

EFECTO DEL BIOBRAS 6 EN LA MORFOGÉNESIS *In Vitro* DEL TOMATE (*Lycopersicon esculentum*, Mill) VAR. AMALIA

Dagmara Plana[✉], Marta Alvarez, Marilyn Florido, Regla M. Lara y Miriam Núñez

ABSTRACT. Brassinosteroids are plant growth-stimulating substances. Since their isolation different investigations have been developed to evaluate their activity as *in vitro* morphogenetic bioregulators in different plant species. In this work, the biological activity of different concentrations of a brassinosteroid analog synthesized in Cuba, commercially called Biobras 6 was studied in the *in vitro* morphogenetic response in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Some trials were performed using hypocotyl apical segments as explants and cotyledons coming from seedlings of Amalia cultivars, which were cultivated in MS medium supplemented with different concentrations of Biobras 6 (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mg. L⁻¹), with or without low concentrations of BAP (0.25, 0.5, 1 mg. L⁻¹). The best shoot organogenesis results were achieved with the use of Biobras 6 (10^{-4} mg.L⁻¹), regarding hypocotyl efficiency and regeneration frequency. The regenerative process of both explant types differed notably. Biobras 6 (10^{-4} mg.L⁻¹) and BAP (0.25 mg.L⁻¹) combination benefited callus formation in all the tested explant, favoring a slow process of indirect regeneration.

Key words: brassinosteroids, *in vitro* culture, *Lycopersicon esculentum*

INTRODUCCIÓN

Actualmente, en nuestro país se encuentran en ejecución diferentes programas de mejora genética encaminados a la obtención de nuevas variedades de tomate, adaptadas a las condiciones estresantes que provocan los factores bióticos y abióticos presentes en los climas tropicales, donde además de los métodos clásicos de

RESUMEN. Los brasinoesteroides son sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal y desde su aislamiento se han desarrollado diferentes investigaciones que han permitido evaluar su actividad como biorreguladores de la morfogénesis *in vitro* de diferentes especies vegetales. En este trabajo, se estudió la actividad biológica de diferentes concentraciones del análogo cubano de brasinoesteroides, llamado comercialmente Biobras 6, en la respuesta morfogenética *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Para ello se realizaron ensayos donde se utilizaron como explantes segmentos apicales de hipocótilos y cotiledones provenientes de plántulas del cultivar Amalia, cultivadas en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de Biobras 6 (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mg. L⁻¹), en presencia o no de bajas concentraciones de BAP (0.25, 0.5, 1 mg. L⁻¹). Con la adición del Biobras 6 (10^{-4} mg.L⁻¹), en los medios de cultivo de los hipocótilos se lograron los mejores resultados en este estudio, en cuanto a eficiencia y frecuencia de regeneración directa se refiere. Es necesario destacar que el proceso regenerativo de los dos tipos de explantes se diferenció notablemente. La combinación del Biobras 6 (10^{-4} mg.L⁻¹) y BAP (0.25 mg.L⁻¹) en el medio de cultivo benefició notablemente la formación de callos en todos los explantes estudiados, favoreciendo un lento proceso de regeneración indirecta.

Palabras clave: brasinoesteroides, cultivo *in vitro*, *Lycopersicon esculentum*

mejora, se emplean novedosas técnicas de ingeniería genética que necesitan de un eficiente protocolo de regeneración (1).

Uno de los elementos clave y más costosos utilizados en la propagación *in vitro* lo constituyen los reguladores de crecimiento; por ello debemos optimizarlos o sustituirlos por biorreguladores de mayor eficiencia y menor costo (2).

En estos momentos, en el país están siendo estudiados varios análogos de brasinoesteroides de producción nacional, con el fin de valorar su actividad como regulador del crecimiento *in vitro*. El desarrollo de todas estas investigaciones ha permitido que se disponga de análogos de brasinoesteroides con diferentes estructuras químicas, en cantidades suficientes para evaluar su efectividad como biorreguladores (3).

Ms.C. Dagmara Plana, Investigadora; Dr.C. Marta Álvarez, Investigador Titular; Ms.C. Marilyn Florido, Investigador Agregado y Regla M. Lara, Especialista del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal; Dr.C. Miriam Núñez, Investigador Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveita Postal 1, San José de las Lajas, La Habana CP 32 700

✉ dagmara@inca.edu.cu

Estos biorreguladores sintéticos obtenidos en Cuba fueron efectivos en los procesos morfogénicos de diferentes especies, con la ventaja de que los mejores resultados se encontraban a las concentraciones más bajas del producto, lo cual permite reducir aún más los costos del medio de cultivo (4, 5, 6, 7, 8).

El tomate presenta una baja eficiencia de regeneración *in vitro*, por lo que este trabajo se propuso como objetivo evaluar la actividad biológica del análogo de brasinoesteroide Biobras-6, en la respuesta morfogénica *in vitro* del tomate, en sustitución de hormonas vegetales o como complemento de éstas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para realizar estos experimentos se partió de semillas del cultivar de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) Amalia (9).

El medio basal (MB) consistió en sales de Murashige y Skoog (10) suplementado con 2 % de agar *Gel Rite*, azúcar comercial (30 g.L⁻¹), Tiamina (4 mg.L⁻¹) y Mioinositol (100 mg.L⁻¹), como aditivo orgánico (11, 12, 13). Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de un análogo epirostanico de brasinoesteroide Biobras 6 conocido por BB6, sintetizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana. Las concentraciones de BB6 y Bencilamino purina más conocido por BAP (B) utilizadas se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Concentraciones de Biobras 6 y BAP en los medios de cultivo ensayados

Tratamientos	BAP (mg.L ⁻¹)	Biobras 6 (mg.L ⁻¹)
BB6 ₁	-	10 ⁻⁴
BB6 ₂	-	10 ⁻³
BB6 ₃	-	10 ⁻²
BB6 ₄	-	10 ⁻¹
BB6 ₁ +B ₁	0.25	10 ⁻⁴
BB6 ₁ +B ₂	0.5	10 ⁻⁴
BB6 ₁ +B ₃	1	10 ⁻⁴

El pH se ajustó a 5.8, previo a la adición del agente solidificante. La esterilización se llevó a cabo en autoclave por espacio de 20 minutos a 121°C con 1.5 atmósferas de presión.

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con agua jabonosa incluidas dos gotas de Tween 80 %; posteriormente fueron lavadas con agua destilada y llevadas al flujo laminar (ESI FLUFRANCE), donde se sumergieron en solución de cloro comercial al 50% (3% de cloro activo) durante 15 minutos y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril hasta eliminar el agente desinfectante (13).

Una vez desinfectadas las semillas, fueron colocadas a razón de 25 semillas por frasco sobre la superficie del medio basal, contenido en pomos de vidrio a razón de 20 mL por recipiente para obtener los germinados cultivados *in vitro* (11, 12, 13). Entre los siete y 10 días posteriores a la germinación, los cotiledones de las plántulas estaban perfectamente expandidos y desarrollados; en este estadio se seccionaron los segmentos apicales de los hipocótilos (1 cm) y la zona central de las hojas cotiledonares, para ser utilizados como explantes en medios de cultivo que contenían medio basal y las concentraciones de BB6 y BAP referidas en la Tabla I a razón de cinco explantes por pomo con 10 repeticiones.

La incubación se realizó en un cuarto de crecimiento a 25±2°C (11), con fotoperíodo de 16 horas luz y aproximadamente 4000 Lux, suministrados por tubos fluorescentes.

Después de 21 días de cultivo se llevó a cabo una valoración cualitativa y cuantitativa, en 50 explantes por tratamiento, de los siguientes aspectos:

❖ desarrollo del callo: según escala 1 (13)

Escala 1:

↪ callo abundante (CA): rodea completamente al explante formando una masa abundante

↪ poco callo (PC): callo escaso formado en la zona de corte del explante

↪ ausencia del callo (AC): no hubo respuesta al tratamiento

❖ tipo de callo:

↪ morfogénico (M): abundante formación de yemas y brotes

↪ nodular (N): compactos y duros con abultamientos de color verde en la superficie

↪ friable (F): blandos, acuosos y sueltos

❖ color del callo: según escala 2 (13)

Escala 2:

↪ crema (C).

↪ verde claro (VC).

↪ mixto (M): callo con zonas de diferentes tonalidades.

El número de yemas y brotes por explante se transformaron a $\sqrt{x+1}$; los resultados fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, modelo fijo (14). El porcentaje de explantes con brotes, brotes anormales, yemas, callos y raíces mediante una comparación de proporciones, a través de la prueba de Chi cuadrado. En caso de existir diferencias significativas entre las medias, se docimaron por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 % (15).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al adicionar el análogo de brasinoesteroide Biobras 6 al medio de cultivo basal donde se cultivaban hipocótilos, se observó una pobre y casi nula formación de callo, con un notable enraizamiento por uno de los extremos de los explantes en todas las combinaciones probadas (Tabla II).

Tabla II. Efecto del Biobras 6 en la morfogénesis *in vitro* de hipocótilos del cultivar Amalia

Tratamientos	Brotos/explantes regenerados	Eficiencia de regeneración (brotos/explantes totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callos (%)	Explantes con raíces (%)
BB ₁	1.57±0.07	1.48	28b	0.7	42
BB ₂	1.48±0.05	1.33	64a	0	64
BB ₃	1.4±0.09	1.12	21b	14	35
BB ₄	1±0.09	1.09	21b	14	57
ESx±	ns	0.07 ns	0.12**	8.17-02E ns	0.13 ns

Medias con letras en común por columna, no difieren significativamente según prueba de Duncan (p<0.05)

** significativo para p<0.01

En la Tabla II se expone el comportamiento del proceso organogénico y la formación de callo ante la acción del Biobras 6. Este análogo de brasinoesteroide en concentraciones mayores a 10^{-4} mg.L⁻¹ (BB₆), disminuyó la formación de brotes y el número de brotes por explante. Si bien la eficiencia de regeneración no fue superior a la de otros experimentos donde se usaron diferentes reguladores (16), se observó regeneración directa en más del 50 % de los explantes para el tratamiento BB₂. Algunos autores (2) sugieren una posible acción de los brasinoesteroides como promotores de la diferenciación celular, aunque aún se desconozcan los mecanismos por los cuales se llevan a cabo.

Los resultados descritos en la Tabla II demuestran que este análogo de brasinoesteroide favoreció la regeneración de manera directa en estos explantes, aunque no incrementó los valores de las variables morfogénicas que describen un eficiente proceso de regeneración para este cultivo (13). La eficiencia de regeneración se mantuvo con valores semejantes en todos los tratamientos, al igual que el número de explantes y el porcentaje de explantes con raíces y/o callos. La regeneración directa fue el proceso más significativo, lográndose los resultados más notables en el tratamiento BB₂, con una frecuencia de regeneración de un 64 %.

Es necesario destacar que el Biobras 6 fue efectivo en los procesos morfogénicos de otras especies, con la ventaja de que los mejores resultados se encontraron con el uso de bajas concentraciones del producto (4, 6, 11, 17).

El uso de 10^{-4} mg.L⁻¹ de Biobras 6 combinado con diferentes dosis de BAP, como suplemento del medio de cultivo de segmentos de hipocótilos, favoreció la formación de callos de abundante crecimiento, morfogénicos y de color verde claro en todos los tratamientos ensayados. Como se destaca en la Tabla III, a medida que se aumentó la concentración de BAP en el medio de cultivo se obtuvo un mayor porcentaje de explantes con callos; sin embargo, a pesar del excelente aspecto de estos, no se logró una eficiente regeneración, siendo más alta la frecuencia y eficiencia de regeneración en los tratamientos con menores concentraciones de BAP.

Tabla III. Efecto de la acción del Biobras 6 combinado con BAP en la morfogénesis *in vitro* en segmentos apicales de hipocótilos del tomate

Tratamientos	Brotos/explantes regenerados	Eficiencia de regeneración (brotos/explantes totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callos (%)
BB ₁ +B ₁	1.68±0.05 a	1.61 a	90 a	70 b
BB ₁ +B ₂	1.41±0.09 b	1.12 b	30 b	100 a
BB ₁ +B ₃	0±0.05 c	0 c	0 c	100 a
ESx±	***	0.07***	0.15***	9.48-02*

*** significativo para p<0.001

Trabajando con la variedad de papaya Maradol Rojo (18), se encontró regeneración de plantas a partir de embriones somáticos, favorecida por las concentraciones de 10^{-4} mg.L⁻¹ de BB₆ en combinación con 0.25 mg.L⁻¹ de BAP, tanto para el número de plantas como para la cantidad de conglomerados que formaron plantas. De igual manera, en este experimento la regeneración de brotes ocurrió en mayor medida en aquellos tratamientos donde era menor la concentración de BAP en el medio, destacándose el BB₆+B₁ con una mayor frecuencia y eficiencia de regeneración (Tabla III).

Es necesario destacar que no hubo formación de raíces en los tratamientos ensayados en este experimento (Tabla III), lo que podría suponer un efecto producido por la acción del BAP, al inhibir la formación de raíces, como ha sido informado en otros trabajos realizados con esta especie, donde se utiliza este regulador en los medios de cultivo (13).

Los resultados evidenciaron que la adición exógena de Biobras 6 en combinación con BAP al medio de cultivo favoreció la frecuencia de explantes regenerados y la formación de callos (Tabla III), así como inhibió la formación de raíces en comparación con aquellos tratamientos donde se utilizó solamente el Biobras 6, como estimulador de la morfogénesis *in vitro* (Tabla II) en hipocótilos apicales.

La adición de Biobras 6 en los medios de cultivo bloqueó la regeneración de brotes y la callogénesis en los segmentos de cotiledones, observándose solo una incipiente formación de callos en un 5 % de los explantes del tratamiento BB₃ (Tabla IV), alrededor de la zona de corte, alcanzando un pobre crecimiento de coloración crema.

Tabla IV. Efecto del Biobras 6 en cotiledones de tomate cultivados *in vitro*

Tratamientos	Explantes con callos (%)	Explantes con raíces (%)
BB ₁	0	50 a
BB ₂	0	10 b
BB ₃	5	70 a
BB ₄	0	75 a
ESx±	2.48-02E ns	0.11***

*** significativo para p<0.001

La formación de raíces fue el fenómeno más común observado en presencia del brasinólido (Tabla IV), acompañado de un proceso de oxidación irreversible que impidió la formación de estructuras y favoreció la necrosis de los explantes, lo que indica que la utilización de estas dosis de BB6 no son adecuadas para favorecer la regeneración *in vitro* de este tipo de experimentos, aún cuando solo se formen raíces en un 10 % de los explantes (BB6₁).

La adición del Biobras 6 combinado con BAP en los medios de cultivo, mostró resultados similares a los obtenidos en la formación de callos a partir de segmentos apicales de hipocótilos (Tablas III y V). En este caso, en la medida que se elevó la concentración de BB6 disminuyó el porcentaje de explantes con callos. Los callos desarrollados eran de color verde claro, friables y de crecimiento abundante, destacándose el tratamiento BB6₁+B₁ con el 100 % de los explantes con callos.

La regeneración directa de órganos fue muy incipiente, solo se formaron brotes a partir de los callos, con una menor eficiencia y sin diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla V). A medida que aumentó la concentración de BAP en el medio de cultivo, se observó un incremento no significativo en el porcentaje de explantes con brotes y el número de brotes por explante.

Tabla V. Efecto de la adición del Biobras 6 combinado con BAP en la morfogénesis *in vitro* de cotiledones del cultivar Amalia

Tratamientos	Brotos/explantes regenerados	Eficiencia de regeneración (brotos/explantes totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callos (%)
BB6 ₁ +B1	1.08±0.08	1.08	20	100
BB6 ₁ +B2	1.12±0.06	1.12	30	70
BB6 ₁ +B3	1.2±0.06	1.2	40	60
ESx±	ns	0.07 ns	0.14 ns	0.13 ns

Medias con letras en común por columna, no difieren significativamente según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

Cuando se estudió la respuesta de segmentos apicales de hipocótilos a la adición de estas mismas combinaciones de Biobras y BAP, se obtuvo una respuesta positiva en todos los tratamientos, en cuanto a la formación de callos, con los mayores valores en los tratamientos de dosis más elevadas. En el caso de los cotiledones con las dosis más bajas (BB6₁+B1), se obtuvo un 100% de explantes con callos, lo que evidencia que los balances hormonales en diferentes explantes de una misma planta difieren.

Es necesario destacar que el proceso regenerativo de los dos tipos de explantes se diferenció notablemente con el uso de bajas concentraciones de BB6. Se lograron los mejores resultados en este estudio, en cuanto a eficiencia y frecuencia de regeneración en los hipocótilos, aunque sin diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que en los cotiledones solo se favoreció la formación de raíces, en cualquiera de los tratamientos ensayados.

La combinación del BB6 (10^{-4} mg.L⁻¹) y BAP (0.25 mg.L⁻¹) en el medio de cultivo benefició notablemente la formación de callos en todos los explantes estudiados, favoreciéndose un lento proceso de regeneración indirecta.

Diferentes autores (19, 20) encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de tomate, estando esta determinada en gran medida por los reguladores del crecimiento utilizados y el tipo de explantes usado, aún cuando se utilizan diferentes explantes de una misma planta, aspecto este a tener en cuenta a la hora de recomendar el empleo de uno u otro regulador del crecimiento.

Los resultados de estos bioensayos confirman los obtenidos en múltiples investigaciones de diferentes especies vegetales, sobre la capacidad de los brasinoesteroides para activar a muy bajas concentraciones los procesos metabólicos y el crecimiento vegetal (3, 6), lo que abre nuevas perspectivas en su utilización como sustituto de las hormonas de crecimiento en los diferentes procesos biológicos. En este caso, se demostró su tipo de acción como regulador y complemento de otros reguladores comerciales, lo que nos permitirá continuar las investigaciones sobre su efecto con estudios más detallados, con vistas a lograr la optimización y eficiencia de un protocolo de regeneración para esta especie.

REFERENCIAS

- Alvarez, M. /et al./ Obtención de nuevos genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) por métodos biotecnológicos y nucleares con tolerancia a estrés abiótico y biótico. Informe final de Proyecto CITMA. (Cod. 300073), 1999.
- González, S. /et al./ Actividad biológica de diferentes brasinoesteroides en *Rhaphanus sativus* L. y *Saccharum officinarum* L. En: Programas y resúmenes seminario científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura. (11:1998:La Habana), 1998.
- Núñez, M. Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol 20, no 3, p. 63-72.
- 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], Universidad de La Habana, 1997.
- Montes, S. /et al./ Uso de análogo de brasinoesteroide BB-6 en la micropropagación del clavel. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 2, p. 51-55.
- García, D. Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en café (*Coffea canephora* Pierra). [Tesis de Maestría], UH, 1998.
- 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.

8. Hernández, M. /et al./ Empleo de brassinoesteroides para la diferenciación de callos de papa (*Solanum tuberosum* L.). En: Programas y resúmenes seminario científico INCA. (9:1994:La Habana), 1994.
9. Alvarez, M.; Armas, G. de y Martínez, B. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1, p. 82.
10. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biassays with the tobacco tissues cultures. *Physiol. Plantarum*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
11. Cano, A. E. /et al./ Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 53, p. 19-26.
12. Fuentes, A. D. /et al./ Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. *Biot. Aplicada*, 1998, vol. 15, p. 242-245.
13. Alvarez, M. /et al./ Radiosensibilidad a rayos gamma ^{60}Co en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) variedad Amalia. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 4, p. 35-39.
14. Snedecor, G. y Cochran, W. Métodos estadísticos. C. México : Continental, 1971. 702 p.
15. Duncan, D. A significance test for differences between ranked treatment in analysis of variance. *Virginia J. Sci.*, 1951, vol. 2, p. 171-189.
16. Plana, D. /et al./ Efecto del oligopeptato Pectimorf sobre explantes de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. En: Programa y Resúmenes Seminario Científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura. (11:1998:La Habana), 1998.
17. Moré, O. Efecto del análogo de brasinoesteroide MH5 en el proceso de callogénesis en papa (*Solanum tuberosum* L.). [Tesis de Maestría], Universidad de La Habana, 2000.
18. Gómez, R. /et al./ Empleo de sustancias biorreguladoras (Biobras-6) en la conversión y adaptación de plantas de frutabomba (*Carica papaya* L.) var Maradol Roja obtenidas a partir de embriones somáticos.-En: Resúmenes del Coloquio Internacional de Biotecnología de Plantas, Santa Clara, (4:1996:Santa Clara), 1996.
19. Santana, N. Estudio sobre la formación de brotes en cultivo *in vitro* de hojas de tomate. *Cultivo Tropicales*, 1985, vol. 7, no. 2, p. 117-122.
20. Torelli, A. /et al./ New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. *Plant Molecular Biology*, 1996, vol. 32, p. 891-900.

Recibido: 29 de octubre del 2001

Aceptado: 9 de enero del 2002

Cursos de Verano

Precio: 200 USD

Biotecnología

Coordinador: Dra.C. María M. Hernández Espinosa

Duración: 30 horas

Fecha: 1 al 5 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