

# EFFECTO DEL ANÁLOGO DE BRASINOESTEROIDE (MH5) EN LA ACLIMATIZACIÓN DE LOS BROTES DE *Vriesea* PROPAGADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Iris Capote, Maritza Escalona, Marcos Daquinta, Danilo Pina, Justo González y Carlos Aragón

Laboratorio de Células y Cultivo Tejidos, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, C. P.: 69450. Cuba.

## RESUMEN

Las bromelias son plantas ornamentales muy atractivas por la coloración de sus hojas y la belleza de sus inflorescencias. Dentro de ellas las *Vrieseas* es uno de los géneros de mayor interés comercial. Cuando se desean introducir nuevos híbridos en el mercado, las técnicas de propagación tradicional son insuficientes, por lo que resultan de gran interés las técnicas de propagación *in vitro*. Con el objetivo de establecer un protocolo para la aclimatación de brotes de *Vriesea* propagados *in vitro* en Sistemas de Inmersión Temporal se evaluó el efecto de la aplicación del brasinoesteroide MH5 en la supervivencia y calidad de los brotes. La integración de los resultados constituyen los procedimientos elementales para un protocolo de aclimatación de brotes de *Vriesea* propagados con el empleo de la técnica de inmersión temporal.

**Palabras claves:** bromelias, reguladores del crecimiento, ornamentales.

## ABSTRACT

Bromeliads are very attractive ornamental plants because of their leaves coloration and the beautiful of its inflorescence. Among these plants, the *Vrieseas* is a genere of great commercial interest. When we wish to introduce new hybrids in the trade market, the technique of traditional propagation are limited, for its the technique of *in vitro* propagation have great interest. With the aim of stablishing an *in vitro* aclimatization protocol of *Vriesea* shoots propagation in the Temporary Immersion System, the effect of brassinosteroids MH5 were evaluated for the survival and quality of shoots. The integration of these results are the elemental procedure for an *in vitro* aclimatization protocol of *Vriesea* shoots propagation with the use of temporary immersion technique.

**Key words:** bromeliads, growth regulators, ornamentals.

## INTRODUCCIÓN

Las Bromelias se propagan de forma tanto natural a través de la vía sexual como de la asexual, pero ambas vías presentan problemas.

El desarrollo de las técnicas de micropropagación ha tenido resultados altamente ventajosos en la propagación rápida y con calidad de genotipos élitos. Los protocolos de propagación *in vitro* de las Bromelias se han establecidos a partir del cultivo de ápices, yemas axilares y explantes de hojas provenientes de plantas adultas (Pierik y Sprenkles, 1991), del cultivo de plantas a partir de la germinación de las semillas *in vitro* (Mercier y Kerbaudy, 1997; Alves y Guerra, 2001), y por la formación de yemas adventicias a partir de la parte basal de las hojas removidas de cultivos asépticos (Carneiro *et al.*, 1999). Todos estos protocolos presentan como desventajas los bajos coeficientes de multiplicación, el alto costo de la mano de obra y la escasa posibilidad de automatización.

Los Brasinoesteroides (BRAS) son un grupo natural de esteroides polihidroxilados que fueron originalmente aislados del polen de *Brassica napus* (L.) en 1979 (Creelman y Mullet, 1997). Se caracterizan por producir la estimulación del crecimiento vegetal, el aumento de los rendimientos y la producción de biomasa en diferentes cultivos y el aceleramiento de la maduración de la cosecha, además de atenuar los efectos del estrés ambiental (Núñez, 1999; González-Olmedo *et al.*, 2005b).

Los brasinosteroides como reguladores del crecimiento en vegetales son capaces de influir en diferentes procesos fisiológicos a muy bajas concentraciones, por lo que ha sido de gran interés científico-técnico el empleo de análogos de brasinoesteroides en la Biotecnología vegetal cubana, por sus efectos sobre la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y el reproductivo (Núñez y Robaina, 2000).

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar diferentes concentraciones de brasinoesteroide MH5 en la aclimatación de brotes de *Vriesea*

Recibido: Enero, 2009. Aceptado: Marzo, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en Ciencia y Tecnología 3: 29-33. 2009.

propagados *in vitro*, en Sistemas de Inmersión Temporal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Plantas cultivadas *in vitro* de un híbrido de *Vriesea*, Bromelia Ornamental, proveniente del Laboratorio Comercial SBW de Holanda. Se utilizaron grupos de 2-3 brotes, las hojas de los brotes se removieron y se cortaron a una altura de 1.5 cm desde la base.

El medio de cultivo fue el MS modificado. Para todos los experimentos, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 previo la esterilización por autoclave, la temperatura de esterilización fue 121 °C y una presión de 118 kPa. El tiempo de esterilización estuvo en correspondencia con el volumen de medio que se empleó en cada caso.

Se emplearon los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) previamente descritos por Escalona *et al.*, (1999). Las condiciones del cultivo en el estante de inmersión temporal fueron de  $25 \pm 1$  °C de temperatura, un flujo de Fotones Fotosintéticos de 30-40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y un foto período de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Como indicadores de calidad se evaluaron la coloración de los brotes, altura de los brotes, número de hojas por brote, número de raíces por brote, así como la masa fresca y la masa seca. Para la determinación de la masa seca los brotes se colocaron durante 72 horas a 70 °C en estufa de convección (HSA) hasta llegar a un peso constante.

### Efecto de la aplicación del análogo del Brasiñoesteroides (MH5) en la supervivencia y en los indicadores morfológicos de calidad de las plantas, durante la aclimatización de los brotes de *Vriesea*

Para desarrollar este experimento se emplearon brotes de *Vriesea* proliferados y desarrollados según las condiciones experimentales establecidas anteriormente. Se emplearon SIT de 1500 ml de capacidad y el volumen de medio de cultivo por explante fue de 42.8 ml. Al finalizar la fase de crecimiento en el medio MS todos los brotes se agruparon y se clasificaron en competentes (brotes mayores de 3 cm) y no competentes (menores de 3 cm), solo pasaron a la fase de aclimatización los brotes mayores de 3 cm de longitud.

Como sustrato se empleó una mezcla de zeolita + fibra de coco en una proporción (1:1, v:v) en bandejas de 144 huecos (52.5 (L) x 29.5 (A) x 4 (A) cm) y se colocaron en una cámara de crecimiento. Con el

empleo de un sistema automático de riego se logró una humedad relativa promedio de 85 %. Todas las mediciones ambientales se realizaron con un equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6). La fase de aclimatización se desarrolló durante 45 días.

A todos los brotes se le aplicó polvo enraizador como inductor de la formación de raíces *ex vitro*. El polvo contenía ácido indol butírico (AIB) a una concentración de 492,12  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$

En este experimento se evaluaron diferentes concentraciones de MH5: 0.0, 0.021, 0.107 y 0.216  $\mu\text{mol}\cdot\text{litroL}^{-1}$ . El MH5 se asperjó foliarmente a los 7, 14, 28 y 45 días de crecimiento en la fase *ex vitro*.

El análogo de brasiñoesteroides MH5 es una formulación producida por el Centro de Estudios de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana, la cual tiene como ingrediente activo un análogo espiroestánico trihidroxilado de brasiñoesteroides ( $\text{C}_{27}\text{O}_6\text{H}_{42}$ , MM=462.606) en una concentración de 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ .

El experimento contó con cuatro tratamientos cada uno con tres repeticiones. En cada repetición se utilizaron 30 plantas para un total de 90 plantas por tratamiento. La supervivencia de las plantas se evaluó de forma dinámica a los 7, 14, 28 y 49 días. A los 49 días se evaluaron las siguientes variables: altura de la planta, número de hojas, número de raíces, masa fresca y masa seca.

Se utilizó el utilitario estadístico SPSS (versión 11.5 para Windows). Para el procesamiento estadístico de los datos se emplearon pruebas paramétricas y no paramétricas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la aplicación del análogo de Brasiñoesteroides (MH5) en la supervivencia y en los indicadores morfológicos de calidad de las plantas en la aclimatización de los brotes de *Vriesea*

En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de supervivencia de las plantas de *Vriesea* durante los 49 días de crecimiento en la fase de aclimatización. A partir de los catorce días comienza a declinar este indicador y los niveles más bajos de supervivencia se presentaron al final de la evaluación. A los 28 y 49 días se encontraron diferencias significativas entre la supervivencia de las plantas que se les aplicó el MH5 y el control sin aplicación de este regulador. Los porcentajes más bajos (66 %) lo presentaron las plantas que no recibieron la aplicación del análogo de brasiñoesteroides al finalizar esta fase.

**Cuadro 1: Efectos de las aplicaciones del análogo de brasinoesteroides MH5 sobre la supervivencia de plantas de *Vriesea* durante los 49 días en la fase de aclimatización.**

| Concentración de MH5<br>( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) | Supervivencia (%) |         |         |          |
|--|-------------------|---------|---------|----------|
|  | 7 días            | 14 días | 28 días | 49 días. |
| 0  | 100               | 97      | 87.00 b | 66.00 b  |
| 0.021  | 100               | 98      | 96.00 a | 88.00 a  |
| 0.107  | 100               | 97      | 92.00 a | 84.00 a  |
| 0.216  | 100               | 99      | 95.00 a | 87.00 a  |
| ES   | 0                 | 7.32    | 7.84    | 8.16     |
| Significación.                                     | NS                | NS      | *       | *        |

Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas para un grado de confiabilidad del 5 % para la prueba de Student-Newman-Keuls. (n=3)

Al analizar los indicadores de calidad de las plantas a los 49 días de la aclimatización se observó un aumento significativo en el número de raíces y hojas de los brotes en los tratamientos donde se aplicó el MH5. La mayor concentración de brasinoesteroides provocó un aumento significativo de la masa fresca de los brotes

en comparación con el valor alcanzado por este indicador en los grupos control y MH5 0.021  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Con relación a la longitud de los brotes y la masa seca no se encontraron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos (Cuadro 2).

**Cuadro 2: Efecto de las aplicaciones del análogo de brasinoesteroides MH5 sobre la calidad morfológica de los brotes de *Vriesea* a los 49 días de la fase de aclimatización.**

| Concentración de MH5<br>( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) | Longitud/<br>brote | Número de<br>raíces/brote | Número de<br>hojas/brote | Masa fresca/<br>brote (g) | Masa seca/<br>brote (g) |
|--|--------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 0  | 5.16               | 1.89 b                    | 11.3 b                   | 0.39 b                    | 0.03                    |
| 0.021  | 5.04               | 3.06 a                    | 11.9 ab                  | 0.34 b                    | 0.04                    |
| 0.107  | 5.05               | 2.62 a                    | 12.1 ab                  | 0.42 ab                   | 0.04                    |
| 0.216  | 5.36               | 3.00 a                    | 12.7 a                   | 0.50 a                    | 0.04                    |
| ES   | 0.08               | 0.09                      | 0.15                     | 0.01                      | 0.001                   |
| Significación                                      | NS                 | *                         | *                        | *                         | NS                      |

Medias con letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas para un grado de confiabilidad del 5% para la prueba de Tukey (n=30).

La transición desde el cultivo *in vitro* a la casa de cultivo es la fase final de cada esquema en la micropropagación. En el cultivo *in vitro* el ambiente se caracteriza por una alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, limitado intercambio de gases, exposición a una fuente externa de carbono y por lo general altos niveles hormonales. Todos estos factores conducen a cambios estructurales y funcionales en la fisiología de las plantas. En las primeras semanas después de la transferencia al ambiente *ex vitro*, las plantas deben adaptarse a nuevas condiciones de crecimiento y tienen que desarrollar

una fisiología normal y funcional del sistema radical (Debergh *et al.*, 2000).

Para acelerar el proceso de aclimatización de las *Vrieseas* se utilizó el enraizamiento *ex vitro* con el empleo de polvo enraizador. Aunque en la micropropagación el enraizamiento *in vitro* es una práctica común, se ha podido comprobar que en general las raíces durante esta etapa son poco funcionales y tienen poca influencia en la aclimatización (Daquinta, 1998; Preece y Sutter, 1991).

Para evaluar el nivel de supervivencia de las

plantas de *Vriesea* provenientes de la inmersión temporal se empleó como sustrato una mezcla de zeolita + fibra de coco con el objetivo de facilitar la aireación del entorno radical y favorecer la diferenciación de las raíces. La presencia de oxígeno en esta zona es un factor importante para la diferenciación y posterior emisión de las mismas. Por lo general las *Bromeliaceae* son muy sensibles a la falta de aireación en el sustrato (Baensch y Baensch, 1996).

A los 49 días de la aclimatización todos los tratamientos mostraron la presencia de raíces, lo cual apoya el efecto positivo que jugó la aplicación del polvo enraizador sobre esta variable morfológica.

Las plantas cuando van a la aclimatización *ex vitro*, presentan problemas de desecación debido a la pérdida de agua foliar y a la toma restringida de la misma por la incapacidad de las raíces en los primeros momentos. Esta es una de las principales causas de muerte de las plantas cuando se trasladan a condiciones *ex vitro* (Preece y Sutter, 1991).

En el proceso de aclimatización de las plántulas de *Vriesea*, las primeras muertes se detectaron a partir de los 28 días. Esta evidencia de adaptabilidad durante los primeros momentos de la salida *ex vitro*, presumiblemente se debe a la alta capacidad de almacenaje de agua y una mayor eficiencia en la utilización de la misma, característica fisiológica importante en la familia *Bromeliaceae* (Medina *et al.*, 1989).

Por otra parte, las plantas que fueron asperjadas con MH5 mostraron la menor mortalidad. Esto pudiera estar relacionado con las propiedades anti-estrés de este regulador. Entre las diversas funciones que se le reconocen a los brasinoesteroides, están el aumento de la resistencia a las plagas y enfermedades y a diferentes factores de estrés como la alta salinidad, sequía, bajas y altas temperaturas y agentes químicos agresivos como plaguicidas y herbicidas (Sasse, 1997). La aplicación del análogo de brasinoesteroides MH5 a la concentración de  $0.216 \mu\text{mol.L}^{-1}$  anuló el porcentaje de plantas de banano FHIA-18 con manchas en las hojas como consecuencia del estrés térmico a que estuvieron expuestas (González-Olmedo *et al.*, 2005a). Tanto es esta especie como en piña se demostró el efecto antiestresante de MH5 por la reducción de los contenidos de prolina libre (González-Olmedo *et al.*, 2005 b), probablemente en *Vriesea* indujo similares efectos que contribuyeron a los incrementos de la supervivencia de las plantas.

La aparición de plantas muertas al final de la etapa de aclimatización (49 días) pudiera estar relacionada con la inanición de las mismas por agotamiento de nutrientes en el sustrato u otras condiciones necesarias a manipular en esta fase como son los niveles de luminosidad, temperatura, humedad relativa y fotoperíodo. Es evidente que la presencia de raíces a los 49 días debe

garantizar la completa adaptabilidad de estas plantas a las condiciones de exteriores, por lo que la muerte por causa de estrés debe ser descartado. Es por ello que el proceso de aclimatización de estas plantas requiere de estudios posteriores con vistas a mejorarlo.

La aplicación de MH5 a las tres concentraciones que se ensayó, estimuló la formación de raíces y el número de hojas de las plantas de *Vriesea*, lo cual presupone un efecto sinérgico o aditivo con las auxinas en dicho proceso. En plántulas de banano FHIA-18 provenientes del cultivo *in vitro* y expuestas a estrés térmico por altas y bajas temperaturas, la aplicación del MH5 a la concentración de  $0.216 \mu\text{mol.L}^{-1}$  aumentó significativamente el número de hojas, la altura, y la masa fresca y no tuvo ningún efecto en el número de raíces (González-Olmedo *et al.*, 2005a).

Los brasinosteroides promovieron el enraizamiento en tallos clonados de *Matricaria chamomilla*, en cortes de hipocotilo de soya, en posturas trasplantadas de *Pinus radiata* y en posturas o plantas de remolacha, trigo, maíz, tabaco y arroz. Además el tratamiento de cortes de *Picea abies* con (22S, 23S)-28-homobrasinólido aceleró la formación de raíces adventicias (Ronsch *et al.*, 1993). Bishop y Yokota, (2001) informaron que los brasinoesteroides están involucrados en el gravitofismo de la raíz de una forma dependiente con el ácido indol acético.

Los brasinoesteroides están involucrados en los procesos de alargamiento celular a través de sus efectos sobre la expresión de genes y/o la actividad de enzimas (Khrupach *et al.*, 2000). Estos compuestos actúan de manera sinérgica con las auxinas y aditivamente con giberelinas (Katsumi, 1985). También se acepta sinergismo o efectos aditivos entre los brasinoesteroides exógenos y otras hormonas de las plantas tales como las auxinas, giberelinas, citoquininas, ABA y etileno, principalmente en experimentos de elongación (Piqueras y Debergh, 1999).

Los cambios que se inducen en el crecimiento y desarrollo de las plantas por la aplicación de los brasinoesteroides son el resultado de una cascada de eventos bioquímicos, los cuales pueden ser iniciados directamente sobre el genoma o a través de rutas que no impliquen la acción directa de los genes. Ambas vías asumen la participación de un sistema de mensajeros secundarios: una importante característica es la capacidad que tienen estos compuestos de actuar a extremadamente bajas concentraciones (Khrupach *et al.*, 2000). También en este experimento la dosis más baja de las ensayadas estimuló buenos resultados, en especial en la supervivencia y el follaje.

Por los resultados de este experimento es importante destacar que en el proceso de aclimatización de las plantas de *Vriesea* provenientes del cultivo en

inmersión temporal, la aplicación de auxinas (polvo enraizador) y del brasinosterioide MH5 promovió la calidad morfológica de las mismas, lo cual se tradujo en un mayor número de raíces, número de hojas y masa fresca de los brotes. Se ha informado que las especies del género *Vriesea* en su hábitat natural son de muy lento crecimiento y desarrollo de allí que se requieran períodos de evaluación más prolongados. Los indicadores de calidad antes mencionados sin duda deben garantizar un adecuado proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas cuando las condiciones propias de aclimatización sean establecidas.

#### CONCLUSIÓN

En el proceso de aclimatización de las plantas de *Vriesea* provenientes de SIT, la aplicación de auxinas (polvo enraizador) y del brasinoesteroide MH5 promovió la calidad morfológica de las mismas, lo cual se tradujo en un mayor número de raíces, número de hojas y masa fresca de los brotes.

#### LITERATURA CITADA

- Alves, M.; Guerra, P. 2001. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea firburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society* 51(5): 202-212.
- Baensch, U.; Baensch, U. 1996. Bromeliáceas en Flor. Tropic Beauty Publishers pp 236-245.
- Bishop, G. J.; Yokota, T. 2001. *Plant Cell Physiol.* 42(2): 114-121.
- Carneiro, L. A.; Arujo, R. F.; Brito, G. J. M.; Fonseca, M. H. P. B.; Costa, A.; Crocomo, O. J. Y.; Mansur, E. 1999. *In vitro* regeneration from leaf of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smit, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 79-83.
- Creelman, R. A.; Mollet, J. E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 48: 355-381.
- Daquinta, M. 1998. Propagación *in vitro* de la piña *Ananas comosus* (L) Merr. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. 99 p.
- Debergh, P. C.; Topoonyanont.; Van Huylenbroeck, J.; Moreira da Silva H. ; Oyaert, E. 2000. Preparation of microplants for *ex vitro* establishment. Proceeding of the internacional Symposium on methods and markers for quality assurance in micropropagation. *Acta Horticulturae* 530.
- Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; González, B.; Daquinta, M.; González J L, Dejardins, Y, Borroto, C. G. 1999. Pineapple *Ananas comosus* (L). Merr micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18(9): 723-748.
- Gonzalez-Olmedo, J. L.; Fundora, Z., Molina, L. A., Abdunour, J.; Desjardanis, Y.; Escalona, M. 2005a. New contributions to propagation of pineapple *Ananas comosus* (L) Merr in temporary immersion bioreactors. *In vitro Cell, Dev. Biol.Plant.*
- González-Olmedo, J. L.; Córdoba, A. ; Aragón, C. E.; Pina. D.; Rivas, M.; Rodríguez, R. 2005b. Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plántulas de FHIA-18 expuestas a un estrés térmico. *Infomusa* 14(1): 18-23.
- Katsumi, M. 1985. Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA3 in the elongation of cucumber hypocotyls sections. *Plant Cell Physiology* 26: 615-625.
- Khripach, V.; Zhabins, K. Z. ; Groot, A. 2000. Botanical Briefing. *Annals of Botany.* 86: 441-447.
- Medina, E.; Olivares, E.; Díaz, M.; Van der Merwe, N. 1989. Metabolismo ácido de crasuláceas en bosques húmedos tropicales. *Monographs in Systematic Botany (Missouri Botanical Garden)* 27: 56-67.
- Mercier, H; Kerbauy, G. B. 1997. Micropragation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). In: Y.P.S. Bajaj (ed) . *Biotechnology in Agricultura and Forestry*, vol. 40: High-Tech. and Micropropagation VI. Springer Verlag. Pp 43-57.
- Nuñez, M. 1999. Aplicaciones practicas de los brasinoesteroides y sus análogos en la Agricultura. *Cultivos Tropicales* 20 (3): 63-72.
- Nuñez, M.; Robaina C M. 2000. Brasinoesteroides. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas en la agricultura. IAC. Campinas. Pp.83.
- Pierik, R. L. M; Sprenkels, P. A. 1991. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. *Journal of the Bromeliad Society* 41: 9-12.
- Piqueras, A.; Debergh, P. 1999. Morphogenesis in micropropagation chapter 15. Morphogenesis in plant tissue culture. Kluwer Academic Publisher. pp 443-462.
- Preece, J. E; Sutter, E. G. 1991. Acclimatizacion in micropropagate plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C. Zimmerman (eds). *Micropropagation Technology ang Applications*. Kluwer Academic Publisher. pp 71-93.
- Ronsch, H. 1993. Influence of 22S, homobrassinoides on rooting capacity and survival of adult Norway Spruce cuttings. *Tree Physiology* 12: 71-80.
- Sasse, J. M. 1997. Recent progress in brassinosteroids research. *Physiol. Plant.* 100: 696-701.