

Acción biorreguladora de los brasinoesteroides DAA-6, DI-31 y ME sobre la callogénesis en variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.).

Miriam L. Prede Rodríguez*, José B. Rodríguez Soria**, Lisbet Rodríguez Machado** y Yenexy Coronado Hernández**

*Instituto de Ecología y Sistemática (IES), CITMA

**Dpto. de Biología Vegetal, Universidad de La Habana

RESUMEN

En la búsqueda de medios de inducción más eficientes, como fase inicial del establecimiento del cultivo *in vitro* en arroz, se evaluó el efecto de los análogos de brasinoesteroides DAA-6, ME y DI-31 sobre la callogénesis. Semillas maduras de las variedades Jucarito 104 (J-104) y Pokkali (Pok), previamente descascaradas y desinfectadas, fueron sometidas a cuatro combinaciones fundamentales de medios de cultivo, a partir de las sales de Murashige y Skoog, 1962 (MS) y diferentes conjugaciones en el suplemento hormonal de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) 2,0 mg/L, Kinetina (KIN) 1,0 mg/L y los análogos de brasinoesteroides (BRs) correspondientes 10^{-5} mg/L, para un total de 13 tratamientos. La mejor respuesta de inducción luego de un mes de cultivo, en ambas variedades, se obtuvo con la combinación: MS + 2,4-D 2,0 mg/L + BRs 10^{-5} mg/L para los tres brasinoesteroides probados. Se corroboró la adición de 2,4-D 2,0 mg/L como requerimiento esencial en la inducción de callos. El brasinoesteroide DAA-6 10^{-5} mg/L constituye un sustituto efectivo de la KIN 1,0 mg/L en la callogénesis de la gramínea en estudio, para ambas variedades, mientras que el ME 10^{-5} mg/L sólo muestra tal efecto restringido a la variedad J-104.

Palabras clave: *Oryza sativa* L., callogénesis, brasinoesteroides, DAA-6, DI-31, ME

ABSTRACT

The effect of brassinosteroids analogous DAA-6, DI-31 and ME was evaluated looking for more efficient callus induction media, as an initial phase to rice *in vitro* culture establishment on mature seeds of Jucarito 104 (J-104) and Pokkali (Pok) rice commercial varieties. Seeds were dehusked and disinfected before culturing in 4 culture media. Media were combinations of Murashige and Skoog salts, 1962 (MS), hormonal supplement of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2,0 mg/L, Kinetin (KIN) 1,0 mg/L and the corresponding brassinosteroids analogous (BRs), at 10^{-5} mg/L, finally, thirteen treatments of media were tested for both varieties. The better induction response was obtained after one month of culture, with combination: MS + 2,4-D 2,0 mg/L + BRs 10^{-5} mg/L for all brassinosteroids tested. The addition of 2,4-D is corroborated as an essential requirement on callus induction. Brassinosteroids DAA-6 was an effective substitute of KIN 1,0 mg/L when used at a concentration of 10^{-5} mg/L for both varieties, whereas ME had such effect only for J-104.

Key words: *Oryza sativa* L., callogenesis, brassinosteroids, DAA-6, DI-31, ME

INTRODUCCIÓN

La callogénesis es uno de los eventos morfogénicos en condiciones *in vitro* que revela el carácter totipotente de la célula vegetal. Debido al valor potencial de los callos como material de partida en la aplicación de variadas técnicas del cultivo de tejidos, proponer aquellas combinaciones de medios favorables para inducir la desdiferenciación celular en determinados explantes, constituye una fase esencial para lograr la iniciación o el establecimiento del cultivo, de una especie en particular.

En opinión de Adkins *et al.* (1993), la rápida producción de callos sanos como primer paso, es de vital importancia, en la formación de tejidos embriogénicos requeridos para el mejoramiento del arroz.

A los brasinoesteroides se les atribuye una amplia gama de actividad biológica, entre la que se ha demostrado su aporte en la división y alargamiento celular (Mandava, 1988) y en la formación de callos (García *et al.*, 1997; Echemendía *et al.*, 1998). Este trabajo evalúa el efecto de los análogos DAA-6, DI-31 y ME en la inducción de

callogénesis a partir de semillas de variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas maduras de arroz, de las variedades Jucarito 104 (J-104) y Pokkali (Pok), correspondientes a la subespecie *indica*, obtenidas del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA). Una vez descascaradas fueron sometidas a un proceso de doble desinfección mediante Hipoclorito de Sodio (Lejía comercial) 2,5% mezclado con Tween 80 0,2 % (15 minutos) y Bicloruro de Mercurio 0,1 % (15 minutos) y lavadas luego de cada inmersión, de tres a cuatro veces con agua destilada estéril.

Se colocaron de forma individual en tubos de ensayo conteniendo 15 mL de las combinaciones de medio de cultivo descritas en la tabla I, para un total de 10 réplicas por tratamiento. Se añadió sacarosa en forma de azúcar refino comercial 30 g/L y agar (Agar-Agar, SIGMA) 9 g/L. Se ajustó el pH de los medios a 5,7 y se esterizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Luego de una semana se procedió a la escisión de coleóptilos y radículas, reinoculando las semillas en sus respectivos tubos y manteniéndolas en condiciones de oscuridad, a la temperatura de (25 ± 2) °C hasta el término de un mes, momento en el cual se evaluaron los parámetros: formación del callo, longitud máxima de expansión celular (cm), coloración y textura.

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante una prueba de Kruskal-Wallis y los tratamientos comparados por medio de la prueba de Student - Newman - Keuls (SNK) según el paquete estadístico TONYSTAT (Sigarrosa, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla II se observa que ambas variedades difieren entre sí en su comportamiento, superando Pok a J-104, no sólo por responder de forma positiva en el mayor número de los tratamientos, sino también por alcanzar los valores de frecuencias de inducción más elevados, que oscilaron entre el 60-90 %. Diferencia explicable desde el punto de vista genotípico, si tenemos en cuenta el criterio de que, incluso dentro del tipo *indica*, existen diferencias significativas entre genotipos, relacionadas con el cultivo *in vitro* (Seraj *et al.*, 1997).

Tanto J-104 como Pok pertenecen a la subespecie *indica*, a la cual se atribuye una inducción de callos de pobre respuesta o crecimiento (Abe y Futsuhara, 1986; Lynch *et al.*, 1991) con relación a las variedades de la subespecie *japonica*.

No obstante, un reciente estudio de la variabilidad isoenzimática del germoplasma cubano (Álvarez *et al.*, 1997), aporta elementos que pudieran justificar la respuesta diferencial entre variedades obtenida. De acuerdo con sus resultados, Pok integró un grupo bien definido que reunió a las variedades altas de la subespecie *indica*, en el que guardó estrecha relación a su vez, con una variedad incluida en el grupo V de la clasificación de Glaszmann (Glaszmann, 1987), grupo

bastante cercano a la subespecie *japonica*; quedando por tanto separado, con un valor de distancia genética apreciable, del resto de las variedades semienanas de la subespecie *indica*, las cuales integra J-104.

En general los callos obtenidos fueron compactos, de aspecto nodular, dimensiones entre 0,3-0,5 cm y con coloraciones que variaban desde el blanco al amarillo, de acuerdo con lo planteado por Vasil y Vasil (1993).

Sin embargo, todas las respuestas resultantes no fueron positivas. Tal como se aprecia en la tabla II, la adición de los análogos en ausencia de la auxina 2,4-D (tratamientos: i-3; i-5; i-7; i-9; i-11; i-13) produjo un marcado efecto inhibitorio, manifiesto tanto a través de los valores de frecuencia de inducción como de aquellos deducidos de la comparación entre las respectivas sumas de rangos.

Dicho comportamiento es contrario al planteado en otras experiencias relacionadas con la callogénesis, en diversas especies, en las que han sido aplicados los análogos DAA-6 y DI-31. El DAA-6, por ejemplo, se ha propuesto como estimulante del crecimiento de callos en soya (*Glycine max* (L.) Merr.) (Echemendía *et al.*, 1998), a las concentraciones de 10⁻⁵ y 10⁻⁶ mg/L y en café (*Coffea arabica* L.) (García *et al.*, 1996) a la de 10⁻³ mg/L, además de favorecer el desarrollo de células meristemáticas y estructuras embrioidales en papa (*Solanum tuberosum* L.), a la concentración de 0,25 mg/L (Moré *et al.*, 1996); mientras que el DI-31 aumentó también el crecimiento de callos en soya c.v. *William* a concentraciones de 10⁻⁴ y 10⁻⁶ mg/L (Echemendía, 1996).

En Pok, el tratamiento i-4 de la serie del DAA-6 no presentó diferencias significativas con respecto al control, ofreciendo los mejores valores, mientras que el i-12 y el i-8 correspondientes al ME y al DI-31 respectivamente, presentaron efectos inhibitorios sobre el parámetro evaluado, difiriendo entre sí. Para la variedad J-104, tanto

TABLA I
Tratamientos de medios de cultivo para la inducción de callos.

Tratamientos			Medio basal: MS (Murashige y Skoog, 1962)		
			2,4-D 2,0 mg/L	KIN 1,0 mg/L	BRs 10 ⁻⁵ mg/L
i-1 (control)			+	+	-
DAA-6	DI-31	ME			
i-2	i-6	i-10	+	+	+
i-3	i-7	i-11	-	+	+
i-4	i-8	i-12	+	-	+
i-5	i-9	i-13	-	-	+

el DAA-6 como el ME, en las mismas combinaciones de medios de cultivo antes mencionados, mostraron similar comportamiento al control, sin diferencias significativas entre ellos, por lo que pueden ser empleados indistintamente con igual probabilidad de éxito; el DI-31 mantuvo su efecto inhibitorio. La diferencia intervarietal es obvia, teniendo en cuenta la especificidad de la respuesta de acuerdo con la interacción genotipo-biorregulador. En este sentido, más de un autor coincide en resaltar el significado de dicha interacción, entre el genotipo, el medio de cultivo y los reguladores del crecimiento (Ravi DS y Minocha, 1993; Ravi HB y Minocha, 1993).

Se destaca como aspecto interesante, que las mejores frecuencias de inducción para cada brasinoesteroide en las dos variedades, se obtuvieron en aquellos tratamientos donde la KIN 1,0 mg/L se sustituyó por el análogo correspondiente 10^{-5} mg/L en presencia del 2,4-D 2,0 mg/L (i-4; i-8 e i-12), aún cuando alguno resultara inhibitorio, superando incluso a la combinación más suplementada, compuesta por ambas fitohormonas y el brasinoesteroide (i-2; i-6 e i-10). El anterior comportamiento, unido al efecto nulo mostrado en las variantes de medio sin la auxina 2,4 -D, nos condujo a relacionar la acción de estos análogos de brasinoesteroides con una función biorreguladora similar a la de las citoquininas durante la callogénesis.

Todo parece indicar que la sumatoria de las concentraciones de cada uno de los brasinoesteroides

con la KIN, acentuó el incremento en la proporción citoquininas/auxinas, limitante para desencadenar la desdiferenciación y por ende desfavorable para la formación del callo, por lo que la inducción quedó reducida a niveles significativamente inferiores o, en la condición más crítica, al carecer de suplemento auxínico (i-3; i-7; i-11), se inhibió. La adición del brasinoesteroide sólo al medio (i-5; i-9 e i-13), tampoco indujo la formación de callo, tal como se atribuye en sentido general a las fitohormonas de tipo citoquinina en la mayoría de las especies de plantas.

Una vez más queda demostrado el papel fundamental de la auxina 2,4 -D en la iniciación y proliferación de callos (Caldas *et al.*, 1990; Lynch *et al.*, 1991; Dodds y Roberts, 1995). Específicamente en arroz, se declara la concentración de 2,0 mg/L utilizada, como la óptima para lograr la mejor inducción (Ravi DS y Minocha, 1993; Ravi HB y Minocha, 1993).

En cuanto a la factibilidad demostrada por los análogos de brasinoesteroides, de reemplazar el efecto fisiológico de otras fitohormonas, Urteaga (1996), en vicaria (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), reporta al brasinoesteroide DAA-6 10^{-1} mg/L como sustituto efectivo del ácido naftalenacético (ANA) 4,5 mg/L, en la estimulación del crecimiento del callo, efecto opuesto al encontrado por nosotros para el propio análogo y el ME, los cuales a una concentración cinco veces menor (10^{-5} mg/L), provocaron también una elevada efectividad para inducir callos, pero como sustitutos de la citoquinina KIN 1,0 mg/L; resultado equivalente con el obtenido por

TABLA II

Comportamiento de la inducción de callos en J-104 y Pok frente a los análogos de brasinoesteroides DAA-6, DI-31 y ME 10^{-5} mg/L.

		Tratamiento	Var. J-104		Var. Pok	
			Frec.	Suma de rangos	Frec.	Suma de rangos
CONTROL		i-1	50 %	860 a	90 %	1025 a
ANÁLOGOS	DAA-6	i-2	30%	730 c	30%	635 f
		i-3	0	535 e	0	440 g
		i-4	50%	860 a	90%	1025 a
		i-5	0	535 e	0	440 g
	DI-31	i-6	0	535 e	40%	440 g
		i-7	0	535 e	0	440 g
		i-8	20%	665 d	60%	830 c
		i-9	0	535 e	0	440 g
	ME	i-10	40%	795 b	50%	765 d
		i-11	0	535 e	0	440 g
		i-12	50%	860 a	70%	895 b
		i-13	0	535 e	0	440 g

García *et al.* (1997) en la callogénesis de café (*Coffea canephora* var. *robusta*) al aplicar DAA-6 y MH-5 a 10^{-2} mg/L.

En correspondencia con los resultados obtenidos sería recomendable extender a otras variedades de arroz, la aplicación y evaluación de los análogos DAA-6 y ME en sustitución de fitohormonas de tipo citoquinina con vistas a generalizar para este cultivo, protocolos de callogénesis más eficientes y económicos.

Atendiendo a las respuestas positivas de frecuencias de inducción de callos generadas en ambas variedades (Tabla II), se identificó al DAA-6 como el análogo más favorable, seguido en orden decreciente por el ME y el DI-31.

Este último brasinoesteroide, en ambas variedades y para cualquiera de las combinaciones en las que fue aplicado, no sólo condujo a una respuesta inhibitoria, con los niveles más bajos de frecuencias de inducción en aquellos tratamientos donde se formaron callos, sino que en el caso de la combinación donde interactuó con las otras fitohormonas (i-6), se alejó de la respuesta ofrecida por las combinaciones homólogas, asumiendo un comportamiento similar a los tratamientos carentes de la auxina 2,4-D (i-7 e i-9) (Tabla II); de tal efecto pudiera entonces inferirse, que quizás, de los tres análogos empleados, corresponde al DI-31 la función citoquinina más potente.

BIBLIOGRAFÍA

Abe T and Futsuhara Y. 1986. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 3-10.

Adkins SW, Kuanuvatchaidach R, Gray SJ and Adkins AL. 1993. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. *Journal of Experimental Botany* 44(269): 1829-1835.

Álvarez A, Fuentes JL, Gutiérrez L and Deus JE. 1997. Isoenzymatic variability in Cuban rice Germplasm Core. Proceedings to VI Workshop on Radiation and Isotopes in Agriculture; III Workshop on Applied Physics in Agriculture and I Symposium on nuclear and related techniques in Agriculture, Industry, Health and Environment, La Habana, 4 p.

Caldas LS, Haridasan P y Ferreira ME. 1990. Meios nutritivos. En: Torres AC, Caldas LS. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ: 37-70.

Dodds JH and Roberts LW. Media composition and

preparation. En: Dodds JH, Roberts LW. *Experiments in plant tissue culture*. Third Edition. Cambridge. University Press. 1995: 42-66.

Echemendía D, Tans M, Rodríguez JB, Román MI, Xiqués X, Coll F y Hechevarría M. 1998. Efecto de 4 brasinoesteroides sintéticos sobre callos de *Glycine max* (L.) Merr. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología de las Plantas: 474-475.

Echemendía D. 1996. Optimización del cultivo *in vitro* y evaluación de brasinoesteroides sintéticos en callos de *Glycine max* (L.) Merr. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 43 p.

García D, Marrero MT, Núñez M y Santana N. 1996. Efecto del DAA-6 sobre la formación y calidad del callo en café. Libro de Resúmenes X Seminario Científico INCA: 157.

García D, Marrero MT, Cuba M y Núñez M. 1997. Efecto cualitativo de análogos de brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la callogénesis de café (*Coffea canephora* var. *robusta*). *Cultiv. Trop.* 18(2): 44-46.

Glaszmann JC. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 74: 21-30.

Lynch PT, Finch RP, Davey MR and Cocking EC. 1991. Rice tissue culture and its application. En: Khush GS, Toenniessen GH. *Rice Biotechnology*. Oxford. Alden Press Ltd.: 135-155.

Mandava NB. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52.

Moré O, Hernández MM, García D y Núñez M. 1996. Efecto del DAA-6 sobre la callogénesis y formación de estructuras embrioidales en papa. Libro de Resúmenes X Seminario Científico INCA: 162.

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Ravi DS and Minocha JL. 1993. Efficiency of different explants and media for callus induction and plant regeneration in Basmati rice. *Crop Improv.* 20(2): 139-142.

Ravi HB and Minocha JL. 1993. Genotypic response for callusing and regeneration in indica rice (*Oryza sativa*

Seraj ZI, Islam Z., Faruque MO, Devi T and Ahmed S. 1997. Identification of the regeneration potential of embryo derived calluses from various indica rice varieties. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 9-13.

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

Urteaga C. 1996. Establecimiento y caracterización de suspensiones celulares de *Cataranthus roseus* (L.) G. Don. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 51 pp.

Vasil IK and Vasil V. 1993. Embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of cereals. En: Lindsey K. *Plant tissue culture. Manual. Supplement 3*. Kluwer Publishers: 1-16.

Recibido: 12 de noviembre de 1998.

Direcc. de los autores : *Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Carretera de Varona Km 3 1/2, Capdevila, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. ** Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 y J, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.