

Formación de callos de caña de azúcar var. 'SP 70-1284' en medio de cultivo líquido a partir de explantes de campo

Apolonio Valdez Balero^{1*}, Pedro A. Orellana Pérez², Novisel Veitía Rodríguez² y Damaris Torres Rodríguez².
*Autor para correspondencia.

¹ Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. Km 3 carretera Cárdenas-Huimanguillo. C.P. 86 500. H. Cárdenas, Tabasco. México. e-mail: licpo@yahoo.com.mx, apoloniovb@colpos.mx

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba

RESUMEN

Se estudió la capacidad de diferentes explantes obtenidos desde secciones de hojas inmaduras tomadas de tallos jóvenes de la variedad de caña de azúcar 'SP 70-1284', seleccionados directamente de campo para la formación de callos. Se evaluó el efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de callos en medio de cultivo líquido considerando la sección del explante utilizado. Se logró la formación de callos de calidad en las tres primeras secciones del tallo más cercanas al meristemo apical al utilizar 3 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Con estos explantes se obtuvieron bajos índices de contaminación microbiana y fenolización.

Palabras clave: callo, contaminación, explante, fenolización, *Saccharum* sp.

ABSTRACT

Explants from immature sections of young leaves in the stems of the variety of sugarcane 'SP 70-1284', were taken directly of field whit the objects of study the capacity for organogenic callus formation. The effect of the concentration of 2,4-D in the callus formation was evaluated using liquid medium and considering the section of the explante utilized. The best callus formation and quality of them was achieved in the three first sections nearly to the apical meristem whit the use of 3 mg.l⁻¹ of 2, 4-D. With these explantes the lowes indices of contamination and fenolization were obtained.

Key words: callus, contamination, explant, fenolization, *Saccharum* sp.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de agregados celulares (de 2.0 a 100 células), distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento. Las suspensiones celulares son generalmente sistemas heterogéneos, en los que el crecimiento y metabolismo dependen de la disponibilidad de nutrientes y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo (Cuba *et al.*, 1996), además de que las células en suspensión pueden ser empleadas en el mejoramiento genético (Carmona *et al.*, 2000).

Esta técnica proporciona mayores posibilidades a las células mutadas para expresarse y generar, por consiguiente, plantas con caracteres modificados que pueden ser seleccionadas mediante métodos biotecnológicos por selección *in vitro* o por medio de la ingeniería genética (Gómez, 1998), y que posteriormente por métodos tradicionales puedan ser seleccionados (Sato *et al.*, 1993). En los últimos años se ha desarrollado con éxito

la embriogénesis somática en especies monocotiledóneas consideradas recalcitrantes (plátanos, bananos y caña de azúcar) entre otras (Castillo *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2000).

Para el establecimiento de cultivos de células en suspensión de diferentes especies de plantas se han utilizado varias fuentes de explantes tales como: mesófilo de hojas o fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993), inflorescencias (Castillo, 2001), plantas *in vitro* (Freire *et al.*, 2002), transfiriendo porciones de callos al medio de cultivo líquido (Dixon, 1991; Cuba *et al.*, 1996; Falcao *et al.*, 1996; Jordan y Veloso, 1996; López *et al.*, 2000, Barranco, 2001; Yemets *et al.*, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue establecer suspensiones celulares de la variedad de caña de azúcar 'SP 780-1284', a partir de explantes desde hojas jóvenes inmaduras que se encuentran en el segmento más cercano al ápice meristemático de plantas seleccionadas directamente de campo, con el fin de disminuir el tiempo para su establecimiento y los riesgos de contaminación microbiana en el proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron explantes desde hojas inmaduras contenidas en el segmento de tallo que sigue al meristemo apical de tallos jóvenes (máximo seis meses de edad) y se eliminaron las hojas viejas envolventes. Se seleccionó un segmento 20 cm de longitud de la parte más interna del tallo (spindel). En el laboratorio se llevó a cabo la desinfección la cual se realizó con una solución de Hipoclorito de Sodio al 3% durante 15 minutos. Una vez desinfectados se procedió a la inmersión e incisión para obtener los explantes en una solución con 200 mg.l⁻¹ de ácido cítrico (Valdez *et al.*, 2002).

Evaluación de la fenolización en medio de cultivo semisólido

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron 30 spindels. Cada uno fue seccionado en 10 fracciones (secciones) de 1cm de longitud. Cada sección fue colocada en un tubo de ensayo que contenía 10 ml del medio de cultivo semisólido propuesto por Payan *et al.* (1977) suplementado con 3 mg.l⁻¹ de 2,4-D y solidificado con 8 g.l⁻¹ agar. Al quinto día, los explantes que presentaron fenolización o contaminación microbiana fueron eliminados y se determinó el porcentaje de fenolización y de contaminación microbiana para cada sección. En ese momento, los explantes no fenolizados se transfirieron de forma individual a erlermeyers de 50 ml que contenían 10 ml del medio de cultivo en estado líquido, propuesto por Freire (2001), el mismo que fue utilizado en las siguientes etapas.

Las condiciones de cultivo fueron de oscuridad a una temperatura de 27 ± 2 °C y en constante movimiento orbital a una velocidad de 100 ± 10 rpm.

Efecto del 2,4-D en la formación de callos en medio de cultivo líquido

En este experimento se estudiaron concentraciones de 2,4-D de 2, 3 y 4 mg.l⁻¹ para determinar el efecto de la concentración de esta auxina sobre la formación de callos en medio de cultivo líquido. Se emplearon seis explantes de cada una de las 10 partes en las que se seccionó el tallo para cada concentración, colocándose cada uno en un erlermeyer de 100 ml que contenía 20 ml del medio de cultivo. Transcurridos 14 días se evaluó la capacidad de los explantes para formar callos y se determinó el porcentaje para cada sección.

El criterio seguido para ordenar los explantes respecto a la posición del meristemo apical, fue

que los números mayores en los segmentos se correspondieron con los más alejados de este.

Con los valores de las diferentes variables, empleando el programa Curve Expert 1.3 sobre Windows 2000, se obtuvieron las curvas de ajuste entre los valores reales y calculados que se ajustaron a rectas mediante las ecuaciones de regresión correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la fenolización en medio de cultivo semisólido

En la figura 1 se observa una relación lineal positiva y altamente significativa ($R^2 = 0.9885$) entre las diferentes secciones del explante y la fenolización. Los resultados muestran que a medida que la fracción o sección del explante se alejaba del meristemo apical la tendencia era a incrementarse la fenolización. La sección del segmento de tallo que mostró tener los valores más altos en explantes no fenolizados fue la más cercana al meristemo durante las 105 horas posteriores al establecimiento. Perl *et al.* (1996) mencionaron que el control de la fenolización es un aspecto crucial ya que una vez que se desencadenan las reacciones de oxidación de fenoles en los tejidos dañados por la manipulación, este proceso se hace irreversible, lo que conlleva a una pérdida significativa de la calidad de los explantes y compromete el establecimiento y la calidad de las suspensiones. Ho y Vasil (1983) observaron en caña de azúcar que en las hojas cuatro y cinco mostraron elevados niveles de fenolización en sus ensayos en medio de cultivo semisólido.

Estos resultados ratifican la importancia de determinar las secciones o fracciones de explantes del tallo que produzcan la menor fenolización, para ser utilizado como material vegetal de partida para el establecimiento de suspensiones celulares y mejorar la calidad de las mismas en caña de azúcar, lo cual constituye un paso fundamental en el proceso de la embriogénesis somática para esta especie.

Al evaluar la incidencia de la contaminación microbiana en los explantes se encontró que la presencia de contaminantes fue directamente proporcional a la distancia del explante del meristemo apical. En la figura 2 se muestra una relación lineal altamente significativa ($R^2 = 0.9925$) y positiva entre las diferentes secciones y la contaminación. Las secciones más alejadas del meristemo apical fueron las que presentaron la mayor contaminación. Los que mostraron los valores más bajos en contaminación fueron los más cercanos al meristemo (explante 1, 2 y 3) durante las 105 horas posteriores al establecimiento.

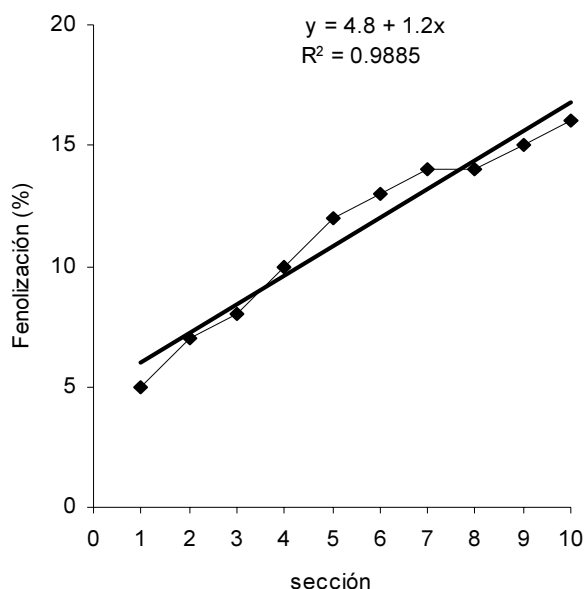


Figura 1. Relación entre la fenolización y la sección del explante en la variedad de caña 'SP 70-1284'.

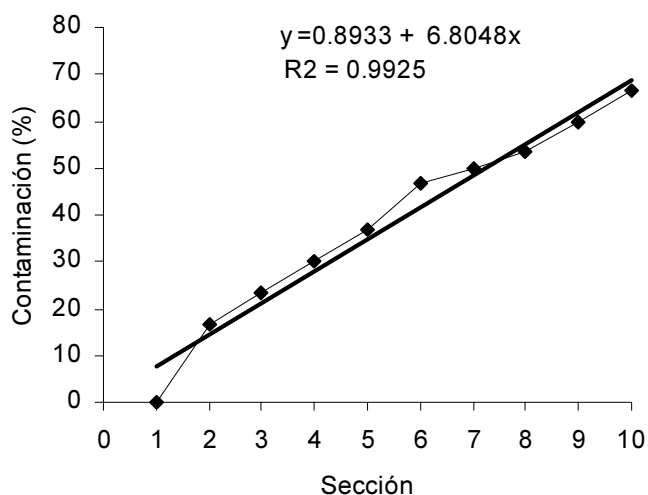


Figura 2. Relación entre la sección de explante y la contaminación microbiana en la variedad de caña 'SP 70-1284'.

Efecto del 2, 4-D en la formación de callos en medio de cultivo líquido

Como se observa en la figura 3, existió una relación directa entre la capacidad para la formación de callos y la posición en el segmento de tallo de donde se tomó el explante. La ecuación de regresión indicó una relación lineal altamente significativa ($R^2 = 0.9416$) y negativa entre las diferentes secciones y la cantidad de explantes que formaron callos. Guideldoni (1986) puso en evidencia la existencia de un gradiente de callogénesis en caña de azúcar, en dependencia de la posición de las hojas y concluyó que las hojas A y B (las más cercanas al meristemo) son las formadoras de callos nodulares embriogénicos. Haydu y Vasil (1981) y Liu (1992) determinaron un gradiente de respuesta para la callogénesis desde la base hasta el ápice y también en segmentos de

hojas en los que el tejido vascular está completamente desdiferenciado. Estos resultados fueron encontrados en medio de cultivo semisólido. Los resultados indicaron la formación de un gradiente para la generación de callos en el segmento de tallo que se encuentra en la parte superior del ápice, pero en este caso, en medio de cultivo líquido.

En la tabla 1, se muestra que la concentración de 3 mg.l^{-1} de 2, 4-D fue la que presentó el porcentaje más alto de explantes que formaron callos con 86%, mientras que las otras dos concentraciones (inferior y superior) evaluadas mostraron porcentajes inferiores. Pérez *et al.* (1996) obtuvieron los mejores resultados para la formación de callos con 3 mg.l^{-1} de 2, 4-D y recomendaron hasta 5 mg.l^{-1} de 2, 4-D para variedades llamadas "recalcitrantes" en medios de cultivo semisólido.

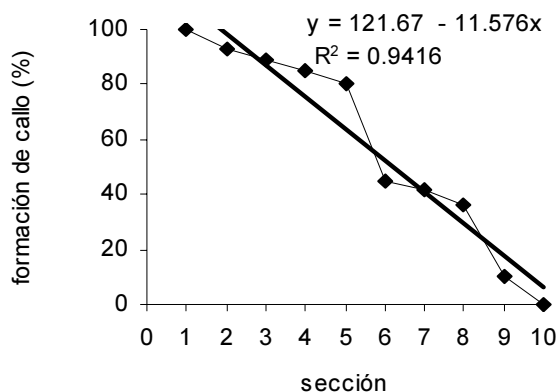


Figura 3. Respuesta de la formación de callos según el origen del explante en la variedad 'SP 701-1284'.

Tabla 1. Porcentaje de explantes que formaron callos a los 21 días de cultivo en medio de cultivo líquido en agitación en la variedad de caña 'SP 70 1284'.

Tratamientos mg.l ⁻¹ de 2, 4-D	Explantes con callo friables (%)
2	70.0 b
3	86.6 a
4	63.3 c

Medias con letras no comunes difieren entre sí para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan

Estos resultados indicaron que para la variedad 'SP 70-1284' es posible obtener callos de calidad a partir de los segmentos de hojas jóvenes que se encuentran en la parte superior inmediata al meristemo apical del tallo.

CONCLUSIONES

Para la variedad de caña de azúcar "SP 70-1284" es posible obtener callos a partir de spinderls traídos directamente de campo en las tres primeras secciones de hojas jóvenes que se encuentran en la parte superior inmediata al meristemo apical del tallo.

Para la inducción de callos, el 2, 4-D a la concentración de 3 mg.l⁻¹ fue superior a los demás tratamientos, se obtuvo el 86% de los explantes con callo.

Agradecimientos

A LA ANUIES-México por la beca otorgada para la realización de la estancia doctoral.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS-CAMPUS TABASCO-México por las facilidades brindadas para la realización del doctorado.

REFERENCIAS

Barranco, L (2001) Embriogénesis somática en banano (*Musa AAAB*, Cv. FHIA 18) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. UCLV-IBP

Carmona, E, Rodríguez M, Borroto J y Arencibia A (2000) Somaclonal variation in transgenic sugarcane plants: practical implications. En: Arencibia AD (ed). Plant genetic engineering towards the Third Millenium. Developments in Plant Genetics and Breeding. Chapter 5, pp. 62-67. Elsevier

Castillo, R, Blanco M y Borroto C (1999) Efecto del 2,4-D y el agua de coco en la formación de los embriones somáticos en suspensiones celulares heterogéneas de caña de azúcar. 5^{to} Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. p.131. Junio 1999. Santa Clara

Castillo, R (2001) La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Bioplantas. Ciego de Ávila. p.109

Cuba, M, García D, Martínez M y Rojas R (1996) Influencia de la edad del callo y la densidad de inoculación en el comportamiento de balance celular en suspensiones celulares de *Coffera canephora* variedad Robusta. Cultivos Tropicales. 17 (2): 63-65

Dennis, J, Trigiano N y Conger V (1993) Liquid suspension culture production of Orchardgrass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement. En: Redenbaugh, K (ed) Calgene, Inc. Daris, California.

Dixon, R (1991) Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. En: Rickwood D y James BD (eds) Plant cell culture: a practical approach. Washinton USA IRL PRESS. pp 1-20.

Falcao, M, Januzzi MB y Tulman NA (1996) Cell suspension culture of sugarcane: Growth, management

and plant regeneration. R. Bras. Fisiol. Veg. 8(1):1-6

Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis presentada en opción al grado científico de doctor en ciencias agrícolas. UCLV-IBP

Freire, M, Gómez R, Herrera I y Reyes M (2002) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) empleando medios de cultivo líquidos. Libro de resúmenes. VI Simposio Internacional de Biotecnología vegetal. junio 2002.p67. IBP. Santa Clara

Gómez, R (1998). Capítulo 4. Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce JN (ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp.57-79. IBP, Santa Clara

Gómez, R, Guilliard T, Barranco L y Reyes M (2000) Embriogénesis somática en medios líquidos maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB). INFOMUSA. 9 (1): 12-16

Guiderdoni, E (1986) Le Embryogenese somatique des explants foliaires de canne aesucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. Initiation des cultures. Le Agronomie Tropicale 41(1): 50-58

Haydu, Z y Vasil I (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue and anthers of *Penisetum purpureum*. Theoret. Appl. Genet.59: 269-273

Ho, W y Vasil I (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Frowth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. Ann Bot. 51: 719-726

Jordan, M y Velozo J (1996) Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspension. Plant Cell Tissue and Organ Culture 44: 189-194

Liu, M (1992) Plant regeneration in cell suspension cultures of sugarcane as affected by activated charcoal, medium composition and tissue source. The SABRAO International Symposium on the impact of Biological Research on Agricultural Productivity. pp. 195-205

López, TJ, Montano N, Ventura JC, Schoots H, Medero V, Espinosa L y Cabrera JM (2000) Establecimiento de suspensiones celulares en plátano vianda del grupo (AAB). Biotecnología Vegetal 1: 69-62

Payán, A, Carmen H y Tascón G (1977) Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante el cultivo de tejidos y yemas. Acta Agronómica 37: 43-79

Pérez, PJ, Orellana PP, Gómez, KR, Jiménez, GE, y Martín FD (1996) Obtención de somaclones mejorados de las variedades de caña (*Saccharum* spp. híbrido) POJ 2878 y C 87-51. En: Resúmenes del tercer Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas.p. 43. Santa Clara

Perl, A, Lotan O y Abu-Abied M (1996) Holland D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The rol of antioxidants during the grape-agrobacterium interaction. Nature biotechnology 8: 535-542

Sato, S, Newel C, Kolacz K, Tredo L, Finer J y Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. Plant Cell Reports.12: 408-413

Valdez, BA, Orellana PP, García RL, Veitía RN, Bermúdez CI, García RL y Padrón MJ (2002) Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) var. SP 70-1284 en la formación de callos. Biotecnología Vegetal 2: 31-37

Yamets, A, Klimkima L y Tarassenko V, (2003) Efficient callus formation of goosegrass (*Eleusine indica* (L) Gartn). Plant Cell Report 21: 503-510