

Obtención y caracterización de la línea celular C-33 de una variedad comercial de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

JUAN B. KOURI, M. J. MARTINEZ, J. RODRIGUEZ, R. GUTIERREZ

**Laboratorio de Bioplasmas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.
La Habana, Cuba**

RESUMEN

La línea celular C-33 de una variedad comercial de caña de azúcar, se estableció mediante la desagregación de callos derivados de hojas jóvenes en medio líquido Heinz modificado por agitación en una zaranda rotatoria a 150 rpm, con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad; a una temperatura de 28°C en un frasco con 50 ml de medio, al cual se le añadieron 200-300 mg de callo/ml. El subcultivo se realizó tomando una alícuota de la desagregación y se le añadió medio fresco hasta alcanzar una concentración en el rango de 10^6 células/ml. Las observaciones microscópicas demostraron la presencia de abundantes núcleos meristemáticos, cuyas células se iban transformando con el decursar de los días, en parenquimatosas y gigantes. Se estableció la curva de crecimiento en diez días por conteo del número celular y se comparó con los datos obtenidos mediante: refractometría para determinar el consumo de azúcares reductores, el volumen celular de sedimentación, el peso húmedo, la reducción de las sales de tetrazolium y el pH. Se estudió también la vitalidad de las células del subcultivo con la tinción de azul de Evans, las características de la siembra en placa, la diferenciación celular y la obtención de protoplastos a partir de la mencionada línea celular.

SUMMARY

Cell line C-33 from a commercial variety of sugarcane was established from a calli derived from young leaves by placing in a liquid modified Heinz culture medium, in rotary shaker at 150 rpm, 12 light hours fotoperiod, at 28°C in a flask where 200-300 mg of calli/ml was added to 50 ml of the medium. The subculture was obtained from an aliquot of the culture diluted in fresh medium until approximately a concentration of 10^6 cell/ml was reached. Microscopic observation showed abundant meristematic nuclei, from which the cells were transformed into parenchymatic and giant cells within the ten days of subculture. The growth curve was established by counting the cells during the 10 days of subculture; this was compared with data obtained by the study of the medium's refraction index

(for measuring the consumption of sugars), cell volume, fresh weight, tetrazolium salt reduction, and pH, during the subculturing period. Cell vitality observations by the Evans Blue staining was carried out. Also plating characteristics, cell differentiation and protoplast yield of the studied cell line were analyzed.

INTRODUCCION

Las suspensiones de células de cultivo de caña de azúcar han sido utilizadas con varios propósitos, entre los cuales se incluyen los estudios realizados para optimizar los medios de cultivos de la mencionada especie (Nickell y Marezki 1969, 1970; Marezki *et al.*, 1969, 1971; Marezki y Thom 1978, Liu y Chen 1973; Thom *et al.*, 1981); en los trabajos de citología para el conteo de cromosomas (Heinz *et al.*, 1969); en estudios fisiológicos relacionados con el transporte de membrana (Marezki y Thom, 1972 a y b) y los potenciales osmóticos sobre el crecimiento (Marezki *et al.*, 1972). También las suspensiones celulares en caña se han utilizado para el aislamiento y cultivo de protoplastos (Ferenczy y Marezki, 1970; Marezki y Nickell, 1973), en estudios bioquímicos (Nickell y Marezki, 1972), así como en la selección de mutantes tolerantes al frío (Chen *et al.*, 1982), a la salinidad (Liu y Yeh, 1982) y en la producción de toxinas de *Helminthosporium sacchari* (Larkin y Scowcroft, 1981).

Más recientemente Ho y Vasil (1983) obtuvieron suspensiones celulares de cultivo de caña altamente embriogénicas, con la consiguiente regeneración de plantas. Esto abre las posibilidades de la utilización de las mismas en los programas de mejoramiento de este importante cultivo.

Las suspensiones, como fuente de protoplastos, aumentan aún más su interés para el mejoramiento mediante el empleo de la técnica de hibridación somática y del ADN recombinante y la ulterior regeneración de plantas, cuestión que requiere aún el esfuerzo de los investigadores.

Este trabajo tiene como propósito describir los métodos para la obtención y la caracterización de una línea celular (C-33), de una variedad de caña de azúcar de importancia comercial.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron callos de una variedad comercial de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y se desagregaron en medio líquido Heinz y Mee (1969) modificado, en una zaranda rotatoria a 150 rpm, con un fotoperíodo de 12 horas luz y una temperatura de 28°C. La desagregación se realizó en frascos de 250 ml, ocupando el medio 1/5 del volumen total y se añadieron 200-300 mg de callo/ml de medio. Para el mantenimiento de las suspensiones, cada 3 ó 5 días se retiró el medio y se sustituyó por igual volumen de medio fresco, realizando una observación pormenorizada del estado de las células en cultivo bajo el microscopio óptico. Para la realización de los subcultivos se tomó una alícuota de la desagregación y se le añadió medio fresco hasta alcanzar una concentración en el orden de 10^6 células/ml.

La caracterización morfológica y fisiológica de los subcultivos se realizó mediante los siguientes procedimientos:

1. Observaciones diarias, al microscopio óptico, de las características de la población celular del subcultivo.
2. Conteo del número de células (10 réplicas por muestra) en cámara de Fush-Rosenthal con

un tratamiento previo según lo descrito por Ho y Vasil (1983). Esto se realizó en cuatro subcultivos de diferentes tiempos.

Para ajustar la curva de crecimiento se realizaron regresiones polinómicas entre segundo y cuarto grados, escogiéndose aquella con la cual se obtuvo el mayor valor del coeficiente de correlación y la mínima varianza residual. Los resultados de tal procesamiento se recogen en la tabla 1.

3. Se determinó la vitalidad de las células de cultivo añadiendo 1 ó 2 gotas de azul de Evans al 1%, sobre la muestra colocada en un portaobjetos, en diferentes etapas del subcultivo. Posteriormente se observó al microscopio óptico.
4. Se determinó el consumo de azúcares reductores midiendo en un refractómetro Karl-Zeiss Jena el índice de refracción del medio sobrenadante del cultivo, en tres subcultivos diferentes.
5. Se calculó el volumen celular de sedimentación según el procedimiento establecido por Chen *et al.**, en cuatro subcultivos diferentes.
6. Se determinó el peso húmedo de la muestra en cada día del subcultivo, de acuerdo a lo descrito por Ho y Vasil (1983), calculando tres réplicas por muestra, en tres subcultivos diferentes.
7. Se determinó la actividad mitocondrial de la muestra mediante la técnica de las sales de tetrazolium descrita por Kartha (1982), en tres subcultivos diferentes.
8. Se determinó el pH de la suspensión durante todos los días del subcultivo en un pH metro analógico CENIC-DIE de construcción nacional, en tres subcultivos diferentes.

Por otra parte, la suspensión fue sembrada en placa en dos etapas diferentes; al inicio y al 5to. y 6to. días en un medio sólido Heinz modificado, fundido a 45°C y mezclado con la suspensión. Las placas petri se incubaron a 28°C en la oscuridad.

También esta suspensión celular fue pasada a medio líquido Heinz modificado, donde gradualmente se fue reduciendo el 2,4-D (ácido 2-4 diclorofenoxiacético) hasta retirarlo del medio totalmente para determinar las características embriogénicas de las células de los núcleos meristemáticos. Para la obtención de protoplastos se tomó 1 ml de suspensión y se puso a digerir en 5 ml de la solución de digestión: 3% Celulasa RS, 4% Macerozima, en un osmótico descrito por Krishnamurthi (1976) con 0,6 M sorbitol a pH= 4,0 con una agitación de 150 rpm, en oscuridad a 28°C durante 4 horas.

Se realizó el conteo de los protoplastos sin lavar en cámara de Fush-Rosenthal.

RESULTADOS Y DISCUSION

La línea celular obtenida presentó un comportamiento caracterizado por el cambio de las poblaciones de células en los 10 días de subcultivo. De núcleos meristemáticos abundantes al inicio con gran vitalidad (fig. 1) a la formación de células parenquimatosas y gigantes que se desprendían de estos núcleos (fig. 2), las cuales tendían a morir cuando quedaban libres en el medio (fig. 3), fue la característica fundamental de los cambios de población antes mencionados.

Las curvas de crecimiento obtenidas (fig. 4), demostraron que en los tres primeros días hay un período de latencia donde las células se adaptan a las condiciones nuevas del cultivo, a

* Wen-Huei Chen y Ming-Chin Lui: "Utilization of Sugar and Nitrogen by Sugarcane Cells in Suspension Cultures". Boletín No. 4, Instituto de Botánica Central Cultures. Tainan, Taiwan, República de China.

partir del cual comienzan a crecer entrando en la fase exponencial de crecimiento a causa de una división activa de los núcleos meristemáticos y la liberación al medio de células parenquimatosas y gigantes que tienden a perder su vitalidad. Esta fase de crecimiento exponencial que ocurre entre el 4to. y 6to. días empieza a decrecer a partir de este último, cayendo bruscamente.

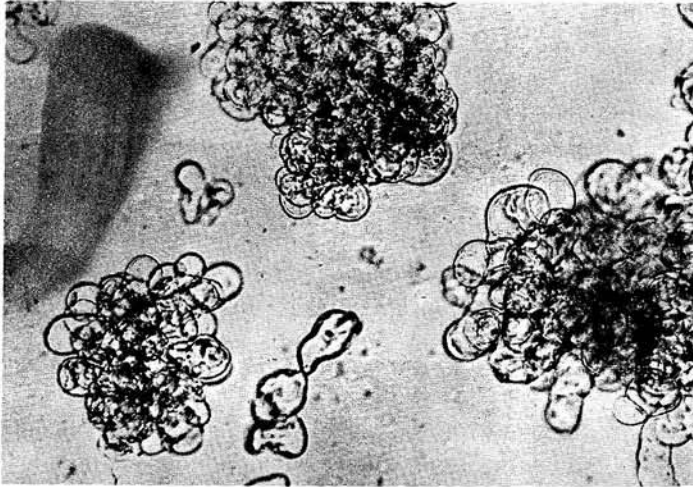


FIG. 1. Suspensión celular constituida fundamentalmente por núcleos de células meristemáticas, que corresponden a los primeros días de subcultivo.

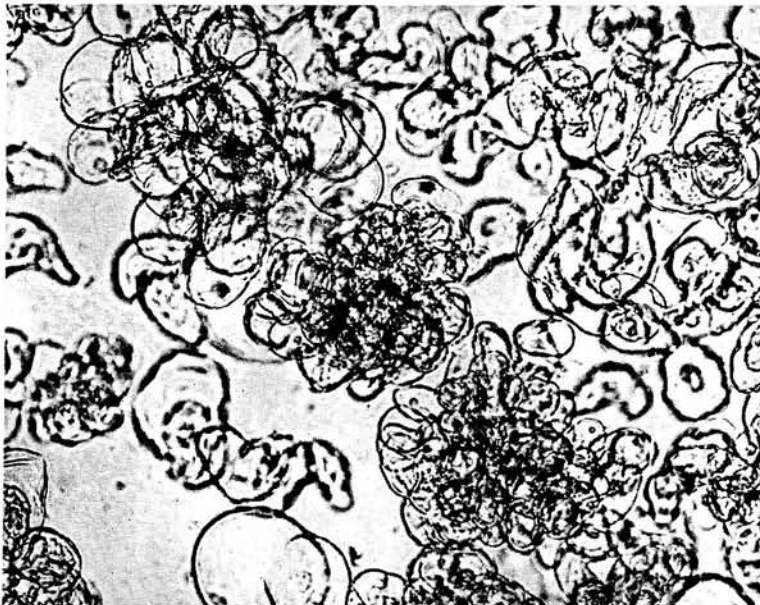


FIG. 2. Suspensión celular del 7mo. día del subcultivo. En este período se incrementa el número de células parenquimatosas y gigantes.

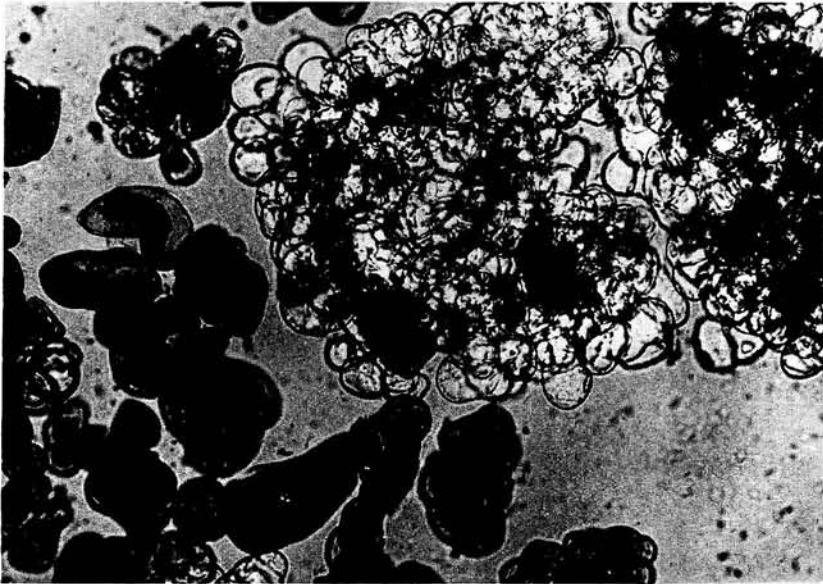


FIG. 3. Suspensión celular a los 2 días de subcultivo, teñida con azul de Evans al 1%. Se observa que la mayoría de las células meristemáticas no toman el colorante, mientras que las parenquimatosas y gigantes se colorean.

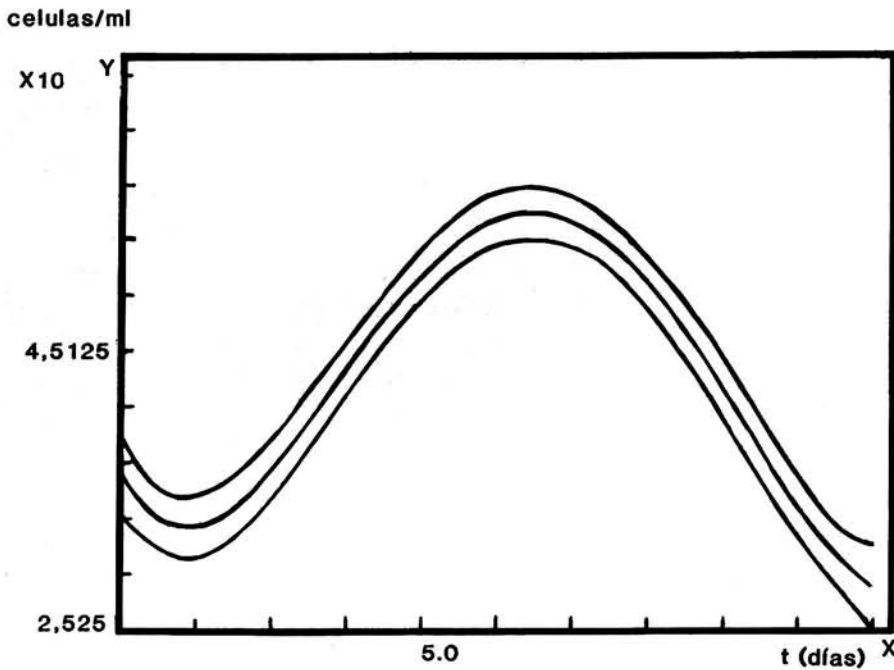


FIG. 4. Ajuste de la curva de crecimiento obtenido durante los 10 días de subcultivo de la suspensión celular.

Tabla 1
RESULTADOS DE REGRESION POLINOMICA DE GRADO 4
COEFICIENTE DE CORRELACION 0,9927133016676982

$F = 1425,251041587907$ para $GLSUP = 5$ y $GLIN = 105$

$VAR. RES. = 1838,312245624370$

Matriz inversa

| | | | | |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0,0916 | -0,0991 | 0,0323 | -0,0041 | 0,0002 |
| -0,0991 | 0,2173 | -0,0909 | 0,0131 | -0,0006 |
| 0,0323 | -0,0909 | 0,0417 | -0,0063 | 0,0003 |
| -0,0041 | 0,0131 | -0,0063 | 0,0010 | -0,0000 |
| 0,0002 | -0,0006 | 0,0003 | 0,0000 | 0,0000 |

| <i>Coficiente</i> | <i>Valor</i> | <i>Varianza</i> | <i>TS (GL = 105)</i> |
|-------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| AO | 301,9895 | 168,4048 | 23,2710 |
| A1 | -91,8343 | 399,4377 | -4,5949 |
| A2 | 59,2217 | 76,6544 | 6,7641 |
| A3 | -9,1256 | 1,8152 | -6,7732 |
| A4 | 0,4047 | 0,0045 | 6,0569 |

A diferencia de los cultivos de células animales, donde existe un conjunto de parámetros establecidos para definir las líneas celulares, en los cultivos de células vegetales no existen descritos criterios uniformes en este sentido. Por tal motivo, el comportamiento estable durante meses de la morfología, la fisiología y la bioquímica se usan como parámetros para definir las líneas. En el caso de este trabajo, que trata acerca de un cultivo de una genética extremadamente complicada por la poliploidía que presenta, por ser estas plantas un mosaico genético y por presentar una interacción genotipo-ambiente significativa (Heinz, *et al.*, 1977 y Heinz *et al.*, 1969), el establecimiento de criterios uniformes para el concepto de línea celular es de gran complejidad. Hemos tomado como criterio fundamental para establecer esta línea celular, la estabilidad de su comportamiento durante más de seis meses, en relación con los parámetros morfológicos y fisiológicos, que incluyen la cantidad significativa de subcultivos realizados (más de 20) y el crecimiento sistemático de la suspensión. Evidenciado por el aumento del volumen celular (fig. 5) en períodos comprendidos entre 2 y 4 semanas y de las curvas de crecimiento obtenidas en más de 3 ocasiones de diferentes subcultivos de la misma suspensión.

Además, esta línea se ha sembrado en placas en distintas fases de su crecimiento, obteniéndose así pequeños callos distribuidos en el medio de cultivo de la placa petri, sobre todo con mayor abundancia en los tres primeros días de haber iniciado el subcultivo (fig. 6). En el 5to. y 6to. días también se obtuvieron callos, pero en menor número que los obtenidos en los días descritos anteriormente, estos resultados están relacionados con la población de células existentes en los diferentes días del cultivo. Los resultados obtenidos en relación con el índice de refracción para determinar los azúcares reductores, el peso húmedo y el volumen celular, pueden correlacionarse adecuadamente con la curva de crecimiento (fig. 7). En el caso del índice de refracción se puede observar cómo disminuye a medida que aumenta el número de células, llegando a un mínimo al 6to. día, lo cual corresponde al máximo de la curva respecto al número de células; esto se explica por el hecho de que el consumo de azúcares reductores



FIG. 5. Precipitado de células que se observa macroscópicamente al dejar sedimentar el cultivo.



FIG. 6. Callos de diferentes tamaños distribuidos en el medio de cultivo de la placa petri, obtenidos aproximadamente a las cuatro semanas de sembrada la suspensión en la placa.

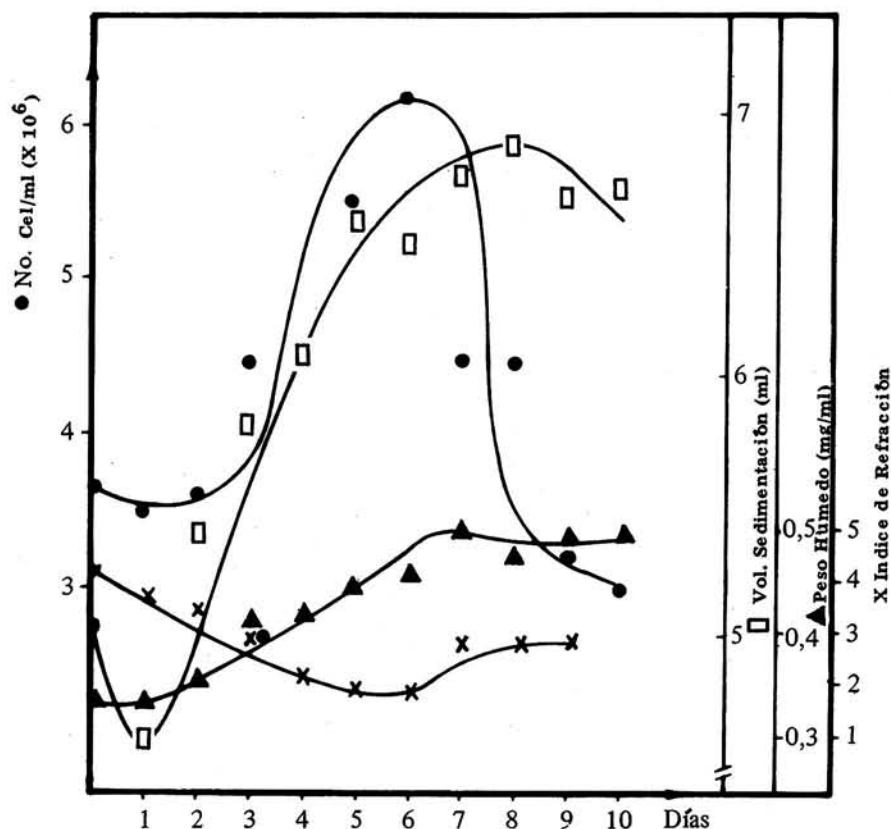


FIG. 7. Crecimiento celular medido a través del volumen de sedimentación (□), peso húmedo (▲), e índice de refracción (x) como una medida del consumo de sacarosa. No. Cel./ml (●)

del medio se incrementa sustancialmente a medida que aumenta el número de células. En relación con el peso húmedo se observa también un crecimiento del mismo, que sigue paralelamente al crecimiento del número de células aunque su máximo se encuentra en el 7mo. día de subcultivo, y después desciende ligeramente, manteniéndose a niveles algo inferiores a su mayor valor. Al parecer, en el proceso de crecimiento celular se sintetizan, se incorporan a las células, o se agregan, sustancias que mantienen alto los valores del peso húmedo encontrado, pues estas sustancias aún se mantienen después de la caída brusca del número celular.

Los valores del volumen de sedimentación encontrados se incrementan paulatinamente y llegan al máximo el 7mo. día; posteriormente descienden ligeramente y se mantienen en valores similares.

Estos resultados coinciden con las observaciones microscópicas del incremento de las células parenquimatosas y gigantes, a medida que pasan los días del subcultivo proveniente de la transformación de las células meristemoides. Estas, después del 6to. día, disminuyen su actividad mitótica a causa, posiblemente, de la carencia de nutrientes en el medio. Esto explica la causa de la caída brusca del número de células en el subcultivo y del incremento del volumen celular y el peso húmedo que mantienen sus valores altos.

El análisis de los resultados de los experimentos de las sales de tetrazolium que miden actividad mitocondrial (fig. 8), refleja el hecho interesante de que los valores máximos están alrededor del 3er. día, período en el cual las células no han entrado en su fase exponencial de crecimiento y que estos valores descienden bruscamente con la fase exponencial de la curva. La interpretación de estos resultados no es concluyente, pero pudiera estar relacionada con una actividad mitocondrial intensa antes del crecimiento exponencial de la población celular, sin embargo, no nos explicamos cómo es posible que durante el período exponencial de crecimiento, donde existe una intensa división celular, la actividad mitocondrial pueda disminuir. En este sentido otros experimentos serán necesarios para dilucidar este problema.

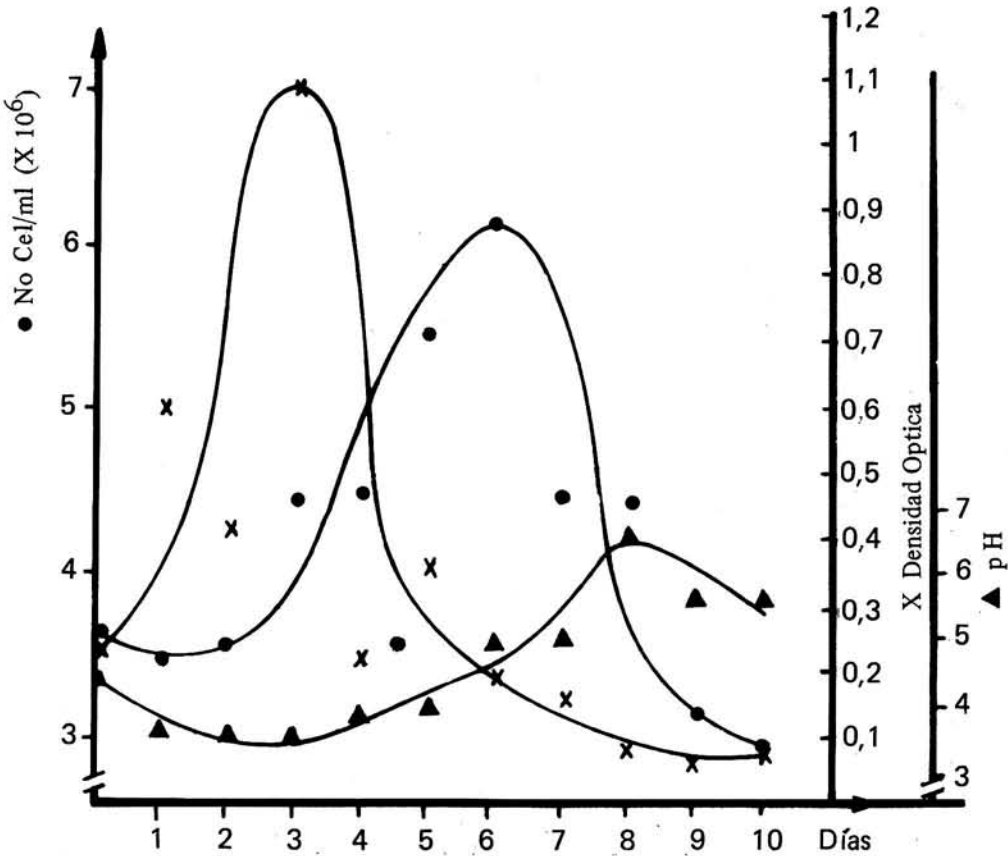


FIG. 8. Registro de la variación del pH en el medio de cultivo (▲) y de la densidad óptica producto de la reducción de las sales de tetrazolium a nivel mitocondrial (x) en comparación con el número celular. No. Cel./ml (●)

En relación con la obtención de protoplastos se pudo observar que el rendimiento en por ciento fue mayor en los primeros días del subcultivo. En este período se obtuvo un rendimiento entre 60-70% de protoplastos. En el 3ro. y 4to. días de subcultivo se mantuvieron cifras similares, posteriormente a esto se inicia un descenso en el rendimiento, llegando a ser nula la obtención de protoplastos a partir del 7mo. día. Es conveniente precisar que si bien es cierto que el rendimiento en por ciento es mayor en los primeros días de subcultivo, los valores

máximos absolutos se encuentran entre el 4to. y el 6to. días, período en que el número de células se incrementa sustancialmente. Esto tiene importancia en la obtención de suficiente cantidad de protoplastos para trabajos en biología molecular.

La obtención de esta línea celular abre amplias perspectivas en los trabajos de biología molecular, biología celular, bioquímica, ingeniería genética en caña, y además, nos brinda la posibilidad de poder incidir directamente a nivel celular en la selección de mutantes en una variedad de importancia económica para nuestra agricultura.

El hecho de que estas suspensiones celulares estén constituidas predominantemente por células dediferenciadas, brinda la posibilidad de incrementar la variabilidad genética mediante las propias condiciones de cultivo o por el uso más efectivo de tratamientos mutagénicos.

También es posible elevar la eficiencia, en la selección frente a factores adversos como salinidad, toxinas, medios hipertónicos y otros.

En la población celular se encuentra cierto grado de diferenciación que se manifiesta en células transformadas semejantes a traqueidas o en estructuras con cierto grado de organización similares a embriones. Esto se incrementa a medida que se reduce el 2-4-D en el medio.

Los embrioides mencionados, según se espera, bajo condiciones propicias deben llegar a formar plantas.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a las compañeras Ana María Barreto y Gumersinda Bombino, por su valiosa ayuda técnica; a la Lic. Ana María Riverón del grupo de neurofisiología del CENIC por su colaboración en el procesamiento estadístico y el ajuste de la curva de crecimiento, así como a Mirtha Prieto por su ayuda en la preparación de este trabajo.

REFERENCIAS

- CHEN, W. H.; W. COCKBRION y H. E. STREET (1982). *Cell plating and selection of cold-tolerant cell lines in sugarcane*. Proc. V. Inter. Cong. Plant Tissue and Cell Cult. Japan.
- FERENCZY, L. y A. MARETZKI (1970). *Success in preparing sugarcane protoplasts*. Ann-Rep. Exp. Sta. Hawaiian. Sugar planters Assoc. 64-65.
- HEINZ, D. J.; M. KRISHNAMURTHI; L. G. NICKELL y A. MARETZKI (1977). *Cell, Tissue and Organ Culture in Sugarcane Improvement*. En: Applied and fundamental aspects of plant cell, Tissue and organ culture; pp. 3-17, edits. J. Reinert and Y.P.S. BAJAJ.
- HEINZ, D. J. y G. W. P. MEE (1969). *Plant differentiation from callus tissue of Saccharum species*. Crop. Sci. 9, 346-348.
- HEINZ, D. J.; G. W. P. MEE y L. G. NICKELL (1969). *Chromosome numbers of some Saccharum species hybrids and their cell suspension cultures*. Amerc. J. Bot. 56, 450-456.
- HO, W. J. e I. K. VASIL (1983). *Somatic Embryogenesis in sugarcane (Saccharum officinarum L.): Growth and plant regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures*. Ann. Bot. 51, 719-726.
- KARTHA, K. K. (1982). *Plant Tissue Culture Methods*, pp. 25-33. Eds. L. R. Wetter and F. Constabel, Canada.
- KRISHNAMURTHI, M. (1976). *Isolation, Fusion and Multiplication of Sugarcane Protoplast and comparison of Sexual and Parasexual Hybridization*. Euphytica 25, 145-150.

- LARKIN, P. J. y W. R. SCOWCROFT (1981). *Eyespot Disease of Sugarcane*. Plant Physiol. **67**, 408-414.
- LIU, M. C. y W. H. CHEN (1973). *Effect of Organic Nitrogen on Growth, and Patterns of Growth and Division in Suspension Cultures of Sugarcane*. J. Agri. Assoc. China T. **81**, 20-27.
- LIU, M. C. y H. S. YEH (1982). *Selection of a NaCl tolerant Line through Stepwise Salinized Sugarcane Cell Cultures*. Proc. 5th Inter. Cong. Plant Tissue and Cell Culture.
- MARETZKI, A.; A. DE LA CRUZ y L. G. NICKELL (1971). *Extracellular hydrolysis of Starch in Sugarcane cell suspension*. Plant Physiol. **48**, 521-525.
- MARETZKI, A. y L. G. NICKELL (1973). *Formation of Protoplasts from sugarcane cell suspension and the regeneration of cell cultures from protoplasts*. Colloq. Intern. CNRS, **212**, 51-63.
- MARETZKI, A.; L. G. NICKELL y M. THOM (1969). *Arginine in Growing Cells of Sugarcane. Nutritional Effects, uptake and Incorporation into proteins*. Physiol. Plantarum **22**, 827-839.
- MARETZKI, A. y M. THOM (1972a). *The existence of two membrane transport systems for glucose in suspensions of sugarcane cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications **47**, 44-49.
- MARETZKI, A. y M. THOM (1972b). *Membrane Transport of sugars in Cell suspensions of Sugarcane. I Evidence for sites and specificity*. Plant Physical., **49**, 177-182.
- MARETZKI, A. y M. THOM (1978). *Characteristics of a Galactose-adapted Sugarcane Cell Line Grown in Suspension Culture*. Plant Physiol. **61**, 544-548.
- MARETZKI, A.; M. THOM y L. G. NICKELL (1972). *Influence of Osmotic potentials on the Growth and Chemical Composition of Sugarcane cell cultures*. Hawaiian Planters's Record **58**, 183-199.
- NICKELL, L. G. y A. MARETZKI (1969). *Growth of Suspension Cultures of Sugarcane Cells in Chemically Defined Media*. Physiologia Plantarum **22**, 117-125.
- NICKELL, L. G. y A. MARETZKI (1970). *The utilization of sugars and starch as carbon sources by sugarcane cell suspension cultures*. Plant and cell Physiol. **11**, 183-185.
- NICKELL, L. G. y A. MARETZKI (1972). *Developmental and Biochemical studies with cultured sugarcane cell suspensions*. Proc. IV IFS. Ferment. Technol. Today, pp. 681-688.
- THOM, M.; A. MARETZKI, E. KOMOR y W. S. SAKAI (1981). *Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle*. Plant cell tissue organ culture **1**, 3-14.