedades INCA LP-7 y J-104, respectivamente (Tabla I). Esto hizo que, a pesar de que estos tratamientos incrementaron las TAC, los valores finales de masas frescas que exhibieron las plántulas tratadas con EBR no difirieron significativamente de los tratamientos control (datos no mostrados).

En cuanto al comportamiento de las masas secas de las plantas controles, se debe destacar que en el caso de la variedad INCA LP-7 (Figura 3), la masa seca de la parte aérea redujo significativamente su TAC cuando las plántulas crecieron en medio con 150 mM de NaCl, como ocurrió con la masa fresca (Figura 3A). Un comportamiento

similar presentó la masa seca de las raíces, aunque, en este caso, la disminución de la TAC en el medio con 150 mM no fue significativa desde el punto de vista estadístico.

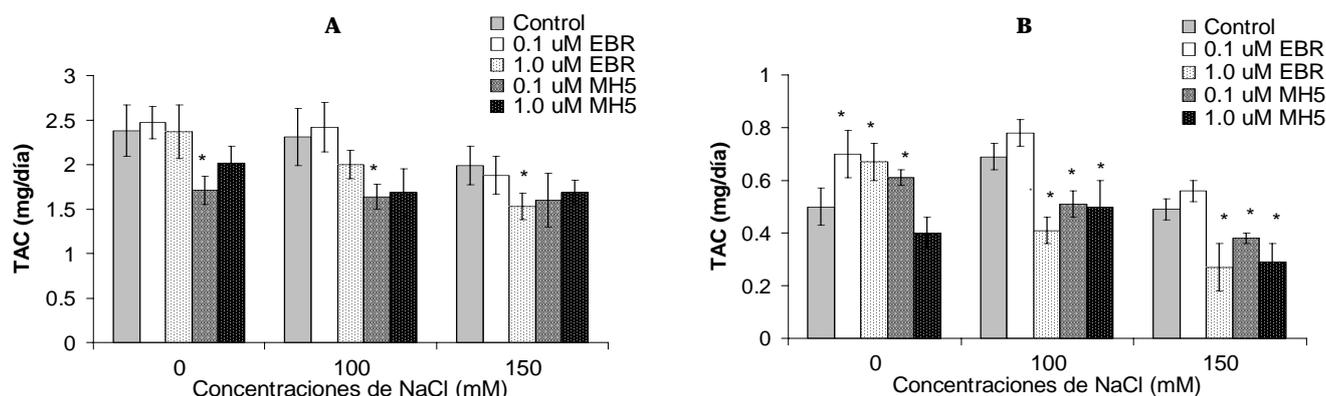
Se debe señalar, además, cómo el tratamiento con EBR no modificó el comportamiento de este indicador en ninguna de las concentraciones de NaCl estudiadas, mientras que el tratamiento de 0.1  $\mu\text{M}$  de MH5 redujo significativamente la acumulación de masa seca de las plántulas, tanto en el medio control como en el suplementado con 100 mM de NaCl.

En la variedad J-104, la presencia de NaCl en el medio no modificó la TAC en función de la masa seca de la parte aérea en las plantas controles y en el caso de las raíces, la concentración de 100 mM de NaCl en el medio de cultivo estimuló significativamente la acumulación de masa seca en este órgano en comparación con las plantas crecidas en medio MS y el suplementado con 150 mM de NaCl (Figura 4).



(Las barras representan los intervalos de confianza a  $p < 0.05$  y los asteriscos los tratamientos que difieren significativamente del control en cada concentración de NaCl)

**Figura 3. Influencia de los tratamientos con EBR y MH5 en las tasas de crecimiento en función de las masas secas de la parte aérea (A) y las raíces (B) de plántulas de arroz de la variedad INCA LP-7, en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de NaCl**



(Las barras representan los intervalos de confianza a  $p < 0.05$  y los asteriscos los tratamientos que difieren significativamente del control en cada concentración de NaCl)

**Figura 4. Influencia de los tratamientos con EBR y MH5 en las tasas de crecimiento en función de las masas secas de la parte aérea (A) y las raíces (B) de plántulas de arroz de la variedad J-104, en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de NaCl**

En cuanto a la influencia de la EBR y el MH5, se puede observar cómo, de forma general, la EBR no influyó en la velocidad de acumulación de la masa seca de la parte aérea y la dosis menor utilizada estimuló, aunque no significativamente, la velocidad de acumulación de masa seca de las raíces en los tratamientos de 100 y 150 mM de NaCl. Sin embargo, la concentración de 1  $\mu$ M inhibió significativamente la TAC de las raíces en las plántulas que crecían en medio salino, al igual que lo hicieron las dos concentraciones ensayadas del análogo MH5. Estos resultados confirmaron que el pretratamiento con este análogo en las concentraciones ensayadas incrementó la sensibilidad de la variedad J-104 al estrés salino.

Los resultados presentados demostraron, en primer lugar, la diferente sensibilidad de la parte aérea y las raíces de las variedades estudiadas a las intensidades de estrés impuestas. En este sentido, se ha informado que la salinidad induce inhibición del crecimiento y, en muchos casos, la parte aérea es más afectada que las raíces (24); sin embargo, algunos plantean lo contrario y otros no han encontrado diferencias en el comportamiento de la raíz, el tallo y las hojas en un amplio rango de salinidad (1).

Este trabajo demostró que la respuesta de la velocidad de crecimiento de los órganos en medio salino estuvo en dependencia de la sensibilidad de la variedad y la intensidad del estrés. Así, en las condiciones en que se efectuó este estudio, la variedad INCA LP-7 resultó más sensible que la J-104 a la inclusión del NaCl en el medio de cultivo, ya que en el primer caso, la concentración de 150 mM logró una reducción significativa de la tasa de acumulación de la masa seca de la parte aérea (Figura 3), mientras que en el segundo caso, esta concentración solamente provocó una reducción significativa de la tasa de acumulación de la masa fresca (Figura 2). Esto demuestra que solo hubo una reducción en la capacidad de hidratación de los tejidos y no en los procesos de síntesis. Luego, en las plántulas de la variedad INCA LP-7, hubo más afectación en la velocidad de crecimiento de las raíces que de la parte aérea en la concentración de 100 mM de NaCl; sin embargo, cuando la intensidad se incrementó, la velocidad de crecimiento de la parte aérea resultó más afectada (Figuras 1 y 3).

En la variedad J-104, se afectó la parte aérea más que las raíces, ya que hubo una reducción significativa de la tasa absoluta de crecimiento en función de la masa fresca, cuando las plantas crecieron en medio con 150 mM de NaCl (Figura 2). Resulta interesante destacar que la concentración de 100 mM de NaCl incrementó la velocidad de crecimiento en función de la masa seca de las raíces. En este sentido, se ha informado que tanto en halofitas como en glicofitas, el efecto de la salinidad en el crecimiento de las raíces es una función de la concentración de sal y algunas concentraciones pueden estimular el crecimiento de las raíces mientras inhiben el crecimiento de la parte aérea (24).

Por otra parte, se ha observado que el mecanismo de tolerancia a la sal en varias especies vegetales puede estar a nivel celular. Así, la exclusión y el secuestro de iones, el ajuste osmótico, la protección de macromoléculas, la homeostasis de los lípidos de las membranas y la función de los sistemas de transporte de la membrana en ambientes salinos son estrategias celulares importantes, que pueden conferir tolerancia a las plantas ante el estrés salino (25).

En el caso particular del arroz, se ha informado que la tolerancia de las plantas al estrés salino puede estar relacionada, entre otros aspectos, con la sobreexpresión de los genes que codifican para la síntesis de la S-adenosilmetionina descarboxilasa, enzima responsable de la formación de las poliaminas espermidina y espermina, a partir de putrescina (26) o a la inducción de la proteína SALT (27) o a la acumulación de iones K<sup>+</sup> y de solutos como la prolina (28). Luego, se hace necesario continuar investigando para conocer cuáles mecanismos son los responsables de la diferencia observada entre el comportamiento de ambas variedades en estas condiciones.

La característica de la 24-epibrasinólida de inducir tolerancia a estrés abióticos en algunos cultivos ha sido informada con anterioridad (29); sin embargo, se necesitan investigaciones más profundas y sistemáticas para incrementar nuestro conocimiento acerca del modo de acción de los brasinoesteroides en condiciones de estrés.

En arroz, la imbibición de las semillas, por 24 horas, con 150 mM de NaCl suplementado con 3  $\mu$ M de EBR, redujo considerablemente el efecto inhibitorio de la salinidad en la germinación de las semillas y, además, resultó en la estimulación del crecimiento inicial de las posturas en medio salino, contrarrestando la supresión del crecimiento y la pérdida de pigmentos fotosintéticos provocada por la salinidad (6, 7).

En variedades susceptibles y tolerantes de sorgo, la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas en medio con polietilenglicol suplementado con 2 ó 3  $\mu$ M de EBR, revertió los efectos adversos provocados por el estrés osmótico (30). En nuestro trabajo, el tratamiento con 1  $\mu$ M de EBR fue capaz de revertir completamente la reducción no significativa que la concentración de 100 mM de NaCl provocó en la tasa de crecimiento de la masa fresca de la parte aérea de las plántulas de la variedad que se comportó más sensible (INCA LP-7), mientras que la concentración de 0.1  $\mu$ M de EBR estimuló significativamente la tasa de acumulación de masa seca de las raíces de las plántulas de la variedad que se comportó más tolerante (J-104) en todas las concentraciones de NaCl estudiadas.

Estos resultados sugieren la necesidad de probar un rango más amplio de concentraciones de EBR, ya que al parecer la respuesta al producto depende de la tolerancia de la variedad a este tipo de estrés. Resultados similares han sido informados recientemente, al someter dos variedades de arroz con diferente tolerancia a períodos cortos de estrés hídrico (31).

En cuanto al análogo MH-5, es necesario destacar que las variaciones estructurales que presenta este compuesto, pueden ser las responsables de la diferencia en actividad en relación con la 24-epibrasinólida. Sin embargo, se ha informado que la germinación y el crecimiento inicial de plántulas de arroz de la variedad J-104, en medio de cultivo suplementado con  $10^{-2}$  mg.L<sup>-1</sup> de este producto, protegió a las plántulas ante períodos cortos de déficit hídrico (31). Además, tratamientos con este análogo en concentraciones bajas protegieron a las plántulas de tomate ante estrés de altas temperaturas (32). Por otra parte, el tratamiento de plántulas de arroz con concentraciones bajas de BB-16, otro análogo espiroestánico de brasinoesteroides, incrementó la actividad de algunas enzimas antioxidantes cuando crecieron en medio suplementado con 75 mM de NaCl (33). Aquí, no se encontró respuesta al tratamiento con este análogo en el caso de la variedad INCA LP-7, mientras que en el caso de la J-104, el tratamiento con este producto incrementó la sensibilidad de las plántulas al estrés salino. Esto pudiera estar asociado a las altas concentraciones utilizadas en comparación con los estudios anteriores, pues estas son equivalentes a 0.05 y 0.5 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Dada la importancia que actualmente tiene el contar con productos ecológicamente inocuos, capaces de proteger a las plantas ante determinados estrés de tipo abiótico, se hace necesario continuar profundizando en las potencialidades antiestrés de los brasinoesteroides y sus análogos.

## REFERENCIAS

- 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.
- Borsani, O.; Valpuesta, V. y Botella, M. A. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 2003, vol. 73 p. 101-115.
- Amor, F. M. del; Martínez, V. y Cerdá, A. Optimización del manejo de aguas salinas en el cultivo del tomate en invernadero. *Agrícola Vergel*, 2001, vol.239 p 588-592.
- 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.
- Takematsu, T. y Takeuchi, Y. Effects of brassinosteroids on growth and yields of crops. *Proc. Jap. Acad. B.*, 1989, vol. 65 p. 149-152.
- 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.
- 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.
- Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N. y Groot, A. E. de. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann. Bot.*, 2000, vol. 86, p. 441-447.
- Zullo, M. A. T. y Adam, G. Brassinosteroid phytohormones structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol.*, 2002, vol. 14, p. 143-181.
- Back, T. G. y Pharis, R. P. Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity. *J. Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 22, p. 350-361.
- Núñez, M. Synthesis and practical applications of brassinosteroid analogs. En: *Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity*. Netherlands:Kluwer Academic Publishers, 2003.
- Núñez, M.; Siqueira, W.; Hernández, M. M.; Zullo, M. A. T.; Robaina, C. y Coll, F. Efecto del Biobras-6 y el MH5 en la inducción de callos y brotes en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 2004, vol.25, no. 4, p. 5-9.
- Moré, O.; Hernández, M. M.; Núñez, M.; Estévez, A. y González, M. E. Empleo de dos análogos de brasinoesteroides en la formación de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22 p. 29-35.
- García, D. Acción del análogo de brasinoesteroides MH-5 y la kinetina en la formación de biomasa en callos de *Coffea canephora* var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, p. 39-46.
- Mazorra, L. M.; Núñez, M.; Hechavarría, M.; Coll, F. y Sánchez-Blanco, M. J. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biol. Plant.*, 2002, vol. 45, p. 593-596.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
- Sasse, J. M. Physiological actions of brassinosteroids: An update. *J. Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 22, p. 276-288.
- Clouse, S. Brassinosteroids. *Current Biology*, 2001, vol. 11, no. 22, p. R904.
- Uozo, S.; Tanaka-Ueguchi, M.; Kitano, H.; Hattori, K. y Matsuoka, M. Characterization of XET-related genes of rice. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, p. 853-860.
- Hunter, W.J. Influence of root-applied epibrassinolide and carbenoxolone on the nodulation and growth of soybean (*Glycine max* L.) seedlings. *J. Agron. Crop Sci.*, 2001, vol. 186, p. 217-221.
- Fujii, S. y Saka, H. The promotive effect of brassinolide on lamina joint-cell elongation, germination and seedling growth under low temperature stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.*, 2001, vol. 4, p. 210-214.
- Ortega, P.; Rodés, R.; Ortega, E.; Fernández, L.; Díez, M.; García, V. Efecto de un brasinoesteroides sintético (DAA-6) sobre el crecimiento del vástago y las raíces de la caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2003, vol. 34, no. 2, p. 67-72.
- Dhaubhadel, S.; Browning, K. S.; Gallie, D. R. y Krishna, P. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J.*, 2002, vol. 29, p. 681-691.
- Poljakoff-Mayber, A. Plants in Saline environments. En: *Handbook of Plant and Crop Stress*. New York:Marcel Dekker, 1994.

25. Mansour, M. M. F.; Salama, K. H. A. y Al-Mutawa, M. M. Transport proteins and salt tolerance in plants. Review. *Plant Sci.*, 2003, vol. 164, p. 891-900.
26. Roy, M. y Wu, R. Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Sci.*, 2002, vol. 163, p. 987-992.
27. Souza Filho, G. A. de; Ferreira, B. S.; Dias, J. M.; Queiroz, K. S.; Branco, A. T.; Bressan-Smith, R. E.; Oliveira, J. G. y García, A. B. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. *Plant Sci.*, 2003, vol. 164, p. 623-628.
28. Basu, S.; Gangopadhyay, G.; Mukherjee, B. B. Salt tolerance in rice *in vitro*: Implication of accumulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, p. 55-64.
29. Krishna, P. Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.*, 2003, vol. 22, p.289-297.
30. 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.
31. 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.
32. Mazorra, L. 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.
33. 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.

Recibido: 13 de junio de 2005  
Aceptado: 4 de enero de 2006

# Cursos de Verano

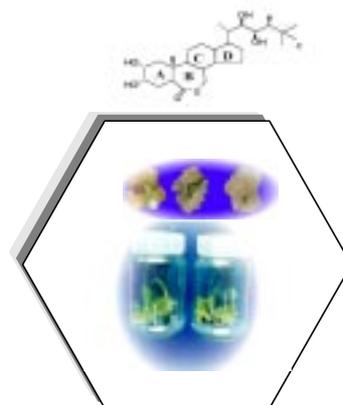
Precio: 320 CUC

## Brasinoesteroides: nuevos biorreguladores de amplia perspectiva para la agricultura

Coordinador: Dra.C. Miriam de la C. Núñez Vázquez

Fecha: julio

Duración: 40 horas



### SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval  
Dirección de Educación, Servicios Informativos  
y Relaciones Públicas  
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)  
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,  
La Habana, Cuba. CP 32700  
Telef: (53) (47) 86-3773  
Fax: (53) (47) 86-3867  
E.mail: posgrado@inca.edu.cu