

ACCIÓN DEL ANÁLOGO DE BRASINOESTEROIDES MH₅ Y LA KINETINA EN LA FORMACIÓN DE BIOMASA EN CALLOS DE *Coffea canephora* VAR. ROBUSTA

Diana García

ABSTRACT. With the objective of knowing the action of MH₅ brassinosteroid analog and different concentrations of kinetina on the fresh and dry matter production in callus of *Coffea canephora* var. Robusta formed from foliar explants, a study was carried out in which different combinations of treatments and times of exposure were evaluated. Thus, the concentrations of 2, 1, 0.5 and 0.2 mg.L⁻¹ kinetina and 0.1, 0.05 and 0.01 mg.L⁻¹ MH₅ were used. Data were analyzed by simple classification ANOVA and also factorially. On the other hand, the proportions of mass increase were calculated for the different treatments and their respective variances. The results showed that the former treatments with the smallest concentrations of kinetina allow to obtain the maximum values for both dry and fresh matters, when the calluses are placed in media with the presence of the smallest concentrations of MH₅; in the same way, the behavior of proportions of increase was determined by the hormonal balance. Also, there was a decrease in the value of estimated variances in those treatments with the brassinosteroid analog.

Key words: brassinosteroid analog, kinetina, callus, biomass, *Coffea canephora*

RESUMEN. Con el objetivo de conocer la acción del análogo de brasinoesteroides MH₅ y diferentes concentraciones de kinetina en la formación de masas fresca y seca de callos de *Coffea canephora* var. Robusta formados a partir de explantes foliares, se llevó a cabo un estudio en el que se probaron diferentes combinaciones de tratamientos y tiempos; para ello fueron utilizadas las concentraciones de 2, 1, 0.5 y 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina y 0.1, 0.05 y 0.01 mg.L⁻¹ de MH₅. A los datos obtenidos se les realizaron análisis de varianza de clasificación simple y también con método factorial. Por otra parte, fueron calculadas las proporciones de incremento entre los diferentes tratamientos y las varianzas de cada uno de ellos. Los resultados mostraron que tratamientos precedentes con las menores concentraciones de kinetina permiten obtener los máximos valores, tanto de masa fresca como seca, cuando los callos son colocados en medios con la presencia de las menores concentraciones de MH₅, así como que el comportamiento de las proporciones de incremento estuvo determinado por los balances hormonales. También se encontró una disminución en el valor de las varianzas estimadas en los tratamientos en los que estaba presente el análogo de brasinoesteroides.

Palabras clave: análogo de brasinoesteroides, kinetina, callo, biomasa, *Coffea canephora*

INTRODUCCIÓN

Los brasinoesteroides constituyen un grupo de compuestos naturales con probada actividad en el crecimiento vegetal y en la actualidad son reconocidos como fitohormonas con mecanismos de acción diferentes a los de las hormonas clásicas. Los análogos de estos esteroides, sintetizados en Cuba, resultan muy efectivos y presentan bajos costos de producción, lo que favorece su uso en múltiples estudios *in vitro* (1, 2, 3, 4).

Estos compuestos no han sido capaces de promover, por sí solos, la formación de callo en diferentes cultivos, entre ellos *C. canephora* var. Robusta (5, 6, 7); lo que ha quedado bien establecido es que pueden promover la elongación celular en un amplio rango de especies vegetales, afirmandose que un sistema intacto de brasinoesteroides es un requerimiento absoluto para tal fin (8).

Se ha confirmado, también en *C. canephora*, que al combinarse el análogo MH₅ con 2,4-D, en presencia o no de kinetina, se observa un favorecimiento en el balance hormonal para la formación de masa fresca en el callo (9). Para protoplastos aislados de *Petunia*, en condiciones no óptimas de auxina, tanto 10 como 100 nM de Brasinólida aceleran las primeras divisiones celulares (12 horas de cultivo), siendo muy elevado el incremento en la frecuencia de división celular de las 72 a las 120 horas de cultivo, hecho que no se verifica cuando se trabaja en condiciones óptimas de auxinas y citoquininas (10). Trabajando con hipocotilos de diferentes cultivares de algodón, encontraron que 0.01 ppm de Brasinólida promovió solamente la diferenciación celular (11), cuando esta concentración se combinó con 0.5 ppm de AIA se promovió la embriogénesis y cuando fue con 0.5 ppm de 2,4-D se formó callo en todos los cultivares estudiados lográndose, al remover este, la formación de callo embriogénico y embriones.

Ms.C. Diana García, Investigador Agregado del departamento de Genética y Mejoramiento, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Por otra parte, algunos autores (12) demostraron que la Epibrasinólida 55 es capaz, en células radicales de cebada en condiciones de estrés salino, de estimular la actividad mitótica y el proceso de crecimiento inhibido por esta condición. No obstante, el papel que juegan los brasinoesteroides en la división celular no está bien dilucidado, pues parece ser necesaria la presencia de otros reguladores del crecimiento para combinar su actividad en este proceso.

A partir de estos resultados, el objetivo del presente trabajo fue determinar la acción del análogo de brasinoesteroides MH₅ en la formación de masas fresca y seca, una vez que el callo de *Coffea canephora* var. Robusta ha sido formado y desarrollado en un medio con diferentes concentraciones de kinetina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de los callos, se utilizaron explantes foliares de *Coffea canephora* var. Robusta, siguiendo la metodología propuesta para la selección y desinfección del material vegetal (13). Los medios de cultivo estuvieron conformados por los nutrientes minerales componentes del medio de Murashige y Skoog (14), complementados con tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, cisteína e inositol, así como por 0.5 mg.L⁻¹ (2.26 μm) de 2,4-D como regulador del crecimiento auxínico; como fuente de carbono se utilizó sacarosa y como agente solidificante Gelrite, ajustándose el pH a 5.8. Las condiciones de cultivo fueron: oscuridad y temperatura de 25±2°C y las siembras fueron realizadas en frascos con capacidad de 200 mL con 25 mL de medio de cultivo. En la Tabla I aparece la descripción de los tratamientos aplicados, según los reguladores del crecimiento presentes en los medios de cultivo y el tiempo en cada uno de estos. Tres repeticiones de las masas fresca (evaluación al momento de separar el callo del medio de cultivo) y seca (evaluación después de ser sometido el callo a la temperatura de ± 60°C por espacio de 24 horas), fueron evaluadas a los 90 ó 120 días, según el esquema de cultivo. El experimento quedó diseñado como un modelo de Bloques al Azar y clasificación simple para m₃ y, además, con método factorial (cuatro concentraciones de kinetina y tres concentraciones de MH₅) en los casos de m₁ y m₂. Para docimar las respuestas entre tratamientos, se realizaron los respectivos análisis de varianzas y las diferencias entre las medias se determinaron según la prueba de rango múltiple de Duncan.

Por otra parte, se calcularon las proporciones de incremento (Tabla II), tanto de la masa fresca como de la seca entre los valores medio de las variantes tratadas con MH₅ (m₂t₂), respecto a los del m₁t₁ que contenían solamente las diferentes concentraciones de kinetina (A), así como entre los tratamientos que volvieron al medio con 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina (m₃t₃) en relación con el medio inicial, también con 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina (B) y a los medios con igual concentración de kinetina y las diferentes concentraciones de brasinoesteroides (C).

Tabla I. Tratamientos (T) en estudio

Tiempos	T	medios de cultivo (reguladores del crecimiento)					
		m ₁ kinetina		m ₂ MH ₅ *		m ₃ kinetina	
		mg.L ⁻¹	μM	mg.L ⁻¹	μM	mg.L ⁻¹	μM
t ₁	1	2	9.29	-	-	-	-
	2	1	4.65	-	-	-	-
	3	0.5	2.32	-	-	-	-
t ₂	4	0.2	0.93	-	-	-	-
	5	2	9.29	0.10	216.5	-	-
	6	2	9.29	0.05	108.2	-	-
	7	2	9.29	0.01	21.6	-	-
	8	1	4.65	0.1	216.5	-	-
	9	1	4.65	0.05	108.2	-	-
	10	1	4.65	0.01	21.6	-	-
	11	0.5	2.32	0.1	216.5	-	-
	12	0.5	2.32	0.05	108.2	-	-
	13	0.5	2.32	0.01	21.6	-	-
t ₃	14	0.2	0.93	0.10	216.5	-	-
	15	0.2	0.93	0.05	108.2	-	-
	16	0.2	0.93	0.01	21.6	-	-
	17	0.2	0.93	0.10	216.5	0.2	0.93
	18	0.2	0.93	0.05	108.2	0.2	0.93
	19	0.2	0.93	0.01	21.6	0.2	0.93

t₁: 90 días en m₁ (subcultivado a los 60 días)

t₂: 60 días en m₁+30 días en m₂

t₃: 60 días en m₁+30 días en m₂+30 días en m₃

*Sintetizado en el Lab. Prod. Nat. Fac. Química Univ. de La Habana

Tabla II. Cálculo de las proporciones

	P	C á l c u l o
A	P ₁	$\bar{t}_{5(m2)} / \bar{t}_{1(m1)}$
	P ₂	$\bar{t}_{6(m2)} / \bar{t}_{1(m1)}$
	P ₃	$\bar{t}_{7(m2)} / \bar{t}_{1(m1)}$
	P ₄	$\bar{t}_{8(m2)} / \bar{t}_{2(m1)}$
	P ₅	$\bar{t}_{9(m2)} / \bar{t}_{2(m1)}$
	P ₆	$\bar{t}_{10(m2)} / \bar{t}_{2(m1)}$
	P ₇	$\bar{t}_{11(m2)} / \bar{t}_{3(m1)}$
	P ₈	$\bar{t}_{12(m2)} / \bar{t}_{3(m1)}$
	P ₉	$\bar{t}_{13(m2)} / \bar{t}_{3(m1)}$
	P ₁₀	$\bar{t}_{14(M2)} / \bar{t}_{4(M1)}$
	P ₁₁	$\bar{t}_{15(m2)} / \bar{t}_{4(m1)}$
	P ₁₂	$\bar{t}_{16(m2)} / \bar{t}_{4(m1)}$
B	P ₁₃	$\bar{t}_{17(m3)} / \bar{t}_{4(m1)}$
	P ₁₄	$\bar{t}_{18(m3)} / \bar{t}_{4(m1)}$
	P ₁₅	$\bar{t}_{19(m3)} / \bar{t}_{4(m1)}$
C	P ₁₆	$\bar{t}_{17(m3)} / \bar{t}_{14(m2)}$
	P ₁₇	$\bar{t}_{18(m3)} / \bar{t}_{15(m2)}$
	P ₁₈	$\bar{t}_{19(m3)} / \bar{t}_{16(m2)}$

P: Proporciones

m: Medio de cultivo

A, B y C: Combinaciones de tratamientos

t: media del tratamiento (Tabla I)

Se realizó la estimación de las varianzas (s²) de cada tratamiento y según la distribución:

$$\frac{S^2 \text{ mayor}}{S^2 \text{ menor}} \cap \rightarrow F(n-2, n-2 \text{ GL}) \quad (15)$$

y se calculó el valor de F, dividiendo siempre la s^2 de mayor valor entre la de menor. Para este análisis de las varianzas, los tratamientos del m_2t_2 fueron comparados, según la concentración de kinetina de la que provenían, con los del m_1t_1 ; y los del m_3t_3 , que solo contenía 0.2 mg.L^{-1} de kinetina, con su correspondiente del m_1t_1 . De esta misma forma, fueron comparados los tratamientos del m_2t_2 y del m_3t_3 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los callos obtenidos por efecto de los diferentes tratamientos empleados, pudiendo observarse, desde el punto de vista cualitativo, que son muy similares, estando dadas sus diferencias solamente en la talla.

La Tabla III presenta los resultados de las diferencias estadísticas entre tratamientos, tanto para la masa fresca como para la masa seca en los medios y tiempos m_1t_1 y m_2t_2 . Como puede observarse para la masa fresca, las variantes que no se desarrollaron en un medio con MH_5 , independientemente de la concentración de kinetina, no presentaron diferencias significativas entre ellas y sí con el resto de las combinaciones, resultando los tratamientos que menos masa alcanzaron. La concentración de 0.05 mg.L^{-1} de MH_5 con 1 mg.L^{-1} de kinetina presentó el máximo valor, difiriendo del resto; pero nótese que, en general, las combinaciones donde estaban presentes las concentraciones de 0.05 y 0.01 mg.L^{-1} de MH_5 presentaron los mejores resultados.

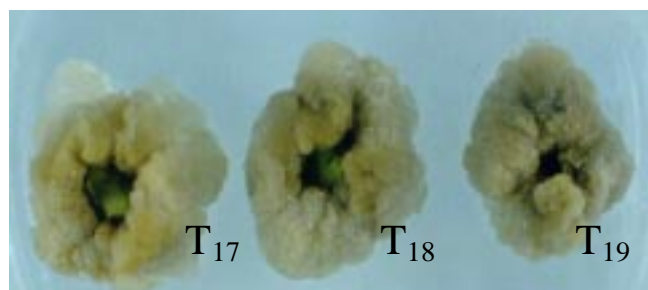
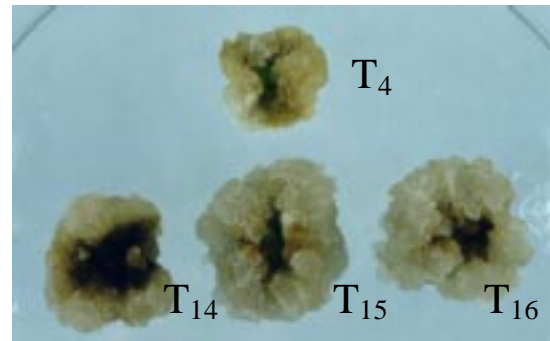
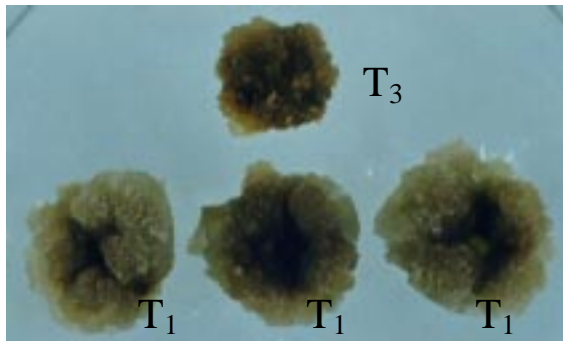
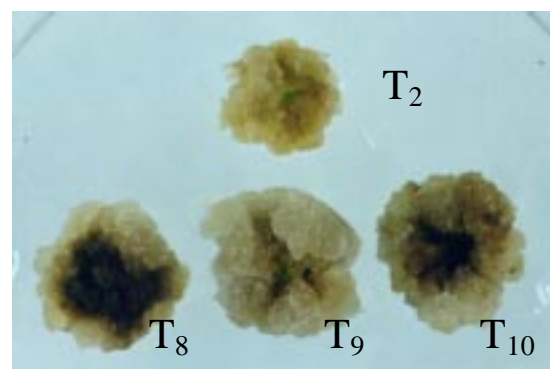
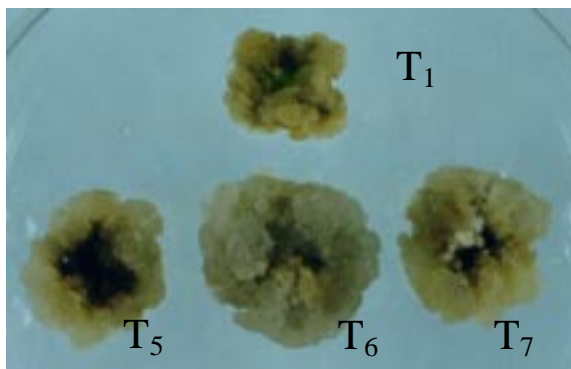


Figura 1. Callos obtenidos en los diferentes medios de cultivo en estudio

Tabla III. Diferencias estadísticas entre las combinaciones de concentraciones de MH₅ y kinetina en los medios y tiempos m₁t₁ y m₂t₂

MH ₅ (mg.L ⁻¹)	Masa fresca Kinetina (mg.L ⁻¹)				Masa seca Kinetina (mg.L ⁻¹)			
	2	1	0.5	0.2	2	1	0.5	0.2
0.1	6.01 ef	5.33 gh	5.64 fg	4.94 h	0.19 ef	0.17 fg	0.16 gh	0.15 hi
0.05	6.09 def	8.49 a	6.52 cde	7.21 b	0.17 g	0.19 e	0.22 bc	0.27 a
0.01	7.51 b	6.59 cd	5.40 gh	7.06 bc	0.21 cd	0.20 de	0.22 bc	0.19 ef
0	3.04 i	2.86 i	3.08 i	3.32 i	0.11 j	0.12 j	0.15 hi	0.15 hi
ES x				0.17***				0.005**

Para el caso de la masa seca, se encontró que el tratamiento sin brasinoesteroides estuvo favorecido significativamente para las concentraciones de 0.5 y 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina, y que éstas a su vez no presentaron diferencias con las combinaciones que contenían 0.1 mg.L⁻¹ de MH₅. La mejor variante resultó la de 0.05 mg.L⁻¹ de MH₅ con 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina, siguiendo en orden de formación de masa seca las concentraciones de 0.05 y 0.01 mg.L⁻¹ de brasinoesteroides con 0.5 mg.L⁻¹ de kinetina. Al analizar el medio 3 (Tabla IV), en el que solamente se valora la concentración de 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina, se encontraron diferencias significativas, tanto para una como para otra masa, entre las diferentes concentraciones de MH₅, siendo en ambos casos la de 0.05 mg.L⁻¹ la de mejor respuesta.

Tabla IV. Diferencias estadísticas entre las combinaciones de concentraciones de MH₅ y 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina en el medio y tiempo m₃t₃

MH ₅ (mg.L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
0.1	8.77 c	0.41 c
0.05	13.40 a	0.65 a
0.01	12.42 b	0.50 b
ES _x	0.23**	0.03**

Evidentemente, las variaciones en los niveles de kinetina no resultaron un factor determinante para la formación de masa fresca, mientras que los tratamientos posteriores, donde estuvo presente el análogo MH₅, provocaron un aumento notable en este indicador. Estos valores de masa fresca no se habían alcanzado en investigaciones anteriores (16, 17), donde el análogo fue utilizado como complemento de auxina y citoquinina o como sustituto de esta última, en tiempos de cultivo similares.

Se conoce que los brasinoesteroides cambian el metabolismo citoquinínico, pudiendo provocar acumulaciones endógenas de estas hormonas y, a su vez, también son capaces de incrementar los niveles de auxina que provocan un decremento en los niveles de citoquininas o su degradación (18, 19, 20, 21), todo lo cual puede manifestarse, al disminuir la actividad citoquinínica, en una disminución en la formación de masa fresca.

Este efecto va unido tanto a los niveles de auxina y de citoquininas como a los de brasinoesteroides, y son los responsables de llevar a cabo un balance hormonal adecuado o no y explicaría el por qué, en trabajos anteriores (16), concentraciones superiores a 0,01 mg.L⁻¹ de MH₅ o de otro análogo, DAA-6, con 0.5 mg.L⁻¹ de 2,4-D no brindaron respuestas positivas.

Que el análogo de brasinoesteroides MH₅ sea capaz de provocar un aumento tan marcado en masa fresca, después de que el callo fue sometido a un tratamiento con 2,4-D y kinetina, pudiera ser explicado de igual forma, es decir, se crea un balance endógeno válido, determinado por las concentraciones de kinetina, para ser favorecido posteriormente en presencia del MH₅ que por sí sólo no es capaz de desencadenar el proceso.

Para la masa seca ocurre algo similar, aunque por ser este un indicador de crecimiento más preciso, pues excluye el contenido de agua en el material, delimita mucho mejor las combinaciones de tratamientos de mejor respuesta y como las evaluaciones se realizaron en el mismo momento del crecimiento del callo no existe posibilidad de introducir errores. Queda claro que los tratamientos que contenían los menores niveles de kinetina resultaron los precedentes más adecuados para un balance hormonal posterior con los menores niveles de MH₅.

Cuando se analizan solamente los precedentes de 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina y los medios con las diferentes concentraciones de brasinoesteroides sobre el medio m₃t₃, se evidencia en el extraordinario aumento en biomasa de los callos, que los tratamientos previos favorecieron en gran medida el proceso. Comparando con resultados obtenidos anteriormente, para el mismo tiempo de cultivo pero con concentraciones mayores de kinetina y el MH₅ utilizado como complemento hormonal (9), se observa que existe aproximadamente cuatro veces más formación de masa en los callos en este caso, lo que pone de manifiesto la eficiencia de esta forma de cultivo. Pudiera decirse que el MH₅ reestructura los niveles hormonales endógenos, de tal forma que al realizarse aplicaciones hormonales nuevamente, sin su presencia, el resultado es superior.

Hasta el momento se ha discutido sobre el efecto del análogo MH₅ en la formación de masas fresca y seca, ¿implica esto variaciones en la multiplicación celular?. Como ya se ha dicho, la masa fresca puede ser fluctuante atendiendo al contenido de agua en el material anali-

zado y el incremento en masa seca puede estar relacionado con cambios cualitativos del crecimiento. Además, en organismos multicelulares la división y la expansión celular pueden ser eventos independientes (22), por lo que no sería conveniente confundir uno y otro procesos.

En la Figura 2 se exponen, tanto para la masa fresca como para la seca, las proporciones de incremento entre los valores medio de las variantes del m_{2,t_2} , que contenían las diferentes concentraciones de brasinoesteroides provenientes de ser cultivadas por 60 días en m_1 y las variantes del m_{1,t_1} correspondientes en concentración de kinetina.

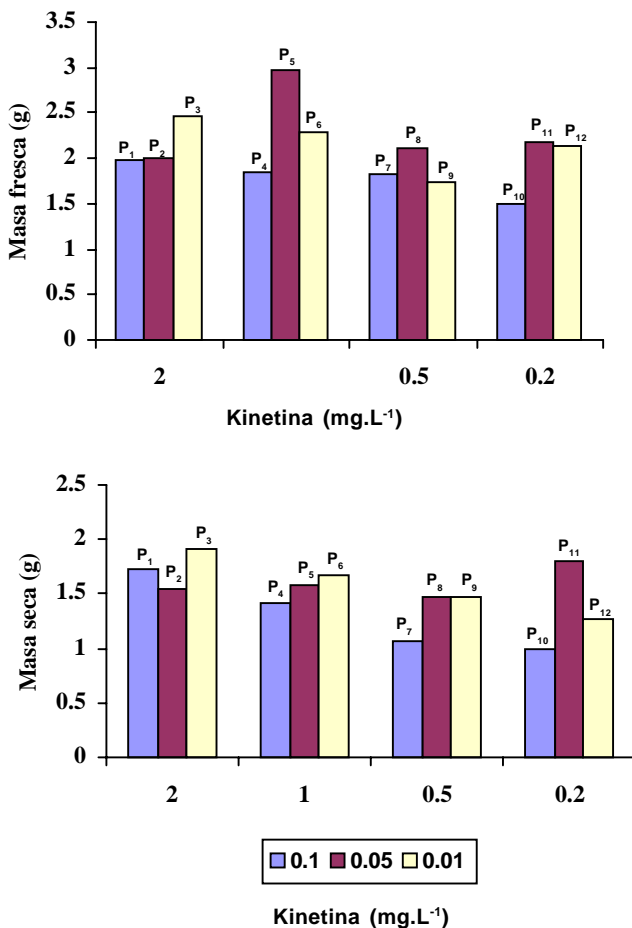


Figura 2. Proporción de incremento entre los valores medio de las masas fresca y seca de las variantes con MH_5 (m_{2,t_2}) y los tratamientos con las diferentes concentraciones de kinetina (m_{1,t_1})

A la concentración de 0.1 mg.L⁻¹ de MH_5 , se observa, para la masa fresca, que con un decremento en la concentración de kinetina aparece también un discreto decremento en el valor de las proporciones, mientras que para la masa seca este decremento es más evidente, fundamentalmente en el rango de 2-0.5 mg.L⁻¹ de kinetina. En presencia de 0.05 mg.L⁻¹, la masa fresca aumenta notablemente hacia la concentración de 1 mg.L⁻¹ de kinetina (casi tres veces), cayendo posteriormente. Para la masa seca aparece un ligero aumento hacia un 1 mg.L⁻¹ de

kinetina para volver a caer y encontrar su máximo valor en 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina. Cuando se valora la concentración de 0.01 mg.L⁻¹ de MH_5 , se observa un decrecimiento en masa fresca hasta 0.5 para volver a aumentar en 0.2 mg.L⁻¹ a niveles similares a los anteriores; en el caso de la masa seca se observa un decrecimiento con la disminución de la concentración de kinetina.

En general, las proporciones de incremento de la masa fresca fueron superiores a las de la masa seca, con la coincidencia de que, independientemente de la concentración de kinetina, las máximas proporciones de incremento se encontraron siempre con las concentraciones de 0.05 y 0.01 mg.L⁻¹ de MH_5 .

A partir de este resultado, queda claro lo que se había referido anteriormente, que las respuestas estuvieron definidas por las combinaciones de concentraciones de los reguladores del crecimiento, lo que implica que las combinaciones que provocaron mayor producción de biomasa no necesariamente coinciden con los de mayor proporción de incremento, pues los balances adecuados pueden verificarse a diferentes niveles de interacción hormonal.

En la Figura 3 aparecen las proporciones de incremento correspondientes a la concentración de 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina con las tres concentraciones de MH_5 .

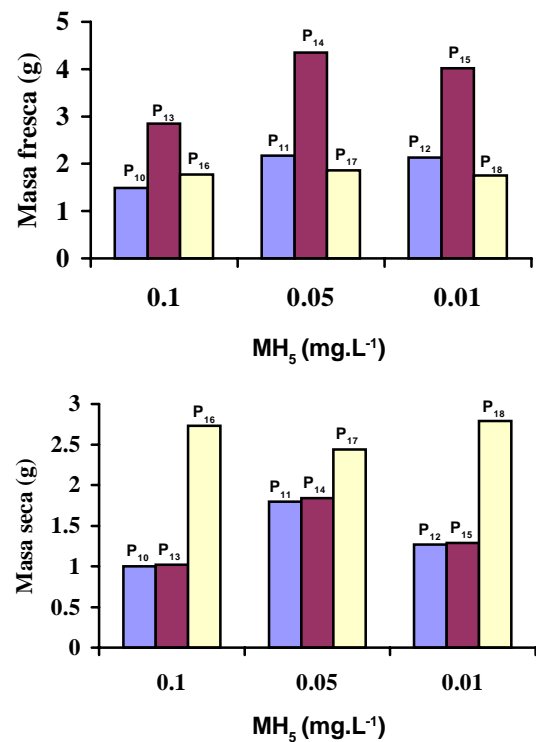


Figura 3. Proporciones de incremento entre los valores medio de las masas fresca y seca de los tratamientos con MH_5 (m_{2,t_2}) y el tratamiento con 0.2 mg.L⁻¹ de kinetina (m_{1,t_1} y m_{3,t_3}), así como entre los tratamientos de m_{3,t_3} y m_{1,t_1}

Como se observa para la masa fresca en las tres concentraciones de brasinoesteroides, la mayor proporción de incremento se encontró entre m_3t_3 y m_1t_1 (P_{13} , P_{14} y P_{15}); es decir, que apareció un aumento notable de masa fresca (aproximadamente entre tres a cinco veces), cuando los callos fueron transferidos de los medios con MH_5 al medio inicial por espacio de un mes adicional, siendo más notable para el precedente de 0.05 y 0.01 $mg.L^{-1}$ de este producto. Debe señalarse que, en general, se provocaron proporciones de incremento alrededor de dos veces las iniciales para el resto de las combinaciones.

Para la masa seca, con incrementos más discretos que la fresca, se encontró el máximo valor para la relación entre m_3t_3 y m_2t_2 (P_{16} , P_{17} y P_{18}), en las tres concentraciones de brasinoesteroides, notándose un comportamiento muy homogéneo para el resto de las variantes dentro de las concentraciones de MH_5 . Debe destacarse que los tratamientos que durante las evaluaciones estuvieron tratados con 0.05 $mg.L^{-1}$ del producto observaron, en conjunto, el mejor resultado.

En este caso la respuesta se definió por la concentración de MH_5 y el tiempo en el medio de cultivo (m_1 y m_2 90 días y m_3 120 días), pero nótese que para la masa fresca, a las concentraciones de 0.05 y 0.01 $mg.L^{-1}$ de MH_5 , las proporciones de incremento entre los medios 2 y 1 (P_{11} y P_{12}) resultaron superiores a los de los medios 3 y 2 (P_{12} y P_{18}), mientras que para la masa seca, en las tres concentraciones del análogo, no se diferenciaron las proporciones de incremento entre los medios 2 y 1 (P_{10} , P_{11} y P_{12}) y entre los medios 3 y 1 (P_{13} , P_{14} y P_{15}). Este resultado parece sugerir que la permanencia en el medio de cultivo no fue tan decisiva para las proporciones de incremento como los tratamientos precedentes con el análogo MH_5 .

En la Tabla V se presentan los cálculos de las varianzas y la estimación de F. Como se observa para la masa fresca, las varianzas de los tratamientos que contenían brasinoesteroides (m_2t_2) siempre son menores que su correspondiente sin el producto (m_1t_1), llegando a alcanzarse valores significativos de F en la mayoría de

los casos ($F_{m_1-m_2}$). Cuando los tratamientos que contenían el análogo vuelven al medio sin este (m_3t_3), los valores de varianza aumentan nuevamente y con diferencias significativas con m_2t_2 ($F_{m_2-m_3}$). Entre los medios m_1 y m_3 no se observan diferencias significativas ($F_{m_1-m_3}$). La masa seca presenta un comportamiento similar, aunque aparecen mayor número de combinaciones con valores significativos para F y en la mayoría de los casos estas se verifican al 1 % de probabilidad.

El análisis de estos resultados permite inferir que el análogo de brasinoesteroides MH_5 es capaz de minimizar la variabilidad inherente al cultivo *in vitro* en la formación de biomasa de callos; no obstante, es solo una primera aproximación a esta problemática, pues es necesario realizar estudios de tamaño de muestra que permitan realizar la estimación sin sesgo.

REFERENCIAS

1. 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, no. 8, p. 980-983.
2. Li, J., et al. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science*, 1996, vol. 272, p. 398-401.
3. Yokota, T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.*, 1997, vol. 2, no. 4, p. 137-143.
4. Núñez, M. Los brasinoesteroides y su actividad. San José: Inst. Nac. Ciencias Agrícolas, 1998.
5. Sala, C. y Sala, F. Effect of brassinosteroids on cell division in cultured carrot (*Daucus carota L.*). *Plant Cell Rep.*, 1985, vol. 4, p. 144-147.
6. Bellicampi, D. y Morpugo, G. Stimulation of growth in *Daucus carota L.* cell cultures by brassinosteroids. *Plant Sci.*, 1988, vol. 54, p. 153-156.
7. García, D., et al. Efecto cualitativo de análogos de brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la callogénesis de café (*Coffea canephora var. Robusta*). *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 2, p. 44-46.

Tabla V. Varianzas (s^2) y significación de F en los tratamientos (T) en estudio

T	m_1t_1 s^2		T	m_2t_2 s^2		$F_{m_1-m_2}$		T	m_3t_3 s^2		$F_{m_1-m_3}$		$F_{m_2-m_3}$	
	MF	MS		MF	MS	MF	MS		MF	MS	MF	MS	MF	MS
1	0.42	0.003	5	0.001	0.00003	**	**							
			6	0.04	0.002	NS	NS							
			7	0.14	0.0001	NS	*							
2	0.18	0.009	8	0.001	0.00003	**	**							
			9	0.004	0.00002	*	**							
			10	0.12	0.00005	NS	**							
3	0.17	0.002	11	0.13	0.0003	NS	NS							
			12	0.12	0.0003	NS	NS							
			13	0.007	0.00003	*	*							
4	0.15	0.003	14	0.004	0.00002	*	**	17	0.07	0.007	NS	NS	NS	**
			15	0.0002	0.00003	*	**	18	0.36	0.008	NS	NS	**	**
			16	0.0005	0.00003	*	**	19	0.28	0.009	NS	NS	*	**

MS: masa seca (g)

MF: masa fresca (g)

8. Azpiroz, R., *et al.* An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell*, 1998, vol. 10, no. 2, p. 219-230.
9. García, D., *et al.* Análisis del crecimiento de callos de *Coffea canephora* var Robusta en presencia del análogo de brasinoesteroides MH₅. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 3, p. 55-60.
10. Oh, M. H. y Clouse, S. D. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia* híbrida. *Plant Cell Rep.*, 1998, vol. 17, no. 12, p. 921-924.
11. Wang, W., Zhang, X. L. y Liu, J. L. Effect of brassinolide on somatic embryogenesis of *Gassypium hirsutum*. *Plant Physiology Communication*, 1992, vol. 28, no. 1, p. 15-18.
12. Khurstaleva, L. I., *et al.* Effect of Epibrassinolide 55 on mitotic activity and the frequency of chromosome aberrations in barley root tip cells under salt stress. *Sel' Skokhozyaistvennaya-Biologiya*, 1995, vol. 5, p. 69-73.
13. Santana, N. Embriogénesis somática en el cultivo del café (Coffea sp.). [Tesis de Doctorado]; ISCAH, 1993.
14. 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.
15. Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1969.
16. García, D. Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en café (Coffea canephora Pierre). [Tesis de Maestría]. La Habana : Universidad de La Habana, Facultad de Biología, 1998.
17. García, D., *et al.* New growth regulator for tissue cultures. Synthetic Brassinosteroid analogs. *Agricell Rep.* 1998, vol. 31, no. 1, p. 2-3.
18. Gaudinová, A., *et al.* Different effects of two brassinosteroids with auxin and cytokinin contents in tobacco callus tissue. *J. Plant Growth Regul.*, 1995, vol. 17, p. 121-126.
19. Vanková, R., *et al.* Effect of synthetic cytokinins on levels of endogenous cytokinins and respiration patterns of *Beta vulgaris* cells in suspension. *J. Plant Growth Regul.* 1991, vol. 10, p. 197-199.
20. Mc Gaw, B. A., *et al.* Mass-spectrometric quantitation of cytokinins induced in tobacco crown-gall tumors induced by mutated octopin Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta*, 1988, vol. 176, p. 230-234.
21. Palmi, L. M. S., Burch, L. y Hogart, R. The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta*, 1986, vol. 174, p. 231-243.
22. Taiz, L. y Zeiger, E. Plant physiology. Pub. Co. Inc., Redwood City, 1998.

Recibido: 26 de octubre de 1999

Aceptado: 24 de marzo del 2000

**CURSO DE VERANO
2000**

**Producción y manejo de biofertilizantes
en condiciones del trópico**

Coordinador: Dr.C. Nicolás Medina Basso
Fecha: 9 al 13 de agosto
Duración: 30 horas
Matrícula 200 USD



Para más información diríjase a:

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700
Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773
Fax: (53)(64) 6-3867
e-mail: posgrado@inca.edu.cu