

EFECTO DEL BIOBRAS-6 Y EL MH-5 EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y BROTES EN LECHUGA (*Lactuca sativa* L.)

Miriam Núñez[✉], W. J. Siquiera, María M. Hernández, M. A. T. Zullo, Caridad Robaina y F. Coll

ABSTRACT. Two laboratory experiments were performed in order to evaluate the effect of two spirostane analogues of brassinosteroids termed Biobras-6 and MH-5 on callus induction and plant regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*) var. Brasil 221. In the first experiment, both analogues were added at two concentrations (0.001 and 0.01 mg.L⁻¹) to MS culture medium containing 0.1 mg.L⁻¹ 6-BAP, whereas in the second one, both concentrations of the products were added but cytokinin concentration was reduced to 50 %. In both experiments, 0.1 mg.L⁻¹ 6-BAP was used as control treatment. Results showed that BB-6 and MH-5 enhanced both callus formation and shoot regeneration from cotyledons only when added at determined concentrations with 0.1 mg.L⁻¹ 6-BAP to the culture medium.

Key words: brassinosteroids, callus, plant regeneration, lettuces

RESUMEN. Con el objetivo de evaluar el efecto que dos análogos espirostánicos de brasinoesteroides denominados comercialmente Biobras-6 y MH-5, ejercen en la formación de callos y regeneración de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) var. Brasil 221, se ejecutaron dos experimentos de laboratorio. En el primero, se adicionaron ambos análogos, en dos concentraciones (0.001 y 0.01 mg.L⁻¹), al medio de cultivo basal MS que contenía 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹, mientras que en el segundo experimento, se adicionaron los productos en ambas concentraciones, pero la concentración de citoquinina se redujo a la mitad. En ambos casos, se utilizó como tratamiento control el medio de cultivo MS en presencia de 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹. Los resultados demostraron que el Biobras-6 y el MH-5 estimularon la formación de callos y brotes a partir de cotiledones solamente cuando se añadieron, a determinadas concentraciones, al medio de cultivo con la presencia de 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹.

Palabras clave: brasinoesteroides, callos, regeneración de plantas, lechugas

INTRODUCCIÓN

Los brasinoesteroides son hormonas vegetales que juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas (1). De esta forma, se ha demostrado que estos compuestos en combinación con auxinas o con auxinas y citoquininas estimulan la formación de callos (2, 3, 4); sin embargo, el papel de los brasinoesteroides en la división celular no está aún muy claro y se requiere de estudios del efecto de estos compuestos sobre los genes que controlan este proceso. En relación con esto, recientemente se demostró que la 24-epibrasinólida puede promover la división celular a través del Cyc D3, un gen de ciclina vegetal tipo D, por el cual la citoquinina activa la división celular y además, se probó que este compuesto puede sustituir a la citoquinina en cultivo de callos y suspensiones celulares de *Arabidopsis* (5).

Por otra parte, se ha demostrado que los análogos espirostánicos de brasinoesteroides utilizados como sustitutos de la citoquinina o como complemento del medio de cultivo son capaces de estimular la formación y el crecimiento de callos embriogénicos de papa y café (6, 7, 8). Además, se ha constatado que la combinación del Biobras-6 con 6-BAP en el medio de cultivo benefició notablemente la formación de callos y un lento proceso de regeneración indirecta en tomate (9); no obstante, existen aún pocas evidencias acerca de los efectos que estos análogos pueden provocar en la división y diferenciación celular, cuando se combinan con diferentes concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo.

Por tales razones, se decidió acometer el presente estudio, cuyo objetivo fundamental fue evaluar el efecto que el Biobras-6 y MH-5 ejercían en la formación de callos y regeneración de plantas de lechuga, cuando eran añadidos al medio de cultivo en presencia de dos concentraciones de citoquinina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los explantes. Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) de la variedad Brasil 221 fueron primeramente lavadas con agua corriente con una o dos gotas

Dra.C. Miriam Núñez, Investigador Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal; Dra.C. María M. Hernández, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Dr.C. W. J. Siquiera y Ms. M. A. T. Zullo, Investigadores del Instituto de Agronomía de Campinas, Brasil; Dra.C. Caridad Robaina, Investigadora y Dr.C. F. Coll, Profesor del Centro de Estudios de Productos Naturales de la Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.

✉ mnunez@inca.edu.cu

de Tween-20 durante 10 minutos y posteriormente con agua desionizada. La esterilización se realizó sumergiendo las semillas durante 20 minutos en una solución comercial de hipoclorito de sodio (2-2.5 % de cloro activo) al 80 % y posteriormente se lavaron cuatro veces con agua estéril. Las semillas esterilizadas se colocaron en placas Petri (50/placa) que contenían 30 mL de medio basal Murashige y Skoog (MS) (10), suplementado con inositol 100 mg.L⁻¹, tiamina 10 mg.L⁻¹, piridoxina 2.5 mg.L⁻¹, ácido nicotínico 1.85 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹ y agar purificado 0.6 %. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de someterlo a la autoclave por 20 minutos a 121°C y 1.5 atm de presión. Las placas se colocaron en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad suministrado por tubos fluorescentes a 48 μE.m⁻².s⁻¹ y temperatura de 26 ± 2°C. A los cinco días, los cotiledones intactos fueron separados y utilizados en los dos experimentos.

Reguladores del crecimiento. El Biobras-6 (BB-6) y MH-5 fueron suministrados por el Centro de Estudios de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana. Ambos productos tienen como ingredientes activos análogos espiroestánicos de brasinoesteroides de fórmulas generales C₂₇O₅H₄₂ y C₂₇O₆H₄₂ para BB-6 y MH-5, respectivamente. Estas formulaciones se prepararon como soluciones patrón de 1 mg.mL⁻¹. El 6-BAP fue obtenido de Sigma Chemical Co.

Experimento 1. Seis explantes cotiledonales con la superficie abaxial en contacto con el medio fueron colocados por placa Petri que contenían 30 mL de medio similar al descrito anteriormente pero suplementado con 6 BAP 0.1 mg.L⁻¹ y con BB-6 ó MH-5 en dos concentraciones (0.001 y 0.01 mg.L⁻¹). Un tratamiento con 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹ fue usado como control.

Experimento 2. En este experimento se procedió como en el experimento 1, con la única diferencia de que los análogos se adicionaron a medios de cultivo con concentraciones de 6-BAP reducidas a la mitad (0.05 mg.L⁻¹).

Para ambos experimentos, se utilizaron cinco placas Petri por tratamiento, que se colocaron en un cuarto de crecimiento con las mismas condiciones de temperatura e iluminación descritas anteriormente.

Las evaluaciones realizadas fueron: porcentaje de explantes que formaron callos a los 10, 15, 20 y 25 días después de iniciado el cultivo y porcentaje de callos que formaron brotes a los 15, 20 y 25 días. Al final de los experimentos, 25 días después de iniciado el cultivo, se evaluaron la masa fresca de los callos y el número de brotes por callo.

Los datos de porcentaje de explantes que formaron callos y de callos que formaron brotes fueron procesados utilizando una comparación de proporciones mediante una prueba de Chi cuadrado, mientras los datos de masa fresca de callos y de número de brotes por callo fueron analizados calculando las medias, los errores estándar y los intervalos de confianza al 95 % de probabilidad. Cada experimento se repitió dos veces y se analizaron los datos promedio de ambos experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del experimento 1 mostraron que la adición del BB-6 ó el MH-5 al medio de cultivo en presencia de 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹ estimuló la inducción de callos y 15 días después de la inoculación de los explantes; todos los tratamientos con análogos de brasinoesteroides mostraron porcentajes de formación de callos estadísticamente superiores al control (Figura 1).

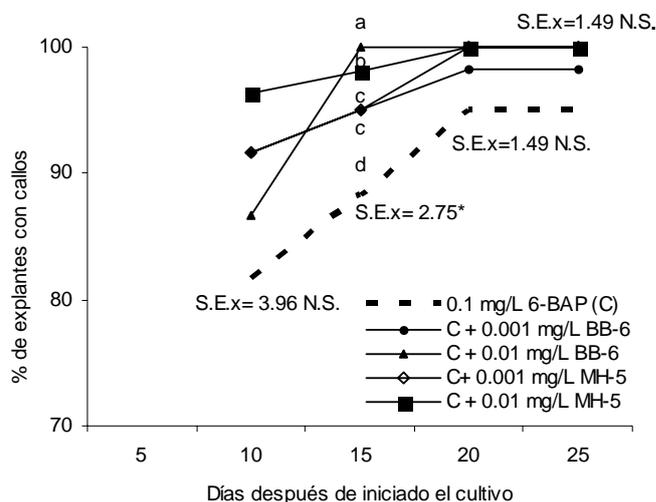


Figura 1. Formación de callos cuando se cultivaron cotiledones de lechuga en medio MS con 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹ y BB-6 ó MH-5. Medias con letras desiguales fueron significativamente diferentes (95 % de probabilidad) según la prueba de Chi cuadrado

Como se puede observar, el tratamiento de 0.01 mg.L⁻¹ de BB-6 alcanzó, en ese momento, el 100 % de formación de callos. Sin embargo, las diferencias estadísticas desaparecieron a los 20 días de inoculados los explantes, aunque como se puede observar en la Figura 1, los tratamientos con análogos de brasinoesteroides incrementaron entre 3.3 y 5 % la inducción de callos en relación con el tratamiento control.

La inducción de brotes a partir de los callos formados se presenta en la Figura 2. No se encontraron diferencias significativas en la primera evaluación efectuada (15 días después de la iniciación del cultivo); sin embargo, cinco y 10 días después, los tratamientos de BB-6 0.001 mg.L⁻¹ y MH-5 0.01 mg.L⁻¹ mostraron porcentajes de regeneración de brotes significativamente superiores al resto de los tratamientos, lo que indica que estos tratamientos estimularon la diferenciación celular.

Por otra parte, los tratamientos de 0.01 mg.L⁻¹ de BB-6 y 0.001 mg.L⁻¹ de MH-5 inhibieron significativamente el porcentaje de formación de brotes a partir de los callos en comparación con el tratamiento control. Esto revela la importancia no solo del tipo de análogo sino también de la concentración añadida al medio de cultivo, en función del proceso fisiológico a estudiar, pues como se demuestra en este trabajo, si bien el análogo y la concentración no

fueron determinantes en la estimulación de la división celular, evaluada a través de la formación de callos, ambos factores sí jugaron un papel fundamental en la inducción de brotes a partir de los callos formados.

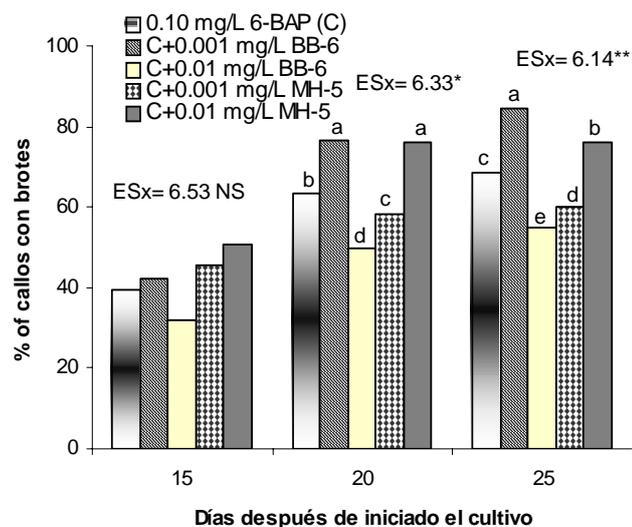


Figura 2. Influencia de la adición de dos análogos de brasinoesteroides al medio de cultivo con 6-BAP 0.1 mg.L⁻¹ en la formación de brotes a partir de callos de lechuga var. Brasil 221. Medias con letras desiguales fueron significativamente diferentes (95 % de probabilidad) según la prueba de Chi cuadrado

La influencia de la adición del BB-6 ó el MH-5 en la masa fresca de los callos y el número de brotes por callo, evaluada 25 días después de la inoculación, se muestra en la Tabla I. Ninguno de los dos indicadores presentó diferencias significativas entre tratamientos, aunque la presencia del análogo MH-5 incrementó hasta un 18 % el número de brotes promedio por callo.

Tabla I. Influencia de la adición de dos análogos de brasinoesteroides al medio control (0.1 mg.L⁻¹ 6-BAP) en la masa fresca de los callos y el número de brotes evaluados 25 días después de la inoculación

Tratamientos (mg.L ⁻¹)	Masa fresca de callos (g)	Número de brotes por callo
Control	2.248 ± 0.144	5.64 ± 0.976
0.001 BB-6	2.182 ± 0.125	5.13 ± 0.547
0.01 BB-6	2.541 ± 0.164	5.54 ± 0.833
0.001 MH-5	2.512 ± 0.167	6.66 ± 0.835
0.01 MH-5	2.241 ± 0.17	6.46 ± 0.905

En general, los resultados de este primer experimento revelaron que la presencia de 0.001 mg.L⁻¹ de BB-6 ó 0.01 mg.L⁻¹ de MH-5 en combinación con 0.1 mg.L⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo, no solo estimuló la formación de callos sino además favoreció la regeneración de plantas en lechuga, sin afectar la masa fresca de los callos ni el número de brotes por callo. Recientemente, se ha sugerido que los brasinoesteroides juegan un doble papel al regular la proliferación y expansión en células foliares de *Arabidopsis* (11).

Estos resultados indican que el contenido hormonal endógeno de los explantes y la citoquinina añadida producen las relaciones auxina/citoquinina adecuadas para promover primeramente la división celular y posteriormente la diferenciación celular, y que la adición de los análogos de brasinoesteroides al interactuar con el contenido hormonal endógeno de los explantes y con la citoquinina añadida al medio, favorece esta relación estimulando ambos procesos fisiológicos.

El sinergismo de los brasinoesteroides con las auxinas se ha observado en varios sistemas biológicos y se ha argumentado que los brasinoesteroides pueden incrementar la sensibilidad del tejido a la auxina o estimular su actividad biológica a través de la auxina endógena (AIA) o estimular la biosíntesis de AIA (12). Por otra parte, se ha encontrado que la 24-epibrasinólida inhibió el crecimiento de callos de tabaco y modificó la concentración de citoquininas endógenas (13).

En cuanto al papel de los brasinoesteroides en la diferenciación y regeneración *in vitro*, se ha encontrado que la adición de 24-epibrasinólida al medio de cultivo en presencia de 0.1 mg.L⁻¹ de kinetina indujo la formación de brotes en *Arabidopsis thaliana*, mientras la kinetina no indujo esta diferenciación por sí sola (14). Recientemente, se informó también que la brasinólida en combinación con AIA y 6-BAP estimuló la regeneración de plantas de *Spartina patens* (15). Además, se ha demostrado que los brasinoesteroides endógenos están involucrados en la inducción de una etapa específica de la diferenciación en plantas a través de la expresión de los genes (16).

La influencia en el porcentaje de callos formados, de la adición de BB-6 ó MH-5 al medio de cultivo cuando la concentración de 6-BAP se redujo a la mitad, se presenta en la Figura 3. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los momentos evaluados, aunque se puede observar que la adición de MH-5 en cualquiera de las dos concentraciones ensayadas indujo el 100 % de formación de callos desde la primera evaluación efectuada 10 días después de la inoculación.

Además, la evaluación de masa fresca de los callos efectuada al final del experimento reveló que el MH-5 incrementó ligeramente este indicador, al igual que el tratamiento de BB-6 0.001 mg.L⁻¹ (Tabla II). Esto demuestra que es posible reducir la concentración de 6-BAP y añadir análogos de brasinoesteroides al medio de cultivo, especialmente MH-5, si se desea acelerar la inducción y el crecimiento de callos en lechuga. Resultados similares se obtuvieron, utilizando el mismo análogo, en el crecimiento de callos de *Coffea canephora* (7).

Por el contrario, la respuesta en la inducción de brotes fue muy diferente (Figura 4), debido a que la adición de los análogos produjo una inhibición significativa en el porcentaje de brotación de los callos, 15 días después de la inoculación de los explantes, significación que desapareció posteriormente. Por otra parte, el número de brotes por callo mostró valores similares en todos los tratamientos (Tabla II).

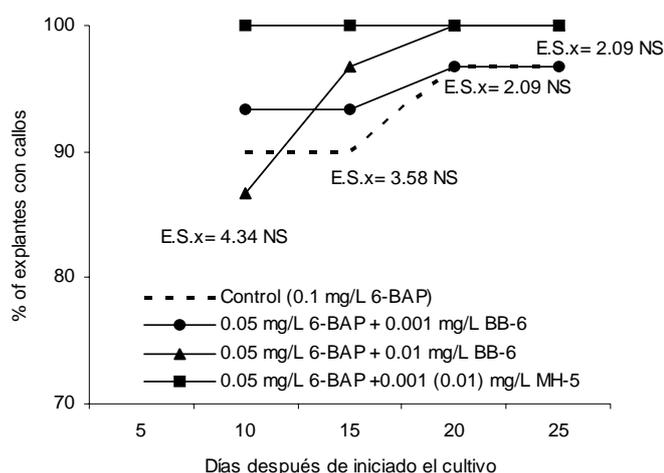


Figura 3. Formación de callos en el cultivo de cotiledones de lechuga en medio MS con BB-6 ó MH-5 adicionado a 6-BAP 0.05 mg.L⁻¹

Tabla II. Influencia de la adición de dos análogos de brasinoesteroides al medio de cultivo con concentración reducida de 6-BAP en la masa fresca de los callos y el número de brotes por callo en lechuga var. Brasil 221, evaluado a los 25 días de iniciado el cultivo

Tratamientos	Masa fresca de callos (g)	Número de brotes por callo
Control (0.1 mg.L ⁻¹ 6-BAP)	2.576 ± 0.144	6.78 ± 1.738
0.05 mg.L ⁻¹ 6-BAP + 0.001 mg.L ⁻¹ BB-6	3.070 ± 0.112	6.75 ± 1.084
0.05 mg.L ⁻¹ 6-BAP + 0.01 mg.L ⁻¹ BB-6	2.816 ± 0.152	6.16 ± 0.951
0.05 mg.L ⁻¹ 6-BAP + 0.001 mg.L ⁻¹ MH-5	3.074 ± 0.177	6.61 ± 2.085
0.05 mg.L ⁻¹ 6-BAP + 0.01 mg.L ⁻¹ MH-5	3.080 ± 0.132	7.26 ± 1.089

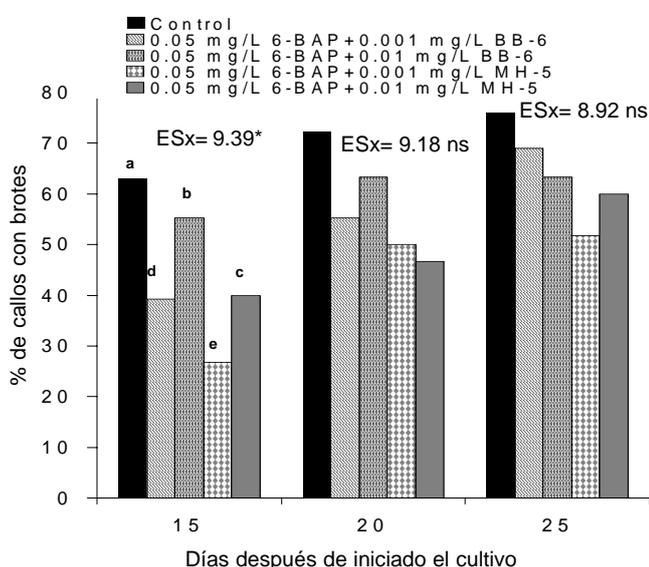


Figura 4. Influencia de la adición de BB-6 ó MH-5 al medio de cultivo con 6-BAP 0.05 mg.L⁻¹ en la formación de brotes a partir de callos de lechuga var. Brasil 221. Medias con letras desiguales fueron significativamente diferentes (95 % de probabilidad) según prueba de Chi cuadrado

Estos resultados revelaron el papel de la citoquinina exógena en el proceso de diferenciación celular e indican que para incrementar el porcentaje de regeneración de plantas a partir de callos en lechuga, puede adicionarse BB-6 0.001 mgL⁻¹ ó MH-5 0.01 mgL⁻¹ en presencia de 6-BAP 0.1 mgL⁻¹; sin embargo, la adición de análogos de brasinoesteroides a medios de cultivo con una concentración de 6-BAP reducida a la mitad no favoreció este proceso.

Esto confirma lo planteado anteriormente, en relación con que la concentración de auxinas y citoquininas de las células es vital para determinar el efecto de los brasinoesteroides (4), pues como se demostró en el presente trabajo, la reducción a la mitad de la concentración de la citoquinina exógena y la adición de MH-5 (0.001 ó 0.01 mgL⁻¹) propiciaron una adecuada relación auxina/citoquinina para acelerar la inducción y el crecimiento de los callos; sin embargo, el balance hormonal del callo formado en esos medios no fue el óptimo para promover la regeneración, comparado con el de los callos crecidos en el medio utilizado como control (6-BAP 0.1 mgL⁻¹).

Los resultados presentados en este trabajo como otros informados (17, 18, 19, 20) demuestran que los análogos espiroestánicos de brasinoesteroides BB-6 y MH-5 tienen actividad biológica *in vitro* similar a los brasinoesteroides naturales, a pesar de las modificaciones estructurales que presentan en la cadena lateral, por lo que pueden ser usados en combinación con los reguladores del crecimiento tradicionales, para promover la división y diferenciación celular.

REFERENCIAS

1. Clouse S y Sasse J. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, vol 49, p. 427-451.
2. Sakurai, A. Production of brassinosteroids in plant-cell cultures./ A. Sakurai, S. Fujioka, H. Saimoto.- En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American. Chem. Society, 1991.
3. Nakajima, N.; Shida, A. y Toyama, S. Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Jpn. J. Crop Sci.*, 1996, vol. 65, p. 114-118.
4. Oh, M.-H y Clouse, S. D. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*, 1998, vol. 17, p. 921-924.
5. Hu, Y. X.; Bao, F. y Li, J. Y. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct Cyc D3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 2000, vol. 24, p. 693-701.
6. García, D.; Torres, W.; Cuba, M. y Núñez, M. Análisis del crecimiento de callos de *Coffea canephora* var. robusta en presencia del análogo de brasinoesteroides MH-5. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, p. 55-60.
7. 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.

8. Moré, O.; Hernández, 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, no. 4, p. 29-35.
9. Plana, D.; Alvarez, M.; Florido, M.; Lara, R. M. y Núñez, M. Efecto del Biobras 6 en la morfogénesis *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 21-25
10. 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.
11. Nakaya, M.; Tsukaya, H.; Murakami, N. y Kato, M. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 2002, vol. 43, no. 2, p. 239-244.
12. Yokota, T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci Rev.* 1997, vol. 2, p. 137-142.
13. Gaudinová, A.; Siissenbeková, H.; Vojtechová, M.; Kamínek, M.; Eder, J. y Kohout, L. Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. *Plant Growth Regul.*, 1995, vol. 17, p. 121-126.
14. Chen, J. C.; Xu, M. D. y Zhao, Y. J. Effects of EBL on cell differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Phytophysiol Sin.*, 1996, vol. 22, p. 399-403.
15. Lu, Z.; Huang, M.; Ge, D. P.; Yang, Y. H.; Cai, X. N.; Qin, P. y She, J. M. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, vol. 73, p. 87-89.
16. Yamamoto, R.; Demura, T. y Fukuda, H. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol.*, 1997, vol. 38, p. 980-983.
17. Diosdado, E. Efecto de biorreguladores en el proceso de embriogénesis somática y cultivo y fusión de protoplastos en el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). Tesis de grado; U.H., 1997.
18. Hernández, M.; Moré, O. y Núñez, M. Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 1999, vol 20, no 4, p. 41-44.
19. Rodríguez, T.; Núñez, M. y Vento, H. Influencia de un análogo de brasinoesteroides en la fase de multiplicación *in vitro* del banano (*Musa spp.*) variedad Gran Enano. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 2, p. 19-22.
20. Rodríguez, T. Influencia de biorreguladores cubanos en algunos indicadores morfológicos durante la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* del banano (*Musa sp.*). [Tesis de doctorado]; Universidad de La Habana, 1999.

Recibido: 24 de octubre de 2003

Aceptado: 6 de julio de 2004

Cursos de Verano

Precio: 320 USD

Brasinoesteroides: nuevos biorreguladores de amplia perspectiva para la agricultura

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

Fecha: 8 al 12 de julio

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) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu