

EMPLEO DE DOS ANÁLOGOS DE BRASINOESTEROIDES EN LA FORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS EN PAPA (*Solanum tuberosum* L)

Olivia Moré, María M. Hernández[✉], Miriam Núñez, Ana Estévez y María E. González

ABSTRACT. The biological activity of brassinosteroid analogs MH5 and Biobras-6 (BB-6) was evaluated with the objective to determine its effects and establish appropriate doses as possible substitutes or hormonal complements in the process of embryogenic callus formation in potato (*Solanum tuberosum*, L. var. Desirée). Doses of 0.0001 until 0.25 mg.L⁻¹ of both analogs and two control media were used, which contained: 3 mg.L⁻¹ 2,4D and 0.84 mg.L⁻¹ kinetine (medium I) and 0.5 mg.L⁻¹ 2,4D and 2 mg.L⁻¹ kinetine (medium II). Evaluations were carried out to the qualitative and quantitative changes of callus evolution and the callogenic growth curves were made with the best variants. Results indicated a cytokinin like activity of these compounds and an enhanced achievement of a better embryogenic callus at the concentrations of 0.1 mg.L⁻¹ MH5 and 0.01 mg.L⁻¹ Biobras-6 for medium I and 0.001 mg.L⁻¹ MH5 and 0.01 mg.L⁻¹ Biobras-6 for medium II. There was not any callus answer when these analogs were used as substitutes of 2,4D. A better behavior was noticed in the growth dynamics of calluses, in those treatments where the products were used as kinetine substitutes for media I and II.

RESUMEN. Se evaluó la actividad biológica de los análogos de brasinoesteroides MH5 y Biobras-6 (BB-6), con el objetivo de determinar sus efectos y establecer dosis adecuadas como posibles sustitutos o complementos hormonales en el proceso de formación de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum*, L. var. Desirée). Se utilizaron dosis de 0.0001 hasta 0.25 mg.L⁻¹ de ambos análogos y dos medios controles, los cuales contenían: 3 mg.L⁻¹ de 2,4D y 0.84 mg.L⁻¹ de kinetina (medio I) y 0.5 mg.L⁻¹ de 2,4D y 2 mg.L⁻¹ de kinetina (medio II). Se realizaron evaluaciones atendiendo a los cambios cualitativos y cuantitativos de la evolución del callo y con las mejores variantes se elaboraron las curvas de crecimiento callogénico. Los resultados indicaron una actividad tipo citoquinina de estos compuestos y un favorecimiento en la obtención de un callo embriogénico de mejor calidad a las concentraciones de 0.1 mg.L⁻¹ de MH5 y 0.01 mg.L⁻¹ de Biobras-6 para el medio I y 0.001 mg.L⁻¹ de MH5 y 0.01 mg.L⁻¹ de Biobras-6 para el medio II. No se encontró respuesta callogénica al ser utilizados estos análogos como sustitutos del 2,4D. Se pudo apreciar un mejor comportamiento en la dinámica de crecimiento de los callos, en aquellos tratamientos donde se emplearon los productos como sustitutos de la kinetina para los medios I y II.

Key words: *Solanum tuberosum*, brassinosteroids, callus, embryogenic development

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, brasinoesteroides, callo, desarrollo embrionario

INTRODUCCIÓN

Los brasinoesteroides representan una nueva clase de productos naturales, reconocidos en la actualidad como hormonas vegetales capaces de influir en diferentes procesos fisiológicos en las plantas, como la elongación, división celular y el desarrollo vascular y reproductivo (1, 2).

En Cuba, se ha estado trabajando en la síntesis de análogos de brasinoesteroides con diferentes estructu-

ras químicas, para la realización de estudios biológicos y probar su efectividad como biorreguladores, tanto en condiciones *in vitro* como de campo (3).

La utilización de técnicas biotecnológicas basadas en la obtención y regeneración de embriones somáticos, ha demostrado ser una herramienta importante para el mejoramiento clásico, pues constituye un método eficiente para la propagación clonal de aquellas variedades de interés económico.

La obtención de un callo con características embriogénicas en papa determina el éxito de este proceso, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevos reguladores del crecimiento que permitan mejorar su calidad, así como la posibilidad de reducción de los costos, teniendo en cuenta que los reguladores tradicionales son de importación y en muchos casos se cotizan con precios elevados.

Ms.C. Olivia Moré, Investigadora; Dras.C. María M. Hernández y Ana Estévez, Investigadoras Titulares y Dra.C. María E. González, Investigadora Auxiliar del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal; Dr.C. Miriam Núñez, Investigador Titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaceta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ mhdez@inca.edu.cu

Los brasinoesteroides constituyen biorreguladores con probada actividad en el crecimiento vegetal y con mecanismos de acción diferentes a los de las hormonas clásicas, por lo que ha sido de gran interés científico-técnico la utilización de análogos de brasinoesteroides en la biotecnología vegetal cubana (4), lo que permitirá validar su acción como reguladores del crecimiento y posibilitará su uso en diferentes estudios *in vitro*.

Teniendo en cuenta lo planteado, los objetivos del trabajo fueron determinar el efecto de los análogos de brasinoesteroides MH5 y Biobras-6 (BB-6) y establecer dosis adecuadas en el proceso de formación de callos embriogénicos en papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para la evaluación cualitativa y cuantitativa de la callogénesis en papa con el empleo de los análogos de brasinoesteroides MH5 y Biobras-6 (BB-6), se utilizaron como material vegetal, entrenudos de vitroplántulas de papa var. Desirée a la edad de 35 días, colocados en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con tapones de algodón que contenían 10 mL de medio, para un total de 40 observaciones por tratamiento.

La siembra de los entrenudos se realizó bajo cámara de flujo laminar; y una vez sembrados, los tubos fueron llevados a un cuarto de crecimiento en la oscuridad a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se emplearon dos medios controles: un primer medio que contenía 3 mg.L^{-1} 2,4D y 0.84 mg.L^{-1} kinetina y un segundo medio con 0.5 mg.L^{-1} 2,4D y 2 mg.L^{-1} kinetina.

Se utilizaron diferentes concentraciones de los análogos de brasinoesteroides (MH5 y Biobras-6), como posibles sustitutos o complementos de la kinetina o el 2,4D en el proceso callogénico en papa para los medios I y II, según se muestra en las Tablas I y II.

Tabla I. Combinaciones propuestas con el empleo del MH5 y BB-6 en el medio I

Combinaciones	2,4D (mg.L ⁻¹)	Kin (mg.L ⁻¹)	MH5 (mg.L ⁻¹)	Combinaciones	2,4D (mg.L ⁻¹)	Kin (mg.L ⁻¹)	BB-6 (mg.L ⁻¹)
C	3.0	0.84	-	C	3.0	0.84	-
T1.1	3.0	-	0.25	T2.1	3.0	-	0.25
T1.2	3.0	-	0.1	T2.2	3.0	-	0.1
T1.3	3.0	-	0.01	T2.3	3.0	-	0.01
T1.4	3.0	-	0.001	T2.4	3.0	-	0.001
T1.5	3.0	-	0.0001	T2.5	3.0	-	0.0001
T1.6	3.0	0.42	0.01	T2.6	3.0	0.42	0.01
T1.7	-	0.84	0.25	T2.7	-	0.84	0.25
T1.8	-	0.84	0.1	T2.8	-	0.84	0.1
T1.9	-	0.84	0.01	T2.9	-	0.84	0.01
T1.10	-	0.84	0.001	T2.10	-	0.84	0.001
T1.11	-	0.84	0.0001	T2.11	-	0.84	0.0001
T1.12	1.5	0.84	0.01	T2.12	1.5	0.84	0.01

C: control

Tabla II. Combinaciones propuestas con el empleo del MH5 y BB-6 en el medio II

Combinaciones	2,4D (mg.L ⁻¹)	Kin (mg.L ⁻¹)	MH5 (mg.L ⁻¹)	Combinaciones	2,4D (mg.L ⁻¹)	Kin (mg.L ⁻¹)	BB-6 (mg.L ⁻¹)
C	0.5	2.0	-	C	0.5	2.0	-
T3.1	0.5	-	0.25	T4.1	0.5	-	0.25
T3.2	0.5	-	0.1	T4.2	0.5	-	0.1
T3.3	0.5	-	0.01	T4.3	0.5	-	0.01
T3.4	0.5	-	0.001	T4.4	0.5	-	0.001
T3.5	0.5	-	0.0001	T4.5	0.5	-	0.0001
T3.6	0.5	1.0	0.01	T4.6	0.5	1.0	0.01
T3.7	-	2.0	0.25	T4.7	-	2.0	0.25
T3.8	-	2.0	0.1	T4.8	-	2.0	0.1
T3.9	-	2.0	0.01	T4.9	-	2.0	0.01
T3.10	-	2.0	0.001	T4.10	-	2.0	0.001
T3.11	-	2.0	0.0001	T4.11	-	2.0	0.0001
T3.12	0.25	2.0	0.01	T4.12	0.25	2.0	0.01

Se realizaron observaciones cualitativas de la evolución del callo para cada una de las variantes en estudio, tomando cinco callos al azar en diferentes momentos (6, 9, 18 y 35 días).

Las evaluaciones se llevaron a cabo atendiendo a:

- * crecimiento (formación o no)
- * consistencia (cambios en la textura: compacta, friable y esponjosa)
- * coloración (cambios de color).

A los 35 días se tomó la masa fresca de cinco callos (g), empleando una balanza analítica Sartorius de 0.1 mg de precisión.

Los datos de masa fresca fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, comparándose las medias según la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05\%$).

En la Tabla III se presentan ocho tipos de callos diferentes, desarrollados en los medios I y II en distintos momentos del cultivo con la utilización del MH5 y Biobras-6, como sustitutos de la kinetina. Los cambios en cuanto a consistencia y coloración entre las variantes estudiadas y el control, estuvieron asociados a las combinaciones de reguladores utilizados y la edad del callo.

Tabla III. Tipos de callos de papa en diferentes momentos del cultivo

Escala	Características
1	Consistencia compacta de color verde con zonas blancas brillantes
2	Consistencia semi-compacta de color crema con zonas blancas brillantes
3	Consistencia friable de color verde claro con zonas cremas traslúcidas
4	Consistencia muy friable de color verde claro con zonas cremas
5	Callo homogéneo, consistencia muy friable, apariencia gelatinosa de color crema traslúcido
6	Callo homogéneo de consistencia muy friable de color crema traslúcido
7	Callo nodular, consistencia muy friable de color crema
8	Callo nodular, consistencia muy friable de color crema con zonas crema-oscuras

Estos cambios durante la evolución de la masa callogénica permitieron la caracterización y clasificación del callo embriogénico y no embriogénico en papa.

Dinámica de crecimiento de los callos. Con las mejores variantes obtenidas (T1.2, T2.3, T3.4 y T4.3), se procedió a la elaboración de las curvas de crecimiento, a partir de la masa fresca de cinco callos por tratamiento tomada cada tres días (hasta los 33 días).

Se realizó el ajuste de las curvas de crecimiento para cada una de las variantes a partir de los programas CURVEFIT (5) y EXCEL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las combinaciones donde se empleó el MH5 (T1.7; T1.8; T1.9; T1.10 y T1.11), medio I (T3.7; T3.8; T3.9; T3.10 y T3.11) y medio II, y Biobras-6 (T2.7; T2.8; T2.9; T2.10 y T2.11), medio I (T4.7; T4.8; T4.9; T4.10 y T4.11) y medio II, como sustitutos de la auxina en los medios, no se manifestó respuesta del explante al proceso de formación de callos, apareciendo a los nueve días de la siembra un tejido necrosado en su superficie, que se hacía cada vez más intenso, hasta llegar a la muerte de los tejidos a los 15 días aproximadamente (Figura 1). Este resultado pudo estar dado porque las dosis empleadas de estos análogos no fueron capaces de estimular los niveles endógenos de auxina necesarios para llevar a cabo el proceso de división celular y tampoco lograr un balance hormonal adecuado para su inducción.

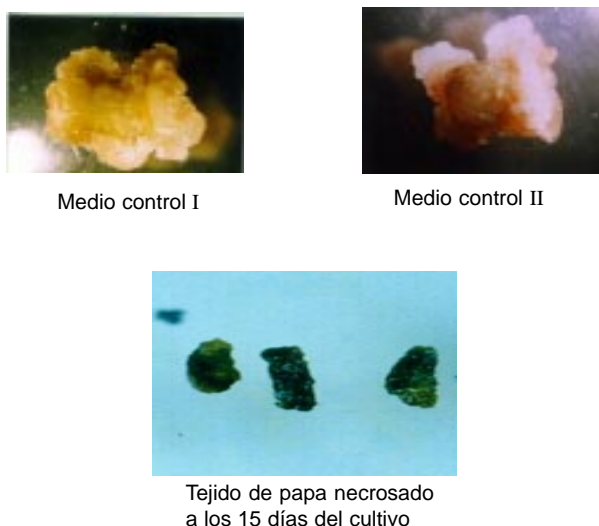


Figura 1. Explante de papa var. Desirée con el empleo del MH5 (T1.7; T1.8; T1.9; T1.10 y T1.11) medio I (T3.7; T3.8; T3.9; T3.10 y T3.11) y medio II, y Biobras-6 (T2.7; T2.8; T2.9; T2.10 y T2.11) medio I (T4.7; T4.8; T4.9; T4.10 y T4.11) y medio II

El papel de los brasinoesteroides en este evento no se ha esclarecido aún, por lo que se requiere de estudios posteriores que permitan dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos sobre los genes que controlan la división celular. Se conoce, además, que en bioensayos típicos para auxinas en diferentes especies vegetales, el brasinoesteroide no mostró respuesta, provocando una disminución en el crecimiento (4).

La respuesta inhibitoria en el crecimiento de los callos al ser empleados el MH5 y Biobras-6 como sustitutos auxínicos demostró, una vez más, la necesaria presencia de la auxina para el desarrollo callogénico en papa, siendo 2,4D el regulador del crecimiento más empleado en este proceso. Los porcentajes más elevados de formación de callos fueron alcanzados al combinar el 2,4D con BAP para diferentes variedades (6).

Para el caso de las variantes T1.6; T1.12; T2.6; T2.12 (medio I) y T3.6; T3.12; T4.6; T4.12 (medio II), donde se empleó el MH5 y Biobras-6 como complementos de la kinetina y el 2,4D respectivamente, se pudo apreciar una ligera inducción del callo en los extremos del explante, que se hizo más notable a los 20 días después de la siembra y se mantuvo hasta los 35 días. El poco tejido desarrollado se mostró de color verde claro con zonas blancas de consistencia compacta (Figura 2).

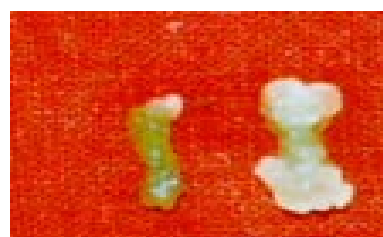


Figura 2. Explante de papa var. Desirée con el empleo del MH5 y Biobras-6 como complementos hormonales del 2,4D y la kinetina en los medios I (T1.6; T1.12; T2.6; T2.12) y II (T3.6; T3.12; T4.6; T4.12)

La utilización de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de MH5 y Biobras-6 como complementos de la kinetina y el 2,4D en los medios I y II respectivamente, permitió alcanzar efectos similares en el desarrollo del callo, lo que pudo estar ocasionado por el establecimiento de un balance hormonal endógeno en el material vegetal, que propició la activación de mecanismos de inhibición sobre el proceso de multiplicación celular.

Cabe señalar que a pesar de la escasa masa callogénica formada, en aquellos tratamientos donde se utilizaron el MH5 y Biobras-6 como complementos de la kinetina, se encontró una respuesta superior comparada con las otras variantes donde se emplearon los productos como complementos del 2,4D. En el mismo cultivo, similar desarrollo del callo fue obtenido con la utilización del MH5 y Biobras-6 como complementos citoquinínicos (7, 8). Por el contrario, en café, se presentó un aumento en la masa fresca del callo con el empleo de estos productos como complementos del 2,4D y la kinetina (9). Trabajando en el mismo cultivo, la concentración de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de MH5 con 1 mg.L^{-1} de kinetina alcanzó el máximo valor (10).

Se encontró que las combinaciones T1.2 ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de MH5); T2.3 ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ Biobras-6) (medio I) y T3.4 ($0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ de MH5); T4.3 ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ Biobras-6) (medio II) mostraron callos con las mejores características

embriogénicas, con apariencia nodular, friable y de color crema con puntos crema oscuros; entre ellos se destacaron aquellos desarrollados en el medio II y donde se empleó el MH5 (T3.4), comparado con los demás tratamientos y el control, que desarrolló una masa semi-compacta de color crema con zonas blancas brillantes (Tablas IV y V, Figura 3).

Tabla IV. Comportamiento de los callos con el empleo del MH5 y Biobras-6 como sustitutos de la kinetina en el medio I

Días	Con- trol	Combinaciones									
		T1.1	T2.1	T1.2	T2.2	T1.3	T2.3	T1.4	T2.4	T1.5	T2.5
6	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	1	3	3	4	3	3	4	4	3	4	3
18	2	5	5	8	6	6	7	6	5	5	5
35	2	5	5	8	6	6	8	6	5	6	6
tipo	ce	cne	cne	ce	cne	cne	ce	cne	cne	cne	cne

ce- callo embriogénico

cne- callo no embriogénico

Tabla V. Comportamiento de los callos con el empleo del MH5 y Biobras-6 como sustitutos de la kinetina en el medio II

Días	Control	Combinaciones									
		T3.1	T4.1	T3.2	T4.2	T3.3	T4.3	T3.4	T4.4	T3.5	T4.5
6	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
9	1	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4
18	2	5	5	6	5	7	8	8	6	5	5
35	2	5	5	6	5	7	8	8	6	5	5
tipo	ce	cne	cne	cne	cne	ce	ce	ce	cne	cne	cne

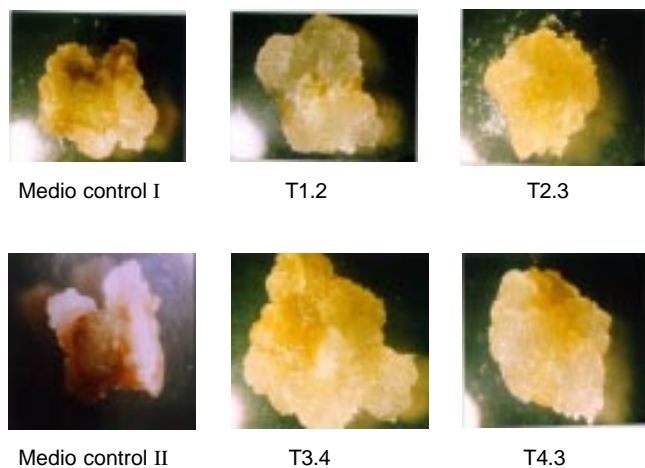


Figura 3. Callos embriogénicos de papa con el empleo del MH5 y Biobras-6 como sustitutos de la kinetina

Desde los primeros días del cultivo, se observó una acción favorecedora de los análogos de brasinoesteroides sobre la consistencia de los callos, para las diferentes variantes evaluadas en comparación con el control. A los nueve días se manifestó en algunos tratamientos un cambio de coloración, apareciendo en diferentes partes del callo puntos de color crema, mientras que en el control

se apreciaron zonas de color blanco brillante, lo que ha sido informado por numerosos autores como zonas sin respuestas morfogénicas.

A los 18 días se presentaron diferencias marcadas en cuanto al crecimiento, consistencia y coloración de los callos entre las variantes y el control, las cuales se mantuvieron y se hicieron más notables con la evolución del callo hasta los 35 días.

Estos resultados corroboran los obtenidos en el cultivo de la papa con una acción favorable del MH5 y Biobras-6, como sustitutos de la kinetina sobre el crecimiento y la calidad de los callos (11). Respuestas satisfactorias se señalaron al sustituir la kinetina por el Biobras-6 en la formación de callos en dos variedades de arroz (12).

En los dos medios utilizados, la concentración de 0.01 mg.L⁻¹ de Biobras-6 resultó la más efectiva para la obtención de un callo con buenas características embriogénicas; al parecer, se logró alcanzar un adecuado balance entre las dosis de auxina (2,4D) y el compuesto, lo que permitió el desarrollo callogénico.

Se conoce que el brasinoesteroide no afecta el nivel y metabolismo de la auxina en el tejido de la planta, existiendo fuertes interacciones entre ambas fitohormonas (13), y que la combinación de los dos compuestos promovieron el crecimiento de los callos de varios cultivos (14).

Teniendo en cuenta estudios anteriores, se dio a conocer que algunos brasinoesteroides pueden estimular la actividad de las citoquininas por inducción de la acumulación de citoquininas endógenas (3).

En las Figuras 4 y 5 se presenta el valor de la masa fresca de los callos a los 35 días, con el empleo del MH5 y Biobras-6 respectivamente, como sustitutos de la kinetina en el medio I; de forma general, se pudieron apreciar diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

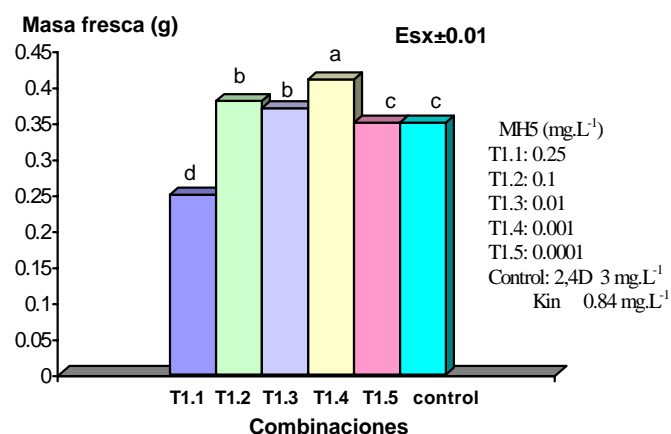


Figura 4. Comportamiento de la masa fresca de los callos con el empleo del MH5 como sustituto de la kinetina en el medio I

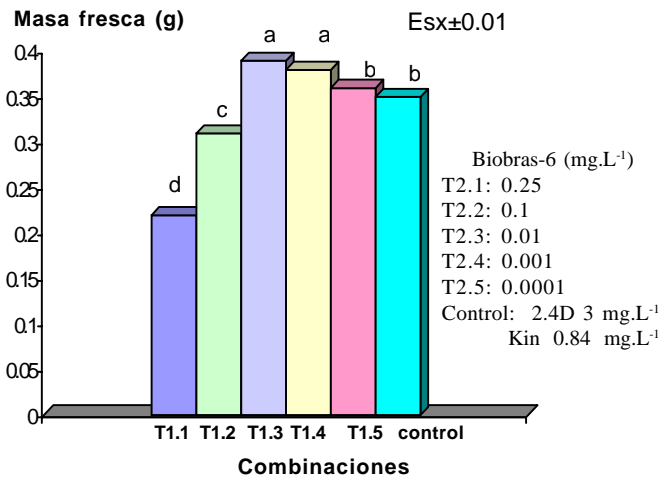


Figura 5. Comportamiento de la masa fresca de los callos con el empleo del Biobras-6 como sustituto de la kinetina en el medio I

Para el caso del MH5, el mayor valor fue alcanzado por T1.4 (0.001 mg.L⁻¹). La variante T1.2 (0.1 mg.L⁻¹), la cual presentó las mejores características cualitativas, ocupó el segundo lugar, sin diferir con T1.3 (0.01 mg.L⁻¹) pero sí con el resto y el control.

En relación con el Biobras-6, se destacaron las combinaciones T2.3 (0.01 mg.L⁻¹) y T2.4 (0.001 mg.L⁻¹), mostrando diferencias significativas con las demás variantes y el control. En este caso, T2.3 coincide en ser la dosis más efectiva para la calidad y el desarrollo del callo.

La masa fresca de los callos con la utilización del MH5 y Biobras-6, como sustitutos de la kinetina en el medio II, se muestra en las Figuras 6 y 7; el mejor resultado para MH5 correspondió a T3.5 (0.0001 mg.L⁻¹), seguido de T3.4 (0.001 mg.L⁻¹), que logró ser la concentración donde el callo mostró las mejores cualidades, difiriendo entre ellas del resto de las combinaciones y del control, el cual presentó uno de los menores valores.

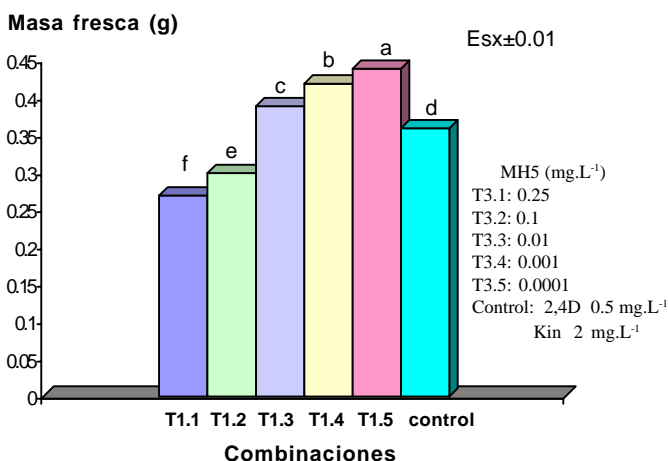


Figura 6. Comportamiento de la masa fresca de los callos con el empleo del MH5 como sustituto de la kinetina en el medio II

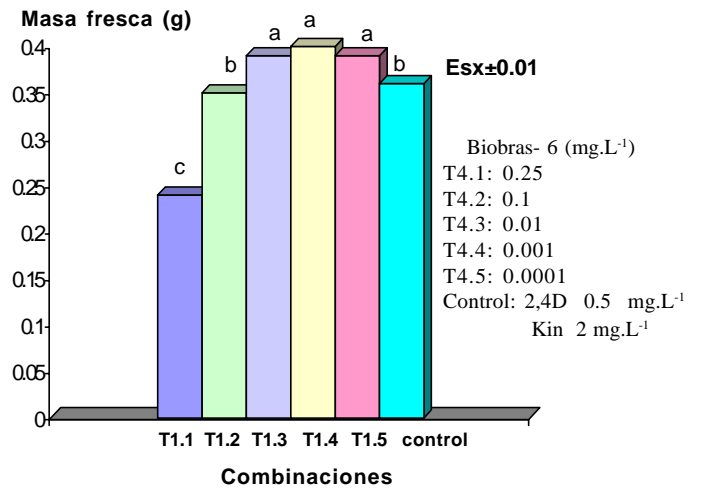


Figura 7. Comportamiento de la masa fresca de los callos con el empleo del Biobras-6 como sustituto de la kinetina en el medio II

Para el compuesto Biobras-6, T4.4 (0.001 mg.L⁻¹) tuvo el mayor valor de masa fresca, sin diferir con T4.3 (0.01 mg.L⁻¹) y T4.5 (0.0001 mg.L⁻¹), pero sí con las demás variantes y el control. La concentración T4.3 coincide con el mejor comportamiento en calidad, al mostrar un callo friable de color crema completamente desarrollado.

La concentración más alta de MH5 y Biobras-6 (0.25 mg.L⁻¹) utilizada para los medios I y II no manifestó efecto positivo, al presentar los menores valores en masa fresca, lo cual además se correspondió con un comportamiento no adecuado en las cualidades del callo, el cual denotó una apariencia gelatinosa; esto reafirma que los brasinoesteroides desencadenan su mayor actividad a muy bajas concentraciones (15).

En dependencia de la composición celular así será la apariencia externa y la textura del callo; algunos presentan una masa celular compacta y dura con células íntimamente unidas, lo cual está asociado al alto número de células meristemáticas presentes en el callo, mientras que otros forman tejidos esponjosos, con una mayor cantidad de espacios intercelulares (6).

Un gran número de investigadores han demostrado la eficiencia de los brasinoesteroides como promotores del crecimiento (16).

En el estudio del efecto de dos brasinoesteroides en callos de tabaco, se encontró que ambos tuvieron efectos diferentes en la formación de la biomasa, la que estuvo inversamente relacionada con el contenido endógeno de citoquininas (17).

Dinámica de crecimiento de los callos para los medios I y II. La dinámica de crecimiento de los callos procedentes de las mejores variantes obtenidas para el medio I (T1.2; 0.1mg.L⁻¹ MH5 y T2.3; 0.01 mg.L⁻¹ Biobras-6) se muestra en la Figura 8; se encontró, en todos los tratamientos, un comportamiento superior en el crecimiento de la masa callogénica comparado con el control. Para todos los casos, se observó una fase de latencia, que tuvo una duración de cinco días. En este momento, no

se manifestó crecimiento del explante, indicativo de un período adaptativo de las células a las nuevas condiciones de cultivo. La fase de crecimiento exponencial se evidenció desde los seis hasta los 14 días, con un desarrollo acelerado del callo, como muestra de una intensa división celular y consecuencia de la activa interacción de los componentes del medio, con el contenido hormonal endógeno del explante.

$$y = -4E-07X^4 + 9E-06X^3 + 0.0004x^2 - 0.001x + 0.02 \quad R^2 = 0.9939$$

$$y = 3E-07X^4 - 5E-05X^3 + 0.002x^2 - 0.0095x + 0.029 \quad R^2 = 0.9939$$

$$y = 1E-08X^4 - 3E-05X^3 + 0.0013x^2 - 0.0063x + 0.0268 \quad R^2 = 0.9958$$

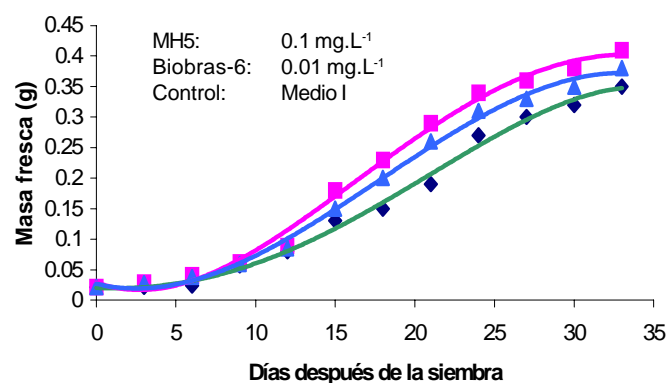


Figura 8. Dinámica de crecimiento de los callos con el empleo de los biorreguladores como sustitutos de la kinetina en el medio I

Para las variantes y el control, la fase de crecimiento lineal se presentó desde los 15 hasta los 30 días, momento en que se puso de manifiesto la fase estacionaria, con detenimiento en el incremento de la masa fresca de los callos.

En la Figura 9, se observa la curva de crecimiento callogénico para las mejores combinaciones desarrolladas en el medio II (T4.4; 0.001 mg.L⁻¹ MH5 y T5.4; 0.01 mg.L⁻¹ Biobras-6); se presentó para el control una fase preparatoria con una duración de ocho días a diferencia de las variantes estudiadas, la cual culminó a los cinco días después de la siembra. Posteriormente, se manifestó la fase exponencial en correspondencia con una gran actividad celular y desarrollo del callo, desde los ocho hasta los 12 días para el control y desde los cinco hasta 10 días para las combinaciones. La fase lineal abarcó desde los 12 a 30 días en relación con el control, siendo más corta para el caso de las variantes con un período de 10 a 27 días, momento a partir del cual se observó una etapa estacionaria con escaso desarrollo callogénico.

De forma general, se notó una mejor respuesta en la dinámica de crecimiento de los callos, en aquellos tratamientos donde se emplearon los biorreguladores MH5 y Biobras-6 para los medios I y II. En cada uno de ellos se observó una curva de crecimiento sigmoide, con las cuatro fases informadas por numerosos autores.

Se observó la influencia del medio en el crecimiento del callo de papa (var. Desirée), presenciando en uno de los casos la existencia solamente de tres fases de su crecimiento (18).

$$y = -1E-06x^4 + 6E-05x^3 - 0.0003x^2 - 4E-05x + 0.0229 \quad R^2 = 0.9937$$

$$y = 7E-07x^4 - 9E-05x^3 + 0.0031x^2 - 0.0173x + 0.0325 \quad R^2 = 0.9918$$

$$y = 7E-07x^4 - 8E-05x^3 + 0.0027x^2 - 0.015x + 0.0311 \quad R^2 = 0.992$$

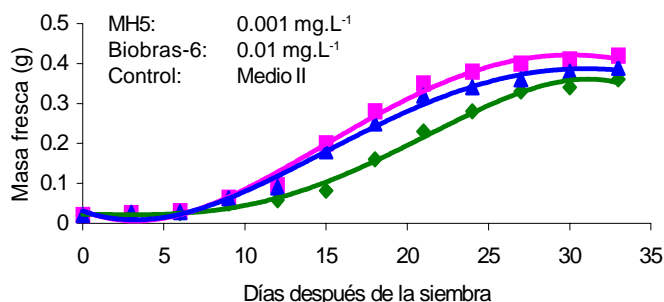


Figura 9. Dinámica de crecimiento de los callos con el empleo de los biorreguladores como sustitutos de la kinetina en Medio II

En café, se señaló un comportamiento típicamente sigmoide en la curva de crecimiento, al estudiar la calogénesis de *C. canephora* (var. Robusta) (19) y al emplear el análogo MH5 (20).

Los resultados obtenidos demuestran el efecto favorecedor de los análogos de brasinoesteroides MH5 y Biobras-6 en la formación de callos de mejor calidad embriogénica, al ser empleados como sustitutos de la kinetina a las concentraciones de 0.1 mg.L⁻¹ de MH5 y 0.01 mg.L⁻¹ de Biobras-6 para el medio I y 0.001 mg.L⁻¹ de MH5 y 0.01 mg.L⁻¹ de Biobras-6 para el medio II.

REFERENCIAS

- Sasse, J. M. Brassinole-induced gation and auxin. *Physiol. Plant.*, 1990, vol. 80, p. 401-408.
- Sasse, J. M. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plant.*, 1997, vol. 100, p. 696-701.
- Núñez, Miriam y Robaina, Caridad M. Brasinoesteroides. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas para la agricultura. IAC. Campinas. 2000, 83 p.
- Núñez, Miriam. Los brasinoesteroides y su actividad biológica. La Habana. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 1998, 61 p.
- Thomas, S. C. CURVEFIT. Programa informativo para el ajuste de curvas. Versión 2. 10. T. 1987.
- Urrea, A. Estudio de parámetros para la selección *in vitro* en la mejora de resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont). De Bary en papa (*Solanum tuberosum*, L.) var. Diacol Capiro. Tesis de Maestría. 1999, 68 p.
- Moré, Olivia; Hernández, María M.; García, Diana y Núñez, Miriam. Efecto del DDA-6 sobre la calogénesis y formación de estructuras embrioidales en papa (*Solanum tuberosum*, L.). En: Seminario Científico (10: 1996: La Habana), INCA.
- Moré, Olivia; Hernández, María M.; García, Diana y Núñez, Miriam. Efecto del análogo de brasinoesteroides MH5 en el proceso de calogénesis en papa (*Solanum tuberosum*, L.). Ponencia XII Fórum Ciencia y Técnica. UNAH. 1997.

9. García, Diana. Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en café (*Coffea canephora*, Pierre). Tesis de Maestría. Biología, Universidad de La Habana. 1998, 74 p.
10. García, D. Acción del análogo de brasinoesteroides MH5 y la kinetina en la formación de biomasa en callos de *Coffea canephora* Var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 3, p. 39-45.
11. Hernández, M. 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.
12. Prede, M. L. Morfología *in vitro* en variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa*, C.): evidencia histológica y efecto biorregulador de fitohormonas tradicionales y análogos de brasinoesteroides. Tesis de Maestría. Biología. Universidad de La Habana. 1999, 104 p.
13. Cao, H. y Chen, S. Brassinosteroid induced rice lamina joint inclination and its relation to indole-3acetic acid and ethylene. *Plant Growth Regul.*, 1995, vol. 16, p. 189-196.
14. Sakurai, A.; Fujioka, S. y Saimoto, H. Production of brassinosteroids in plant-cell cultures. En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications. Washington: *American. Chem. Society*. 1991.
15. Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N. y Groot, A. E. Brassinosteroids. A new class of plant hormones. London. *Academic Press*. 1999.
16. Bellicampi, D. y Morpurgo, G. Stimulation of growth induced by brassinosteroid and conditioning factors in plant-cell cultures. En: Brassinosteroids. Chemistry. Bioactivity and Applications. Washington. Am. Chem. Soc. 1991.
17. Gaudinová, A. *et al.*. Different effects of two brassinosteroids on growth auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. *Plant Growth Regul.*, 1995, vol. 17, p. 121-126.
18. Hidrobo, J. R. Estudios morfológicos, histológicos y bioquímicos de callos embriogénicos en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*, L.). Tesis de Maestría. Biología. Universidad de La Habana. 2000, 127 p.
19. Zapata, B. Estudio morfohistológico y bioquímico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* var. Robusta. Trabajo de Diploma. UNAH. 1994, 48 p.
20. García, Diana; Torres, W.; Cuba, Marely y Núñez, Miriam. Crecimiento de callos de *Coffea canephora* var. Robusta por efecto del análogo de brasinoesteroides MH5. En: Seminario Científico (11: 1998: La Habana). INCA. La Habana. 1998b, p. 127.

Recibido: 23 de abril del 2001

Aceptado: 24 de octubre del 2001

MAESTRÍAS

Precio: 5 000 USD

• *Mejoramiento genético de las plantas*

Coordinador: Dra.C. María E. González Hernández

Duración: 2 años

Fecha de comienzo: febrero/2002



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