

Efecto del análogo de brasinoesteroide DAA-6 sobre la respuesta *in vitro* de plantas en variedades de arroz (*Oryza sativa*)

Miriam L. Prede Rodríguez*, José B. Rodríguez Soria**, María Isabel Román***, Lisbet Rodríguez Machado** y Yenexi Coronado Hernández**

* Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA

** Departamento de Biología Vegetal, Universidad de La Habana

*** Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT

RESUMEN

La actividad biorreguladora del DAA-6, en condiciones *in vitro*, ha sido demostrada en diversas especies vegetales. El presente trabajo evalúa el efecto de dicho análogo de brasinoesteroide (BR) sobre la morfogénesis, en las variedades de arroz (*Oryza sativa*) Jucarito-104 (J-104), Pokkali (Pok) e IACuba-23 (IAC-23). Se emplearon callos R₀ obtenidos a partir de semillas maduras, en dos combinaciones de medios de inducción. Se probaron tres tratamientos de medios de regeneración, compuestos por las sales de Murashige & Skoog (MS), DAA-6 10⁻⁵ mg/L sólo, o combinado con Kinetina (KIN) 1.0 mg/L. Se realizaron electroforesis sobre gel de poliacrilamida (PAGE) para los sistemas Esterasas (Est) (E.C. 3.1.1) y Peroxidasas (Px) (1.11.1.7) a muestras de hojas de plantas regeneradas *in vitro* y germinadas *in vivo*. El análogo acentuó la acción citoquinínica sobre la rediferenciación caulinar y solo, promovió el desarrollo radical con profusión de raíces laterales. Por otra parte no constituyó una fuente de variabilidad para la expresión isoenzimática, a pesar de que se detectaron alteraciones en el patrón de bandas Px para aquellos regenerantes albinos.

Palabras clave: *Oryza sativa*, regeneración de plantas, análogo de brasinoesteroide, DAA-6, isoenzimas

ABSTRACT

Under *in vitro* conditions, the DAA-6 biorregulating activity has been demonstrated in several vegetable species. Our work evaluates the effect of this brassinosteroid analogue on the morphogenesis in Jucarito-104 (J-104), Pokkali (Pok) e IACuba-23 (IAC-23) rice (*Oryza sativa*) varieties. R₀ calli obtained from mature seeds in two combinations of induction media were employed. Three treatments of regeneration media, using Murashige & Skoog (MS) salts, DAA-6 10⁻⁵ mg/L alone or combined with Kinetin (KIN) 1.0 mg/L, were tested. Polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) for Esterases (Est) (E.C. 3.1.1) and Peroxidases (Px) (1.11.1.7) systems were performed on leaf samples of *in vitro* regenerated and *in vivo* recently germinated plants. The analogue enhanced cytokinin action on caulinar redifferentiation and used alone promoted radical development and profuse lateral root formation. On the other hand, it was not a source of variability for isoenzymatic expression despite the fact that some alterations in the Px band patterns was detected for albin regenerants.

Key words: *Oryza sativa*, plant regeneration, brassinosteroid analogous, DAA-6, isoenzymes

INTRODUCCIÓN

La obtención de plántulas, en la continuidad de las etapas morfogénicas *in vitro*, es la máxima expresión del éxito de los procesos de rediferenciación que tienen lugar a nivel de las células que conforman el callo. La regeneración de plantas fértiles a partir del cultivo de callos, es un prerrequisito para la realización total del potencial biotecnológico en el desarrollo agrícola (Zhu & al., 1996).

Dirigido a elevar la frecuencia de regeneración de plantas, la adición de diferentes biorreguladores al medio de cultivo ha sido uno de los factores más generalizados. A pesar del criterio acerca de que el control fitohormonal es una tecnología clave para el establecimiento de la rediferenciación de callos (Mitsuoka & al., 1994) y de que exista una inclinación mayoritaria hacia las fitohormonas tradicionales (Raghava & Nabors, 1984; Peterson & Smith, 1991; Ella & Zapata, 1991; Zhu & al., 1996; Coll & al., 1996), otros reguladores del crecimiento como extractos naturales (Fatokun & Yamada, 1984),

aminoácidos (Ravi, D. & Minocha, 1993; Wenzhong & al., 1994) y más recientemente los brasinoesteroides, nuevo grupo de hormonas (Mandava, 1988; Arteca, 1995) se han incorporado con expectativas de mejores respuestas.

Vinculado con los estudios de actividad biológica de los brasinoesteroides a nivel de la morfogénesis *in vitro* desarrollados por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, el presente trabajo evaluó el efecto de uno de los análogos de brasinoesteroides cubanos de mayor aplicación en nuestro país: DAA-6, sobre la respuesta de regeneración de plantas en variedades de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material de partida consistió en fragmentos de callos (0.5-1.0 cm) de 30 días (Fase R₀), obtenidos a partir de semillas de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23, de arroz (*Oryza sativa* L.), que se desarrollaron en los

medios de inducción I y II. El medio de inducción I estaba constituido por: MS + Tiamina 1.0 mg/L + Mioinositol 200 mg/L + ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) 2.0 mg/L, mientras que el II, por: MS + Tiamina (normal, 0.1 mg/L) + Mioinositol 100 mg/L + 2,4 D 2.0 mg/L + KIN 1.0 mg/L.

Los fragmentos fueron dispuestos, respetando la procedencia de inducción, en tubos de ensayos con 15 mL de los diferentes tratamientos de medios de regeneración probados. Se ensayaron tres variantes formuladas a partir de las sales basales de MS I, suprimiendo la auxina 2,4 D, adicionando KIN 1.0 mg/L, el análogo de brasinoesteroide (BR) DAA-6 10^{-5} mg/L o una combinación de ambos (Tabla I). Se añadió como fuente de energía 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 esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 min.

TABLA I

Tratamientos de medios de cultivo para la regeneración de plantas.

Tratamientos	Medio basal MS I		
	2,4-D (2.0 mg/L)	KIN (1.0 mg/L)	BR DAA-6 (10^{-5} mg/L)
r_{c1} (control)	-	+	-
r_1	-	-	+
r_2	-	+	+

Cada tratamiento contó entre 4-7 réplicas, permaneciendo bajo condiciones de iluminación con luz fluorescente, blanca, continua de 900 lux y temperatura de 25 ± 2 °C durante 30 días, hasta la aparición y desarrollo de los brotes, a los que se les evaluaron: número, tallas promedio y máxima (cm) y enraizamiento.

Los brotes fueron considerados desde los primordios (aproximadamente 0.3 cm) hasta las plantas bien definidas, mientras que la evaluación de la variable enraizamiento, fue realizada a nivel de la población de raíces, o sea, teniendo en cuenta la biomasa radical por tubo de ensayo.

El análisis isoenzimático se realizó a partir de hojas de plántulas de arroz, de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23, obtenidas en condiciones de cultivo *in vivo* e *in vitro*.

Las muestras quedaron constituídas al homogeneizar, por separado, el total de hojas verdes y albinas, por cada tratamiento de medio y condiciones de cultivo. Dicho material se obtuvo a partir de plantas germinadas *in vivo*, con 9 días de crecimiento sobre un sustrato compuesto por zeolita pulverizada y materia orgánica (humus corriente) (1:1) y de aquellas regeneradas *in vitro*,

procedentes de los tres tratamientos de regeneración luego de 37 días de cultivo.

Los extractos se prepararon al macerar 0.08 g para las plantas albinas y 0.48 g para las verdes, del material vegetal con el auxilio de un mortero y la adición de 25 gotas de solución de sacarosa (20 %). Posteriormente dichos extractos fueron filtrados a través de una tela de gasa, envasados en tubos Eppendorf y mantenidos a temperaturas de -4 °C hasta su aplicación.

Las corridas electroforéticas se realizaron sobre gel de poliácridamida (PAGE) de 8.5 % de separación y sistema de buffers discontinuos según Ornstein (1964) y Davis (1964) en un aparato de corrida en lámina vertical según Raymond (1964) con modificaciones (Chapel & al., 1974). El buffer de corrida fue Tris-glicina 0.04 M a pH 8.3.

Para distinguir la banda de Kohlraush se agregaron 10 ml de una solución de Bromofenol azul (1 %) al buffer de cada compartimento. La intensidad de corriente empleada fue de 50 mA durante 12 horas. Las movilidades electroforéticas se midieron en centímetros (cm) tomando como origen o punto cero el comienzo del gel de separación.

La caracterización de los sistemas se realizó de acuerdo con las técnicas de tinción y conservación descritas por Iglesias & al. (1974) para Peroxidasas, y por González & González (1981) en el caso de las Esterasas.

La interpretación genética de los zimogramas se efectuó a través de un análisis cualitativo, basado en la presencia o ausencia de bandas, y uno cuantitativo a partir de la determinación de las variables: total de loci, total de bandas o alelos y porcentaje de loci polimórficos; mientras que para la interpretación estadística de los resultados experimentales de la regeneración, se aplicó un ANOVA factorial y en caso de existir diferencias significativas, se efectuó la comparación múltiple de medias a través de la prueba de Duncan. En la evaluación del enraizamiento se construyeron tablas de contingencia R x C y se aplicó la prueba G. Todo el procesamiento se realizó según el paquete estadístico TONYSTAT (Sigarroa, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del DAA-6 sobre la regeneración.

En el transcurso de un mes, los eventos morfogenéticos inducidos, condujeron a una regeneración positiva de brotes y de plántulas. De un total de 96 fragmentos de callos dispuestos inicialmente en el Experimento, regeneraron 55, para una eficiencia del 57.3 %, afectada en sentido negativo por la respuesta nula manifiesta en los callos de la variedad J-104 iniciados en medio I (Tabla II), pero que

superó el 20 % alcanzado por Ravi & Minocha (1993), contrario al criterio de pobre potencial de regeneración referido por Rance & al. (1994) para la subespecie *indica*.

Al evaluar la frecuencia de regeneración de los callos y los valores totales netos de producción de plantas en ambos medios de procedencia (Tabla II), se aprecia una tendencia al incremento de la respuesta regenerativa en los callos procedentes del medio de inducción II con relación al I. Lo cual pudiera estar relacionado con el tiempo de permanencia en los diferentes medios. Para los fragmentos de callos procedentes de la variante I, el período de cultivo en el mismo medio se extendió por dos meses, teniendo en cuenta las etapas de iniciación de los callos y su rediferenciación. Sin embargo, el material originado en el tratamiento II, un MS (Murashige & Skoog, 1962) sin modificaciones, es dispuesto, por primera vez a un medio más enriquecido.

La tiamina, única vitamina esencial para todas las plantas cultivadas *in vitro* (Dodds & Roberts, 1995) puede, en forma de tiamina-pirofosfato, participar como cofactor principal en reacciones críticas de respiración aerobia, fotosíntesis y biosíntesis de algunos aminoácidos (Caldas & al., 1990). Esto unido a la capacidad del inositol de formar conjugados con las auxinas (Caldas & al., 1990; Dodds & Roberts, 1995), además de otras funciones especiales en las que interviene, pudieron acelerar la rediferenciación y provocar una regeneración diferencial, con un aumento en la producción de brotes y plantas en el material más favorecido nutricionalmente.

Otro aspecto a valorar es el contenido de hormonas de uno y otro medio inductor. El I sólo contenía 2,4-D 2.0 mg/L mientras que el II poseía además 1.0 mg/L de KIN y en este sentido se ha verificado que la adición de

citoquininas al medio de iniciación de callos a partir de semillas de arroz, aumenta la posterior regeneración de plantas (Ravi & Minocha, 1993), pero que aquellos callos inducidos con 2,4-D sólo, al transferirse a medio de regeneración, en arroz *indica*, producen una pobre respuesta regenerativa (Wenzhong & al., 1994).

Los callos de la variedad Pokkali mostraron los valores de frecuencia de regeneración más elevados, mientras que en cuanto al total de plantas regeneradas, el mayor número se obtuvo en la combinación r_2 (Fig. 1.), que además favoreció el proceso de rediferenciación en la totalidad del material vegetal. El tratamiento r_1 , por su parte promovió la menor formación de brotes y plantas (Fig. 2.).

Tomando en cuenta aquellos callos que regeneraron, el promedio de brotes por callo osciló entre 0.60 y 15.50 (Tabla III), rango de marcada amplitud, pero indicador de

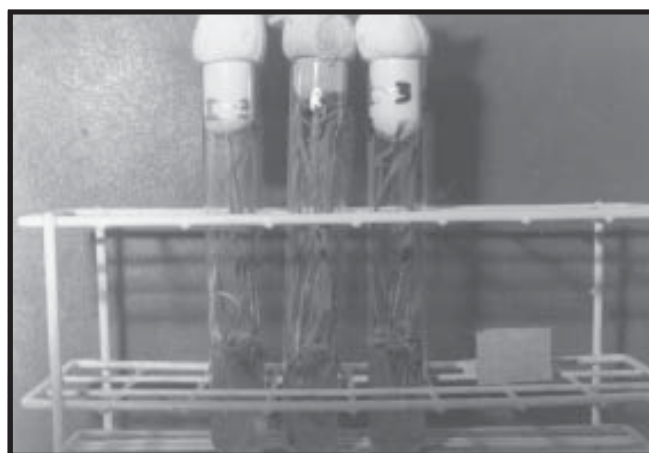


Fig. 1. Mejores resultados en la regeneración *in vitro* de plantas de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23 en el tratamiento de regeneración r_2 .

TABLA II

Frecuencias de regeneración (Fr., %) y total de plantas regeneradas (Pl.) en tratamientos aplicando el análogo de brasinoesteroide DAA-6.

() Plantas albinas.

		PROCEDENCIA															
		I								II							
		r_{c-1}		r_1		r_2		Totales		r_{c-1}		r_1		r_2		Totales	
Fr.	Pl.	Fr.	Pl.	Fr.	Pl.	Fr.	Pl.	Fr.	Pl.	Fr.	Pl.	Fr.	Pl.	Fr.	Pl.		
V	J	0	0	0	0	0	0	0	0	80	26	60	12	100	49 (3)	80	87 (3)
A	P	57	47 (1)	85	31	66	50 (5)	70	128 (6)	100	36 (2)	100	32	100	62	100	130 (2)
R.	IA	33	16	42	8	42	21 (6)	40	45 (6)	80	27	20	3	100	22	64	52
Totales		31	63 (1)	47	39	41	71 (11)			85	89 (2)	57	47	100	133 (3)		

J: Jucarito 104 (J-104)

P: Pokkali (Pok)

IA: IACuba 23 (IAC-23)

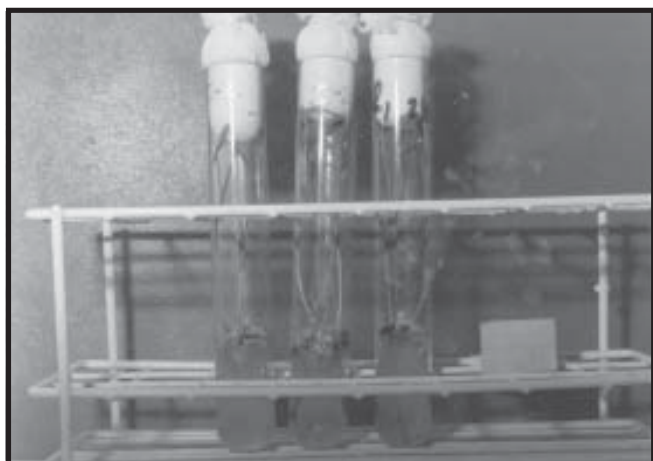


Fig. 2. Mejores resultados en la regeneración *in vitro* de plantas de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23 en el tratamiento de regeneración r_1 .

la existencia de diferentes niveles o de determinadas interacciones en cuanto a: las facultades genotípicas; la capacidad regenerativa del material; la distribución de zonas embriogénicas y no embriogénicas y la efectividad de los tratamientos aplicados. El medio r_2 superó a los restantes en el número promedio de brotes o plantas rediferenciadas por callo, incluyendo valores que sobrepasan el de 6 plantas, asumido como máximo por Rueb & al. (1994) al emplear el medio de Linsmaier & Skoog (Linsmaier & Skoog, 1965) suplementado con AIA (0.5 mg/L) y BA (0.3 mg/L).

De acuerdo con los resultados del ANOVA factorial aplicado, el mayor número de diferencias significativas se apreció precisamente en las variables número de brotes y talla máxima, quedando establecidas la variedad, la procedencia y la interacción entre la variedad y el medio de procedencia como los factores y la interacción principales respectivamente.

La variedad Pokkali sobresalió entre las dos restantes como la de mayor plasticidad fenotípica al alcanzar los valores más elevados en todos los parámetros analizados, independientemente de los medios de inducción precedentes (Fig. 3.). Queda explícito entonces que el mejor genotipo con relación a la talla de las plantas cultivadas *in vitro* se corresponde con la variedad Pokkali (Fig. 4.). J-104 e IAC-23 se caracterizaron por presentar respuestas inferiores.

El medio de procedencia II se destacó como el más eficiente en la obtención de plantas y de sus mayores tallas.

En cuanto a los medios de cultivo, las combinaciones r_{c-1} y r_2 devinieron como las más favorables, difiriendo significativamente del r_1 , de lo que se deduce que el brasinoesteroide DAA-6, a la concentración empleada y

como único suplemento fitohormonal, no aporta el suficiente complemento citoquinínico para desencadenar una potente rediferenciación de brotes.

En opinión de Raghava & Nabors (1984) la adición de citoquininas solas no es efectiva en la regeneración, sin embargo nuestro control (r_{c-1}) con la KIN como único aditivo, logró una estimulación de la regeneración de plantas superior al 33 %, conforme a lo demostrado por Zhu & al. (1996) acerca de su papel como promotora de los procesos regenerativos.

Ahora bien, probablemente la combinación con el DAA-6 (r_2) acentuó la actividad citoquinínica, potenciando la acción de la KIN, evidente a través de diferencias de más del 9 % en las frecuencias de regeneración entre r_{c-1} y r_2 y la obtención del 100 % para las tres variedades en II.

Se ha demostrado la actividad citoquinínica del DAA-6 al promover el desarrollo *in vitro* de brotes de caña de azúcar (Gainza, 1994) así como su notable efecto estimulador de la diferenciación celular en variedades de arroz (González & al., 1994).

En 1994, González & al. reportan la mejor respuesta de diferenciación al sustituir la citoquinina del medio por DAA-6, resultado que no se ajusta al nuestro debido a que el tratamiento combinación homóloga (r_1) resultó inhibitorio para esta variable y ofreció las menores frecuencias de regeneración de plantas, inferiores incluso a las provocadas por el efecto de la KIN, tal como se verifica para la regeneración de brotes en caña de azúcar (Ramírez, 1996).

Albinismo.

Entre las plantas regeneradas se presentaron individuos albinos, cuya mayor incidencia estuvo relacionada con la procedencia del medio de inducción I (Tabla II). Los medios que favorecieron la presencia de este carácter, coincidieron con los de mayor regeneración de plantas: r_{c-1} y r_2 . A pesar de que las tres variedades resultaron afectadas en alguna medida con esta variación fue precisamente la variedad Pokkali la más susceptible.

Refiriéndose a este carácter, Schlienger (1987) comenta acerca de la presencia simultánea, como en nuestro caso, de plántulas de cebada verdes y albinas, obtenidas a partir de embriogénesis somática.

La mayor frecuencia de plántulas albinas tiene lugar en la variante de medio r_2 : MS + KIN 1.0 mg/L + DAA-6 10^{-5} mg/L (Fig. 5.). Es probable entonces, que la manifestación fenotípica de albinismo resultante, guarde relación con el tiempo de permanencia (67 días) en el mismo tratamiento de cultivo, tal como

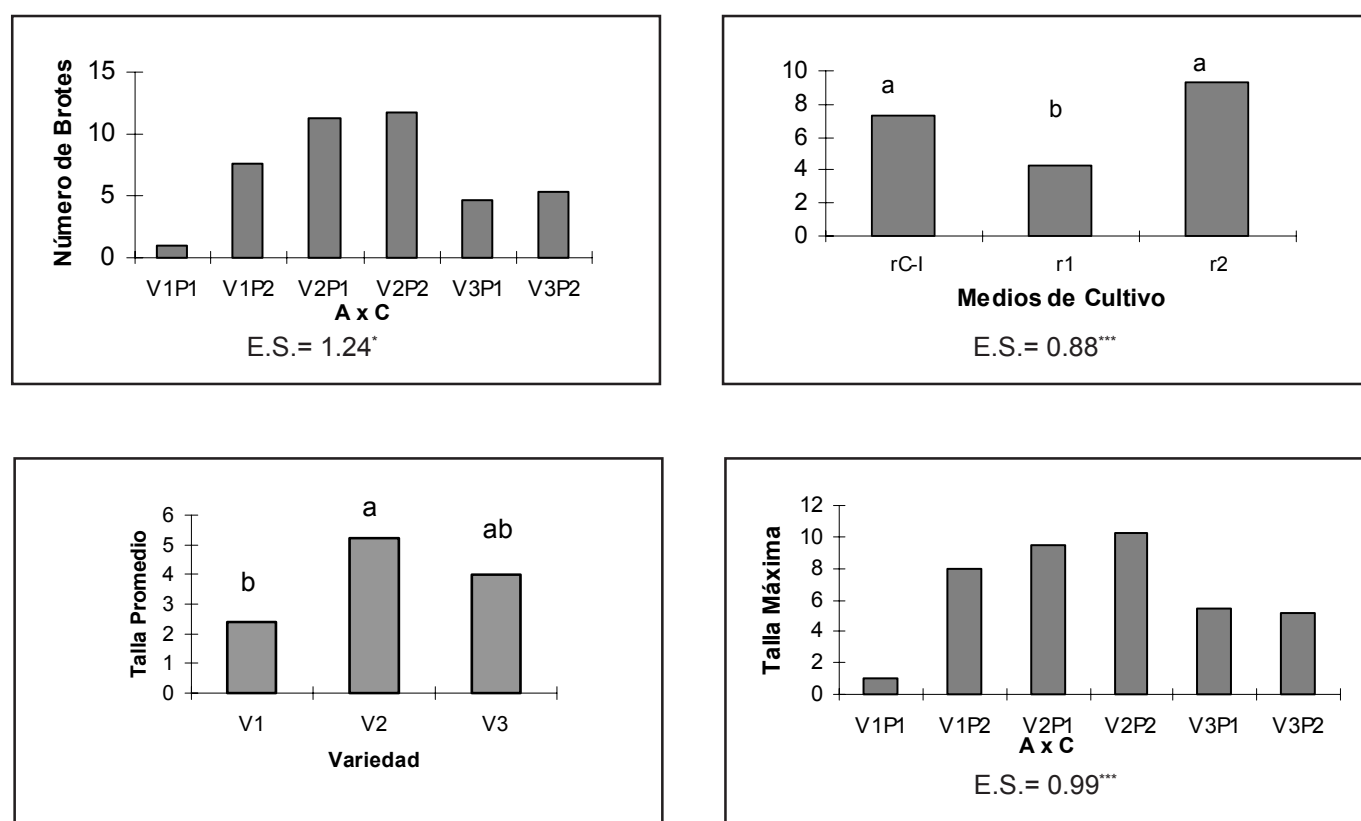


Fig. 3. Influencia de los factores e interacciones diferenciales sobre el comportamiento de las variables analizadas (Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos).

TABLA III

Valores medios y de error estándar (E.S.) para los caracteres número, tallas máxima y promedio de los brotes regenerados *in vitro*.

		Variables												
		N° de brotes				Talla máxima				Talla promedio				
Procedencia		I		II		I		II		I		II		
Estadísticos		x	E.S.	x	E.S.	x	E.S.	x	E.S.	x	E.S.	x	E.S.	
V a	J-104	r _{C-I}	0	-	5.20	1.50	0	-	4.94	1.73	0	-	1.77	0.60
		r ₁	0	-	2.40	1.17	0	-	5.13	2.24	0	-	2.16	0.98
		r ₂	0	-	9.80	2.22	0	-	7.94	0.94	0	-	2.40	0.34
r i	Pok	r _{C-I}	6.71	2.83	9.00	2.12	4.66	1.72	10.00	0	1.60	0.64	3.11	0.14
		r ₁	4.43	1.54	8.00	1.78	6.88	1.70	7.75	2.25	3.69	1.23	3.50	1.07
		r ₂	8.33	4.23	15.50	1.50	5.58	1.95	9.75	0.25	2.61	1.19	4.53	1.00
e d	IAC-23	r _{C-I}	2.66	1.71	5.40	3.01	1.66	1.48	4.56	2.26	1.28	0.92	2.40	1.00
		r ₁	1.14	0.83	0.60	0.60	2.93	1.83	2.00	2.24	2.15	1.45	1.57	1.57
		r ₂	3.00	1.62	5.50	1.32	3.14	1.74	4.45	1.87	1.19	0.71	1.84	0.70
		E.S. = 0.99				E.S. = 0.74				E.S. = 0.30				

sugieren Rance & al. (1994), quienes atribuyen la formación de plantas albinas a las condiciones del periodo de subcultivo. En este caso, aunque se dispuso de medios frescos y se varió la composición hormonal, tanto en la etapa de inducción como en la de regeneración se emplearon similares contenidos de sales basales, vitaminas e inositol. De hecho el efecto de exceso de actividad citoquinina, dado por las fitohormonas KIN y DAA-6, podría quedar en segundo

plano, si tomamos en consideración que el material albino resultante de r₂, procedente del tratamiento de inducción II, para el que la combinación de regeneración resultaba nueva, es mínimo. En este sentido se ha planteado la influencia de las sales minerales sobre dicho carácter (Lynch & al., 1991).

Todo parece indicar que el DAA-6 no causa la alteración genética, pues en el tratamiento r₁, suplementado sólo

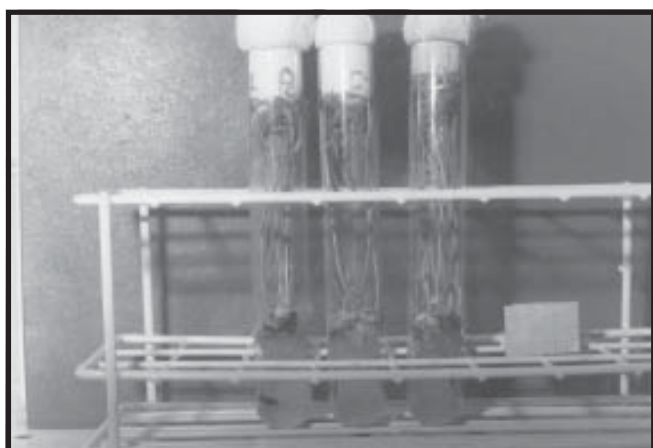


Fig. 4. Plantas de la variedad Pokkali regeneradas *in vitro*, luego de 30 días de cultivo en los medios r_{c-1} , r_1 y r_2 .

por dicho biorregulador (10^{-5} mg/L), no se produjeron albinos.

Con relación a los tratamientos de medios de cultivo, el r_2 , en el que aparece el mayor número de regenerantes albinos, se produce una interacción entre la KIN y el DAA-6 que refuerza la actividad citoquinínica. A este efecto debe sumarse además la acción de las fitohormonas empleadas durante la inducción, tales como el 2,4-D, auxina fuerte y considerada altamente mutagénica (medios I y II) y la propia KIN (medio II), las cuáles en forma de conjugados pueden haber mantenido trazas remanentes en el callo, material a partir del cuál se iniciaron los procesos de rediferenciación. Así, el incremento de los niveles esteroidales (u hormonales) presentes en el medio e incorporados a las células pudieron alterar los mecanismos de regulación genética durante la neoformación de tejidos, causando lesiones en algunos, expresadas en este caso a través de deficiencias en la pigmentación.

De forma similar, pero en menor medida, por no contar con el efecto brasinoesteroide, debió ocurrir para el material obtenido en el medio r_{c-1} , debido posiblemente a los eventos morfogenéticos propios de la callogénesis y la rediferenciación por los que transitó durante más de 2 meses. No obstante, en este tratamiento llama la atención que la manifestación fenotípica de albinismo se produjo restringida a Pokkali, lo que puede relacionarse con una variación inherente a la variedad, si consideramos una posible susceptibilidad a la formación de individuos albinos, teniendo en cuenta que se ha reconocido a este carácter como genotipo dependiente (Lynch & al., 1991).

Enraizamiento.

Los resultados experimentales en cuanto a la rediferenciación de raíces, demostraron que los tres niveles con que fue caracterizado el desarrollo del sistema radical guardan relación con el medio de cultivo con el que interactúa el material vegetal (Tabla IV).

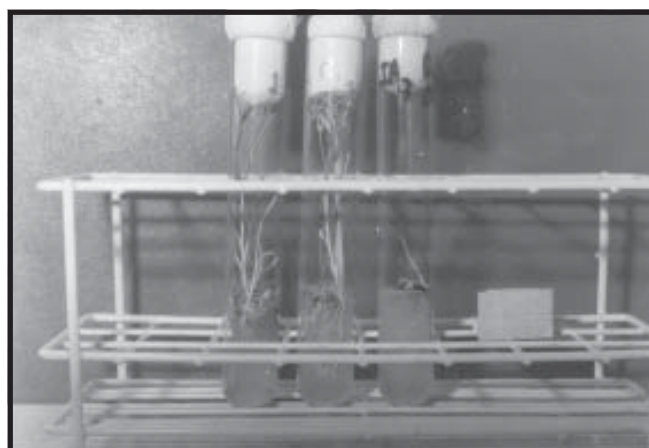


Fig. 5. Plantas albinas de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23 obtenidas en el tratamiento de regeneración r_2 luego de 30 días de cultivo.

TABLA IV

Niveles de desarrollo del sistema radical alcanzado por tratamiento y estadístico G para cada variedad.

		Desarrollo radical (Niveles)				Estadístico G
		Medio	1	2	3	
V a r i e d a d	J-104	r_{c-1}	0	3	9	G= 19.519 ***
		r_1	5	0	4	
		r_2	0	0	9	
		r_{c-1}	1	5	5	
	Pok	r_1	8	0	3	G= 18.833 ***
		r_2	1	6	3	
		r_{c-1}	0	2	9	
	IAC-23	r_1	6	0	6	G= 19.297 ***
		r_2	0	4	7	

- 1: 20 ó más raíces, con crecimiento mayor que 2.0 cm de longitud y proliferación de raíces laterales.
- 2: 20 ó más raíces, con crecimiento mayor que 2.0 cm de longitud.
- 3: Menos de 20 raíces, con crecimiento menor que 2.0 cm de longitud.

En sentido general, independientemente del medio de procedencia (I ó II), existe una buena respuesta de enraizamiento, en la que prevalece la formación de las raíces menos desarrolladas (nivel 3).

La variedad Pokkali generó un mayor desarrollo radical al agrupar los valores de frecuencias más elevados en los niveles 1 y 2, J-104 por el contrario produjo las raíces con menor grado de desarrollo.

Se hizo notable que el único tratamiento de medio de cultivo capaz de promover un número apreciable de sistemas radicales más desarrollados con proliferación de raíces laterales (nivel 1) fue el r_1 , mientras que los tratamientos de los medios de cultivo r_{c-1} y r_2 denotaron su influencia sobre el desarrollo de sistemas radicales tipos 2 y 3.

Tal como lo descubre la significación del estadístico G, esta manifestación en el enraizamiento parece estar vinculada con la composición de los medios de cultivo al mismo tiempo que los valores de frecuencias sugieren cierta relación entre el efecto del brasinoesteroide DAA-6 y el máximo desarrollo radical, dirigido especialmente hacia la diferenciación de raíces laterales.

Al respecto, a pesar de reportarse respuestas desfavorables o inhibitorias por parte de algunos brasinoesteroides en la formación y crecimiento de la raíz en diferentes ensayos (Guan & Roddick, 1988 a; Mandava, 1988; Roddick, 1994) se han arribado a otros resultados contrarios, por ejemplo, entre los propios cereales se ha comprobado la estimulación del alargamiento de la raíz en maíz (Yokota, 1997) y en arroz, las mayores longitudes de las radículas, al tratar las semillas en soluciones de brasinoesteroides (10^{-5} y 10^{-3} ppm) previo a la germinación (Wang & Deng, 1992).

La relación entre la formación de raíces laterales y la acción biorreguladora de los brasinoesteroides no es nueva. Guan & Roddick (1988 b), evaluaron incrementos en el desarrollo de raíces laterales en tomate, a bajas concentraciones del epibrasinólido. Años más tarde, Roddick & Ikekawa (1992) concluyen que concentraciones de $0.1 \mu\text{M}$ ($\approx 10^{-4}$ mg/L) del mismo brasinoesteroide, algo superiores a las aplicadas por nosotros en el presente trabajo, causan ligeros incrementos en el desarrollo tanto de la raíz principal como de las laterales en trigo (*Triticum aestivum* L.) y en *Phaseolus aureus* L.

Para el DAA-6 en particular, se ha reportado recientemente un efecto inhibitorio, a 10^{-2} mg/L, sobre el número de raíces en la fase de multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. var. *gran enano* (Rodríguez & al., 1998); aunque se le ha atribuido un efecto positivo en el enraizamiento de vitroplántulas de caña de azúcar (Jiménez & al., 1996), también a concentraciones mayores que las probadas en el experimento discutido (10^{-2} , $3 \cdot 10^{-2}$ y $5 \cdot 10^{-2}$ mg/L). Además en la micropropagación del plátano, durante la propia fase objeto de análisis, ha sustituido al ácido 3-indolacético (AIA) en cultivos del clón FHIA-03 (Núñez, 1996) y ha promovido un elevado número de raíces en el FHIA-21 (Agramonte & al., 1996), al ser aplicado a 10^{-2} y $3 \cdot 10^{-2}$ mg/L de concentración, en ausencia de citoquininas y auxinas.

Estos últimos resultados guardan cierta correspondencia con los nuestros si tenemos en cuenta que la combinación que agrupó a los sistemas radicales de mayor desarrollo, la r_1 , contiene, a diferencia de los otros dos tratamientos, al DAA-6 como único suplemento fitohormonal. Además, atendiendo al marcado efecto

causado por el tratamiento r_1 sobre la profusión de raíces laterales con respecto a los dos medios restantes, en los cuáles la frecuencia de aparición de dichos órganos es mínima o nula, podemos inferir la influencia directa del DAA-6 sobre su formación.

Estudio isoenzimático.

El zimograma representado en la figura 6, correspondiente al comportamiento del sistema isoenzimático peroxidasas (Px) muestra un total de 8 bandas con diferentes movilidades electroforéticas, distribuidas en 4 regiones o loci genéticos, denominados Px-1, Px-2, Px-3 y Px-4 y caracterizados por un total de 2 bandas cada uno.

No se presentan diferencias en la respuesta isoenzimática entre las variedades, ni entre las muestras procedentes de material *in vivo* e *in vitro*, tampoco con relación a las muestras obtenidas en los diferentes medios de cultivo para las plantas verdes. Sólo los regenerantes albinos mostraron diferencias, relacionadas con la ausencia de bandas en 2 de los loci; en el caso del locus Px-3 no aparece la banda de posición 2.6 unidades y para el locus Px-1 no se observan ninguna de sus bandas.

En el zimograma del sistema isoenzimático esterasas (Est) (Fig. 7.), se detectó un total de 7 bandas con diferentes movilidades electroforéticas, describiendo 6 loci genéticos: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, Est-6, conformados en su mayoría por una sola banda, a excepción del locus Est-2 que cuenta con 2.

El patrón isoenzimático se comportó de forma idéntica para las 3 variedades en cada tratamiento, sin diferir entre las plantas verdes ni con las albinas (Tabla V). Medidas de variabilidad genética para los sistemas isoenzimáticos peroxidasas y esterasas.

El sistema peroxidasas (Px) resultó ser polimórfico (Tabla V) en dos loci, debido a diferencias en el número de bandas entre las plantas albinas y las verdes, mientras que las esterasas (Est) presentaron un total de loci monomórficos. De acuerdo con estudios de la variabilidad isoenzimática, realizados al germoplasma cubano de arroz (Álvarez & al., 1997), fueron detectados los mayores niveles de polimorfismo, precisamente, para peroxidasas en relación con los de esterasas. Similar resultado fue alcanzado por nosotros.

No existen diferencias en la expresión enzimática de las plantas verdes obtenidas *in vivo* e *in vitro* para ninguno de los dos sistemas isoenzimáticos, por lo que podemos inferir que el tiempo de cultivo (67 días), en las condiciones empleadas, no ofrece alteraciones genéticas a nivel de las actividades de las enzimas peroxidasas

TABLA V

Medidas de variabilidad genética para los sistemas isoenzimáticos peroxidasa y esterasas.

Sistemas	No. de loci	No. de alelos	Media de por locus	% de loci alelos por polimórficos	Media de alelos por loci polimórficos
Px	4	8	2	50	2
Est	6	7	1.2	0	0
Total	10	15	1.6	20	2

y esterasas. Estos resultados concuerdan con la homogeneidad genética revelada para los propios sistemas en muestras foliares de material *in vitro* de variedades de arroz, entre las que se incluyen J-104 y Pokkali, con ciertas diferencias cuantitativas en algunas formas peroxidasa encontradas por Iglesias & González (1995).

Relacionado con la actividad peroxidasa Abe & al. (1994) refieren una correlación positiva, significativamente elevada entre ésta y la frecuencia de iniciación de brotes en callos de arroz de 2 meses, en medio de regeneración.

El número de isoformas (8 bandas) detectado para las peroxidasa, coincide con los resultados obtenidos para plantas jóvenes (Ravi & Minocha, 1992) en variedades de arroz de la propia subespecie *indica* en medios de cultivo similares a los empleados y para coleótilos y plúmulas de plántulas de arroz luego de 15 días de germinadas (Álvarez & al., 1997).

Según Ravi & Minocha (1992) el medio y los reguladores del crecimiento pueden cambiar el nivel y los patrones de las isoenzimas, mientras que Lassner & Orton (1983) también atribuyen a las fitohormonas, algún grado de modulación de la expresión del patrón peroxidasa. No obstante, a pesar de que se plantea que los brasinoesteroides no afectan la actividad peroxidasa (Mandava, 1988; Rodríguez, 1994) si se les caracteriza por inducir la síntesis de proteínas específicas (Mandava, 1988), además de que no es posible obviar las variaciones en la composición y el contenido de dicha enzima ante alteraciones fisiológicas (González, 1989; Dueñas, 1998).

En callos de soya, Echemendía & al. (1998) reportan que concentraciones de 10^{-5} mg/L de DAA-6 causan variaciones en los patrones peroxidasa y no en los de esterasas, coincidiendo con nuestros resultados a pesar de tratarse de material vegetal diferente.

De forma general, la expresión peroxidasa disminuye para los individuos albinos, evidenciada a través de la pérdida de bandas, resultado similar al encontrado por

Szilágyi & Nagy (1977) en *Nicotiana sylvestris*. Dicha desaparición de bandas en los locus Px-1 y Px-3, para las plantas albinas, pudiera indicar la existencia de una posible mutación (Lassner & Orton, 1983), que en el caso del arroz se describe como recesiva (Chandraratna, 1964).

CONCLUSIONES

1.- El análogo de brasinoesteroide DAA-6, en las variedades estudiadas, genera un doble efecto regulatorio sobre la regeneración de plantas: combinado con la KIN acentúa la acción citoquinínica sobre la rediferenciación caulinar y solo promueve el desarrollo radical con proliferación de raíces laterales.

2.- La adición del análogo de brasinoesteroide DAA-6 10^{-5} mg/L al medio de regeneración, no parece estar relacionada con la aparición de individuos albinos.

3.- La utilización del DAA-6 en el medio, a la concentración probada, no constituye una fuente de variabilidad para la expresión fenotípica de los patrones de isoenzimas Peroxidasa (Px) y Esterasa (Est), no obstante el patrón Px encontrado para las plantas albinas regeneradas *in vitro* es diferente al de cualquier planta verde, independientemente de su origen.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe T, Oka Y & Sasahara T. 1994. Varietal variations in biochemical changes during growth and redifferentiation of rice callus cultures. *Jpn. J. Genet.* 69: 385-396.
- Agramonte D, Ramírez D, Jiménez F, Pérez M, Gutiérrez O & Núñez M. 1996. Efecto del DAA-6 en la micropropagación *in vitro* del plátano (*Musa spp*) clón FHIA-21. Seminario Científico del INCA, Junio 6 al 8, 1996: 158.
- Álvarez A, Fuentes JL, Gutiérrez L & 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, Octubre 28-30, 1997: 4 pp.
- Arteca RN. 1995. Brassinosteroids. En: *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies, P. J. (Ed.). Dordrecht. Kluwer Acad. Press. London: 206-213.
- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME. 1990. Meios Nutritivos. En: *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Torres, A.C. y L.S. Caldas (Eds.). ABCTP, EMBRAPA/CNPq, Brasília: 37-70.
- Coll Y, Castillo D, González A, Alfonso J, Armas R & Pujol M. 1996. Improvement of indica rice plant regeneration from callus through manipulation of culture conditions. *Biotecnología Aplicada* 13(4): 298.
- Chandraratna MF. 1964. The origin and differentiation of cultivated rice. En: *Genetics and breeding of rice*. Chandraratna, M. F. (Ed.). Longman, green and Co. LTD: 389 pp.

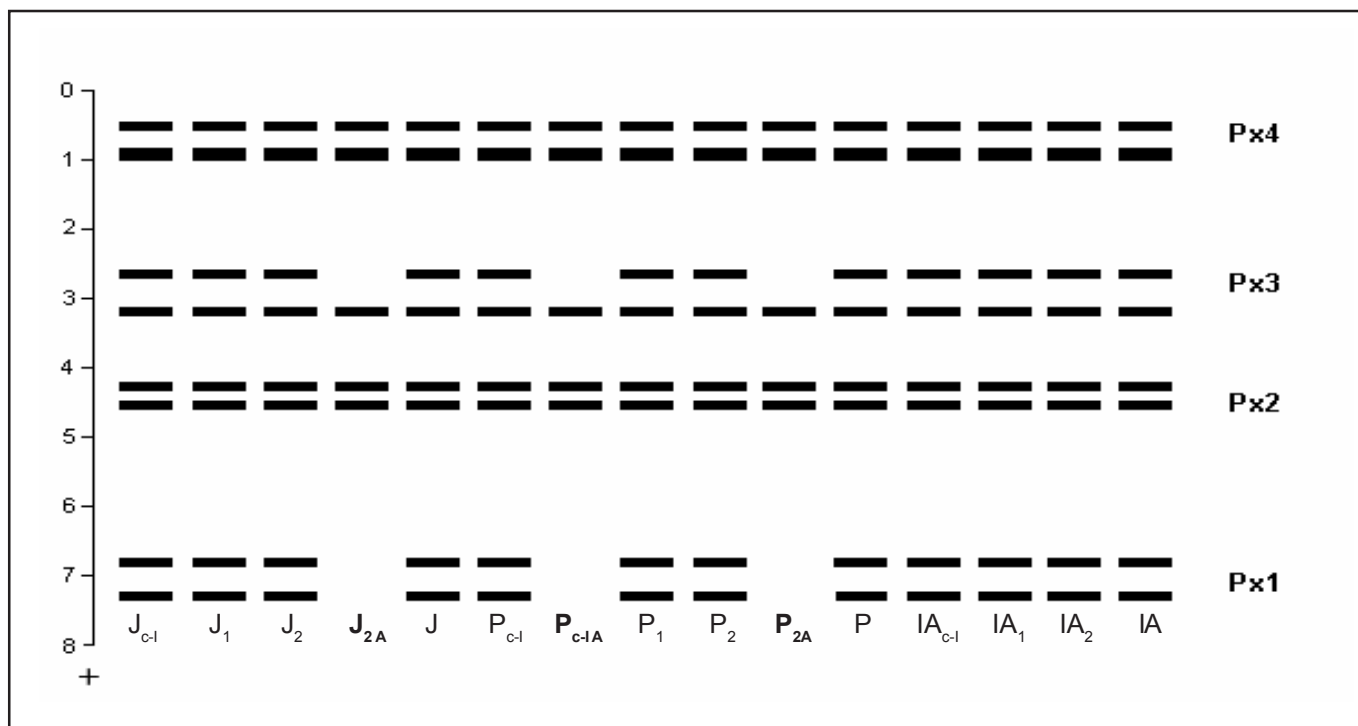


Fig. 6. Zimograma del sistema Peroxidasas.

J_{c-1}, J₁, J₂; P_{c-1}, P₁, P₂; IA_{c-1}, IA₁, IA₂: muestras correspondientes a plantas de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23 obtenidas *in vitro* en los medios de regeneración r_{c-1}, r₁ y r₂.

J_{2A}, P_{c-1A}, P_{2A}: muestras correspondientes a las plantas albinas obtenidas durante la regeneración *in vitro*.

J; P; IA: muestras de las plantas obtenidas en condiciones *in vivo*.

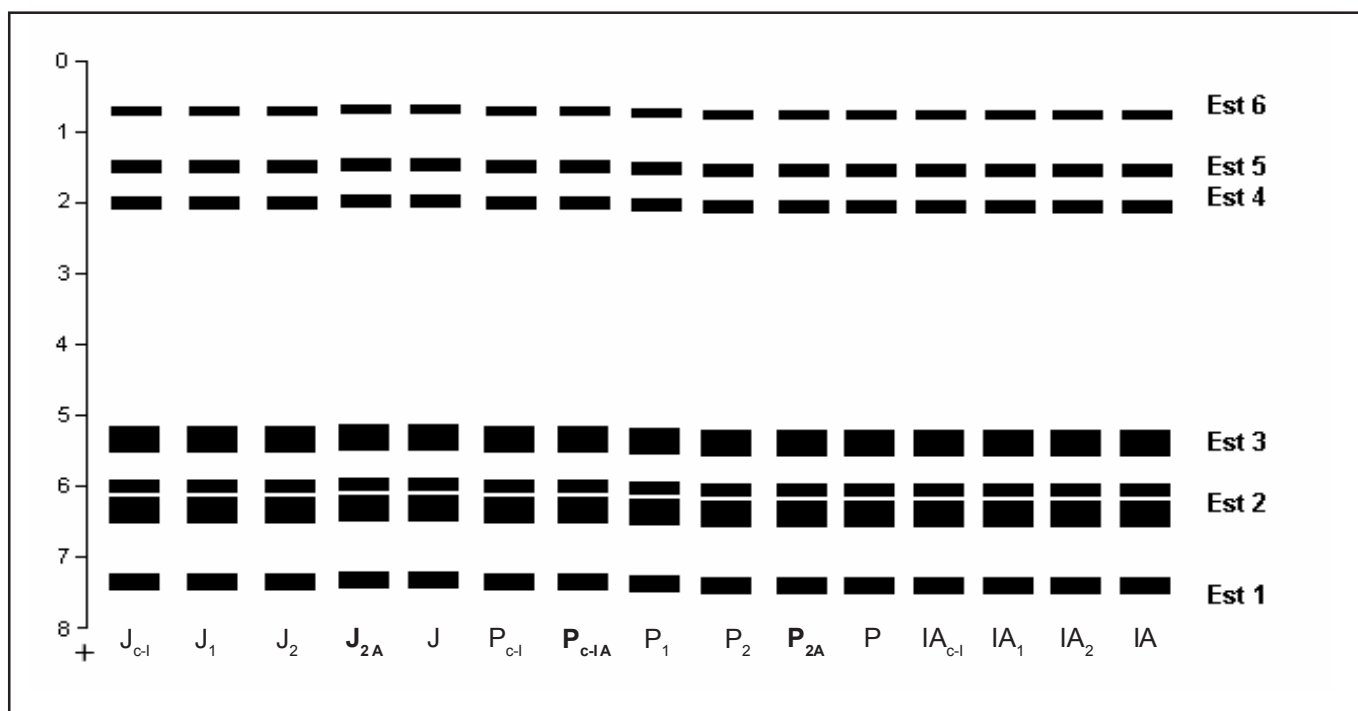


Fig. 7. Zimograma del sistema Esterasas.

J_{c-1}, J₁, J₂; P_{c-1}, P₁, P₂; IA_{c-1}, IA₁, IA₂: muestras correspondientes a plantas de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23 obtenidas *in vitro* en los medios de regeneración r_{c-1}, r₁ y r₂.

J_{2A}, P_{c-1A}, P_{2A}: muestras correspondientes a las plantas albinas obtenidas durante la regeneración *in vitro*.

J; P; IA: muestras de las plantas obtenidas en condiciones *in vivo*.

- Chapel T, Iglesias L, Barreto A, Baisre F & Simón JP. 1974. A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrilamide gel. *Laboratory Practice* (23): 311-312.
- Davis BJ. 1964. Disc. electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Dodds JH & Roberts LW. 1995. Experimental: callus and callus-derived systems. En: *Experiments in plant tissue culture*. Dodds, J. H. y L. W. Roberts (Ed.). Third edition. Cambridge University Press: 67-81.
- Dueñas JM. 1998. Caracterización genético-bioquímica de 20 variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.). Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana: 38 pp.
- Echemendía D, Tans M, Rodríguez JB, Román MI, Xiqués X, Coll F & 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 (Junio 1-5, 1998): 474-475.
- Ella ES & Zapata FJ. 1991. Effect of abscisic acid and zeatin on plant regeneration from scutellum-derived callus of rice (*Oryza sativa* L. Cv. 'Nona Bokra'). *Philipp. J. Crop Sci.* 16(1): 3-6.
- Fatokun CA & Yamada Y. 1984. Variations in callus formation and plant regeneration in African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *J. Plant Physiol.* 117: 179-183.
- Gainza E. 1994. Efecto del DAA-6 y el estrés hídrico sobre la regeneración *in vitro* de la caña de azúcar. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana: 43 pp.
- González C. 1989. Comportamiento genético-bioquímico de la Lima persa SRA-58 (*Citrus latifolia* Tan) sobre diferentes patrones en Cuba. Tesis presentada en opción al grado de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas: 101 pp.
- González C & González JA. 1981. Estudio de patrones para la Lima persa III. Caracterización isoenzimática. *Cienc. Téc. Agric.* 4 (2): 102-108.
- González MC, Merrys A & Núñez M. 1994. Utilización del brasinoesteroide como posible sustituto de citoquininas *in vitro*. Programa y Resúmenes IX Seminario Científico INCA. *Cult. Trop.* 15 (3): 78.
- Guan M & Roddick JG. 1988 a. Comparisons of the effects of epibrassinolide and steroidal estrogens on adventitious root growth and early shoot development in mung bean cuttings. *Physiologia Plantarum* 73: 426-431.
- Guan M & Roddick JG. 1988 b. Epibrassinolide-inhibition of development of excised, adventitious and intact roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*): comparison with the effects of steroidal strogens. *Physiologia Plantarum* 74: 720-726.
- Iglesias L & González MC. 1995. Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en arroz (*Oryza sativa* L.). *Cult. Trop.* 16 (1): 64-69.
- Iglesias L, Lima H & Simon JP. 1974. Isozymes identification of nuclear seedlings in citrus. *J. Heredity* 65: 81-84.
- Jiménez M, Ortiz R & de la Fé C. 1996. Efecto de dos análogos de brasinoesteroides como suplementos o sustitutos de auxinas en la micropropagación de la caña de azúcar. Seminario Científico del INCA, Junio 6 al 8, 1996: 157.
- Lassner MW & Orton TJ. 1983. Detection of somatic variation. En: *Isozymes in plant genetics and breeding*. Tanksley, S. D. y T. J. Orton (Eds.). Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam : 207-217.
- Linsmaier EM & Skoog F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100.
- Lynch PT, Finch RP, Davey MR & Cocking EC. 1991. Rice tissue culture and its application. En: *Rice Biotechnology*. Khush, G. S. y G. H. Toenniessen (Eds.). C.A.B. International in association with the International Rice Research Institute: 135-155.
- Mandava NB. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52.
- Mitsuoka K, Honda H, Xing X.- H & Unno H. 1994. Effect of intracellular 2,4 D concentration on plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 364-366.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Núñez M. 1996. Los brasinoesteroides y su actividad biológica. INCA: 35 pp.
- Ornstein L. 1964. Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 121: 321-349.
- Peterson G & Smith R. 1991. Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of american and international rice varieties. *Plant Cell Report* 10 (1): 35-38.
- Raghava NV & Nabors MW. 1984. Cytokinin mediated long-term, high frequency plant regeneration in rice tissue cultures. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 113: 315-323.
- Ramírez YM. 1996. Actividad biológica de algunos brasinoesteroides sintéticos en plantas. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana: 37 pp.
- Rance IM, Wenzhong T, Mathews H, Kochko A, Beachy RN & Fauquet C. 1994. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. *Plant Cell Report* 13 (11): 647-651.
- Ravi DS & 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 & Minocha JL. 1992. Effect of media and age on peroxidase isozyme pattern in calli of rice (*Oryza sativa*). *Crop. Improv.* 19 (2): 88-91.
- Ravi HB & Minocha JL. 1993. Genotypic response for callusing and regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). *Jour. Pl. Sci. Res.* 9: 19-20.
- Raymond S. 1964. Acrilamide gel electrophoresis. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 121: 350-361.

Roddick JG. 1994. Comparative root growth inhibitory activity of four brassinosteroids. *Phytochemistry* 37 (5): 1277-1281.

Roddick JG & Ikekawa N. 1992. Modification of root and shoot development in Monocotyledon and Dicotyledon seedlings by 24-epibrassinolide. *J. Plant Physiol.* 140: 70-74.

Rodríguez E. 1994. Efectos del brasinoesteroide DAA-6 sobre la germinación y el desarrollo de plántulas de arroz y tomate. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana: 50 pp.

Rodríguez T, Núñez M & Vento H. 1998. Influencia de un análogo de brasinoesteroides en la fase de multiplicación *in vitro* del banano (*Musa spp.*) var gran enano. *Cultiv. Trop.* 19 (2): 19-22.

Rueb S, Leneman M, Schilperoort RA & Hensgens LAM. 1994. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 259-264.

Schlienger C. 1987. Microscopy as a tool for plant biotechnology. *Nestlé Research News* 1986/87: 105-114.

Sigarroa A. 1987. Manual de prácticas de Biometría y Diseño Experimental. La Habana, Ed. Pueblo y Educación: 154 pp.

Szilágyi L & Nagy H. 1977. Comparative analysis of green and spontaneous albino mutant lines of *Nicotiana sylvestris* Speg. et Comes. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* 23 (1-2): 219-227.

Wang SG & Deng RF. 1992. Effects of brassinosteroid (BR) on root metabolism in rice. *Journal of Southwest Agricultural University* 14 (2): 177-181.

Wenzhong T, Rance I, Sivamani E, Fauquet C & Beachy RN. 1994. Improvement of plant regeneration frequency in vitro in indica rice. *Chinese Journal of Genetics* 21 (2): 105-112.

Yokota T. 1997. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in plant Science* 2 (4): 137-143.

Zhu Y, Ouyang WH, Li Y & Chen Z. 1996. The effects 2-ip and 2,4-D on rice calli differentiation. *Plant Growth Regulation* 19: 19-24.

Recibido: 12 junio del 2000.

Direcc. de los autores: *Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Carretera de Varona Km 3 1/2, Capdevila, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. ** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de La Habana, Cuba. *** Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Santo Domingo, Villa Clara (INIVIT)