

## Efecto de dos análogos de brasinoesteroides en la inducción y regeneración de callos de *Ipomoea batatas*

Orlando S. González Paneque<sup>1\*</sup>, Miriam Nuñez Vázquez<sup>2</sup>, María M. Hernández Espinosa<sup>2</sup>, Juan J. Silva Pupo<sup>1</sup> y Angel Espinosa Reyes<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Apdo. 21. Bayamo. C.P.: 85100. Granma. Cuba. e-mail: ogpaneque@udg.co.cu

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera Tapaste–San José de Las Lajas, Km 3 ½. Gaveta Postal 1. C.P.: 32700. La Habana. Cuba.

### RESUMEN

Con la finalidad de estudiar, en diferentes clones, el efecto de dos análogos de brasinoesteroides en la inducción de callos y la regeneración de los mismos, fueron recolectadas raíces tuberosas pertenecientes a los clones Cemsa 78-354, Inivit B 90-1, Inivit B 93-1, Yabú-8 y Jewel y se colocaron en frascos con agua en el laboratorio para inducir la brotación de las yemas. Posteriormente, se seleccionaron explantes del limbo foliar y se sembraron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog con 2,4-D (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) combinados con los análogos de brasinoesteroides MH-5 y Biobras-6 a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.05 y 0.1 mg.l<sup>-1</sup>) y el empleo de los análogos de brasinoesteroides independientes para inducir la formación de callos. A partir de la cuarta semana los callos fueron transferidos, para posibilitar la inducción de regenerantes, al medio de cultivo anteriormente mencionado al cual se le adicionaron los análogos de brasinoesteroides MH-5 y Biobras-6 independientes y combinados con los reguladores del crecimiento AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y Kinetina (0.2 mg.l<sup>-1</sup>). Los mismos se mantuvieron en condiciones de luz solar a temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 80-90% e intensidad luminosa de 3 000-5 000 l. Transcurridas cuatro semanas, se evaluó el comportamiento morfológico de los callos y los regenerantes. Se obtuvieron buenos resultados en la inducción de callos morfogénicos, al emplear los reguladores del crecimiento independientes en el medio de cultivo y al ser combinados con 2,4-D (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) a la concentración de 0.01 mg.l<sup>-1</sup> con ambos análogos de brasinoesteroides. La inducción de regenerantes se vio más favorecida con el empleo del análogo de brasinoesteroides Biobras-6 combinado con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y Kinetina (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) que al ser utilizado de manera independiente en el medio de cultivo.

Palabras clave: Boniato, medios de cultivo, regenerantes

### ABSTRAT

With the purpose of studying, in different clones, the effect of two similar brassinoesteroids in the induction of callus and the regeneration of the same ones, tuberous roots belonging to the clones Cemsa 78-354, Inivit B 90-1, Inivit B 93-1, Yabú-8 and Jewel were gathered and they were placed in flasks with water in the laboratory to induce the sprouting of the buds. Later, explants of the limbo foliar were selected and they were culture in the Murashige and Skoog (1962) culture medium with 2, 4-D (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) and 6-BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) with the similar brassinoesteroids MH-5 and Biobras-6 at different concentrations (0.001, 0.01, 0.05 and 0.1 mg.l<sup>-1</sup>) and the employment independent brassinoesteroids analogues to induce the formation of callus. Starting from the fourth week the callus were transferred, to facilitate the regenerants induction, to the culture medium previously mentioned to which the independent brassinoesteroids analogues MH-5 and Biobras-6 and cocktails with the regulators of the growth AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) and Kinetina (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) were added. The same ones stayed under sun light conditions to temperatures of 25 ± 2 °C, relative humidity of 80-90% and luminous intensity of 3 000-5 000 l. After four weeks, it was evaluated the morphological behavior of the callus and the regenerants. Good results were obtained in the induction of morphogenic callus, when using the regulators of the independent growth in the culture medium and when being combined with 2, 4-D (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) and 6-BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) to the concentration of 0.01 mg.l<sup>-1</sup> with both brassinoesteroids analogues. The regenerantes induction was more favored with the employment of the brassinoesteroids analogues Biobras-6 combined with AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) and Kinetina (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) than when being used independent in the culture medium.

Key Words: culture medium, regenerantes, Sweet potato

### INTRODUCCIÓN

El cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) ofrece diversas ventajas económicas para muchos países y en especial Cuba, ya que se puede emplear en la alimentación humana y animal, así como en la

industria (López *et al.*, 1995). Las técnicas *in vitro* ha sido una poderosa herramienta en la explotación comercial y ha propiciado el empleo de la micropropagación en diferentes especies. Existen referencias de la aplicación de los brasinoesteroides en diferentes cultivos en la obtención de callos

morfogénicos, la regeneración de plantas y la inducción de embriones somáticos, siendo bien marcada la actividad de los mismos en los procesos desarrollados *in vitro*, lo que abre nuevas perspectivas para la agricultura cubana (Núñez, 1996).

Las respuestas de los brasinoesteroides incluyen efectos sobre la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente-sitio de consumo y la modulación del estrés (Núñez y Robaina, 2000).

Los efectos promotores de los brasinoesteroides sobre la elongación del tejido vegetal, han sido observados en muchas especies, pero solamente en pocas se han estudiado en detalle; mientras que, el papel en el cultivo de células vegetales ha sido demostrado por varios autores, los cuales plantearon que estos compuestos en combinación con las auxinas, promueven el crecimiento de callos de varias plantas y el alargamiento celular pero no la división.

Los resultados de las aplicaciones de los brasinoesteroides en la agricultura han sido generalmente satisfactorios; sin embargo, muchas veces estos no pudieron ser repetitivos, por lo que existen muchos factores que pueden explicar estas condiciones, no existiendo referencias anteriormente en el cultivo de tejidos vegetales.

Por todo lo anteriormente planteado, el objetivo propuesto en este trabajo fue evaluar, en diferentes clones de boniato, el efecto de dos análogos de brasinoesteroides en la inducción y la regeneración de callos a partir de segmentos de limbos foliares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Granma, en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana. Se recolectaron raíces tuberosas de los clones Cemsa 78-354, Inivit B 90-1, Inivit B 93-1, Yabú-8 y Jewel; y se colocaron en frascos con agua. Posteriormente se procedió al corte de los explantes de limbos foliares (1.0 cm<sup>2</sup>). Los mismos fueron sembrados en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), al cual se adiciono tiamina (1.0 mg.l<sup>-1</sup>), mioinositol (100 mg.l<sup>-1</sup>), sacarosa (3.0%) y phytigel (0.25%). El pH fue ajustado 5.8 ± 0.01. Para la inducción de callos morfogénicos se utilizaron los análogos de brasinoesteroides MH-5 y Biobras-6 (0.001, 0.01, 0.05 y 0.1 mg.l<sup>-1</sup>), adicionados independientes o combinados con 2,4-D (0.1 mg.l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>) y se empleó un control que contenía 2,4-D y 6-BAP a las concentraciones anteriormente mencionadas. La siembra se mantuvo en cámaras de crecimiento aséptico con el empleo de la luz

solar durante cuatro semanas. Se evaluaron veinticinco explantes por tratamiento y se realizaron tres repeticiones, donde se analizó: porcentaje de callos formados, desarrollo de los callos (escala de Santana, 1982), color y consistencia. Se realizó un análisis de comparación de proporciones a los callos de grado 3 de la escala por ser los que mejores características morfogénicas presentaron. Para la inducción de regenerantes se tomaron en cuenta los resultados con el empleo de 2,4-D y 6-BAP en la inducción de callos, añadiendo al medio de cultivo MH-5 o Biobras-6 (0.001, 0.01, 0.05 y 0.1 mg.l<sup>-1</sup>), independiente o combinados con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>) y Kinetina (0.2 mg.l<sup>-1</sup>). Se empleó un control que contenía solamente los reguladores del crecimiento y las concentraciones anteriormente mencionadas y se realizaron tres repeticiones. Fueron analizados a las cuatro semanas 15 callos por tratamiento, y se tuvieron en cuenta: número de regenerantes/callos/tratamiento, número de callos con raíces y cantidad de raíces.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al emplear los análogos de brasinoesteroides independientes en el medio de cultivo, no se obtuvieron resultados en la inducción de callos morfogénicos pertenecientes al grado 3 de la escala de Santana (1982) y los explantes mantuvieron su coloración verde y en algunas concentraciones se obtuvo un bajo porcentaje de callos de grado uno de la escala, y al combinar el Biobras-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>) con 2,4-D y 6-BAP, se alcanzó hasta un 100% en la formación de callos de grado 3 de la escala. Con el empleo del análogo de brasinoesteroides MH-5 se obtuvieron resultados similares al anterior; y existieron diferencias en dependencia del clon. Los mejores resultados se obtuvieron en los clones Inivit B 90-1, Inivit B 93-1 y Jewel; es decir, el factor genotipo conjuntamente con el tipo de sustancia empleada fueron determinantes en la callogénesis.

Moré *et al.* (1998), con el empleo de los análogos de brasinoesteroides en la callogénesis en papa (*Solanum tuberosum*, L.), observaron un efecto favorable en el crecimiento, desarrollo y calidad de los callos. Mientras que García *et al.* (1998), plantearon que los análogos de brasinoesteroides presentaron una potente actividad biológica, debido a su acción como reguladores del crecimiento, posibilitando su aumento en masa fresca en condiciones extremas de desbalance hormonal.

Los callos morfogénicos de grado 3 obtenidos en los experimentos, fueron de color crema amarillo, nodulares y friables, resultados similares a los alcanzados en otros cultivos por Kawaguchi *et al.* (1996); Sasse (1997) y Velázquez *et al.* (1999).

Según Vega *et al.* (2000), los brasinoesteroides y sus análogos producen actividad a concentraciones

más bajas que las efectivas para las giberelinas, lo cual coincidió con Núñez y Robaina (2000), que plantearon que el empleo de los análogos de brasinoesteroides es de vital importancia si se tiene en cuenta que estos son activos a concentraciones muy bajas.

En 1983, Takematsu *et al.* (citados por Núñez, 1996), encontraron que los brasinoesteroides y las auxinas combinados, estimularon el crecimiento de callos más efectivamente que las auxinas y las citoquininas por separado. Coll *et al.* (1999), en callos embriogénicos de naranjo agrio (*Citrus aurantium*, L.) obtuvieron buenos resultados al combinarlos con los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo.

En la inducción de regenerantes, se alcanzó la mayor inducción de los mismos con el empleo del análogo de brasinoesteroides Biobras-6 (0.01 mg.l<sup>-1</sup>) independiente y combinado con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>). Entre los clones estudiados hubo respuestas diferentes; lo que puso de manifiesto que el factor genotipo influyó en la respuesta *in vitro*. Al evaluar el MH-5 independiente, se obtuvieron los mejores resultados con 0.01 mg.l<sup>-1</sup>, al igual que cuando se combinó con la auxina (AIA) y las características manifestadas por los regenerantes arrojaron que en los clones Inivit B 90-1, Inivit B 93-1 y Jewel se obtuvieron los mayores porcentajes de regenerantes por callo por tratamiento y el mayor número de callos con raíces y la mayor cantidad de raíces por callo, todo lo anterior sugiere que las respuestas de las raíces a los brasinoesteroides son diversas y fisiológicamente diferentes a las respuestas de los tallos, por lo que deben ser cuidadosamente considerados aspectos tales como: la formulación, la concentración, la aplicación y el tiempo de exposición (Núñez y Robaina, 2000). Existen referencias del empleo de los análogos de brasinoesteroides MH-5 y Biobras-6 con buenos resultados en la diferenciación de callos de papa (*Solanum tuberosum*, L.) por Hernández (1994), la tuberización *in vitro* del ñame (*Dioscorea* spp.), por Labrada *et al.* (1994) y la conversión y adaptación de plantas de papaya (*Carica papaya*, L.) a partir de embriones somáticos por Gómez *et al.* (1996); citados por Núñez (1996) y en la producción de vitroplantas de plátano macho (*Musa* spp.) con una alta eficiencia en la multiplicación (Díaz *et al.*, 2002).

Según Núñez y Robaina (2000), el desarrollo de todas estas investigaciones con los brasinoesteroides, ha permitido que en Cuba se disponga de análogos de diferentes estructuras químicas para estudios biológicos y además, de cantidades suficientes de algunos de los más activos para validar su efectividad como biorregulador, tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones de campo.

## CONCLUSIONES

Los análogos de brasinoesteroides empleados y a las concentraciones evaluadas no favorecieron la inducción de callos morfogénicos pertenecientes al grado 3 de la escala de Santana (1982); mientras que, en la inducción de regenerantes se obtuvo la formación de brotes a la concentración de 0.01 mg.l<sup>-1</sup> en los análogos de brasinoesteroides independientes y combinados con AIA (0.05 mg.l<sup>-1</sup>), existiendo diferencias entre los clones estudiados.

## REFERENCIAS

- Coll, GD, Diosdado E, González C, Román MI, Xiqués X, Coll F, Pérez R y Echevarría MT (1999) Efecto de tres análogos de brasinoesteroides en el crecimiento y variabilidad genética del callo embriogénico de naranjo agrio (*Citrus aurantium*, L.) Resúmenes del Taller Internacional de Biotecnología Vegetal, BioVeg '99, P. 5, La Habana
- Díaz, BR, Hector E, Torrez A, Vento H, Isidró M, Garcés N, Izquierdo H, Núñez M, Iglesias R, Roque A, Pinzón M, Tirado A, Cabaña M, creme Y y Días AC (2002) Sustitución de la hormonas sintéticas por bioproductos de producción nacional en la tecnología de Propagación *in vitro* del Plátano macho (AAB). En: Progama y Resúmenes del XII Congreso Científico del INCA, P. 81, La Habana
- García, M, Rodríguez S, Medero V, López J, Ventura J de la C y Cabrera M (1998) Desarrollo de la embriogénesis somática en malanga (*Xantosoma* spp. y *Colocasia esculenta*). En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal Resúmenes, P. 51, La Habana
- Kawaguchi, M, Imaizumi-Anraku H, Fukai S y Syono K (1996) Unusual branching in the seedlings of *Lotus japonicus* gibberellins reveal the nitrogen-sensitive cell divisions within the pericycle on roots. *Plant Cell Physiol.* 37: 461-170
- Moré, O, Hernández M y Núñez M (1998) Efecto de los análogos de brasinoesteroides MH<sub>5</sub> y DAA-6 sobre el proceso de callogénesis en papa. En: Programa y Resúmenes del XI Seminario Científico del INCA, P. 111-112, La Habana
- Murashige, T y Skoog FS (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys Plant* (5): p. 473-497
- Núñez, VM (1996) Los brasinoesteroides y su actividad biológica. Folleto, INCA, P. 35, La Habana
- Núñez, VM y Robaina C (2000) Brasinoesteroides. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas para la agricultura. Documento IAC, 68, P. 83, Campinas (SP)
- Sasse, JM (1997) Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol. Plantarum* 100:698-701
- Santana, BN (1982) Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L.) *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 4 (3): 35-40, La Habana
- Vega, R, Rodríguez LE, Sague JL y Santiago Y (2000) Utilización de sustratos alternativos en la aclimatación de vitroplantas de plátano cv FHIA 01. En: Programa y Resúmenes del XII Seminario Científico del INCA, P. 188, La Habana
- Velázquez, L, Cruz B, García Y e Jomarrón I (1999) Aplicación de Biobras-6 al cultivo *in vitro* de plátano, c.v. Fhia-18. Resúmenes del Taller Internacional de Biotecnología Vegetal, BioVeg '99, P. 8, La Habana