

# Efecto de análogos de brasinoesteroides en callos de caña de azúcar sometidos a estrés abiótico.

Sergio González Suárez\*, Miladys Gómez Ferrán\* y Danahe Coll García\*\*

\* Facultad de Biología, Universidad de La Habana

\*\*Facultad de Química, Universidad de La Habana

## RESUMEN

Los brasinoesteroides constituyen un nuevo grupo de reguladores del crecimiento vegetal que tienen un marcado efecto sobre la recuperación de las plantas bajo diferentes tipos de estrés. Se emplearon callos de caña de azúcar que fueron sometidos a estrés abiótico con manitol 20%, PEG-1500 20% y ClNa 50 m molar. Las soluciones se prepararon en medio MS de regeneración y los callos se colocaron en placas, sobre papel de filtro embebido en las soluciones, durante 7 días, en condiciones estériles. Al cabo de este tiempo se pasaron al medio sólido MS con 24-epibrasinólido y los análogos de brasinoesteroides Biobras-6 y Biobras-16. Se detectó una respuesta positiva sobre el crecimiento del callo y la regeneración de brotes a partir de los callos estresados y cultivados posteriormente con los brasinoesteroides. Se obtiene una respuesta diferencial entre el producto utilizado para provocar el estrés y el brasinoesteroide utilizado en su recuperación.

**Palabras clave:** Brasinoesteroides, caña de azúcar, organogénesis, estrés hídrico, estrés salino

## ABSTRACT

Brassinosteroids are a new group of plant growth regulators which have a special effect on plant recuperation after different stress conditions. Sugarcane callus were stressed with mannitol 20%, PEG-1500 20% and NaCl 50 m molar solutions prepared on MS liquid media for plantlet regeneration. Callus were treated in petri dishes on filter paper embedded in different solutions, during 7 days, in sterile conditions. After that, callus were transferred to solid MS media supplemented with 24-epibrassinolide and the synthetic brassinosteroid analogues Biobras-6 and Biobras-16. A positive response on callus growth and plantlet regeneration was detected. A differential response between stress substance and the brassinosteroid used for recuperation is obtained.

**Key word:** Brassinosteroids, sugarcane, organogenesis, water stress, saline stress

## INTRODUCCIÓN

En las plantas se han identificado muchos compuestos esteroidales, pero solo una clase de esteroides, los brasinoesteroides (BRs), tiene una amplia distribución a través del reino vegetal y tiene una actividad promotora del crecimiento, cuando se aplican de forma exógena (Yokota y Takahashi, 1985; Mandava, 1988; Yokota, 1997; Clouse y Sasse, 1998; Li y Chory, 1999).

Numerosos estudios fisiológicos han demostrado que los BRs pueden inducir un amplio espectro de respuestas a nivel celular como el alargamiento de los tallos, el crecimiento del tubo polínico, la inhibición del crecimiento de la raíz, la inducción de la biosíntesis del etileno, la activación de la bomba de protones, la diferenciación del xilema y la regulación de la expresión génica (Mandava 1988; Clouse y Sasse, 1998; Altman, 1998; Koncz, 1998). Además, se han encontrado aplicaciones útiles en la agricultura en el incremento de los rendimientos en algunos cultivos y en el mejoramiento de la resistencia a diferentes condiciones de estrés en varias plantas cultivadas de interés económico (Cutler *et al.*, 1991; He *et al.*, 1991; Kulaeva *et al.*, 1991).

En numerosos trabajos se ha empleado el 24-epibrasinólido para estudiar la relación entre BRs y el

estrés. En arroz, el 24-epibrasinólido provocó una reducción en los electrolitos durante tratamientos fríos a una temperatura entre 1-5°C, redujo el contenido de malonilaldehído y provocó una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa, mientras que los niveles de ATP e inicialmente de prolina aumentaron (Wang y Zeng, 1993). El incremento de la resistencia fue atribuido al efecto de los BRs sobre la estabilidad de la membrana y la osmoregulación.

En arroz tratado con BRs, se ha confirmado el mejoramiento con respecto a la tolerancia salina (Takematsu *et al.*, 1986; Takeuchi, 1992) y un efecto protector en la ultraestructura de la hoja de cebada después de estar sometidas a una solución de cloruro de sodio 500mM (Kulaeva *et al.*, 1991). Un efecto promotor del 24-epibrasinólido 10 mM fue detectado tanto en la velocidad como en el porcentaje de germinación de semillas de *Eucalyptus camaldulensis* en condiciones salinas con cloruro de sodio 150 mM (Sasse *et al.*, 1995).

También se ha descrito que el 24-epibrasinólido aumenta la resistencia tanto a condiciones de bajas como a altas temperaturas; cambios en el espectro de heat-shock-proteins (HSP) después de la aplicación de BRs también han sido detectadas en trigo sometido a estrés térmico

(calor) (Kulaeva *et al.*, 1991).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado el efecto fisiológico de diferentes análogos de brasinoesteroides sobre el desarrollo *in vitro* de tejidos de caña de azúcar, naranjo agrio, soya, vicaria y tabaco, donde se ha demostrado su efecto como promotor del crecimiento y desarrollo de la planta (Diosdado, 1997; González y Gainza, 1997; González *et al.*, 1998). En un estudio preliminar sometiendo callos de caña de azúcar a diferentes condiciones de estrés hídrico con manitol y polietilenglicol-1500 se detectó que un análogo de BRs, el Biobras-6, tenía un efecto positivo en la recuperación de los callos ante el estrés y en la organogénesis (González y Gainza, 1997).

En este trabajo se evalúa comparativamente el efecto de dos análogos de BRs y del 24 epibrasinólido sobre la organogénesis de callos de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico y salino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**-Material vegetal.** Se emplearon callos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L. var Cuba-87-51) cultivados *in vitro* sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con AIA 1.0mg/L y kinetina 1.0mg/L (Heinz *et al.*, 1977) (MS2 medio de regeneración).

**-Estrés hídrico y salino.** El estrés salino se provocó con manitol 20% y PEG-1500 20% (González y Gainza, 1997). El estrés salino se provocó sometiendo los callos a una solución de NaCl 50mM.

Para someter los callos a estrés, se colocan 5 mL de las soluciones (preparadas en medio MS2) en placas de petri con papel de filtro (estériles) donde permanecen durante siete días (González y Gainza, 1997). Se empleó el medio MS2 como control.

## Tratamientos con Brasinoesteroides

Al cabo de los siete días los callos sometidos a estrés son cultivados en medio MS2 a los que se le añadieron los distintos análogos sintéticos de BRs Biobras-6, Biobras-16 y el 24-epibrasinólido, todos a una concentración de 0.1 mg/L (Fig. 1). En total se evaluaron 16 combinaciones o tratamientos (estrés-brasinoesteroide) y 14 réplicas de cada uno. Los callos fueron cultivados en estos medios y colocados en el cuarto de cultivo con luz permanente y a una temperatura de  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ .

A los 30 días se evaluó, mediante escala de rangos:

A)Crecimiento del callo:

- (1) – nulo 5mmØ
- (2) – poco 6-10mmØ

(3) – medio 11-15mmØ

(4) – mucho >15mmØ

B)Número de brotes:

- (1) – nulo, no regeneración
- (2) – 1-5
- (3) – 6-10
- (4) – >10

C)Tamaño promedio de los brotes:

- (1) – no crecimiento
- (2) – < 5mm
- (3) – 6-10mm
- (4) – 11-15mm
- (5) – 16-20mm
- (6) – > 20mm

## Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante un análisis no paramétrico, la prueba de Kruskal-Wallis y los valores de las sumas de rangos fueron comparados mediante la prueba de Student-Newman-Keuls. Para ello se empleó el programa TONYSTAD (Sigarroa, 1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento del callo.

En la tabla I se presentan los resultados del crecimiento de los callos de caña de azúcar sometidos a distintas combinaciones de estrés-BRs.

Los callos sometidos a estrés hídrico y salino presentan un crecimiento mayor con respecto al callo del tratamiento control, no tratado (AA). Luego el estrés indujo una estimulación del crecimiento de los callos.

Los callos cultivados en medio con Biobras-6 (0.1 mg/L) después de sometidos a estrés, presentan un incremento significativo en su tamaño, con respecto al callo no estresado y cultivado en el mismo medio (bA).

Los callos cultivados en medio con el Biobras-16 presentan un crecimiento diferencial en dependencia al estrés previo al que fueron sometidos; la respuesta de crecimiento es superior en los callos sometidos a estrés con manitol o Na CL, no así con los callos tratados con PEG-1500, cuyo crecimiento es ligeramente inferior.

Los callos cultivados en medios de cultivo con el 24-epibrasinólido después de sometidos a estrés, presentan una afectación negativa si el estrés se provocó con PEG-1500 o Na CL. Sin embargo, la respuesta de los callos sometidos a estrés con manitol fué superior.

Cuando se cultivan los callos sin ser sometidos a estrés, los callos cultivados en medio con los BRs Biobras-16(cA)

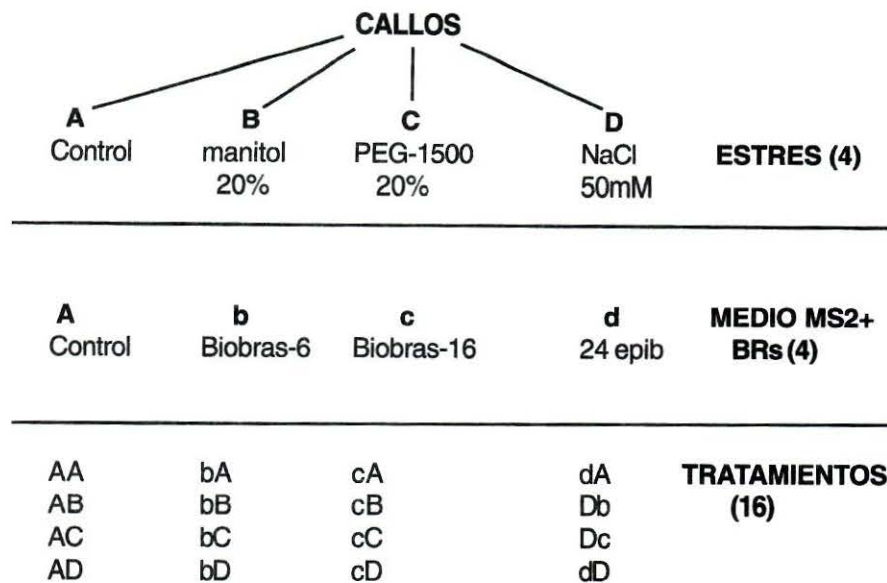


Fig. 1. Esquema de trabajo.

y 24-epibrasinólido (dA) presentan un crecimiento mayor que el medio control (AA), mientras que en los cultivos sobre el medio con Biobras-6 (bA) el crecimiento está afectado negativamente y muy por debajo del control (AA).

Al tratar los callos con manitol, solo se alcanza una recuperación mayor en el crecimiento de los callos, cuando después de estresados se cultivan en un medio con 24-epibrasinólido (dB). Sin embargo, los callos tratados con PEG-1500 y con Na Cl no alcanzan valores mayores al ser cultivados en los medios con BRs en comparación con los callos no tratados (AC y AD ,respectivamente).

### Organogénesis

En la tabla II se presentan los datos de la regeneración de brotes obtenida en los diferentes tratamientos de estrés y medios de cultivo con BRs.

En los callos sometidos a estrés hídrico y salino (tratamientos AB, AC y AD) se obtiene una regeneración de brotes superior que en los callos no tratados (AA) al cultivarlos sobre el medio MS2 sin BRs.

El número de brotes se estimula también cuando los callos son sometidos a estrés y cultivados sobre un medio que contiene Biobras-6 0.1 mg/L., en comparación con los callos no tratados cultivados en ese mismo medio (bA).

El Biobras-16, por el contrario, no produce una estimulación en el crecimiento de los callos sometidos a estrés en comparación con los callos no estresados (cA). Mientras que en los callos estresados con PEG-1500 el crecimiento es menor.

El 24-epibrasinólido en el medio de cultivo estimula una recuperación significativa en el número de brotes en los callos estresados con manitol. Sin embargo, los callos que fueron sometidos a estrés con PEG-1500 y Na Cl no presentan un efecto positivo en su recuperación.

Callos no estresados y cultivados en medios con los BRs presentan diferente respuesta: el Biobras-16 y el 24-epibrasinólido añadido al medio de cultivo estimulan la regeneración de brotes, mientras que en los callos cultivados sobre un medio que contiene Biobras-6 se inhibe.

Los callos sometidos a estrés con manitol, solo se recuperan mejor en cuanto a la regeneración de brotes, si son cultivados posteriormente en un medio con 24-epibrasinólido.

Cuando los callos son estresados con PEG-1500 o Na Cl no se obtiene una respuesta positiva al cultivarlos posteriormente sobre un medio con BRs, al comparar los resultados con sus controles respectivos (AC y AD).

### DISCUSIÓN

En los últimos años los BRs han adquirido gran auge por los efectos fisiológicos que producen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y los estudios moleculares y genéticos para tratar de determinar la vía de señalización o sea como los BRs regulan el desarrollo de la planta (Clouse y Sasse, 1998; Li y Chory, 1999).

Sin embargo, años recientes no se han publicado trabajos que permitan profundizar sobre los otros efectos que tienen los BRs sobre los mecanismos de resistencia a enfermedades y a condiciones ambientales adversas, en el sentido de que pueden estar relacionados con la

TABLA I

Crecimiento del callo. Valores de sumas de rangos. Letras iguales no difieren entre sí (SNK,  $p < 0.001$ )

TRAT.	ESTRES	BRs	Crecimiento del callo
AA	-	-	1389.5 e
AB	manitol	-	2092.5 b
AC	PEG-1500	-	2019.0 b
AD	Na Cl	-	2366.0 a
bA	-	Biobras-6	381.0 h
bB	manitol	+	989.0 f
bC	PEG-1500	+	826.5 g
bD	Na Cl	+	1516.0 d
cA	-	Biobras-16	1629.0 c
cB	manitol	+	1975.0 b
cC	PEG-1500	+	1515.0 d
cD	Na Cl	+	1902.5 b
dA	-	24 epi	2092.5 b
dB	manitol	+	2366.0 a
dC	PEG-1500	+	1369.0 e
dD	Na Cl	+	771.5 g

H: 104.68 \*\*\*  
gl 15

recuperación de las plantas ante un estrés (Yokota y Takahashi, 1985; Mandava 1988; He *et al.*, 1991; Kulaeva *et al.*, 1991).

En un trabajo anterior se ha descrito que al cultivar los callos de caña de azúcar en un medio MS2 sin Kinetina pero con Biobras-6 (0.1 mg/L) después de sometidos a estrés hídrico con varias concentraciones de manitol, el Biobras-6 tiene un efecto positivo sobre la regeneración de brotes (González y Gainza, 1997; González *et al.*, 1998).

Los resultados que aquí se presentan corroboran y amplían los resultados anteriores. Es de destacar como al tratar los callos con un estrés hídrico y salino se incrementa sustancialmente tanto el crecimiento de los callos como la producción de brotes. Por otra parte, el Biobras-6 (0.1 mg/L) también incrementa tanto el crecimiento de los callos como la regeneración de brotes, cuando los callos son sometidos a estrés hídrico o salino. Se evidencia que al añadir el Biobras-6 en presencia de la kinetina (1.0 mg/L) hay una respuesta superior en estos parámetros evaluados.

El Biobras-16 es otro análogo de BRs que ha presentado respuestas biológicas interesantes en distintos cultivos (Jomarrón, 1995; González *et al.*, 1998). Es de destacar como también este compuesto estimula el crecimiento de los callos sometidos a estrés hídrico con manitol o estrés salino con Na Cl, pero no incrementa la regeneración de brotes.

Estos resultados con el Biobras-6 y el Biobras-16, dos

análogos sintéticos de BRs, corroboran lo planteado en la literatura por otros autores y obtenidos con BRs naturales extraídos de plantas. (He *et al.*, 1991; Kulaeva *et al.*, 1991. En tal sentido también son interesantes los resultados que aquí se presentan cuando se cultivan los callos de caña de azúcar en un medio MS2 con el 24-epibrasinólido, donde se obtiene también un incremento en el crecimiento y la regeneración de los callos que fueron tratados con manitol 20%.

Estos resultados obtenidos *in vitro* con tejidos de la caña de azúcar, constituyen un elemento importante en la aplicación futura de los análogos de BRs en caña de azúcar. Este cultivo presenta innumerables problemas por las condiciones de sequía y salinidad de los suelos en nuestro país.

### CONCLUSIONES

1. El estrés hídrico y salino incrementa tanto el desarrollo de los callos como la organogénesis.
2. El Biobras-6 incrementa tanto el crecimiento del callo como la regeneración de brotes, cuando los callos son sometidos a estrés hídrico o salino.
3. El Biobras-16 solo estimula el crecimiento del callo sometido a estrés con manitol o Na Cl pero no incrementa la regeneración de brotes.
4. El 24-epibrasinólido solo incrementa el crecimiento y la regeneración de brotes de los callos sometidos a estrés con manitol.

**TABLA II**

Regeneración de los brotes. Valores de sumas de rangos. Letras iguales no difieren entre sí (SNK,  $p < 0.001$ )

TRAT	ESTRES	BRs	BROTOS
AA	-	-	1477.5 e
AB	manitol	-	1735.0 d
AC	PEG-1500	-	1872.0 c
AD	Na Cl	-	2368.0 a
bA	-	Biobras-6	798.0 i
bB	manitol	+	1137.0 g
bC	PEG-1500	+	1260.5 f
bD	Na Cl	+	1259.0 fcA
cA	-	Biobras-16	1668.0 d
cB	manitol	+	1643.0 d
cC	PEG-1500	+	1476.0 d
cD	Na Cl	+	1710.0 d
dA	-	24-epi	2064.0 b
dB	manitol	+	2404.0 a
dC	PEG-1500	+	1451.0 e
dD	Na Cl	+	876.5 h

### BIBLIOGRAFÍA

Altman T. 1998. Recent advances en brassinosteroid molecular genetics.

Current Opinion in Plant Biology 1:378-383.

Clouse SD and Sasse JM. 1998. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. Ann Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 49:427-51.

Cutler HG, Yokota T and Adam G. Eds 1991. Brassinosteroids Chemistry, Bioactivity and Applications. Amer Chem Soc, Maple Press, York P.A. 358p.

Diosdado E. 1997. Efectos de biorreguladores en el proceso de embriogénesis somática, cultivo y fusión de protoplastos en el Naranja Agrio (*Citrus aurantium* L.). Tesis de PhD en Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana, 100p.

González S y Gainza E. 1997. Efectos fisiológicos del Brasinoesteroides sintético DAA-6 sobre el desarrollo *in vitro* de brotes de caña de azúcar. Revista Biología 11:53-60.

González S, Diosdado E, Rodríguez J, Roman MI, González C, Garbey P, Coll D, Benitez D, Abreu C, Echementia D, Ramírez I, Ferron, Coll F y Cabrera JC. Y CARVAJAL V. 1998. Actividad biológica de nuevos biorreguladores de las plantas. Revista Biología 12:28-34.

He L, Wang G and Wang X 1991. Effects of Brassinolide on Growth and Chilling Resistance of Maize Seedlings. Tomado de Cutler HG *et al*, Ch 19:220-230.

Heinz DJ, Krishnamurti M, Nickell G and Maritzki A. 1977. Cell, Tissue and Organ Culture in Sugarcane Improvement, Ch.1.1 – p 3-17. Tomado de: Reinert J y Y.P.S. Bajaj. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer-Verlag Berlin.

Joamrron I. 1995. Síntesis de espirostatonas y espiroslactonas biológicamente activas. Tesis de Doctorado de Ciencias Química. Cuba, 100 p.

Kulaeva ON, Burkhanova EA, Fedina AB, Khokhlova VA and Bokebayeba GA. 1991. Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions. Tomado de Cutler *et al.* (1991), pp 141-155.

Li J and Chori J. 1999. Brassinosteroid actions in plant. J. Exp. Bot 50, 332:275-282.

Mandava NB. 1988. Plant growth promoting brassinosteroids. Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. 39: 23-52

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phys. Plantarum 15:473-497.

Sasse JM, Smith R, Hudson NI. 1995. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camaldulensis* in saline conditions. Proc. Plant Growth Reg. Soc. Am. 22:136-141.

Sigarroa A. 1985. Biometría y Diseño Experimental. Ed. Pueblo y Educación p.793, La Habana.

Takematsu T, Takeuchi Y y Choi D. 1986. Overcoming effects of brassinosteroids on growth inhibition of rice caused by unfavourable growth conditions. *Shokucho* 20:2-12

Takeuchi Y. 1992. Studies on physiology and applications of brassinosteroids. *Shokubutsu no Kogaku Chosetsu* 27:1-10.

Wang B y Zeng G. 1993. Effect of epibrassinolide on the resistance of rice seedlings to chilling injury. *Zhiwu Shengli Yuebao* 19:53-60.

Yokota T. 1997. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science* 2:137-143.

Yokota T and Takahashi N. 1985. Chemistry, physiology and agricultural application of brassinolide and related steroids. Tomado de: *Plant Growth Substances*, 1985 ed M.Bopp. p 129-138; Springer-Verlag, Berlin.

**Recibido:** 18 de enero del 2001.

**Direcc. de los autores:** \*Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e l Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba. \*\* Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Química, Universidad de La Habana, Vedado, Plaza 10400. Ciudad de La Habana, Cuba.