

República de Cuba

Universidad "Carlos Rafael Rodríguez"

Facultad de Ingeniería mecánica. Dpto. de Agronomía.

Efecto del Biobrás-16 y el Fitomás en el Tomate
(*Lycopersicon esculentum*, Mill) de crecimiento
indeterminado, en casas de cultivo protegido.

Por

Autor: Javier Pulido Vega.

Tutor: DraC. Rafaela Soto Ortiz

Cienfuegos. 2009

"Año del 50 Aniversario del Triunfo de la Revolución"

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a, La Revolución por darnos esta oportunidad, única en el Mundo.

A todos los que con sus modestos esfuerzos me han ayudado y apoyado en los momentos difíciles.

A mis amigos que tanto me han ayudado en el desarrollo de este trabajo.

A mi tutor DraC. Rafaela Soto Ortiz, que me ha guiado en el camino de la investigación.

A todos los profesores que contribuyeron a mi enseñanza.

A mis compañeros de carrera por compartir todos estos años de estudio.

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres y demás familiares por su incondicionalidad.

A mi esposa y mis hijos por ser la principal razón de existir.

A todos mis amigos que me aprecian, estiman y que siempre me han apoyado incondicionalmente.

A todos los que de una forma u otra les pueda servir este trabajo Parnu realización futura.

SÍNTESIS

Con el objetivo de evaluar el efecto que ejercen el Biobrás-16 y Fitomás sobre el tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), se realizó un experimento en la Granja Agropecuaria Espartaco de la Provincia de Cienfuegos durante la época de invierno 2008-2009 bajo una instalación protegida. El ensayo fue conducido mediante un diseño completamente al azar con 20 réplicas por tratamiento. Se evaluaron en cada unidad experimental las siguientes variables: altura, diámetro, número de racimos, de flores y frutos, número de hojas, porcentaje de flores abortadas, cantidad de frutos, masa y calidad de los mismos, así como rendimientos estimados por tratamiento. Los mejores resultados se alcanzaron con la aplicación de $0,1 \text{ ml.L}^{-1}$ de Biobrás- 16 y el Fitomás. La variable número de frutos de calidad 1 fue la determinante en el resultado final.

Palabras clave: Biobrás-16, Fitomás, tomate, cultivo protegido

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.3.	Problema de Investigación	3
1.4.	Objetivo General.....	3
1.4.1.	Objetivos específicos	4
1.5.	Hipótesis de la Investigación	4
2.	DESARROLLO.....	5
2.1.	Revisión Bibliográfica.....	5
2.1.1.	Importancia Económica y nutricional.....	5
2.1.1.1	Situación taxonómica.....	5
2.1.2	Brasinoesteroides.....	6
2.1.3	Características estructurales, identificación y distribución en el reino Animal	9
2.1.4	Aislamiento e identificación.....	11
2.1.5	Distribución en el Reino Vegetal.....	11
2.1.6	Análogos de Brasinoesteroides.....	11
2.1.7	Biosíntesis.....	12
2.1.7.1	Mutantes biosintéticos de Brasinoesteroides.....	12
2.1.7.2	Metabolismo.....	13
2.1.8	Bioensayo y relación estructura-actividad.....	15

2.1.9 Interacción con otras hormonas vegetales.....	17
2.1.10 Respuesta fisiológica a los Brasinoesteroides.....	19
2.1.11 Efectos fisiológicos sobre el crecimiento vegetal.....	20
2.1.12 Otros efectos fisiológicos.....	25
2.1.13 Efectos sobre el metabolismo de las plantas.....	27
2.1.14 Efectos sobre el estrés.....	28
2.1.15 Aplicaciones prácticas en la Agricultura.....	30
2.1.16 Aplicaciones prácticas de Análogos de Brasinoesteroides.....	31
2.1.17 Fitomás: Aplicación y efectos.....	35
2.1.17.1 Momentos de aplicación.....	36
2.1.17.2 Efectos del Fitomás en algunos cultivos.....	36
2.1.18 Problemas de uso práctico.....	37
2.2. Materiales y métodos.....	39
2.2.1 Momentos de la aplicación de Biobras-16 y de l Fitomás.....	40
2.3. Resultados y discusión.....	42
2.3.1 Efectos de los tratamientos sobre la altura, diámetro, número de hojas y racimos de flores por planta.....	43
2.3.2 Efectos de los tratamientos sobre el número de racimos de frutos por planta, porcentaje de flores abortadas y numero de frutos totales por planta.....	44
2.3.3 Efecto acumulativo de las aplicaciones de Biobras-16 y el Fitomás sobre la cantidad, calidad de los frutos, masa de los frutos por planta y rendimientos estimados.....	45
2.4. Análisis económico.....	48
3. CONCLUSIONES.....	50

4.	RECOMENDACIONES	51
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
6.	Anexos	

1. INTRODUCCIÓN

La producción y consumo de hortalizas frescas a nivel mundial cobra cada día más fuerza, debido al papel que desempeñan las hortalizas y vegetales en la dieta diaria y familiar, por sus riquezas en vitaminas, sales minerales y fibras, así como sus excelentes cualidades gustativas que mejoran el apetito y ayudan a la digestión de los alimentos (Gómez y Casanova, 2003).

Entre las hortalizas más importantes del mundo encontramos al tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) perteneciente a la familia de las *Solanáceas* que es una planta nativa de América Tropical continental, cultivada en todas las regiones templadas y tropicales del mundo. En Cuba se le encuentra en terrenos yermos y cultivables por toda la isla (Pérez, N. y L Vaquez, 2004).

La producción mundial de tomate (tanto fresco como procesado) alcanzó en el año 2005 (cita FAO 2009), un crecimiento del 291% sobre el total producido en el año 1965. En el mismo periodo (1965-2005) el rendimiento promedio mundial del tomate por unidad de superficie se incremento un 64%, llegando a las 36 toneladas por hectárea. La mayor parte del incremento de la producción se concentró en Asia, región que participó con un 50% de la producción global en el 2002. De hecho China es el mayor exportador con el 85% de su producción total, rubro que ha crecido a una tasa del 33% anual en el periodo 1996-2006.

En Cuba se han realizado numerosos esfuerzos por intensificar la producción del tomate por la importancia que éste tiene, tanto en la dieta familiar, como por constituir una alternativa viable para la sustitución de importaciones.

Según, Pozo y Coll. (1998) existe en el mundo la necesidad de intensificar los cultivos mediante la elevación del potencial fisiológico de las plantas, donde paralelamente cobra fuerza el empleo de una Producción Agropecuaria ecológica la que busca excluir el uso indiscriminado, en gran escala, de sustancias químicas contaminantes (tanto de las cosechas, como de los suelos, aguas y medio circundante en general), para elevar los rendimientos, el control

de plagas y enfermedades, debido a los daños que estos productos ocasionan en la salud humana y en el equilibrio ecológico natural.

Esta situación adversa ha encaminado las investigaciones entre otras alternativas a la obtención de productos bioactivos, los que ejercen diversos efectos beneficiosos en las plantas, tales como, la inducción de mecanismos defensivos y la estimulación del crecimiento vegetal, además de tener la ventaja de no ser dañinos a las plantas ni al medio ambiente (Corbera, 1999).

En esta perspectiva, el empleo de sustancias esteroides inocuas, análogas a las originalmente designadas como brasinólidos, podrán ocupar un lugar importante, teniendo en cuenta que se trata de compuestos naturales o muy cercanos a los mismos, en lo que a estructura molecular concierne.

El uso de bioestimulantes se incrementa gradualmente en la agricultura nacional, al punto que en la actualidad su aplicación se ha hecho frecuente y casi imprescindible en muchos huertos, frutales, así como en el cultivo de hortalizas y otros. (Casanova *et al.*, 2002)

Los brasinoeteroides son una variedad de productos semisintéticos obtenidos a partir de fuentes naturales, cuyo común denominador es que contienen principios activos, que actúan sobre la fisiología de las plantas, que aumentan su desarrollo, mejoran su productividad en la calidad del fruto, contribuyendo a mejorar la resistencia de las especies vegetales, ante diversas enfermedades (Díaz, 1995).

Los brasinoeteroides han sido probados para evaluar su actividad promotora del crecimiento vegetal en múltiples bioensayos. En el caso del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) se ha encontrado cierto incremento en los rendimientos (Núñez, 1995a).

Entre estos productos se encuentra el Biobrás-16 que es una formulación líquida que tiene como principio activo un análogo de Brasinoesteroides sintetizado en Cuba. El mismo posee las características generales de incrementar los rendimientos, aumentar la calidad de las cosechas, incrementar la resistencia de

los cultivos a estrés ambiental, no producir daños fisiológicos sobre el material vegetal además de no ser un producto tóxico. Puede sustituir, en diversos procesos, a varias de las fitohormonas conocidas. Se ha podido comprobar que cuando se aplica en plantas jóvenes acelera notablemente el crecimiento de las mismas e incrementa el área foliar, obteniéndose plantas más robustas y resistentes (Núñez, 1998).

Entre otros productos, con efecto similar a los anteriormente señalados, se encuentra el Fitomás considerado como un producto biorregulador antiestrés que estimula y vigoriza las plantas desde la germinación hasta la fructificación (Hernández, 2003), producido por el Instituto Cubano de investigación de los derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

El surgimiento de la tecnología de cultivo protegido ha permitido obtener rendimientos en el tomate de 120 t/ha en la campaña de invierno, mientras que en la de primavera alcanza valores entre 60 y 90 t/ha. (Casanova, *et al.* 2002)

Sin embargo; en las casas de cultivo protegido de la Granja Agropecuaria Espartaco de la Provincia de Cienfuegos, no se han explotado las potencialidades del Biobrás – 16 y las del Fitomás, para el incremento de los rendimientos en las hortalizas, particularmente en el tomate.

Por todo lo expuesto anteriormente se plantea el siguiente:

1.2 Problema de Investigación:

¿Cuál será la efectividad del Biobrás-16 y el Fitomás, en el proceso de crecimiento, floración y fructificación del tomate en las casas de cultivo protegido de la Granja Agropecuaria Espartaco, para lograr un incremento en el rendimiento de dicho cultivo?

1.2. Objetivo General:

Evaluar el efecto del Biobrás-16 y el Fitomás en el tomate de crecimiento indeterminado en las casas de cultivo protegido de la Granja Agropecuaria Espartaco.

1.2.1 Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto del Fitomás y diferentes concentraciones de Biobrás-16 en aplicaciones foliares antes, durante y después de la floración del tomate.
- Realizar un análisis de la factibilidad económica del efecto de las aplicaciones foliares del producto Biobrás-16 y el Fitomás en el tomate, bajo condiciones de cultivos protegido.

1.3 Hipótesis de la Investigación.

Con el empleo del Biobrás-16 y/o el Fitomás se estimula el proceso de crecimiento y desarrollo del tomate, lo que permitirá incrementar los rendimientos bajo condiciones de cultivo protegido en la Granja Agropecuaria Espartaco.

2. DESARROLLO

2.1 Revisión bibliográfica.

2.1.1 Importancia económica y nutricional.

El tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) es la hortaliza más importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente. En la actualidad este cultivo ha adquirido importancia económica en todo el mundo por los altos niveles de consumo y por sus requerimientos técnicos.

El valor nutritivo del tomate no es muy elevado; según un estudio realizado por Stevens (1974) sobre las principales frutas y hortalizas de EEUU, el tomate ocupa el lugar 16 en cuanto a concentración relativa de un grupo de 10 vitaminas y minerales. No obstante su popularidad, demostrada por el alto nivel de consumo, convierte a este cultivo en una de las principales fuentes de vitaminas y minerales en muchos países.

2.1.1.1 Situación taxonómica.

El tomate es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las *solanáceas*. Los miembros de esta familia presentan haces bicolaterales y una estructura floral modelo. Sus flores son radiales y con cinco estambres. El ovario, súpero, bicarpelar, contiene numerosos primordios seminales produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor. Con la domesticación y cultivo es frecuente observar flores con mayor número de pétalos y sépalos, así como ovarios multiloculares en adición al bilocular que podríamos considerar normal. Siguiendo a Hunziker (1979) la taxonomía generalmente aceptada es:

Clase: *Dicotiledóneas*

Orden: *Solanáles (personales)*

Familia: *Solanácea*

Subfamilia: *solanoideae*

Tribu: *solaneae*

Género: Especie: *Esculentum*

Posee una semilla discoidal comprimida y con embrión enrollado, de diámetro más o menos uniforme. Todos los miembros de esta subfamilia tienen el mismo número de cromosomas básico ($x = 12$). El embrión tiene los cotiledones incumbentes, con endospermo abundante. El género ***Lycopersicon*** se caracteriza por sus estambres únicos, con conectivos alargados. La situación taxonómica del tomate entre las *solanáceas* ha resultado siempre muy clara, no así su ubicación genérica.

En los fines de este décimo milenio del origen de la agricultura en que más que nunca es necesario compatibilizar el respeto al medio con las exigencias de un mercado internacional cada vez más competitivo, el uso racional de la tecnología es un reto sin precedentes. En este sentido los autores han tratado de presentar el conocimiento agronómico de una manera objetiva, mostrando un conjunto de posibilidades con sus ventajas e inconvenientes. De este modo se pueden definir distintas estrategias en función de cada situación concreta.

En las Casas de Cultivo, se confrontan problemas con el proceso de floración fructificación en el cultivo del tomate, en la época de primavera verano, debido a las condiciones climáticas prevalecientes (Núñez, 1994), es por ello que comúnmente se aplican productos de acción fisiológica, que inducen el cuaje de los frutos.

2.1.2 Brasinoesteroides.

En las décadas del treinta y del cuarenta, diversos investigadores habían reconocido la existencia de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal en extractos de polen, semillas inmaduras, etcétera. Sin embargo, no fue hasta 1970 que Mitchell *et al.*, informaron que el polen de la *Brassica napus* L. producía, en el bioensayo del segundo entrenudo del frijol, una respuesta inusual que combinaba el alargamiento celular (respuesta típica de las giberelinas) con el engrosamiento y la curvatura. Estos autores, además,

propusieron que este polen contenía un nuevo grupo de hormonas de origen lipídico denominado brasinas.

Posteriormente, Mitchell *et al.*, (1972) demostraron que las brasinas podían estimular el rendimiento y la eficiencia de los cultivos, y el vigor de las semillas.

En un esfuerzo de los investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos por aislar los constituyentes activos de esta fracción lipídica, una gran cantidad de polen de nabo recolectado por las abejas fue extraído con 2-propanol. El extracto se fraccionó entre CCL₄, CH₃OH y H₂O. La fracción metabólica que contenía la actividad biológica fue cromatografiada en una serie de columnas preparativas de sílica gel. En una purificación posterior por cromatografía de columna y HPLC se obtuvo un material cristalino, al cual se le denominó Brasinólida (BL). La brasinólida y/o sus compuestos relacionados son conocidos colectivamente como **Brasinoesteroides (BR)**.

El descubrimiento de la primera fitohormona de estructura esteroideal, la brasinólida, por Grove *et al.* (1979), fue descrito por Thompson (1982), citados por Adam y Marquardt (1986), como "quizás el descubrimiento más importante de los fisiólogos y bioquímicos vegetales desde el descubrimiento del ácido giberélico".

Estos nuevos compuestos estimularon el interés en el mundo, lo que se manifiesta en el hecho de que a pesar que fue un colectivo de investigadores norteamericanos, los autores del aislamiento e identificación de la brasinólida, cinco años después, de cien artículos científicos publicados, aproximadamente la mitad procedían de Japón.

La estructura inusual de esta familia de compuestos, las bajas concentraciones en que se encuentran en la fuente natural, su interesante actividad promotora del crecimiento vegetal y las amplias perspectivas que poseen para su aplicación en la agricultura han motivado a países como Estados Unidos, China, Japón, Rusia, Argentina, Alemania, Checoslovaquia, Canadá, Italia y Cuba entre otros, a desarrollar un intenso trabajo investigativo en las líneas siguientes:

- ❖ aislamiento y caracterización de nuevos brasinoesteroides naturales
- ❖ desarrollo de técnicas micro analíticas para la detección en la fuente natural.
- ❖ estudios de los mecanismos de acción de estos biorreguladores.
- ❖ búsqueda de nuevos efectos biológicos.
- ❖ empleo de métodos de síntesis más eficientes.
- ❖ síntesis de análogos de los brasinoesteroides naturales a partir de diferentes sustratos esferoidales.
- ❖ estudios de relación estructura-actividad de estos compuestos.
- ❖ desarrollo de bioensayos específicos para este tipo de fitohormonas.
- ❖ determinación de las condiciones óptimas de aplicación en los diferentes cultivos.

2.1.3 Características estructurales, identificación y distribución en el reino vegetal

La elucidación de la estructura de la brasinólida se determinó por espectroscopia y cristalografía de rayos X, y resultó ser la [(2 α , 3 α , 22R, 23R)-tetrahidroxi-24 α -metil-B-homo-7-oxa-5 α colestano-6-ona]. Esta estructura era única en poseer un metilo en C₂₄ con estereoquímica α , una función 7 oxalactona en el anillo B e hidroxilos vecinales en el anillo A (C2 α y C3 α) y en la cadena lateral (C22R y C23R) (Kim, 1991).

El desarrollo de diferentes técnicas micro analíticas basadas en la combinación de técnicas de detección, aislamiento y elucidación, ha contribuido enormemente al estudio de la identificación y caracterización estructural de un número de brasinoesteroides naturales, tales como el análisis de derivados bismetano-boronatos de brasinoesteroides por cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masa (CG-EM) (Ikekawa 1984), el análisis por HPLC de los brasinoesteroides como derivados bisboronatos (Takatsuto y Gamoh, 1990, citados por Marquardt y Adam, 1991), el análisis por radioinmunoensayo (Yokota *et al.*, 1990) y el análisis espectroscópico mediante la combinación de técnicas monodimensionales de RMN con las bidimensionales HHCOSY y HCCOSY (Porzel *et al.*, 1992).

Debido al avance tecnológico anteriormente citado, hasta el presente han sido aislados además de la brasinólida (BL), 45 brasinoesteroides de diferentes especies vegetales, 41 de ellos en forma libre y 4 conjugados (Fujioka, 1999); (Khripach, Zhabinskii y de Groot, 1999).

2.1.4 Aislamiento e identificación.

La propia historia del descubrimiento de la BL, el primer miembro de esta familia, es un ejemplo de lo complejo y laborioso que resulta el aislamiento e identificación de este tipo de compuestos, debido a las pequeñas concentraciones en que los mismos se encuentran en la fuente vegetal. En los procedimientos utilizados con este fin se involucran diferentes técnicas de extracción y purificación cromatográficas, conjuntamente con el monitoreo de la actividad biológica con bioensayos específicos y sensibles (Wada et al., 1981) y el análisis de las fracciones seleccionadas por CG-EM (Takatsuto e Ikekawa, 1982 y Takatsuto, 1994).

2.1.5 Distribución en el reino vegetal

Desde el descubrimiento de la brasinólida y la castasterona, se han intensificado y extendido los estudios sobre el aislamiento de nuevos brasinoesteroides de fuentes vegetales y fundamentalmente los científicos japoneses han estudiado la distribución de estos compuestos en el reino vegetal.

Las evidencias sugieren que estos compuestos, al igual que las giberelinas y las auxinas, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tanto en plantas superiores como inferiores.

Takatsuto (1994) informó que los brasinoesteroides están presentes en 22 familias y 39 géneros. Además, Fujioka (1996) demostró la presencia de castasterona, 6-desoxo-castasterona, tifasterol y 6-desoxotifasterol en los tallos de *Arabidopsis thaliana*, así como Schmidt, Altmann y Adam (1997) aislaron e identificaron la 24-epibrasinólida y la castasterona de extractos de semillas de

esta misma especie. Por otra parte, Yokota, Nomura y Nakayama (1997) identificaron la castasterona, la 6-desoxocastasterona y la 28-norcastasterona en tallos de tomate.

Recientemente, Fujioka y Sakurai (1997) plantearon que los brasinoesteroides se han encontrado en 32 angiospermas, incluyendo nueve monocotiledóneas y 23 dicotiledóneas, cuatro gimnospermas, un alga y una pteridofita. Todos estos resultados sugieren que estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, al igual que las otras hormonas vegetales conocidas y que ejercen algunas funciones fisiológicas en el crecimiento y el desarrollo.

La castasterona seguida de la brasinólida son los brasinoesteroides más abundantes en las plantas que se han investigado hasta el momento.

En cuanto a la distribución de los brasinoesteroides en la planta, Adam y Marquardt (1986) destacaron que el polen es la fuente más rica de estos compuestos, con cantidades que oscilan entre 10-100 mg/kg; las semillas inmaduras también tienen altos contenidos (1-100 mg/kg), mientras que las hojas y los tallos poseen niveles inferiores (10-100 mg/kg).

Por otra parte, Yokota y Nakayama (1992), citados por Takatsuto (1994) detectaron la presencia de sustancias bioactivas similares a los brasinoesteroides tipo cetonas (tipo castasterona) en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*), en raíces de zanahoria (*Daucus carota*) y en raíces tuberosas de boniato (*Ipomoea batatas*). Otro tejido interesante es la agalla provocada por insectos. Las agallas de *Castanea crenata* y *Distylium racemosum* tienen niveles superiores de brasinoesteroides que los tejidos normales (Arima, Yokota y Takahashi, 1984 e Ikekawa, 1984). También, las células de crown gall (agallas de corona o cáncer vegetal) tipo nopalina en *Catharanthus roseus* tienen contenidos superiores de brasinólida y castasterona (30-40 mg/kg) que las células normales (García, 1998).

También, es conocido que en tejidos vegetales, los jóvenes en crecimiento poseen contenidos superiores de brasinoesteroides que los viejos. Por otra parte, se conoce que en el polen de *Thea sinensis* y *Lillium longiflorum*, la

actividad biológica, evaluada a través del bioensayo de inclinación de la lámina de arroz, incrementó a medida que el polen maduraba y alcanzó un valor máximo, inmediatamente antes de la antesis, para disminuir después de ésta. Esto sugiere la posibilidad de que estos compuestos ejerzan un papel importante en la regulación del crecimiento regenerativo (Takatsuto, 1994). En cuanto a la localización intracelular de los brasinoesteroides, se ha indicado que los plastidios son organelos importantes para estos compuestos. El estroma puede ser el sitio de síntesis mientras que los gránulos de almidón se asumen como sitios de almacenaje de estos potentes reguladores del crecimiento (Gross y Parthier, 1994).

2.1.6 Análogos de brasinoesteroides.

Si bien es cierto que el término análogo se aplica a compuestos con estructura y actividad biológica similar a los compuestos naturales que han sido aislados, en el caso de los esteroides y en particular para los BR debe tenerse en cuenta que:

- Algunos análogos muestran un tipo determinado de actividad similar o superior al compuesto natural.
- Varios análogos son obtenidos como subproductos de la síntesis química y a veces en igual o mayor proporción que el compuesto deseado.
- Determinados compuestos son primeramente considerados como análogos y estudios posteriores constatan que se encuentran presentes en fuentes naturales.

Todas estas consideraciones son elementos positivos en la futura aplicación práctica de los denominados análogos de estos compuestos. Por otra parte, los análogos son elementos importantes en los estudios de relación estructura-actividad, biosíntesis y metabolismo de los compuestos naturales, entre otros.

En general, los análogos de BR pueden ser divididos en 3 grandes grupos:

- Análogos de cadena lateral.
- Análogos del núcleo esteroide.

- Análogos con modificaciones tanto en el núcleo esteroidal como en la cadena lateral.

2.1.7 Biosíntesis.

2.1.7.1 Mutantes biosintéticos de brasinoesteroides

Se han identificado un número de mutantes de la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, que se conocen como det (des-etiolado) y cop (fotomorfogénesis constitutivo), que muestran características de plantas crecidas a la luz aún cuando crecen en la oscuridad. Estos mutantes cuando crecen en la luz tienen un fenotipo extremadamente enano con hojas de color verde intenso, fertilidad masculina reducida, dominancia apical y floración retardada. Dentro de los mutantes, recientemente se han caracterizado el DET 2 y cpd como deficientes en la biosíntesis de brasinoesteroides (Clouse, *et. al.*, 1996).

Además de *Arabidopsis*, también se caracterizó un mutante de guisante deficiente de brasinoesteroides. El fenotipo de estos mutantes se restablece cuando se aplica brasinólida de forma exógena, mientras que otras hormonas vegetales como el AIA y las giberelinas no tuvieron efectos. Estos resultados indican que los brasinoesteroides tienen funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Clouse, 1996) y además facilita los estudios de la biosíntesis sobre una base molecular.

Chory, Nagpal y Peto (1991) identificaron un mutante recesivo de DET 2 como uno de los mutantes desetioldados de *Arabidopsis*. Las mutaciones del gen pleiotrópico DET2 provocan defectos, tales como la inhibición del crecimiento del hipocotilo, la expansión del cotiledón, la iniciación de la hoja primaria y la acumulación de antocianinas también como la desrepresión de la expresión de genes regulados por la luz en plantas crecidas en la oscuridad. (Li y Chory, 1996) analizaron la secuencia del gen DET2 y encontraron una estrecha similitud con la 5 α -reductasa de los esteroides de los mamíferos que catalizan la reducción NADPH-dependiente de testosterona a deshidrotestosterona; se demostró posteriormente que el DET2 es un ortólogo de estas enzimas animales

(Li y Chory, 1997). Otro mutante identificado en *Arabidopsis* que mostró un fenotipo similar al *det2* fue el *cpd* (foto morfogénesis constitutiva y enanismo) aunque ellos no fueron alélicos.

Szekeres, (1996) clonó el gen CPD y encontró que éste codifica dominios conservados de la monooxigenasa del citocromo P450, mostrando similitud con hidroxilasas esteroidales y el producto del gen CPD fue asignado a una nueva familia P450, la CYP90. Se sugirió, entonces, que el producto del gen CPD estaba involucrado en un cierto paso de hidroxilación en la biosíntesis de los brasinoesteroides.

Así, la aplicación exógena de intermediarios biosintéticos al mutante *cpd* demostró que éste era bloqueado en el paso de hidroxilación del C₂₃ de castasterona a teasterona, catalizado por una monooxigenasa del citocromo P450.

2.1.7.2 Metabolismo

En cuanto al metabolismo, Yokota *et al.* (1992) informaron que cuando se suministró castasterona tritiada ([³H]CS) a células de "crown gall" de *Catharanthus roseus* de 12 días de edad y se incubaron por dos días, se detectó tanto en las células como en el medio un pico radioactivo de brasinólida, lo que reveló que estas células convierten la castasterona a brasinólida.

En posturas y explantes foliares etiolados de arroz, el suministro de [³H]CS, no condujo a la formación de brasinólida sino a la formación de metabolitos no glicosídicos; al igual que cuando se suministró brasinólida tritiada ([³H]BL) (Yokota *et al.*, 1992). Estos dos últimos ejemplos revelan que la castasterona ejerce su actividad biológica aún cuando no sea convertida en brasinólida.

Por otra parte, Schneider (1994) encontró que la 24-epibrasinólida aplicada exógenamente es convertida en 25-β-D-glucosiloxi-24-epibrasinólida por cultivos de suspensiones celulares de *Lycopersicon esculentum* y posteriormente, Hai, Schneider y Adam (1995) y Winter, (1997) reveló que éste es un proceso metabólico en dos etapas que involucran la hidroxilación de la cadena lateral en

el C₂₅ y C₂₆, respectivamente, seguido de la glucosidación de los grupos hidroxilos recién formados.

En células cultivadas de lily, el [¹⁴C] 3-miristato de teasterona fue convertido en brasinoesteroides libres tales como teasterona, castasterona y brasinólida. El polen inmaduro de lily contiene una forma conjugada de teasterona y tifasterol, mientras que el polen maduro contiene teasterona, 3-deshidroteasterona (3-oxo-teasterona), tifasterol, castasterona y brasinólida. Con la maduración los conjugados pueden ser hidrolizados para liberar brasinoesteroides libres, sugiriendo la función de la conjugación de la teasterona como una forma de almacenaje.

Schlaghaufer y Arteca (1991) en un estudio del metabolismo de los brasinoesteroides en plantas de tomate, demostraron que al suministrar [³H]BL a plántulas de 20 días de edad, en las primeras cuatro horas no hubo metabolismo aparente del compuesto; sin embargo, a las ocho horas aparecieron dos productos metabólicos y después de 24 horas se detectó un incremento sustancial del ACC (ácido aminociclopropano-1-carboxílico), precursor del etileno. Posteriormente, cuando las plantas se transfirieron a una solución que no contenía brasinólida, el contenido de ACC de los tejidos disminuyó; sin embargo, la cantidad de productos metabólicos continuó incrementando, lo que denotó que la planta metaboliza la brasinólida a formas inactivas.

El metabolismo de los brasinoesteroides tiene que incluir activación, inactivación y/o conversión a formas de almacenaje que son importantes para la comprensión de la dinámica de estos compuestos en su acción fisiológica. Se requieren, entonces, estudios posteriores para determinar si esos son o no procesos metabólicos constitutivos, ya que la mayoría de los metabolitos aún no se han detectado en las plantas.

Además, el avance en la caracterización de los mutantes serán instrumentos efectivos para el estudio de la base molecular de la biosíntesis de los brasinoesteroides. La complementación de los defectos del crecimiento en los mutantes por los brasinoesteroides debe clarificar el papel esencial de estos

compuestos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En un sentido similar, el desarrollo de inhibidores biosintéticos específicos de brasinoesteroides contribuirá a la elucidación de la acción de éstos. Las evidencias que se acumulen por los estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares, abrirán nuevos horizontes en el conocimiento de la regulación hormonal del crecimiento y desarrollo vegetal.

2.1.8 Bioensayos y relación estructura-actividad.

El primer bioensayo usado para detectar y aislar la brasinólida (BL) y los brasinoesteroides del polen y más tarde para determinar la relación estructura-actividad de los brasinoesteroides sintéticos y sus análogos fue el del segundo entrenudo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Aunque en este bioensayo las giberelinas causan sólo alargamiento del entrenudo tratado y de los superiores, los brasinoesteroides provocan tanto el alargamiento como la división celular, lo que resulta en una elongación, engrosamiento, curvatura y desdoblamiento del segundo entrenudo (Mandava, 1988).

En general, los brasinoesteroides han sido probados para evaluar su actividad promotora del crecimiento vegetal en más de 20 bioensayos típicos para la actividad de auxinas, giberelinas y citoquininas. En varios sistemas, los brasinoesteroides interactúan fuertemente de forma sinérgica con las auxinas. Por otra parte, la respuesta de los brasinoesteroides y las giberelinas parecen ser ambas independientes y aditivas. En sistemas diseñados como característicos para citoquininas, los brasinoesteroides actúan de varias formas (Marquardt y Adam, 1991). De acuerdo con esto, los brasinoesteroides pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citoquininas en otro.

La BL al igual que el GA₃ inhibió la acumulación de betacianina en posturas de *Amaranthus* y previno la iniciación de raíces adventicias en hipocotilos de frijol mungo, frijol enano y pepino; sin embargo, la aplicación de BL promovió, en lugar de retardar, la senescencia de hojas de Rumex.

De forma general, los brasinoesteroides (Mandava, 1988) producen actividad a

concentraciones mucho más bajas (nM a pM) que las efectivas para giberelinas (usualmente un rango de μM).

Es bueno destacar que, los estudios del crecimiento inducido por la BL en frijoles, han permitido enfatizar la importancia de la energía radiante y de la calidad espectral de la luz en este proceso, lo que además correlacionó con el contenido de clorofilas y la asimilación de fotosintatos. De esta forma, en posturas de **soya** y secciones de fríjol mungo, el efecto promotor del crecimiento de la brasinólida ocurre solamente en la luz, pero no en la oscuridad y la región más importante es la luz roja (660 nm, 2.6 W.cm^{-2}).

Takatsuto *et al.*, (1983) concluyeron que los requerimientos estructurales de los brasinoesteroides para las actividades promotoras del crecimiento vegetal, obtenidos por los bioensayos del **rábano** y del tomate eran más rigurosos que los obtenidos por el bioensayo de la inclinación de la lámina de arroz (*Oriza sativa* L.).

Teniendo en cuenta que en dependencia del bioensayo varía la contribución a la bioactividad de uno u otro de los requerimientos estructurales postulados cualitativamente, Carmen Brosa (1997) informó una nueva forma de definir estos sobre la base de establecer una relación cuantitativa de estructura-actividad biológica, que permita diseñar nuevos análogos y predecir su actividad biológica.

Considerando que los brasinoesteroides activos tienen una estructura tridimensional, la cual se inserta en el receptor, esta autora desarrolló un estudio sistemático de modelación molecular, con el objetivo de encontrar "la conformación activa" de cada brasinoesteroides que debe interactuar con el sitio de enlace del receptor, de cuyo análisis concluyó que la actividad biológica de los brasinoesteroides depende de la posición espacial de los átomos de oxígeno en la molécula. (Carme Brosa y Rodríguez-Santamarta, 1998; Carme Brosa, 1999).

De todo lo anterior, se puede resumir que aún queda mucho por investigar en este aspecto, para poder establecer definitivamente la relación estructura-actividad de los brasinoesteroides; y diseñar con mayor probabilidad análogos

de brasinoesteroides con una buena actividad biológica.

2.1.9 Interacción con otras hormonas vegetales.

Se ha demostrado, que a pesar de las fuertes interacciones de los brasinoesteroides con las auxinas, estos compuestos no afectan ni el metabolismo ni el transporte del AIA en la sección del primer entrenudo de *Phaseolus vulgaris* (Sakurai y Fujioka, 1993).

Zhao *et al.*, (1990), quienes han presentado algunos resultados sobre estas interacciones, concluyeron que la 24-epibrasinólida probablemente promovió el crecimiento del epicotilo del frijol mungo a través de la estimulación del nivel endógeno de AIA; la cual pudo estar asociada a la inhibición de la peroxidasa y la AIA oxidasa, enzimas relacionadas con el metabolismo del AIA.

En cuanto a la interacción de los brasinoesteroides con otras hormonas vegetales se puede plantear que Zhao Xu y Luo (1990) encontraron incrementos en los niveles endógenos de GA₃ y de ácido abscísico (ABA) en hipocotilos de pepino tratados con epibrasinólido. Después de 24 horas de tratamiento la proporción de GA₃/ABA en hipocotilos tratados fue dos veces superior a la del control. Estos autores demostraron también que los efectos del epibrasinólido y del GA₃ fueron aditivos estimulando la elongación del hipocotilo y la hidrólisis del almidón.

En ese mismo año, Zhao, Xu y Luo demostraron que el ácido abscísico contrarrestó el fuerte efecto estimulador que ejerce la 24-epibrasinólida en la senescencia de cotiledones separados de posturas de pepino.

Kurapov (1992) trató plantas de cebada al comienzo de la floración con brasinólida o 24-epibrasinólida y determinó que cuando el grano estaba en estado lechoso, los tratamientos redujeron marcadamente el contenido de ABA e incrementaron el contenido de giberelina. Además, se detectó la presencia de dihidrozeatina, ribósido de dihidrozeatina e isopentenil adenina, que estaban ausentes en las plantas controles, lo que indica cambios en el metabolismo de

las citoquininas.

Más recientemente, Gaudinová, (1995) estudió los efectos de dos brasinoesteroides en el crecimiento y contenido de auxinas y citoquininas de callos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y encontró que los dos brasinoesteroides ensayados (24-epibrasinólida, 24-epiBL y $2\alpha,3\alpha,17\beta$ -tri-hidroxi 5a-androstan-6-ona, THA-BL) tuvieron efectos diferentes en la formación de la biomasa y estos efectos estuvieron inversamente relacionados con el contenido de citoquininas endógenas, especialmente isopentenil adenina (iP) y trans-zeatina. Así, cuando suministraron al medio de cultivo 24-epiBL en concentraciones que oscilaron entre 8×10^{-9} y 5×10^{-6} M detectaron un decremento de la masa fresca de los callos y un incremento de la concentración de iP y de trans-zeatina, mientras que el otro análogo sintético estimuló el crecimiento de los callos y disminuyó la concentración de las citoquininas antes mencionadas.

Se puede especular entonces, que algunos brasinoesteroides pueden estimular la actividad de las citoquininas por inducción de la acumulación de citoquininas endógenas. Es interesante destacar, que el THA-BR que suprimió la acumulación de citoquininas en tejidos de tabaco exhibió una actividad débil como citoquinina en los bioensayos para estas hormonas de callos de tabaco y yemas de guisantes mientras que la 24-epiBL fue inactiva.

Por otra parte, Khripach y Zhabinskii (1999) informaron la influencia que diferentes brasinoesteroides ejercieron en el contenido de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA) y ribósido de zeatina (RZ) en plantas de trigo de 10 días de edad del cv. Chinese Spring y sus líneas DT. Los datos demostraron la alta especificidad de la interacción de cada brasinoesteroide con los genotipos. Así, se observó una fuerte estimulación del nivel de ABA en plantas de la línea-5B^L que fueron obtenidas de semillas tratadas con epibrasinólida y homobrasinólida (850 % y 680 % del control, respectivamente). Las plantas de la línea-5B^S también dieron una buena respuesta (363 y 298 % del control, respectivamente). Por otra parte, se registró un incremento razonable del nivel

de AIA en el euploide por la acción del tratamiento con la epibrasinólida y se encontró un incremento del nivel de RZ en las mismas plantas cuando fueron tratadas con la homobrasinólida. Se debe señalar, que un número de estas mediciones demostraron que, en este período del desarrollo de la planta, la acción de los brasinoesteroides produjo una supresión en la acumulación de las fitohormonas. La evidencia acerca de la influencia de los brasinoesteroides en la función y contenido de las otras hormonas en las plantas, sugiere que los macroefectos observados pudieran estar mediados de esta manera. Consideraciones similares crearon la base para una hipótesis acerca del papel director de los brasinoesteroides con respecto a las otras hormonas, pero esta hipótesis aún requiere confirmación.

2.1.10 Respuestas fisiológicas a los brasinoesteroides

Las respuestas a 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.

Sasse (1999) destaca que dos conceptos importantes quedaron explícitos desde el comienzo de las investigaciones sobre los efectos fisiológicos de estos potentes reguladores del crecimiento vegetal, que son: primero, que los brasinoesteroides pueden acelerar el crecimiento y la maduración de las plantas (lo que puede o no guiar a incrementos absolutos del crecimiento con el tiempo) y segundo, que los efectos inducidos por los brasinoesteroides no pueden ser considerados en forma aislada, ya que estos compuestos interactúan con otros reguladores del crecimiento vegetal endógenos y con señales ambientales, particularmente con la calidad de la luz.

Los brasinoesteroides también pueden afectar el desarrollo de insectos y hongos (Adam y Petzold 1994; Chory *et al.*, 1996 y Sasse, 1997). Los sitios de síntesis de estos compuestos en las plantas no se han elucidado aún; puede ser que todos los tejidos los produzcan, ya que los genes de transducción de señales y de la biosíntesis de los brasinoesteroides están expresados en una gama amplia

de órganos vegetales (Li y Chory, 1997) y se pueden asumir efectos a corta distancia, como se ha visto en el polen, las semillas y los cultivos de células.

Los estudios sobre la distribución de brasinoesteroides marcados aplicados exógenamente sugieren que el transporte a larga distancia es predominantemente acropetal (Yokota *et al.*, 1992 y Nishikawa *et al.*, 1994), sin embargo, no se conoce aún si su transporte a larga distancia es importante en el crecimiento y desarrollo vegetal normal.

En *Arabidopsis*, los mutantes de brasinoesteroides muestran un enanismo extremo (tan pequeños como 1/30 del tamaño del tipo silvestre) que es restablecido por la aplicación exógena de BL en los mutantes deficientes, no así en los insensibles y el examen microscópico de las células muestran que las del mutante son más cortas que las del tipo silvestre (Clouse, Langford y Mc Morris, 1996; Kauschmann 1996; Li y Chori, 1996 y Szekeres, 1996).

En *Arabidopsis* y en tomate, los mutantes muestran un fenotipo des-etiolado en el que las posturas crecidas en la oscuridad exhiben un hipocotilo corto y cotiledones abiertos, características éstas de plantas crecidas a la luz. En la luz, estos mismos mutantes muestran una morfología foliar alterada (Clouse *et al.*, 1996). De esta forma, se puede asumir que los brasinoesteroides desempeñan un papel importante en la fotomorfogénesis y en la morfogénesis foliar. Estos mutantes, generalmente, tienen fertilidad reducida o esterilidad masculina, senescencia retardada y desarrollo vascular alterado, implicando a estos compuestos en todos estos procesos del desarrollo (Clouse *et al.*, 1996).

2.1.11 Efectos fisiológicos sobre el crecimiento vegetal

Los efectos promotores de los brasinoesteroides sobre la elongación del tejido vegetativo han sido observados en muchas especies, pero solamente en pocas se han estudiado en detalle.

Sasse (1991a) plantea que el tratamiento con las hormonas vegetales reconocidas afecta la elongación inducida por la brasinólida; las giberelinas tienen un efecto aditivo y la zeatina un efecto inhibitorio. Con las auxinas hay un

sinergismo donde la brasinólida permite a éstas inducir elongación cuando solas son inefectivas. La auxina exógena afecta la cinética de la respuesta a la brasinólida; sin embargo, el sinergismo encontrado en pepino puede ser atribuido a un incremento en la amplitud de la respuesta a la auxina. Este es también el parámetro que se afecta cuando la elongación inducida por la BL en guisante es inhibida por el ABA.

Es interesante destacar que aunque tanto las auxinas como los brasinoesteroides promueven la elongación, sus cinéticas son muy diferentes; ya que generalmente las auxinas muestran un lapso de tiempo muy corto (10 a 15 min) entre la aplicación y el comienzo de la elongación, sin embargo, los brasinoesteroides tienen un lapso de al menos 45 minutos con velocidades de elongación que continúan creciendo por varias horas (Clouse *et al.*, 1992; Zurek y Clouse *et al.*, 1994 y Mayumi y Shibaoka, 1995).

En cuanto a la inhibición del efecto de los brasinoesteroides, el ethephon puede contrarrestar la elongación inducida por la BL mientras que la colchicina e inhibidores específicos de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos también son inhibidores potentes. Ellos no son inhibidores competitivos y la elongación continúa en la presencia de un inhibidor de la síntesis de ADN. Se sugiere que la síntesis y/o mantenimiento del ARNm es esencial para la elongación inducida por la BL y en segmentos senescentes de guisantes son afectadas por la BL varias bandas de proteínas en las etapas tempranas de elongación.

Sasse (1991a) también cita que en el trabajo de Sala y Sala (1985) se demostró que la BL puede imponer una morfología alargada en células en cultivo de zanahoria carentes de auxinas, pero en una planta completa, la altura final y la forma son probablemente el resultado de muchas influencias, tales como hormonas, nutrientes, estado hídrico y efectos ambientales, con interrelaciones complejas entre ellas; por lo que no es sorprendente que la mayoría de los estudios fisiológicos de los efectos de los reguladores del crecimiento vegetal, incluyendo los brasinoesteroides, se conduzcan en sistemas modelos. Estos pueden ser explantes que contienen muchos tipos de células, tales como

posturas desenraizadas, segmentos de pedúnculos, secciones de raíces u órganos más simples como coleoptilos o tubos polínicos, además del uso de cultivos de células o de protoplastos, que han resultado muy útiles.

El papel de los brasinoesteroides en el cultivo de células vegetales ha sido demostrado por varios autores. Por ejemplo, Sakurai, Fujioka y Saimoto (1991) plantearon que estos compuestos en combinación con las auxinas promueven el crecimiento de callos de varias plantas y en el cultivo de células de **zanahoria**, éstos indujeron el alargamiento celular pero no la división. Además, Bellincampi y Morpurgo (1991) demostraron que la 24-epiBL aumentó la eficiencia del plaqueo en suspensiones celulares de zanahoria a través de la estimulación del alargamiento celular y de su acción sinérgica con los factores de acondicionamiento.

Recientemente, Oh y Clouse (1998) demostraron que la brasinólida afecta la velocidad de división celular en protoplastos aislados de hojas de **Petunia hybrida**. Así, ellos encontraron que en condiciones óptimas de auxinas y citoquininas en el medio, concentraciones entre 10 y 100 nM de BL aceleró el momento de la primera división celular por 12 horas pero tuvo poco efecto sobre las frecuencias finales de división después de 72-120 horas de cultivo. Sin embargo, bajo condiciones subóptimas de auxinas, estas mismas concentraciones de BL aceleraron el momento de la primera división celular e incrementaron notablemente las frecuencias finales de división entre 72 y 120 horas; lo que motivó que los autores propusieran los protoplastos aislados como sistema modelo útil para investigar los mecanismos moleculares de acción de los brasinoesteroides en la proliferación celular.

Estos resultados contradictorios reflejan que el papel de los brasinoesteroides en la división celular no está claro y que se requiere de mucho trabajo posterior, incluyendo estudios del efecto de estos compuestos sobre los genes que controlan la división celular.

Es bueno destacar que, generalmente, la estimulación de la elongación provocada por los brasinoesteroides ocurre en la luz pero no en la oscuridad

(Mandava, 1988). Kamuro (1991) estudió la influencia de la luz en los efectos promotores del crecimiento de la brasinólida en epicotilos de frijol mungo (*Vigna radiata* L.) y encontró que la BL no ejerció efecto en la elongación en condiciones de oscuridad, luz azul monocromática y luz roja-lejana; sin embargo, en condiciones de luz blanca (400-700 nm) y luz roja monocromática (660 nm) con las cuales se retrasa normalmente el crecimiento, se observó claramente el efecto de este compuesto.

Estos resultados indican que el crecimiento de epicotilos involucra la regulación por fitocromos y que la acción de la BL puede estar relacionada con la regulación del crecimiento mediada por fitocromos (Sakurai y Fujioka, 1993).

Es conocido que el consumo de nutrientes en las células vegetales, así como su distribución entre los órganos y tejidos es un pre-requisito para el crecimiento y generalmente se acepta que el transporte demanda la energización de la membrana plasmática o plasmalema. Para delimitar entonces el posible o los posibles modos de acción de los brasinoesteroides, Sasse. (1991a) ejecutó diferentes experimentos con varias plantas que deben indicar los cambios en la energización de la membrana y en el transporte inducido por fitoefectores. Encontró que la 22S,23S homobrasinólida (SSHB) tanto en presencia de luz como en la oscuridad, provocó una hiperpolarización del gradiente de potencial eléctrico de la membrana; sin embargo, sorprendentemente la 24-epiBL, que es muy activa biológicamente, no afectó el gradiente de potencial eléctrico en presencia de luz e hiperpolarizó el plasmalema solamente en ocasiones, en la oscuridad.

Se ejecutó otro experimento para estudiar la influencia de los brasinoesteroides en la apertura estomática, teniendo en cuenta que la bomba de protones del plasmalema entrega la fuerza motora para el fuerte influjo de iones que requiere este proceso. Acorde con esta estrategia, se midió el efecto de la SSHB y de la 24-epiBL en la apertura estomática y se encontró que ambas inhibieron este proceso en tiras epidérmicas de *Commelina*.

De toda esta información se concluyó que los brasinoesteroides interactúan con

el plasmalema de tal modo que muestran efectos a corto plazo sobre el potencial de membrana y(o) la acidificación del medio. En algunos casos estos efectos correlacionan con el movimiento de los estomas y el consumo de solutos en hojas o en tejidos conductores.

También, Tominaga y Sakurai (1996) demostraron que la brasinólida causó crecimiento en elongación en segmentos de hipocotilo de *Cucurbita máxima Duch.*, por alteración de las propiedades de los tejidos internos y externos de la pared celular. Estos autores sugirieron que la BL indujo el crecimiento por reducción del potencial hídrico de la vacuola por consumo de iones y (o) azúcar del apoplasto.

También, Roddick (1994) estudió la influencia de cuatro brasinoesteroides en el crecimiento en cultivo aséptico de raíces separadas de tomate, encontrando que todos los compuestos ensayados (brasinólida, 24-epibrasinólida, 22,23,24-triepibrasinólida y 28-homobrasinólida) causaron inhibición del crecimiento estando la actividad inhibitoria en el orden brasinólida > 24-epibrasinólida > 22,23,24-triepibrasinólida > 28-homobrasinólida. Sin embargo, según informa este autor, existen también numerosas evidencias de que los brasinoesteroides estimulan el crecimiento de sistemas de raíces intactas.

Es de destacar que en todos los anteriores sistemas, los tallos han estado presentes y que los brasinoesteroides usualmente se aplican a este órgano por inmersión o aspersión; por lo que no se puede excluir la posibilidad de que la promoción causada por estos compuestos en la raíz, sea un efecto indirecto que se ejerce por la vía del tallo. No obstante lo anterior, debe acentuarse que la inhibición de las raíces puede ocurrir en cortes y posturas cuando los brasinoesteroides se aplican directamente y continuamente al extremo del corte o a las raíces, respectivamente (Roddick y Guan, 1991).

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 aplicación y el tiempo necesario de exposición.

2.1.12 Otros efectos fisiológicos

Además de los efectos en el crecimiento vegetal se han informado otros efectos de los brasinoesteroides, tales como la influencia en el gravitropismo (Meudt, 1987), en el retraso de la abscisión de hojas de Citrus y explantes de frutos (Iwahori, Tominaga e Higuchi, 1990) y en la regulación de la diferenciación de elementos traquearios en células aisladas del mesófilo de *Zinnia elegans* (Iwasaki y Shibaoka, 1991).

En **soya**, Zurek y Clouse (1994) destacaron el papel de los brasinoesteroides en la diferenciación del xilema, a través de la expresión espacial del BRU1, un gen regulado por los brasinoesteroides que codifica una endotransglicosilasa de xiloglucano en esta especie. Se piensa que esta enzima está involucrada en los procesos que requieren modificación en la pared celular, incluyendo la expansión, la diferenciación vascular y la maduración del fruto (Fry , 1992).

La influencia de los brasinoesteroides en la translocación de asimilatos ha sido demostrada por Porzel *et al.*, (1992) quienes encontraron que la aplicación de homobrasinólida, 24-epibrasinólida, GA₃ y AIA a hojas de Vicia faba acelera el consumo de sacarosaC¹⁴ por discos foliares. Por su parte, Fuji y Saka (1992) encontraron un efecto estimulador de la brasinólida en la translocación de asimilatos en plantas de arroz (*Oriza sativa* L.).

Otras publicaciones han establecido que los brasinoesteroides estimulan la actividad fotosintética (Braun y Wild, 1984) expresada por una aceleración en la fijación del CO₂, incrementando la biosíntesis de proteínas y el contenido de azúcares reductores.

También se ha informado la activación de la síntesis de proteínas en hojas de trigo después del tratamiento con 22S, 23S homobrasinólida, incluyendo la síntesis de proteínas específicas, algunas de las cuales corresponden a las proteínas del choque térmico (Kulaeva *et al.*, 1991, citados por Marquardt y Adam, 1991).

En cuanto a la biología reproductiva, se puede señalar que el polen es una

fuentes ricas de brasinoesteroides endógenos y los estudios *in vitro* han sugerido que la elongación del tubo polínico puede depender en parte de estos compuestos (Hewitt, 1985).

En el polen de *Brassica napus* y *Lolium temulentum* se exploró la localización celular de los brasinoesteroides, usando anticuerpos policlonales generados contra la castasterona y los resultados sugirieron que estos compuestos podían estar almacenados o atrapados en los gránulos de almidón en desarrollo y se liberaban en la imbibición (Sasse, 1992). La distribución relativa de los brasinoesteroides en el polen en maduración se ha explorado químicamente (Asakawa, 1996) y la teasterona conjugada estuvo presente en la etapa de microespora. Su nivel descendió cuando el polen se desarrolló y los niveles de brasinoesteroides libres incrementaron. Uniendo todos estos datos, se puede plantear que los brasinoesteroides desempeñan un papel importante en la fertilización de las plantas.

En relación con el efecto general de los brasinoesteroides en la diferenciación del sexo en las plantas, Brosa (1997), encontró que la aplicación directa de brasinólida a la inflorescencia estaminada de *Luffa cylindrica* indujo flores bisexuales y pistiladas. Otro efecto de los brasinoesteroides es su influencia en la senescencia en algunos sistemas.

La senescencia retardada en mutantes de brasinoesteroides de *Arabidopsis* tendía a apoyar el papel de los brasinoesteroides en acelerar la senescencia en plantas normales (Szekeres, 1996 y Li y Chori, 1997). Sin embargo, el trabajo relacionado con la peroxidación lipídica sugiere que la 24-epibrasinólida inhibe la degradación oxidativa, disminuye los niveles de malondialdehído (Erslova y Khripachn *et al.*, 1999) y actúa como un protector de membrana y de esta forma retrasa la senescencia.

Para ayudar a clarificar el papel de los brasinoesteroides en este proceso será necesario estudiar el efecto de la aplicación de estos compuestos en mutantes de *Arabidopsis* asociados con la senescencia; así como la expresión de los genes asociados a la senescencia en dichos mutantes.

2.1.13 Efectos sobre el metabolismo de las plantas

La división y el alargamiento celular en un tejido en crecimiento requieren de la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Las hormonas vegetales tales como las auxinas, giberelinas y citoquininas regulan el metabolismo de los ácidos nucleicos en las plantas (Key, 1969).

El efecto de los brasinoesteroides en el metabolismo de las proteínas y los ácidos nucleicos fue estudiado por Mandava, Thompson y Yopp (1987), los cuales utilizaron inhibidores de la síntesis de proteínas y del ARN para evaluar sus efectos en la respuesta inducida por brasinoesteroides en cortes de epicotilo de frijol mungo y ellos encontraron que los inhibidores ensayados y en particular, la actinomicina D y la cicloheximida, interfirieron en el crecimiento del epicotilo. Los efectos causados por estos inhibidores parecen ser revertidos por los brasinoesteroides cuando el tejido tratado con el inhibidor, se lava con agua y entonces se expone a la BL. Este procedimiento contrarrestó la respuesta inhibitoria y produjo adicionalmente un efecto promotor del crecimiento.

Si el tejido pretratado con BL se trata posteriormente con los inhibidores, la promoción inducida por la BL se detiene completamente. Estos efectos son reversibles y dependientes de la concentración. Metodologías similares fueron utilizadas en epicotilos de frijol Azuki (Cerana, 1983) y de **guisante** (Sasse, 1985).

Estos estudios claramente indican que los efectos en el crecimiento inducidos por los brasinoesteroides, al igual que los inducidos por auxinas y giberelinas, dependen de la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas celulares.

En otro estudio, Kalinich, Mandava y Todhunter (1985) encontraron que el tratamiento con BR incrementó significativamente las actividades de la ARN y ADN polimerasas, la síntesis del ARN, ADN y proteínas en *Phaseolus vulgaris* L. y *Phaseolus aureus* Roxb. Esto sugiere la inclusión de los brasinoesteroides en la replicación y transcripción durante el crecimiento del tejido. Bajo la influencia de los brasinoesteroides, los cambios en las actividades enzimáticas aparentemente afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos de tal forma, que

los niveles de ARN, ADN y proteínas acumulados en el tejido incrementan durante el crecimiento.

Más recientemente, Bajguz y Czerpak (1996) encontraron que en el alga *Chlorella vulgaris* el contenido de proteínas es intensamente estimulado por la brasinólida y la 24-epibrasinólida durante un período de 12 a 36 horas de cultivo.

Aunque la BL causa un incremento en el contenido de la proteína celular, no afecta las actividades de la peroxidasa ni de la polifenoloxidasas en frijol mungo; lo que sugiere una inducción de la síntesis de proteínas específicas más que un incremento indiscriminado de la síntesis de todas las proteínas.

El tratamiento con BL incrementa además la actividad de la ATPasa en epicotilos de frijol Azuki y en raíces de maíz (*Zea mays* L.) (Cerana, 1983). Esta actividad está relacionada con la fuerte secreción ácida en esas plantas. Por su parte, Katsumi (1985) informó que un inhibidor de la ATPasa asociada a la membrana, la dicitclohexil carbodiimida, afectó la elongación inducida por BL en hipocotilos de pepino.

Se ha encontrado también que la BL está implicada en el incremento de la velocidad de fijación del CO₂ en la oscuridad, mediante la activación de la síntesis del malato citoplasmático vía la fosfoenolpiruvato carboxilasa y en condiciones in vitro se ha informado la estimulación de la actividad de la ribulosa bifosfato carboxilasa (Mandava, 1988).

2.1.14 Efectos sobre el estrés

Desde 1987, Meudt informó que el tratamiento de lechuga con 22,23,24-triepiBL incrementó el rendimiento cuando ésta era cultivada en un suelo fertilizado subóptimamente. Posteriormente, Hamada (1986) consideró que una acción importante de la brasinólida era acelerar la resistencia a varios estreses, tales como estrés a las bajas temperaturas, estrés a la infección por hongos, a los daños por herbicidas y al estrés salino. Esta característica de estos compuestos fue confirmada también por Takematsu (1986) y cada vez es más creciente el interés por investigar en este sentido, no sólo por las implicaciones prácticas que

esto puede tener sino además porque permite incrementar nuestra comprensión acerca de los mecanismos de respuesta a los brasinoesteroides.

Así, Schilling, Schiller y Otto (1991) informaron que plantas de **remolacha** tratadas con homobrasinólida y sometidas a un estrés hídrico ligero (45 - 50 % de la capacidad hídrica máxima) fueron capaces de compensar completamente los efectos de dicho estrés. Sin embargo, el contenido de sacarosa incrementó solamente en casos de estrés severo (25-30 % de la capacidad hídrica máxima).

Una disminución del efecto del estrés hídrico en frijol mungo tratado con epibrasinólida estuvo asociado con una capacidad superior de las plantas para asimilar agua, lo cual fue confirmado en experimentos con agua tritiada (*Zhao et al.*, 1990, citados por Khripach, Zhabinskii y de Groot, 1999). Además, se encontró un incremento significativo del contenido de prolina en las plantas tratadas, lo que fue interpretado por los autores como un indicador del incremento de la tolerancia de las plantas a esta condición de estrés.

En cuanto a la protección de los brasinoesteroides ante el estrés salino, Kulaeva (1991) informó que el pretratamiento con brasinólida protegió la ultraestructura del núcleo y el cloroplasto en segmentos de hojas de cebada expuestas a NaCl 500 mM.

Es bueno destacar, además, que se ha informado por varios autores el efecto de la epibrasinólida en la acumulación de metales pesados por diferentes plantas tales como **cebada**, tomate, **rábano y remolacha** (Kitani, 1994); citados por Khripach, Zhabinskii y de Groot, 1999). Ellos encontraron que la aplicación de la epiBL en dosis apropiadas en una cierta etapa del desarrollo reduce significativamente la absorción de metales.

La influencia de la 24-epiBL sobre la degradación lipídica oxidativa ha sido estudiada a nivel bioquímico en guisante por Ershova y Khripach (1996) y ellos demostraron que la 24-epiBL disminuyó los niveles de los productos de descomposición, no sólo en tejidos normales aireados sino particularmente en condiciones de hipoxia o niveles incrementados de CO₂.

2.1.15 Aplicaciones prácticas en la agricultura.

Desde el aislamiento e identificación de la brasinólida en 1979 por un grupo de investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) se han dedicado numerosos recursos a la síntesis de estas lactonas esteroidales y a la evaluación de sus actividades biológicas (Adam y Marquardt, 1986).

En Japón, se sintetizó por primera vez la brasinólida en 1980, pero su proceso de síntesis requiere de múltiples pasos, indicando que su preparación es muy costosa para ser utilizado en la agricultura. Esta situación no se modificó aún después del descubrimiento de muchas rutas sintéticas; por lo que han sido pocos los brasinoesteroides que se han probado en condiciones de campo (Ikekawa y Zhao, 1991).

Estos autores además destacaron que desde que el grupo de la USDA obtuvo los primeros resultados prometedores, pasaron diez años para la obtención de evidencias firmes que demostraron la utilidad de los brasinoesteroides en incrementar los rendimientos de los cultivos, la biomasa en los vegetales, los granos en los cereales, etc.

Las aplicaciones prácticas en la agricultura a una mayor escala comenzaron en Japón en 1985 y hasta 1990 se habían informado, de forma general, resultados similares a los anteriormente citados.

Al comparar los efectos de los brasinoesteroides con los de otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, se deben destacar las siguientes características:

- los brasinoesteroides son activos a concentraciones extremadamente bajas, generalmente soluciones de 0.1 - 0.001 ppm, que es un rango 100 veces inferior que el de los otros reguladores del crecimiento vegetal.
- los brasinoesteroides estimulan el crecimiento de la raíz.
- los brasinoesteroides no causan deformaciones en las plantas.
- el efecto de los brasinoesteroides en el crecimiento vegetal es

particularmente fuerte en condiciones de crecimiento adversas (temperatura sub-óptima, salinidad), por lo que los brasinoesteroides pueden ser llamados "hormonas del estrés".

➤ los brasinoesteroides tienen baja toxicidad vide post.

Por otra parte, Ikekawa y Zhao (1991) también informaron que dada la colaboración entre Japón y China, a partir de 1985 se comenzaron las aplicaciones de epibrasinólida en la agricultura china.

En el cultivo del melón de agua, las aspersiones foliares de epibrasinólida durante la etapa de postura y en la floración incrementó el cuajado del fruto y por ende, el rendimiento del cultivo entre 10-20 %. El rendimiento del pepino se incrementó en la misma magnitud por la aplicación del compuesto.

Cuando la 24-epibrasinólida se aplicó en el cultivo de la vid en la etapa de floración, se incrementaron el número de uvas por racimo y el rendimiento total en 66.7 % y 29.9 % cuando se utilizaron dosis de 0.01 y 0.1 ppm, respectivamente. Este efecto puede resultar de la prevención de la abscisión del fruto, especialmente en condiciones de estrés.

Todos estos resultados contribuyeron a que los agricultores chinos promovieran el uso práctico de la 24-epibrasinólida dado que es un compuesto natural muy efectivo como sustancia promotora del crecimiento vegetal.

2.1.16 Aplicaciones prácticas de análogos de brasinoesteroides

En Cuba, el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana ha estado trabajando en la síntesis de análogos de brasinoesteroides. Así, en 1990, Esther Alonso, informó por primera vez la obtención de análogos de brasinoesteroides con un sistema espirocetálico en la cadena lateral, además del uso de sapogeninas esteroidales para la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal.

La actividad biológica manifestada por la mayoría de estos compuestos en el bioensayo de inclinación de la lámina de arroz, abrió el camino hacia la síntesis de análogos de brasinoesteroides más sencillos y, por tanto, más económicos, lo

que permitiría su uso potencial en la agricultura. Así, Isabel Jomarrón (1995) informó la síntesis y caracterización de cuatro análogos espirostánicos de brasinoesteroides con estereoquímica 5β , además de la obtención de compuestos biológicamente activos con un sistema 2,3 ó 3,5 diol en el anillo A con diferentes estereoquímicas.

Por otra parte, Caridad Robaina (1995) obtuvo varios análogos biológicamente activos con sistema $2\beta,3\beta$ diol o función epoxídica en el anillo A y funciones lactonas, cetonas e hidroxicetonas en el anillo B utilizando una materia prima nacional, la hecogenina.

Posteriormente, Iglesias (1996) reportó que la introducción de funciones oxigenadas en la posición 23 o modificaciones en la cadena lateral de las sapogeninas esteriodales influyen en la actividad biológica de estos análogos.

Estudios más recientes de obtención de análogos de BR fueron realizados por Roxana Gil (1998), en los cuales reportó la síntesis de análogos a partir del ácido quenodesoxicólico. Varios de estos análogos mostraron actividad biológica en los bioensayos del crecimiento y expansión de los cotiledones del rábano.

El desarrollo de todas estas investigaciones han permitido que en el país 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.

De esta forma, a partir de 1993, se comenzó la validación del DAA-6 o BIOBRAS-6 en condiciones de campo a nivel experimental por diferentes colectivos de investigaciones del país. Así, Isora Franco (1994) demostró que el DAA-6 (BB-6) estimuló el rendimiento de plantas de arroz de las variedades J-104 y Perla de Cuba, a través del aumento del número de granos llenos por panícula y el peso de 1 000 granos.

En ese mismo año (1994), Sánchez probó diferentes dosis del producto en el

clon de boniato (*Ipomoea batatas* L.) "CEMSA 85-48" y encontró que la dosis más efectiva y económica fue la de 1 ppm cuando ésta se aplicó a los 30 días después de la siembra.

Los resultados de las aplicaciones de este análogo y de otros en algunos frutales han sido informados por Pozo y Coll (1998) quienes obtuvieron incrementos en la estolonización y el rendimiento de plantas de **fresa** cvs. Misionaria y Parker, así como efectos consistentes en el incremento del poder germinativo y el vigor vegetativo de plántulas de frutabomba (*Carica papaya* L.) cv. Maradol.

Además, estos autores informaron la influencia beneficiosa que cuatro análogos de brasinoesteroides sintetizados en Cuba ejercieron sobre la germinación, el crecimiento y la fructificación de un cultivar de papaya obtenido en Colombia por técnicas de mejoramiento genético.

En el cultivo de la papa, Miriam Núñez, Torres y Coll (1995a) informaron la influencia positiva que la aspersión foliar de DAA-16 ejerció en la masa fresca de los tubérculos comerciales y totales del cv. Desirée. En 1997, Torres y Miriam Núñez, demostraron que la aplicación del BB-16 en este mismo cultivar incrementó el rendimiento de tubérculos comerciales entre 9 y 34 % con dosis de 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ asperjados a los 30 y 45 días después de la plantación, respectivamente.

En hortalizas, Miriam Núñez *et al.* (1995b) estudiando el efecto de la aplicación de BB-16 en el cultivo del tomate, demostraron que cuando este producto es asperjado al follaje de las plantas al inicio de la floración en una concentración de 1 mg.L⁻¹ de forma general, hubo un incremento en el rendimiento, independientemente de la época de plantación, aunque no siempre el incremento encontrado fue estadísticamente significativo. Resultados similares obtuvieron Alicia Fernández *et al.* (1999) en los cvs. Rilia y Lignon.

Sin embargo, estudios posteriores demostraron que en este cultivo, se obtuvieron respuestas similares en el rendimiento cuando se aplicaron dosis de 50 y 100 mg.ha⁻¹ de BB-6 al inicio de la floración y la efectividad de este

producto se incrementó cuando la dosis de 50 mg.ha⁻¹ se fraccionó en dos aplicaciones, una efectuada siete días después del trasplante y la otra al inicio de la floración (Miriam Núñez *et al.*, 1998).

La utilización de otra formulación denominada DI-31 o BIOBRAS-16 a nivel experimental en condiciones de campo con resultados satisfactorios ha sido informada por diversos autores. Así, se ha demostrado la efectividad de esta formulación en hortalizas (Miriam Núñez *et al.*, 1998; Miriam Núñez, 1996; Rosales, Martínez e Isabel Jomarrón, 1995), papa (*Solanum tuberosum* sp.)(Rosales, Martínez e Isabel Jomarrón, 1995); maíz (*Zea mays* L.) (Almenares, 1999); soya (Rosales *et al.*, 1995), uva (Miriam Núñez, 1995 b), cítricos (María E. García, Pozo y Mayda Betancourt, 1996), cafeto (*Coffea arabica* L.)(Soto, Tamara Tejeda y Miriam Núñez, 1997), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Pita, 1998) y pastos (Mirelis Mirabal y Herrera, 1998).

De forma general, en los resultados que se han obtenido a nivel experimental, las dosis más adecuadas han oscilado entre 0.1 y 1 mL.L⁻¹, o sea, entre 10 y 100 mL.ha⁻¹; evidenciando la efectividad de ambas formulaciones como estimuladores del rendimiento en diferentes cultivos, lo que abre nuevas perspectivas para la agricultura cubana.

En la Tabla 1 se presentan las áreas tratadas y el rango de porcentaje de incremento en los rendimientos, por cultivo.

Estos resultados propiciaron que se decidiera la validación del BIOBRAS-16 en otras regiones del país y así, en la campaña 1996-1997 y 1997-1998 se realizó la aspersión foliar de este compuesto en los cultivos anteriormente citados, obteniéndose en el caso de las hortalizas resultados muy favorables, independientemente de la variedad y de las condiciones edafoclimáticas y de cultivo imperantes en cada lugar. En el cultivo de la papa, aunque el efecto en los rendimientos no fue tan consistente con la tecnología aplicada (dos aspersiones foliares a los 25-30 y 45-50 días de edad con dosis de 50 mL.ha⁻¹) en algunas variedades y localidades, la aplicación del producto en todos los casos incrementó el vigor de las plantas.

Tabla 1. Efecto de las aplicaciones de BIOBRAS a diferentes cultivos de importancia económica durante la campaña 1995-1996

Cultivos	Área aplicada (ha)	Incremento en el rendimiento (%)
Papa	134	6 - 30
Tomate	32	24 - 85
Pimiento (<i>Capsicum annum L.</i>)	10	14 - 45
Cebolla (<i>Allium cepa L.</i>)	27	20 - 25
Ajo (<i>Allium sativum L.</i>)	35	6 - 15

Estos resultados se obtuvieron efectuando como máximo dos aplicaciones del producto durante el ciclo de desarrollo de las plantas con dosis totales que oscilaron entre 40 y 100 mL.ha⁻¹; lo que unido a la factibilidad económica de su obtención, permitirá la introducción gradual de estos nuevos reguladores del crecimiento en la tecnología de los cultivos.

Todos estos resultados demuestran las potencialidades de estos análogos sintetizados en Cuba y recomiendan la necesidad de continuar investigando en los efectos que los mismos ejercen en la biología de las plantas, con vistas a lograr en un breve plazo una utilización cada vez más racional y efectiva de los mismos (Brosa, 1997).

2.1.17 Fitomás: aplicación y efecto.

En el afán de obtener nuevos productos biorreguladores se ha logrado por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), un fitoestimulante natural derivado de la industria azucarera denominado Fitomás. Este es un producto antiestrés que estimula y vigoriza las plantas desde la germinación hasta fructificación. Es una mezcla de sales

minerales y sustancias bioquímicas de alta energía (aminoácidos, bases nitrogenadas, sacáridos y polisacáridos biológicamente activos) formuladas con una suspensión acuosa que se debe agitar antes de usarse (Rodríguez, 2001)

2.1.17.1 Momentos de la aplicación.

Su aplicación se realiza en cualquier fase fenológica del cultivo: germinación, semillero, vivero, fase de crecimiento vegetativo, prefloración, formación y cuajado de frutos. Se pueden realizar varias aplicaciones pero una sola suele ser efectiva, se usan en las más variadas especies botánicas.

2.1.17.2 Efectos del Fitomás en algunos cultivos.

Según Rodríguez, (2001) el Fitomás: Aumenta y acelera la germinación de la semilla, ya sean botánicas o agámicas, estimula el desarrollo de la raíz, tallo y hoja; mejora la nutrición, la floración y cuajado de los frutos, reduce el ciclo del cultivo; potencia la acción de los herbicidas y los plaguicidas lo que permite reducir las dosis recomendadas. Acelera el compostaje y la degradación de los residuos de cosechas; ayuda a superar los efectos negativos del estrés por salinidad, sequía, exceso de humedad, fitotoxicidad y, enfermedades y plagas.

Los resultados muestran que el bionutriente es capaz de compensar las disparidades en cuanto a estos niveles nutricionales en tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y en maíz, ambos sembrados sobre suelo Ferralítico Rojo y en cebolla plantada en suelo aluvial.

Hernández, (2003) desarrolló en diferentes Entidades perteneciente a la Empresa de Cultivos Varios de Batabanó, un experimento donde se realizaron valoraciones cualitativas y cuantitativas en 7 cultivos, tomando en cuenta la opinión del productor al comparar el área tratada con el testigo. Las valoraciones cuantitativas se realizaron en el cultivo del pepino (dos variedades: Poinsett y Tropical SS-5). Los indicadores estudiados demuestran que el Fitomás incrementa, el área foliar de las plantas, la floración, el número, tamaño y peso de los frutos; la resistencia a enfermedades fungosas. Además acorta el tiempo entre cosechas y disminuye la acidez de los frutos. En el caso del pepino

disminuyó del número de manchas por hojas donde se aplicó el Fitomás respecto al testigo e incremento los rendimientos que oscilaron entre 17.5 y 24.3%. Lo que demuestra que el producto estimuló la planta y desarrolló resistencia sobre el mildiu. Los resultados económicos en el cultivo evaluado muestran un incremento promedio de los ingresos respecto al testigo de \$ 5621.00/ha. El no uso de formulaciones químicas en este producto hace que estos alimentos de tanta demanda entre la población sean más sanos y que posean mayor calidad, además de disminuir la carga tóxica en el ecosistema.

2.1.184 Problemas del uso práctico

Los resultados de las aplicaciones de los biorreguladores 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 dicho comportamiento.

En relación con esto, Clouse *et al.*, 1991, realizaron estudios de formación del complejo de inclusión de la 24 epibrasinólida **6** con β -ciclodextrina, ya que este tipo de complejo es utilizado en la industria farmacéutica para proteger de la luz y de las condiciones atmosféricas a los principios activos; además de aumentar el tiempo de acción de algunas drogas en el organismo. Este complejo fue probado en el bioensayo de inclinación de la lámina de arroz donde se obtuvo un incremento de la actividad biológica de aproximadamente 5 y 10 % en relación al tratamiento con la 24 epibrasinólida libre y al control, respectivamente.

Se deben considerar, también, otros aspectos como la fácil descomposición y la dificultad de movimiento en el sitio activo. Por ejemplo, en experimentos con *Cucumis melo*, se aplicó solución de BL a las yemas, hojas jóvenes y maduras y únicamente el tejido foliar en crecimiento activo pudo responder a la brasinólida; sugiriendo que éste tiene efecto sólo en un período limitado de la etapa de crecimiento, lo que puede estar asociado a la fácil descomposición del compuesto en el tejido y por ende, a la no retención en forma activa por un período largo.

En cuanto al movimiento de este compuesto, Iwahori, Tominaga e Higuchi

(1990) encontraron que los explantes de Calamondina mostraron un retraso marcado en la abscisión de hojas y frutos; sin embargo, la aplicación repetida de BL a plantas intactas no fue efectiva. Esto sugiere que este compuesto apenas se mueve dentro de la zona de abscisión. De esta forma, es necesario para el uso práctico de estos compuestos encontrar tejidos en los cuales los brasinoesteroides sean translocados fácilmente.

Además de estos factores, Kamuro y Takatsuto (1991) destacaron la influencia que las condiciones ambientales ejercen en la respuesta a las aplicaciones de brasinoesteroides. Por ejemplo, plantas de arroz crecidas a diferentes temperaturas, los efectos promotores del crecimiento del BR fueron obvios a temperatura baja, pero no en condiciones ambientales óptimas.

Otras variables importantes resultan la longitud del día y las condiciones de luz. Así, en una variedad de rábano de maduración temprana, crecida en una temperatura controlada en condiciones de día largo o día corto, se asperjó una solución de 0.1 ppm de brasinólida en la etapa de cuarta hoja verdadera y se encontró que en condiciones de día largo, el tratamiento promovió el crecimiento de hojas y raíces mientras que en condiciones de día corto el BR inhibió el crecimiento de la raíz, lo que indica que los efectos de estos compuestos pueden ser dependientes del fotoperíodo y éstos pueden estimular efectos diferentes en función de si las plantas usadas son de día corto o de día largo.

En cuanto a la calidad de la luz, anteriormente se discutieron los efectos de ésta en el crecimiento inducido por los brasinoesteroides y se sugiere que estos efectos pueden estar relacionados con la acción de los fitocromos; lo cual deberá ser investigado posteriormente.

Todos estos resultados revelan que los brasinoesteroides poseen un modo de acción muy característico y se han considerado como la sexta clase de hormonas vegetales, que son efectivos como reguladores del crecimiento en la producción de los cultivos; no obstante, se hace necesario continuar profundizando en los efectos y mecanismos de acción de estos compuestos para dar respuesta a algunas interrogantes que aún existen.

2.2 Materiales y métodos.

Este trabajo fue realizado en un área de la Granja Agropecuaria ``Espartaco`` perteneciente al MINAZ de la provincia de Cienfuegos, durante el periodo comprendido de Septiembre del 2008 / Enero del 2009.

Para la realización de este estudio se utilizó una instalación de cultivo protegido bajo condiciones controladas de iluminación, temperatura, humedad relativa. La instalaciones de tipología 2 de la firma Cuba – España (CARISOMBRA), cuya dimensión es 12m x 45m (540m²), una altura de 4m con un cerramiento superior de la instalación de rafia plastificado con una abertura para favorecer la circulación del aire y una malla antiinsectos por los laterales y los frentes. Este tipo de instalación no presenta ventana cenital.

La instalación esta ubicada lejos del área de producción, en un sitio alto y ventilado con posibilidad de riego y vías de acceso.

En el estudio se empleó el híbrido de crecimiento indeterminado **Aro 8479**; se utilizó un sustrato para la siembra de cepellones compuesto por una mezcla de 50% de tierra y otro tanto de materia orgánica. El manejo de las labores agrotécnicas y fitosanitarias, se realizaron según las recomendaciones del Instituto de Investigación Hortícola, ``Liliana Dimitrova`` (2003), para casa de cultivo protegido. Las variables temperatura y humedad relativa fueron determinadas diariamente, las cuales estuvieron en un rango entre 22°C – 30°C y 70 – 80% respectivamente.

Las plántulas de tomate cuando alcanzaron una altura de aproximadamente 8 cm. fueron transplantadas al cantero a una distancia de 50 cm. entre plantas y 60 cm. entre hileras utilizando una distribución de plantas de tresbolillo, obteniéndose una densidad de 2.0 plantas por metro cuadrado y una distancia entre pasillo de 70 a 90 cm.

Se empleo un diseño experimental completamente aleatorizado, con 20 réplicas por tratamiento. Fueron evaluados los siguientes tratamientos

Tabla 2. Tratamientos evaluados.

TRATAMIENTOS	DOSIS	UM
Biobrás-16	0.01	ml.L ⁻¹
Biobrás-16	0.05	ml.L ⁻¹
Biobrás-16	0.1	ml.L ⁻¹
Fitomás	7,0	ml.L ⁻¹
Testigo(sin aplicación)	0	0

2.2.1 Momentos de aplicación del Biobrás-16 y el Fitomás

Las aplicaciones se realizaron de la forma siguiente:

Primera: 11 días después del trasplante

Segunda: Durante la floración (20 días después de la primera evaluación).

Tercera: Durante la floración-fructificación (20 días después de la segunda evaluación).

En cada fase se le realizaron las aplicaciones con sus respectivas dosis y se evaluaron las variables antes de la aplicación posterior. Se seleccionaron hileras diferentes para cada aplicación y en cada una se escogieron al azar 20 plantas, cada planta constituyó una unidad experimental. Para la aplicación de los productos se utilizó un spray estándar de un litro de capacidad y una jeringuilla que garantizó la exactitud de las dosis para una correcta evaluación.

En la primera evaluación, durante la floración, se evaluaron los parámetros siguientes. (Hay que destacar que estas evaluaciones se hicieron siempre con las actividades agrotécnicas realizadas para este tipo de cultivo en estas condiciones).

Tabla 3. Parámetros evaluados en la primera evaluación (durante la floración).

Parámetros	UM	Medios para la medición
Altura de la planta.	cm.	Cinta Métrica.
Diámetro del tallo.	cm.	Pie de Rey.
Cantidad de hojas.	Unid.	Conteo físico.
Número de racimos de flores.	Unid.	Conteo Físico.

Ya en la segunda valoración (floración-fructificación) se hizo una evaluación semejante por réplicas pero a otras variables, buscando la influencia de las anteriores aplicaciones en éstas.

Tabla 4. Parámetros evaluados en la segunda evaluación (durante la floración-fructificación).

Parámetros	UM	Medios para la medición
Nro de racimos de frutos por planta	Unid.	Conteo físico
% de flores abortadas.	%	flores abortadas/ flores abortadas + Número de frutos
Número de frutos	Unid.	Conteo físico.

Para una tercera evaluación se hizo una categorización de los frutos cosechados acorde a la calidad de los mismos, para determinar el rendimiento final teniendo en cuenta los parámetros que se requieren para casas de cultivos (**Anexo 1**).

Los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS Versión 5.1 Las variables que según la prueba de contraste de Bartlett no tenían una distribución normal se le aplicó el test de Kruskal – Wallis para determinar si había diferencias significativas entre las medianas a un nivel de confianza del 95%, mientras que las variables que siguieron una distribución normal fueron sometidas a un análisis de varianza simple , y donde hubo diferencias significativas se aplicó el test múltiple de Tukey al 95% probabilidad.

Para el análisis económico se estimó el rendimiento total expresado en t/ha por tratamiento, el costo de las tres aplicaciones de los productos empleados a partir de los precios de \$100,00 por gramo del Biobras –16 y \$ 1,45 el litro de Fitomás y el % de incremento de los tratamientos sobre el testigo sin aplicación.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

2.3.1. Efecto de los tratamientos sobre la altura, diámetro, número de hojas y racimos de flores por planta. (1 aplicación de los productos) (Tabla 2).

Para la altura de las plantas, los tratamientos donde se aplicó el Biobrás-16 a 0,05 y 0,10 ml.L⁻¹, así como el Fitomás alcanzaron valores significativamente superiores al testigo sin aplicación, sin diferencias entre sí.

El diámetro de las plantas (Tabla 5) alcanzó valores significativamente superiores en todos los tratamientos con relación al testigo sin aplicación y no hubo diferencias significativas entre las dosis de 0,05; 0,1 ml.L⁻¹ de Biobras-16 y la aplicación del Fitomás.

Tabla 5. Efecto de los tratamientos (una aplicación del Biobrás-16 y de Fitomás) sobre la altura, diámetro y nro de racimos de flores por planta.

Tratamientos	Altura (cm.)	Diámetro (cm.)	Rac. de flores /planta
Biobrás 16 a 0.01 ml.L ⁻¹	64.8 bc	0,99 b	6,7 b
Biobrás 16 a 0.05 ml.L ⁻¹	69.3 ab	1,00 ab	7,15 ab
Biobrás 16 a 0. 1 ml.L ⁻¹	73.5 a	1,07 a	8,10 ab
Fitomás a 7.0 ml.L ⁻¹	70.5 ab	1,06 a	8,70 a
Testigo (Sin aplicación)	60.3 c	0,90 c	6,35 b
Significación	**	**	**
ES x	1.6935	0,0289	0,4503
C.V. (%)	12.97	14,00	29,19

(Letras diferentes, difieren estadísticamente, según test de Tukey al 95%)

Para el número de racimos de flores por planta, sólo la aplicación del Fitomás alcanzó valores significativamente superiores al testigo sin aplicación, aunque no difiere de los obtenidos en los tratamientos donde se aplicó el Biobrás-16 a 0,05 y 0,1 ml.L⁻¹, todo parece indicar que en estas condiciones este último producto estimula el crecimiento, expresado a través de la altura y no el número de racimos de flores por planta. Por otro lado, según Rodríguez, (2001), el Fitomás mejora la floración del cultivo. Los resultados antes señalados corroboran lo planteado por Sasse (1999) que plantea que los biorreguladores pueden acelerar el crecimiento y la maduración de las plantas.

Para el número de racimos de flores, los tratamientos donde se aplicó el Biobrás-16 a las dosis de 0,05 y 0,10 ml.L⁻¹ y el Fitomás alcanzaron valores que están en el rango señalados por Krarup y Konar 1997) de 7 a 12 racimos de flores.

En cuanto al número de hojas por planta (Figura 1), los mayores rangos de las medianas se alcanzaron en el tratamiento donde se aplicó el Biobrás al 0,1 ml.L⁻¹ y el menor, en el testigo sin aplicación.

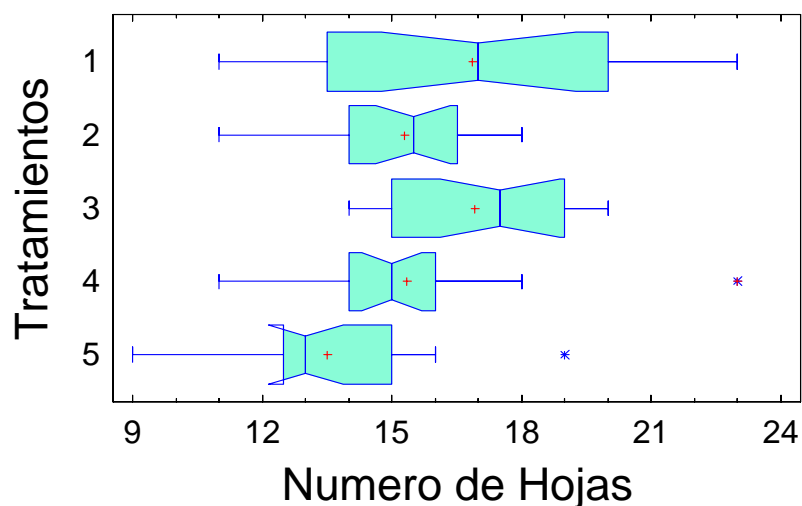


Figura 1. Efecto de los tratamientos sobre el número de hojas

2.3.2. Efecto de los tratamientos sobre el número de racimos de frutos por planta, porcentaje de flores abortadas y número de frutos totales por planta.

La aplicación del Biobrás-16 en las diferentes dosis evaluadas y del Fitomás, incrementaron significativamente el número de racimos de frutos (Tabla 6) y la cantidad de los mismos por planta con relación al testigo sin aplicación (Figura 2), no ocurriendo así con relación al porcentaje de flores abortadas, donde no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 6).

Según Núñez (1995), parece indicar que el uso de estos productos estimula la fructificación, pues resultados obtenidos revelaron que la aspersion foliar de las plantas de tomate con Biobrás-16 en dosis entre 40 y 50 ml.ha⁻¹ repetidas en tres aplicaciones (trasplante, inicio de floración y floración-fructificación) son adecuadas para estimular los rendimientos en el cultivo del tomate.

Tabla 6. Efecto de los tratamientos (2 aplicaciones de Biobrás -16 y Fitomás) sobre el número de racimos de frutos por planta y porcentaje de flores abortadas.

Tratamientos	No de rac. de frutos/planta	Flores abortadas (%)
Biobrás -16 a 0.01 ml.L ⁻¹	11,7 a	47,4
Biobrás -16 a 0.05 ml.L ⁻¹	11,8 a	48,1
Biobrás -16 a 0.1 ml.L ⁻¹	12,45 a	49,1
Fitomás a 7.0 ml.L ⁻¹	12,15 a	48,4
Testigo (Sin aplicación)	10,5 b	49,1
Significación	**	NS
ES x	0,1651	0,877
C.V. (%)	14.09	8,05

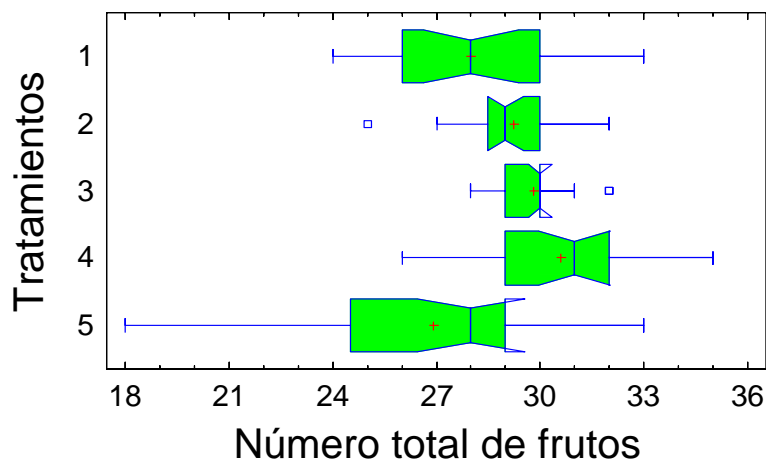


Figura 2. Efecto de los tratamientos sobre el número de frutos por planta.

2.3.3. Efecto acumulativo de las aplicaciones de Biobrás-16 y el Fitomás sobre la cantidad, calidad de los frutos, masa de los frutos por planta y rendimientos estimados.

La aplicación del Biobrás -16 a razón de 0,05 y 0,1 ml.L⁻¹ y de Fitomás, incrementaron significativamente el número de frutos de calidad 1 por planta (Tabla 7) con relación al testigo y al tratamiento donde se aplicó la dosis más baja del Biobrás-16, no influyendo estos productos en la cantidad de frutos de Calidad 2 y 3, ya que no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos.

En correspondencia con el número de frutos por planta, principalmente los de calidad 1, la masa de frutos por planta (Figura 3) alcanza los mayores valores en los tratamientos donde se aplicó el Biobrás-16 a las dosis de 0.05 y 0,1 ml.L⁻¹ y el Fitomás, sin diferencias estadísticas entre si, difiriendo de la dosis más baja de aplicación del primer producto y éste a su vez, del testigo sin aplicación.

Tabla 7. Efecto acumulativo de las tres aplicaciones de Biobrás 16 y Fitomás sobre la cantidad por calidad de los frutos por planta (UM: U)

Tratamientos	Calidad 1	Calidad 2	Calidad 3
Biobrás 16 a 0.01 ml.L ⁻¹	8,95 b	10,05	8,6
Biobrás 16 a 0.05 ml.L ⁻¹	10,85 a	10,2	8,15
Biobrás 16 a 0.1 ml.L ⁻¹	11,55 a	9,95	8,4
Fitomás a 7.0 ml.L ⁻¹	10,95 a	10,5	9,0
Testigo (Sin aplicación)	7,50 c	9,85	9,55
Significación	**	NS	NS
ES x	0,2579	0,2979	0,4383
C.V. (%)	18,98	13,10	22,68

(Letras diferentes, difieren estadísticamente, según test de Tukey al 95%)

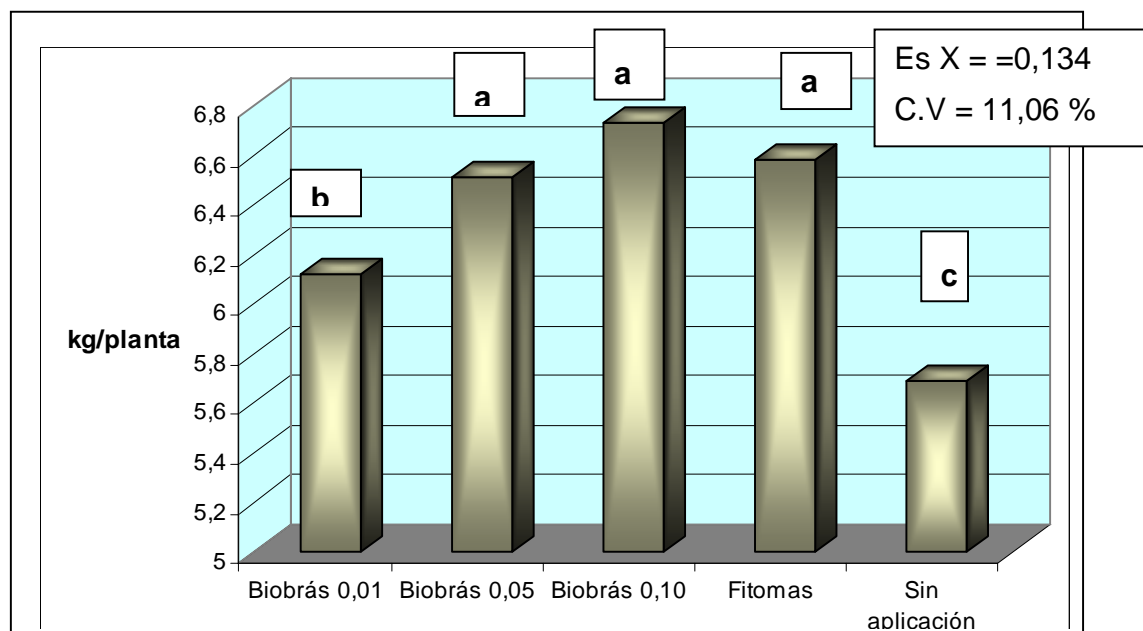


Figura 3. Efecto de los tratamientos sobre la masa de frutos por planta.

Teniendo en cuenta el efecto de los tratamientos sobre la masa de los frutos por planta, la figura 4 muestra los rendimientos estimados, donde los mejores resultados se alcanzaron con las dosis 0.05 y 0.1 ml.L⁻¹ de Biobrás -16 y la de Fitomas con diferencia significativa con la dosis más baja de Biobrás que a su vez difiere estadísticamente del testigo sin aplicación. Los rendimientos obtenidos corroboran lo expuesto por Gómez y Casanova (2003) que las casas de cultivo protegido han permitido obtener rendimientos de 120 t/ha en la campaña de invierno y de Núñez (1995a), que demostró que la aspersion foliar de las plantas de tomate con Biobrás-16 en dosis entre 0.040 y 0.050 ml.L⁻¹ tuvieron un efecto significativo en la masa de los frutos.

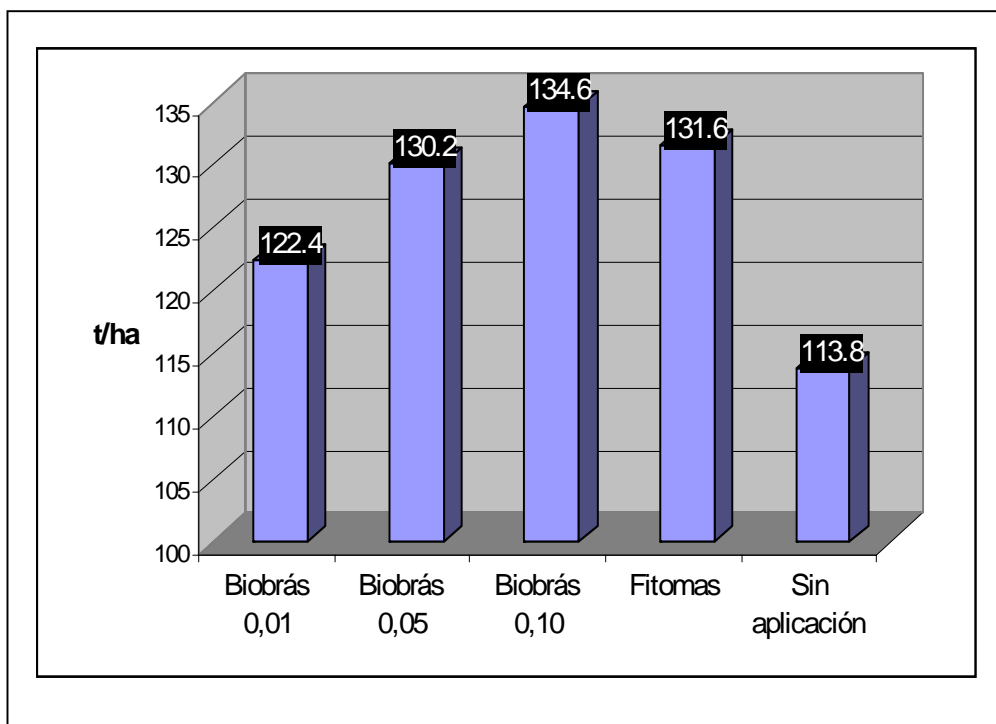


Figura 4. Rendimientos estimados por tratamiento.

De forma general, los resultados de esta investigación, coinciden con los obtenidos a nivel experimental por Miriam Núñez et al., (1998)., en cuanto a que las dosis más adecuadas de Biobrás-16 han oscilado entre 0.01 y 0.1 ml.L⁻¹, o

sea, entre 10 y 100 ml.ha⁻¹; evidenciando la efectividad de este producto como estimulador del rendimiento en diferentes cultivos, lo que abre nuevas perspectivas para la agricultura cubana, así como lo planteado por Hernández (2003) de que el Fitomás incrementa, el área foliar de las plantas, la floración, el número, tamaño y peso de los frutos;

2.4. Análisis económico.

Los resultados del efecto económico que se muestran en la Tabla 8 reflejan que en los tratamientos donde se utilizaron los biorreguladores, se obtuvieron mayores beneficios netos que en el tratamiento testigo, debido al aumento de los rendimientos, que se refleja en el % de incremento del valor total de la producción menos el costo adicional de estos productos. Como se puede apreciar los mejores resultados se lograron en las dosis más altas de Biobrás-16 y con la aplicación de Fitomás.

Tabla 8. Efecto económico (1 ha).

Tratamientos	Costo adicional	Valor de producción	Efecto económico	% Diferencia relativa
Biobrás- 0.01 ml.L ⁻¹	750,00	326150.00	325400.00	+9.4
Biobrás- 0.05 ml.L ⁻¹	3750,00	350130.00	346380.00	+16.5
Biobrás- 0.1 ml.L ⁻¹	7500,00	361020.00	353520.00	+18.9
Fitomás- 7.0 ml.L ⁻¹	90,00	349680.00	349590.00	+17.6
Testigo	0,00	297360.00	297360.00	0

Al respecto, Pérez y Vaquez, (2002) señalan que el desarrollo vegetativo y el aumento de la producción son estimulados por reguladores del crecimiento vegetal.

Montano y Villar (2005), demostraron que el Fitomás al incrementar el área foliar de las plantas, la floración, el número, tamaño, peso de los frutos y la resistencia a enfermedades fungosas incrementa el rendimiento en el cultivo del tomate.

Miriam Núñez (1995b) estudiando el efecto de la aplicación de Biobrás-16 en el cultivo del tomate, demostró que cuando este producto fue asperjado al follaje de las plantas al inicio de la floración en una concentración de 0.01 ml/L^{-1} de forma general, hubo un incremento en el rendimiento, independientemente de la época de plantación, aunque no siempre el incremento encontrado fue estadísticamente significativo. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que en este cultivo, se obtuvieron respuestas superiores en el rendimiento cuando se aplicaron dosis de 0.05 y 0.1 ml.L^{-1} (Miriam Núñez *et al.*, 1998). De forma general, en los resultados que se han obtenido a nivel experimental, las dosis más adecuadas han oscilado entre 0.01 y 0.1 ml.L^{-1} , o sea, entre 10 y 100 ml.ha^{-1} de Biobrás-16 y, el Fitomás de 0.2 a 2 L.ha^{-1} lo que ha evidenciando la efectividad de ambas formulaciones como estimuladores del rendimiento en diferentes cultivos, lo que abre nuevas perspectivas para la agricultura cubana.

3. CONCLUSIONES

3. CONCLUSIONES

Conclusiones

Para las condiciones en que se realizó la siguiente investigación, se arriban a las siguientes conclusiones:

1. Aplicaciones de Biobrás-16 a razón de 0,01; 0,05 y 0,1 ml.L⁻¹ y de Fitomás a 7.0 ml.L⁻¹ incrementan el desarrollo y el rendimiento del tomate de crecimiento indeterminado en las casas de cultivo protegido de la Granja Agropecuaria Espartaco.
2. Los mejores resultados se alcanzan con la aplicación de 0,1 ml.L⁻¹ de Biobrás- 16 y con el Fitomás.
3. Aplicaciones de Biobrás-16 a razón de 0,05 y 0,1 ml.L⁻¹ y de Fitomás resultan económicamente factibles para el incremento de los niveles de producción entre 16 y 18,9 %.

4. RECOMENDACIONES

4. RECOMENDACIONES

1. Divulgar los resultados para que constituyan una experiencia más de agricultura ecológica, con productos netamente cubanos.
2. Hacer aplicaciones en las casas de cultivo en condiciones similares a las que prevalecieron en el desarrollo de la presente investigación.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, G. y U. Petzold. Brassinosteroide-eine neue Phytohormon-Gruppe?. **Naturwissenschaften** 81: 210-217, 1994.
- Adam, G. y V. Marquardt. Brassinosteroids. **Phytochem.** 25: 1787-1799, 1986.
- Almenares, J.C. Influencia de diferentes dosis y momentos de aplicación del BIOBRAS-16 en el cultivo del maíz. **Cult. Trop.** 20 (3): 77-79, 1999.
- Alonso, Esther. Síntesis de análogos espiroestánicos de brasinoesteroides. /Esther Alonso.- F. Coll, Tutor. Tesis de grado (Dr. en Ciencias Químicas); U.H. (Qui), 1990.
- Arima, M., T. Yokota y N. Takahashi. Identification and quantification of brassinolide-related steroids in the insect gall and healthy tissues of the chestnut. **Phytochem.** 23: 1587-1591, 1984.
- Asakawa, S. Purification and identification of new acyl conjugated teasterones in lily pollen. **Biosci. Biotech. Biochem.** 60: 1416-1420, 1996.
- Bajguz, A. y R. Czerpak. Effect of brassinosteroids on growth and proton extrusion in the alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorophyceae*). **Plant Growth Regul.** 15: 153-156, 1996.
- Bellicampi, D. y G. Morpurgo Stimulation of growth induced by brassinosteroid and conditioning factors in plant-cell cultures. **En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.-** Washington: Am. Chem. Soc. 1991.
- Braun, P. y A. Wild. The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants. **J. Plant Physiol.** 116: 189-196, 1984.
- Brosa, Carme. Biological effects of brassinosteroids./ Carme Brosa.- **En: Biochemistry and Function of Sterols.** CRC Press, 1997.

- Brosa, Carme y C. Rodríguez-Santamarta. New synthetic brassinosteroids: a 5 α -hydroxy-6-ketone analog with strong plant growth promoting activity. **Tetrahedron** 54: 12337-12348, 1998.
- Brosa, Carme y C. Rodríguez-Santamarta. A new efficient procedure for reduction of Δ^7 ergostane derivatives. **Tetrahedron** 55: 1793-1798, 1999.
- Casanova, A; O Gómez; T. Depestre; Guía técnica para la producción Protegida de Hortalizas en casa de cultivo tropical con efecto Sombrilla. La Habana. Folleto: 55p, 2002.
- Cerana, R. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls. **Physiol. Plant.** 59: 23-27, 1983.
- Chory, J. P. Nagpal y C. A. Peto. From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA 93: 12066-12071, 1996.
- Chory, J., P. Nagpal y C. A. Peto. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 3: 445-459, 1991.
- Clouse, S. M. Langford y T. C. McMorris. Effect of brassinolide on gene expression in elongation soybean epicotyls. **Plant Physiol.** 100: 1377-1383, 1992.
- Clouse, S., M. Langford y T. C. McMorris. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiol.** 111: 671-678, 1996.
- Corbera, J. Efectividad del empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo de la soya en: IV Taller de Productos Bioactivos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. (oct. 28: 1999 La Habana).- La Habana: INCA, 1999.
- Díaz, G. Efecto de un análogo de brasinoesteroide -DAA-6- en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). **Cult. Trop.** 16(3):53-55, 1995.

- Ershova, A. y V. Khripach. Effect of epibrassinolide on lipid peroxidation in *Pisum sativum* at normal aeration and under oxygen deficiency. **Russ. J. Plant Physiol.** 43: 750-752, 1996.
- FAO, 2005 Estadísticas disponibles en: [http:// www.fao.stat.org](http://www.fao.stat.org). Revisada el 7 de abril del 2009.
- Fernández, Alicia, Miriam Núñez y P. Pérez, Efecto del Biobras-6 en el crecimiento y desarrollo del ajo (*Allium sativum* L.) Tesis de grado (M. Sc. en Biología Vegetal). U.H. (Biol.) 1999.
- Franco, Isora. Efectividad del brasinoesteroide DAA-6 en el cultivo del arroz. Programa y Resúmenes IX Seminario Científico INCA. **Cult. Trop.** 15(3): 79, 1994.
- Fry, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. **Biochem. J.** 282: 821-828, 1992.
- Fujii, S. y H. Saka. Growth regulating action of brassinolide on plants. II. Effect of brassinolide on the translocation of assimilate in rice plants during the ripening stage. **Jpn. J. Crop Sci.** 61: 193-196, 1992.
- Fujioka, S. Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6-deoxytyphasterol from the shoots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.** 37: 1201-1203, 1996.
- Fujioka, S. Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59: 1543-1547, 1999.
- Fujioka, S. y A. Sakurai. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. **Physiol. Plant.** 100: 710-715, 1997.
- García, Diana. Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en café (*Coffea canephora* Pierre)./ Diana García, Miriam Núñez y Clara González, tutoras. Tesis de grado (M. Sc. en Biología Vegetal) U.H. (Biol.), 1998.

- García, María E, L. Pozo y Mayda Betancourt. Influencia de los brasinoesteroides sobre la calidad de la toronja cv. Ruby en dos regiones del país. - **En:** Programa y Resúmenes X Seminario Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.- La Habana: INCA, -p 154, 1996.
- Gaudinová, A. Different effects if two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. **Plant Growth Regul.** 17: 121-126, 1995.
- Gil, Roxana. Synthesis of analogues of brassinosteroids from chenodeoxycholic acid. **European J. Org. Chem.** : 2405-2407, 1998.
- Gómez, O; A Casanova. Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. La Habana. IHLD. MINAGRI: 159 p. 2003.
- Gross, D. y B. Parthier. Novel natural substances act in plant growth regulation. **J. Plant Growth Regul.** 13: 93-114, 1994.
- Hai, T., B. Schneider y G. Adam. Metabolic conversion of 24-epibrassinolide into pentahydroxylated brassinosteroid glucosides in tomato cell cultures. **Phytochem.** 40: 443-448, 1995.
- Hamada, K. Brassinolide in crop cultivation. Plant growth regulators in agriculture, **FFTC Book Ser.** 34: 188-196, 1986.
- Hewitt, F.R. Effect of brassinolide and other growth regulators on the germination and growth of pollen tubes of *Prunus avium* using a multiple hanging drop assay. **Austr. J. Plant Physiol.** 12: 201-211, 1985.
- Hernández, F. Tesis Maestría Biología Vegetal. Fac. Biología, Universidad de la Habana. —83p, 2003.
- Hunziker. A.T. South American Solanaceae: a synoptic survey. **in:** «Hawkes, J.G. Lester, R.N.; Skelding, A.D. (Eds.). **The biology and taxonomy of the Solanaceae.** Academia Press, New York & Londow>: 4985. 1979.

- Iglesias, M. Síntesis de análogos furostánicos y espirostánicos de brasinoesteroides./ M. Iglesias/F. Coll, tutor.- Tesis de grado (Dr. en Ciencias Químicas), U.H. (Qui), 1996.
- Ikekawa, N. Analysis of natural brassinosteroids by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromat.** 290: 289-302, 1984.
- Ikekawa, N y Y-J. Zhao. Application of 24-epibrassinolide in agriculture.- **En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.-** Washington: American Chem. Society, 1991.
- Iwahori, S., S. Tominaga y S. Higuchi. Retardation of abscission of citrus leaf and fruitlet explants by brassinolide. **Plant Growth Regul.** 9:119-125, 1990.
- Iwasaki, T. y H. Shibaoka. Brassinosteroids act as regulators of tracheary-element differentiation in isolated *Zinnia* mesophyll cells. **Plant Cell Physiol.** 32:1007-1014, 1991.
- Jomarrón, Isabel. Síntesis de espirostanonas y espirostanlactonas biológicamente activas. Isabel Jomarrón/F. Coll, tutor.- Tesis de grado (Dr. en Ciencias Químicas), U.H.(Qui), 1995.
- Kalinich, J., N. B. Mandava y J. Todhunter. Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide-induced responses in beans. **J. Plant Physiol.** 120: 207-214, 1985.
- Kamuro, Y y S. Takatsuto. Capability for and problems of practical uses for brassinosteroids.- **En: Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.-** Washington: American Chem. Society, 1991.
- Katsumi, M. Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA₃ in the elongation of cucumber hypocotyl sections. **Plant Cell Physiol.** 26:615-625, 1985.
- Kauschmann, A. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. **Plant J.** 9: 701-713, 1996.
- Key, J.L. Hormones and nucleic acid metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 20: 449-474, 1969.

- Khripach, V. A. , V. Zhabinskii y A.E. de Groot Physiological of action of BS./ **En:** Brassinosteroids. A new class of plant hormones.-Academic Press, 1999.
- Kim, S. K. Natural occurrences of brassinosteroids./S. K. Kim.- **En:** Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American Chem. Society, 1991.
- Kitani, Y. Induction of parthenogenetic haploid plants with brassinolide. **Jpn. J. Genet.** 69: 35-39, 1994.
- Krarp, C y P. Konar. Hortalizas de estación cálida. Biología y diversidad cultural. P. Universidad Católica de Chile, URA. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Proyecto de desarrollo Docente, Santiago, Chile.p: 111. 1997.
- Kulaeva, O. Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell ultrastructure under stress conditions.- **En:** Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American Chem. Society, 1991.
- Kurapov, P. B. Effect of brassinosteroids on content of ABA, cytokinins and gibberellins in spring barley. **En:** Plant Growth Regulators. Ed. por B.E. Bumazhnyi *et al.* Ukrainian Academy of Sciences, Kiev, Ukraine. p: 144-155, 1992.
- Li, J. y J. Chory. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. **Science** 272: 398-401, 1996.
- Li, J. y J. Chory. Conservation of function between mammalian and plant steroid 5α -reductases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 3554-3559, 1997.
- Mandava, N. B. Plant growth-promoting brassinosteroids. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 39: 23-52, 1988.
- Mandava, N. B., M. J. Thompson y J.H. Yopp. Effects of selected putative inhibitors of RNA and protein synthesis on brassinosteroid-induced growth in mung bean epicotyls. **J. Plant Physiol.** 128:63-68, 1987.

- Marquardt, V. y G. Adam. Recent advances in brassinosteroid research. **Chem. Plant Prot.** (Review) 7:103-139, 1991.
- Mayumi, K. y H. Shibaoka. A possible double role for brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cells of Azuki bean epicotyls. **Plant Cell Physiol.** 36: 173-181, 1995.
- Meudt, W. J. Investigations on the mechanism of the brassinosteroid response. VI. Effect of brassinolide on gravitropism of bean hypocotyls. **Plant Physiol.** 83: 195-198, 1987.
- Mirabal, M y R. Herrera. Efecto del BIOBRAS-16 en algunos indicadores morfológicos de la hierba de guinea (*Panicum maximum*). - **En:** Seminario Científico (11:1998 nov.17-20): La Habana: INCA, - p. 124. 1998.
- Mitchell, J. W. Meudt, y L.E. Gregory. Brassin- a new family of plant hormones from rape pollen. **Nature** 225: 1065-1066, 1970.
- Mitchell, J, W. Meudt, y L.E. Gregory. Enhancement of overall plant growth, a new response to brassins. **Nature** 239: 253-254, 1972.
- Montano, R y José Villar. . Efectividad de bionutrientes en las Hortalizas. Programa y Resúmenes IX Seminario Científico INCA. **Cult. Trop.** 15(3): 79, 2005.
- Nishikawa, N. The uptake and transport of ¹⁴C-labelled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. **J. Plant Res.** 107: 125-130, 1994.
- Núñez, Miriam. Efecto de tratamientos con brasinoesteroides sobre las relaciones hídricas y el crecimiento de plantas de tomate bajo estrés hídrico. Actas del 4º Simposium Hispano-Portugués. Relaciones hídricas en las plantas, Murcia, España.-p. 206-209, 1998.
- Núñez, Miriam. Influencia de análogos de brasinoesteroides en el rendimiento de diferentes cultivos hortícolas. Programa y Resúmenes IX Seminario Científico INCA. **Cult. Trop.** 15(3): 87, 1994.

- Núñez, M. Influencia del análogo de brasinoesteroide Biobras-6 en el rendimiento de plantas de tomate cultivar INCA-17. **Cult. Trop.** 16(3): 49-52, 1995 b.
- Núñez, Miriam. W. Torres y F. Coll. Influencia de dos nuevos biorreguladores cubanos en el rendimiento de plantas de cebolla (*Allium cepa*) cv. Red Creole. **Cult. Trop.** 19(1): 21-24, 1998.
- Núñez, Miriam, W. Torres y F. Coll. Efectividad de un análogo de brasinoesteroide sobre el rendimiento de plantas de papa y tomate. **Cult. Trop.** 16(1): 26-27, 1995a.
- Oh, M.-H. y S.D. Clouse. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. **Plant Cell Reports** 17: 921-924, 1998.
- Pérez, N. y L. Vaquez. El nuevo modelo agrícola en Cuba. <http://www.agendaorganica.cl/porganica3.asp>. 2004.
- Pita, O. Influencia de un análogo de brasinoesteroide, DI-31, en el rendimiento y calidad del tabaco (*Nicotiana tabacum*) L. - **En**: Programa y Resúmenes X Seminario Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.- La Habana: INCA; -p 155. 1996.
- Porzel, A. V. Marquadt y G. Adam. ^1H y ^{13}C NMR Analysis of brassinosteroids. **Magnetic Resonance in Chemistry** 30: 651-657, 1992.
- Pozo, L. y F. Coll. Algunos resultados en el cultivo de los frutales mediante la utilización de brasinoesteroides o compuestos análogos. Programa y Resúmenes. IX Seminario Científico INCA. **Cult. Trop.** 15(3):79, 1998.
- Robaina, Caridad. Síntesis de espirobrasinoesteroides a partir de hecogenina. Caridad Robaina. /F. Coll, tutor. Tesis de grado (Dr. en Ciencias Químicas). U.H.(Qui), 1995.
- Roddick, J. Comparative root growth inhibitory activity of four brassinosteroids. **Phytochem.** 37: 1277-1281, 1994.

- Roddick, J. y M. Guan. Brassinosteroids and root development.- **En:** Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American Chem. Society, 1991.
- Rodríguez, M. Estudio de diferentes variables agrobotánicas y de calidad del jugo en la variedad comercial de caña de azúcar. —Tesis Maestría Biología Vegetal. Fac. Biología, Universidad de la Habana. —83p, 2001.
- Rosales, A L. Martínez e Isabel Jomarrón. Efecto de la aplicación de biorreguladores en el cultivo del tomate.- **En:** I Taller de Productos Bioactivos, IV Taller de Brasinoesteroides. (nov. 30-dic. 1, 1995: La Habana), INCA, 1995.
- Sakurai, A. y S. Fujioka. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids. A review. **Plant Growth Regul.**13: 147-159, 1993.
- Sakurai, A. S. Fujioka, H. Saimoto. Production of brassinosteroids in plant-cell cultures- **En:** Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American. Chem. Society, 1991.
- Sánchez, R. Efectos del brasinoesteroide DAA-6 en el boniato (*Ipomoea batata* Lin.). Programa y Resúmenes. IX Seminario Científico INCA. **Cult. Trop.** 15(3): 79, 1994.
- Sasse, J. M. Brassinolide-induced elongation./ J.M. Sasse.- **En:** Brassinosteroids. Chemistry, Bioactivity and Applications.- Washington: American Chem. Society, 1991a.
- Sasse, J. M. Physiological actions of brassinosteroids./ J.M. Sasse.- **En:** Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. Springer-Verlag Tokyo, 1999.
- Sasse, J. M. Recent progress in brassinosteroid research. **Physiol. Plant.** 100: 696-701, 1997.
- Sasse, J. M. Some characteristics of brassinolide-induced elongation. /J. M. Sasse.- **En:** 12th. Int. Plant Growth Substances Conf. Heidelberg. Aug. (Abstr. RO6D4)., 1985.

- Sasse, J. M. Brassinolide-induced elongation. **Progress in Plant Growth Regul.** Dordrecht: Kluwer, p 319-325, 1992.
- Schlaghauer, C. D. y R. N. Arteca. The uptake and metabolism of brassinosteroid by tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. **J. Plant Physiol.** 138: 191-194, 1991.
- Schilling, G. C. Schille y S. Otto Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants.- **En: Brassinosteroids, Chemistry, Bioactivity and Applications.- American Chem. Society, 1991.**
- Schmidt, J., T. Altmann y G. Adam. Brassinosteroids from seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochem.** 45: 1325-1327, 1997.
- Schneider, B. A metabolite of 24-epibrassinolide in cell suspension cultures of *Lycopersicon esculentum*. **Phytochem.** 36: 319-321, 1994.
- Soto, F.; Tamara Tejeda y Miriam Núñez. Estudio preliminar sobre el uso de brasinoesteroides en cafetos. **Cult. Trop.** 18(1): 52-534, 1997.
- Stevens, M.A. influence on nutritional value. in: P.L.; N. Nutritionai of vegetables. Futura New 87,1974.
- Szekeres, M. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. **Plant J.** 9: 701-713, 1996.
- Thompson, M. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. **Steroids** 39: 89-105, 1982.
- Takatsuto, S. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromat.** 658:3-15, 1994.
- Takatsuto, S. y N. Ikekawa. Microanalysis of brassinolide and its analogues by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromat.** 1239: 233-241, 1982.
- Takatsuto, S. N. Ikekawa y N. Sakurai. Structure-activity relationship of brassinosteroids. **Phytochem.** 22: 2437-2441, 1983.

- Takematsu, T. Brassinolides for diminution of salt or herbicide damage to crops. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63 66,104 [88 66,104], 1986.
- Tominaga, R. y N. Sakurai. Brassinolide induces vacuolar H⁺-ATPase activation and stem elongation. **Plant Cell Physiol.** 37 (Suppl.): 152, 1996.
- Torres, W. y Miriam Núñez. The application of Biobras-6 and its effect on potato (*Solanum tuberosum* L.) yields. **Cult. Trop.** 18 (2):8-10, 1997.
- Wada, K. y M. Nakayama. Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. **Plant Cell Physiol.** 22: 323-325, 1981.
- Winter, J. Role of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in the hydroxylation of 24-epibrassinolide. **Phytochem.** 45: 233-237, 1997.
- Yokota, T. T. Nomura y M. Nakayama. Radioimmunoassay for brassinosteroids and its use for comparative analysis of brassinosteroids in stems and seeds of *Phaseolus vulgaris*. **J. Plant Growth Regul.** 9: 151-159, 1990.
- Yokota, T. T. Nomura y M. Nakayama. Transport and metabolism of brassinosteroids in rice. **Progress in Plant Growth Regul.:** 298-305, 1992.
- Yokota, T. Molecular Structure and Biological Activity of Brassinolide and related brassinosteroids.- **En:** Molecular structure and biological activity of steroids. CRC Press Boca Taton, 1992.
- Yokota, T., T. Nomura y M. Nakayama. Identification of brassinosteroids that appear to be derived from campesterol and cholesterol in tomato shoots. **Plant Cell Physiol.** 38: 1291-1294, 1997.
- Zhao, Y-J., R-J. Xu y W-H. Luo. Inhibitory effects of abscisic acid on epibrassinolide-induced senescence of detached cotyledons in cucumber seedlings. **Chinese Sci. Bull.** 35: 928-931, 1990.
- Zurek, D. y S. Clouse. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. **Plant Physiol.** 104:161-170, 1994.

6. ANEXOS.

Anexo 1. Números de frutos y valores en MN por calidad (normas para casas de cultivos).

Tratamientos.	Biobras-16(0.01)	Biobras-16(0.05)	Biobras-16(0.1)	Fitomás.	Testigo.
Frutos-1ra	179	217	231	219	150
Frutos-2ra	201	204	199	210	197
Frutos-3ra	172	163	174	180	191
Kg.-1ra	58	68	72	68	48
Kg.-2ra	44	44	43	43	43
Kg.-3ra	21	19	20	20	22
Valor 1ra((\$)2.35)	136.3	159.8	169.2	159.8	112.8
Valor 2da((\$)2.15)	94.6	94.6	92.45	92.45	92.45
Valor 3ra((\$)1.70)	35.7	32.3	34.0	34.0	37.7
C.C ((\$) 0.44xKg.)	54.12	57.64	59.4	57.64	49.72
M.L ((\$) 0.0442xKg.)	5.43	5.79	5.97	5.79	4.99
Valor total (\$).	326.15	350.13	361.02	349.68	297.36

C.C. Capacidad de compra.

M.L. Moneda líquida.