

Morfogénesis de suspensiones celulares de caña de azúcar

E. DÍAZ, S.B. KORNEVA, R.H. MARIBONA y O. ANCHETA

Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC), Apartado 6880, La Habana, Cuba

Recibido en julio de 1989

Aprobado en mayo de 1990

RESUMEN

En el presente trabajo se determinaron algunas de las condiciones de cultivo que favorecen la morfogénesis de las suspensiones celulares de la caña de azúcar. Fue comprobado el efecto del 2,4-D sobre la calogénesis y morfogénesis de las suspensiones. Se determina el estadio de crecimiento más apropiado de los callos para la obtención de suspensiones celulares morfogénicas. Fue demostrada la dependencia existente entre el tiempo de subcultivo y la capacidad calogénica y morfogénica de las suspensiones celulares. La observación con el microscopio electrónico permitió confirmar que los bajos niveles de 2,4-D favorecen la morfogénesis de las suspensiones celulares.

SUMMARY

In the present work, some culture conditions for morphogenesis of sugarcane cell suspension cultures were determined. We tested the effect of 2,4-D and the growth stage of callus on callogenesis and morphogenesis of cell suspensions. We demonstrated the direct dependence of time of subculture on callogenesis and morphogenesis of cell cultures. Scanning electron microscopic observations confirmed that lower levels of 2,4-D favored morphogenesis of cell suspensions.

INTRODUCCION

En la caña de azúcar, y en general en las gramíneas, se han realizado diferentes

trabajos con el objetivo de obtener plantas a partir de suspensiones celulares (Liu *et al.*, 1977; Vasil, 1982 y Guiderdoni, 1985). A pesar de que aún son pocos los éxitos alcanzados en este sentido, se ha logrado establecer que la morfogénesis de las suspensiones celulares depende de la composición de reguladores del crecimiento presentes en el medio (Vasil, 1982). Para cultivos de diferentes especies el balance hormonal que se requiere es diferente (Dos Santos *et al.*, 1980).

Uno de los reguladores del crecimiento que influye en el establecimiento y posterior regeneración de plantas a partir de cultivos de callos y de suspensiones celulares, es el ácido-2,4-diclorofenoacético (2,4-D, auxina sintética) (Barba y Nickell, 1969; Chagvardieff, 1980). También es conocido que la morfogenicidad de los cultivos de tejidos disminuye durante períodos prolongados de subcultivo (Barba y Nickell, 1969).

El objetivo general de este trabajo está dirigido a determinar algunas de las condiciones de cultivo que favorecen la morfogénesis de las suspensiones celulares, mediante el estudio de diferentes factores que influyen en el crecimiento y la regeneración de plantas a partir de

suspensiones celulares, tales como concentración de 2,4-D, edad y tiempo de subcultivo de los callos de los cuales se obtendrán las suspensiones celulares.

MATERIALES Y METODOS

Los explantes utilizados en nuestro trabajo fueron las hojas primordiales del verticilio apical de plantas de caña de azúcar, con (c.a.) 6-8 meses de edad, de la variedad B4362 (*Saccharum officinarum* L.).

A partir de estos explantes fueron obtenidos los callos en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificado por Heinz (MSH) (Heinz, 1969), en presencia de 3 mg/l de 2,4-D, 10 mg/l de kinetina y 2,5 mg/l de ácido indolacético (AIA).

Dinámica de crecimiento de los callos en distintos niveles de 2,4-D

El efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D sobre la dinámica de crecimiento de los callos, fue determinada cultivando callos de c.a. 30 mg y 30 días de edad, en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo sólido (MSH) y distintas concentraciones de 2,4-D (0,5; 1,5; 3 mg/l).

En el intervalo comprendido desde 10 hasta 50 días de crecimiento en el medio, con distintos niveles de 2,4-D, fueron seleccionados al azar 10 callos por cada variante de 2,4-D y tiempo de crecimiento transcurrido y pesados en una balanza analítica de 0,1 mg de sensibilidad.

Influencia de los distintos niveles de 2,4-D y estadios de crecimiento de los callos sobre la calogénesis y morfogénesis de las suspensiones celulares

Para analizar la influencia del 2,4-D y los estadios de crecimiento de los callos sobre la calogénesis y morfogénesis de las suspensiones celulares, fueron seleccionados callos de 0, 10, 20 y 30 días de haber sido cultivados en medio MSH con 0,5; 1,5 y 3 mg/l de 2,4-D, y fueron realizadas las desagregaciones celulares en medio líquido MSH en presencia de diferentes concentraciones de 2,4-D.

A la tercera semana de desagregación, las suspensiones celulares fueron filtradas por una tela de doble gasa. De este filtrado fueron tomadas alícuotas de 8 ml y mezcladas en relación 1:1 con el medio sólido fundido en baño de María a 37 °C ± 1.

Alícuotas de 5 ml de esta mezcla fueron vertidas en placas Petri de 50 mm de diámetro.

La siembra en placas fue realizada en medios (A, B y C) contentivos de la correspondiente concentración de 2,4-D (MSH), y en ese mismo medio, pero sin la adición de reguladores del crecimiento: AIA, kinetina y 2,4-D (SH), en presencia y ausencia de hidrolizado de caseína (HC), solidificados con 1,4 % de agar (technical oxoid No. 3). Medio A: MSH en presencia de concentraciones variadas de 2,4-D. Medio B: MSH en presencia de concentraciones variadas de 2,4-D + HC. Medio C: SH; Medio D: SH + HC. Para cada variante de medio fueron utilizadas dos placas.

Después de 30 días de haber sido cultivadas las suspensiones celulares en las placas, fueron contados los callos neoformados en cada una y determinada la eficiencia del plaqueo (EP), según la fórmula siguiente (Street, 1977): $EP = (\text{número de colonias por placa}) \times 100 / \text{número de células por placa}$. Los datos de EP fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA trifactorial (diseño completamente aleatorizado) y un test de Duncan.

Los callos neoformados en los medios A y B (con reguladores del crecimiento) fueron pasados a medio fresco MSH, pero sin 2,4-D y cultivados a la luz.

A los 30 días de cultivo, se ponderó mediante una escala subjetiva la presencia de brotes foliares y radiculares.

De los callos neoformados en las placas fueron tomadas muestras para la caracterización de su morfología mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido.

Influencia de los subcultivos sobre la morfogénesis de las suspensiones celulares

Para determinar la dependencia existente entre el tiempo de subcultivo y la capacidad calogénica y morfogénica de las suspensiones celulares, fueron fragmentados callos derivados de distintos subcultivos (R1, R2, R3) y colocados en dos medios de cultivo líquido: MSH (en presencia de 3 mg/l de 2,4-D) y en medio sin hormonas (SH).

Después de tres semanas de desagregación, las suspensiones celulares fueron filtradas, sembradas en las placas y cultivadas en las condiciones y medios de cultivo descritos anteriormente. Igualmente fueron determinadas la eficiencia del plaqueo y la capacidad morfogénica de los callos neoformados. Todos los medios de cultivo utilizados durante los experimentos fueron esterilizados 20 minutos a 121 °C y 1 atm de presión.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dinámica de crecimiento de los callos en distintos niveles de 2,4-D

Las auxinas desempeñan un papel muy importante en la formación de los callos en la caña de azúcar. De ellas, el 2,4-D es considerado el más potente promotor del crecimiento (Barba y Nickell, 1969; Chagvardieff, 1980).

El comportamiento de los callos en los tres niveles de 2,4-D estudiados fue semejante, describiendo la curva sigmoidea típica del crecimiento (figura 1). En estas curvas se observan bien definidas las fases de latencia o fase lag, la fase exponencial y la estacionaria. Curvas de crecimiento de callos, similares a las obtenidas en este trabajo, han sido reportadas en otras especies de plantas (Aitchison *et al.*, 1977; Sroga, 1983).

Se evaluó el incremento de peso fresco/unidad inicial de peso de callo mediante un ANOVA bifactorial (diseño completamente aleatorizado) (tabla 1).

Las medias de los tratamientos fueron comparadas mediante el test de Rangos Múltiples, de Duncan (figura 1).

El análisis de estos resultados refleja que el incremento de peso de los callos/unidad inicial fue superior en presencia de 1,5 mg/l de 2,4-D entre los 40-50 días de cultivo. Por el contrario, en ese mismo período se observó un menor incremento del peso fresco en presencia de 0,5 mg/l.

En el gráfico puede observarse, además, que la fase exponencial de crecimiento fue más prolongada (hasta 40 días) en presencia de 1,5 mg/l de 2,4-D, mientras que en los otros dos niveles los callos dejan de crecer a los 30 días.

Ho y Vasil (Ho y Vasil, 1983a) encontraron que la concentración óptima de 2,4-D para la formación de callos embriogénicos en la variedad 68-1067 de caña de azúcar fue de 0,5-1,5 mg/l, obteniendo el máximo de peso fresco a 1,5 mg/l. Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, por lo que sugerimos esta concentración de 2,4-D en el medio de crecimiento de los callos.

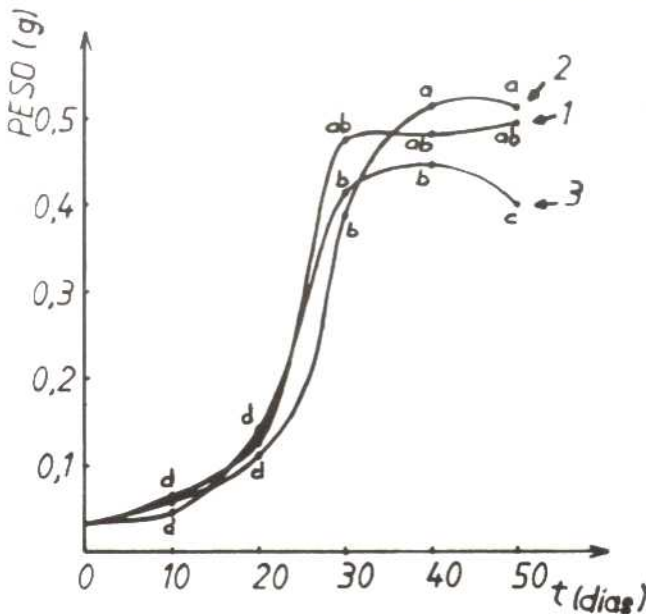


FIG. 1. Dinámica de crecimiento de los callos en distintos niveles de 2,4-D: 1) 3 mg/l; 2) 1,5 mg/l y 3) 0,5 mg/l; a-d) resultados del test de Duncan (letras iguales no difieren significativamente).

Tabla 1
ANOVA BIFACTORIAL: INFLUENCIA DEL 2,4-D Y LA EDAD DEL CALLO SOBRE EL INCREMENTO DE PESO/UNIDAD INICIAL DE PESO DE CALLO

F. de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamientos	14	5796,1	414,007	39,6047 ***
Concentración 2,4-D (A)	2	156,764	78,3818	7,4981 ***
Edad callo (B)	4	5327,83	1331,96	127,417 ***
(A x B)	8	311,504	38,938	3,7248 ***
Error	135	10,4535		
Total	149	7207,32		

*** = significativo para $p < 0,001$

Influencia de los distintos niveles de 2,4-D y estadios de crecimiento de los callos sobre la calogénesis y morfogénesis de las suspensiones celulares

Las suspensiones obtenidas estaban compuestas por agregados celulares y células aisladas (figura 2).

Del análisis estadístico realizado a los resultados de la calogénesis de las suspensiones celulares (tablas 2 y 3) se deduce que la mayor calogénesis se obtuvo a 1,5 mg/l, 30 días de crecimiento de los callos donantes y el medio B (MSH + HC).

Las condiciones de cultivo de menor calogénesis fueron observadas en presencia de 0,5 mg/l de 2,4-D.

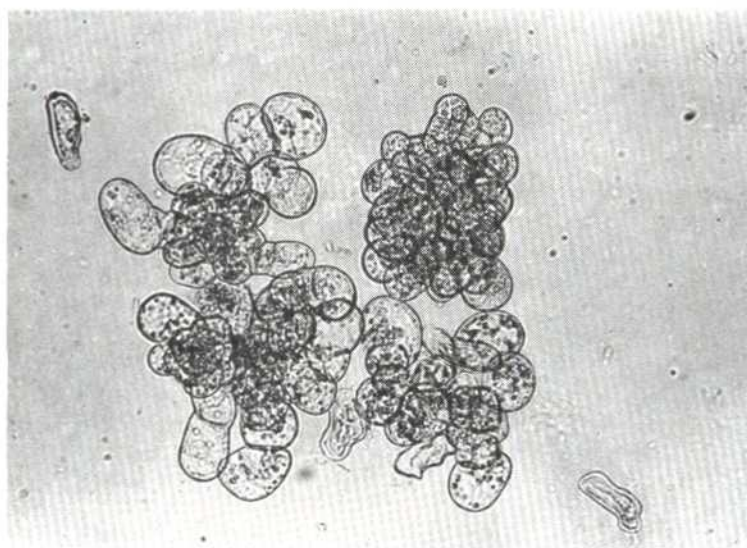


FIG. 2. Células y agregados celulares liberados al medio después de tres semanas de desagregación (x 32).

Tabla 2
ANOVA TRIFACTORIAL: INFLUENCIA DEL 2,4-D, EDAD DEL CALLO Y MEDIO DE PLAQUEO
SOBRE LA CALOGENESIS (EP) DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

F. de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamientos	35	40743,2	1164,09	834,36 ***
Concentración 2,4-D (A)	2	8715,88	4357,94	3123,56 ***
Edad callo (B)	2	10088,9	5044,46	3615,63 ***
Medio plaqueo (C)	3	5682,97	1894,32	1357,76 ***
(A x B)	4	5405,72	1351,43	968,64 ***
(A x C)	6	3311,9	551,983	395,63 ***
(B x C)	6	2185,64	364,274	261,09 ***
(A x B x C)	12	5352,16	446,013	319,68 ***
Error	36	50,22	1,395	
Total	71	40793,4		

*** = significativo para $p < 0.001$

EP = Eficiencia del Plaqueo

En general, la calogénesis fue mayor en los medios de plaqueo A y B con reguladores del crecimiento enriquecidos con hidrolizado de caseína.

A partir de los callos neoformados de las suspensiones celulares, fue posible observar la formación de brotes foliares y radiculares (figura 3).



FIG. 3. Brotes foliares y radiculares neoformados a partir de suspensiones celulares.

Tabla 3
 INFLUENCIA DEL 2,4-D Y EDAD DEL CALLO SOBRE LA CALOGENESIS Y MORFOGENESIS
 DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

Calogénesis				Morfogénesis		
2,4-D (mg/l)	Edad Callo (días)	Medio Plaqueo	X EP (x10 ⁻²)	Test de Duncan	Brotos foliares	Brotos radiculares
0,5	10	A	5,15	g	++	+++
		B	13,50	fg	++	+++
		C	4,35	g	+	-
		D	12,00	fg	+	+++
	20	A	1,45	g	+	-
		B	2,60	g	+	++
		C	0,00	g	-	-
		D	2,30	g	-	+
	30	A	7,95	g	+	+
		B	4,85	g	+++	+++
		C	1,75	g	-	+
		D	5,55	g	+	+
1,5	10	A	18,50	fg	+	+
		B	41,00	de	-	-
		C	17,50	fg	+	+
		D	5,90	g	-	-
	20	A	0,60	g	-	-
		B	1,20	g	-	-
		C	9,15	fg	-	+
		D	3,45	g	-	+
	30	A	46,00	cd	-	-
		B	94,50	a	+	+
		C	13,00	fg	-	-
		D	6,40	g	-	-
3,0	10	A	23,00	efg	-	-
		B	45,00	cd	-	-
		C	15,00	fg	-	+
		D	1,40	g	-	++
	20	A	1,30	g	-	-
		B	32,00	def	-	+
		C	13,00	fg	-	-
		D	9,65	fg	-	-
	30	A	66,50	bc	+	++
		B	65,50	bc	+	+
		C	76,50	ab	+	-
		D	33,00	def	-	-

Símbolos:

- (-) No presente
 (+) Poco frecuente
 (++) Frecuente
 (+++) Muy frecuente

Medios de plaqueo:

- A: MSH
 B: MSH + HC
 C: SH
 D: SH + HC

En los mayores niveles de 2,4-D analizados (3 y 1,5 mg/l), la morfogénesis de las suspensiones celulares fue pobre (ver tabla 3). Sin embargo, en presencia de 0,5 mg/l fue posible observar una mayor frecuencia de brote de los callos neoformados en las placas.

La regeneración de plantas de las suspensiones celulares en gramíneas ha sido difícil. Varios autores sólo refieren la obtención de una organogénesis radicular a partir de suspensiones celulares (Liu *et al.*, 1977; Gutiérrez, 1984 y Guiderdoni, 1985). Sin embargo, en los últimos años ya se ha reportado con éxito la regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares y protoplastos en numerosas especies de gramíneas (Vasil y Vasil, 1982; Ho y Vasil, 1983b; Srinivasan y Vasil, 1986; Vasil y Vasil, 1986; Harris *et al.*, 1988; Rhodes *et al.*, 1988; Prioli *et al.*, 1989; Shillito *et al.*, 1989).

La adición de hidrolizado de caseína así como la presencia de kinetina, ácido indolacético y 2,4-D en el medio de plaqueo

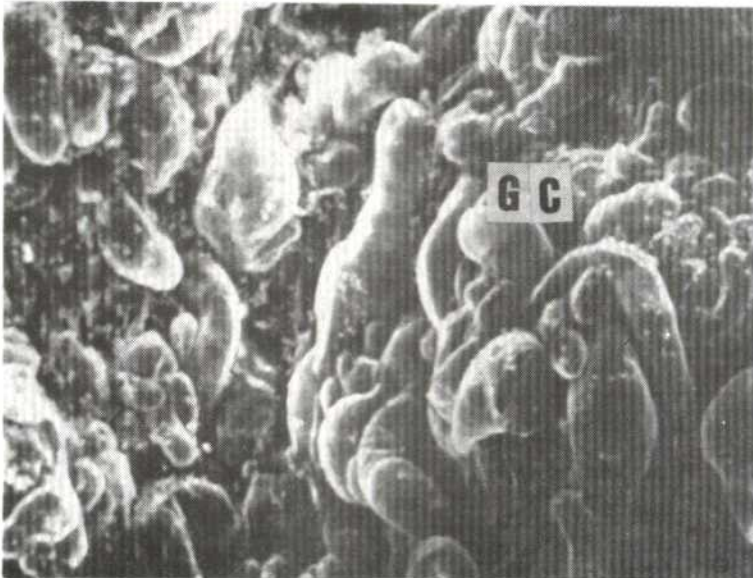
de las suspensiones celulares, también resultaron ser factores críticos en la calogénesis y morfogénesis de las suspensiones celulares (ver tabla 3).

El estudio de la morfología de los callos neoformados a partir de las suspensiones celulares mediante microscopía electrónica de barrido, reveló que en las mayores concentraciones de 2,4-D estudiadas (3 y 1,5 mg/l), la presencia de embriones somáticos fue pobre (figura 4-A). En presencia de 0,5 mg/l fueron observados no sólo embriones bien definidos, sino además primordios foliares precoces (figura 4-B).

Estos resultados confirman que las bajas concentraciones de 2,4-D son las más adecuadas para la morfogénesis de las suspensiones celulares.

Resultados similares han sido observados en suspensiones celulares de *Pennisetum americanum* (Vasil y Vasil, 1982), en caña de azúcar (Ho y Vasil, 1983b) y en maíz (Vasil y Vasil, 1986). En estos cultivos se comprobó que las altas

a)



b)

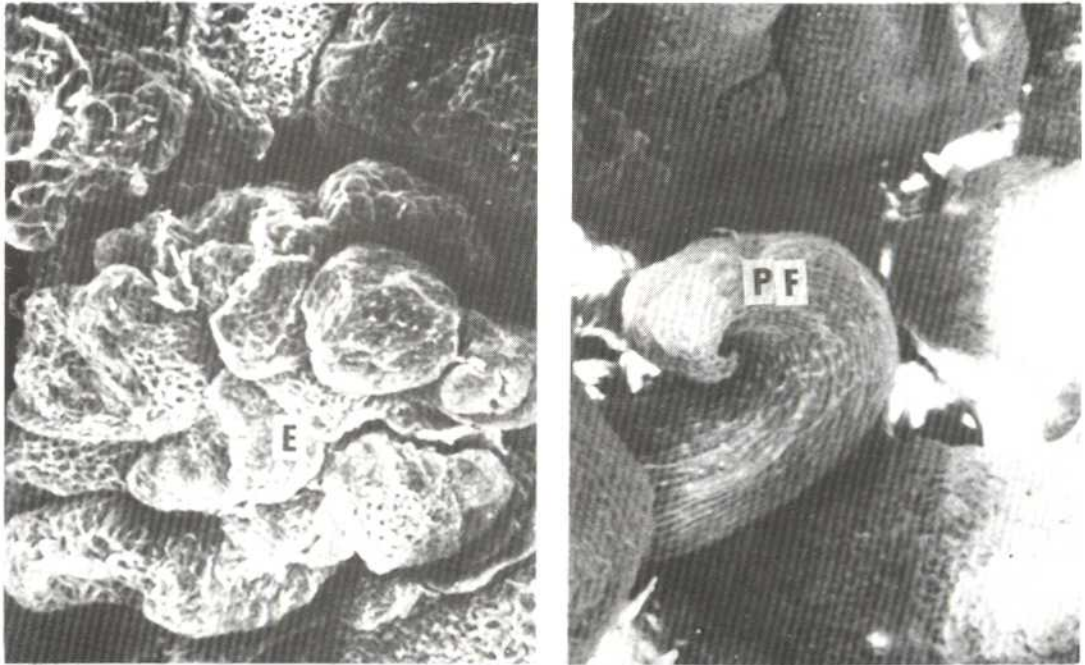


FIG. 4. Morfología de los callos neoformados de suspensiones celulares por MEB: A) En presencia de 3 mg/l: predominio de grupos celulares (GC); B) En presencia de 0,5 mg/l: embrioides (E) y primordio foliar (PF).

concentraciones de 2,4-D permiten una rápida proliferación de las células embriogénicas en la suspensión y en el medio de plaqueo, y que significativamente menores concentraciones son requeridas durante la organización de los embrioides globulares y la regeneración de plantas.

La presencia de embriones somáticos en numerosas muestras analizadas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, coincide con lo reportado en varios estudios histológicos en gramíneas. En estos reportes se comprueba que la regeneración de plantas en este importante grupo de monocotiledóneas es mediante la embriogénesis somática (Green, 1982; Wang, 1982; Vasil y Vasil, 1982; Torroella y Kourí, 1986).

Influencia de los subcultivos sobre la calogénesis y morfogénesis de las suspensiones celulares

La concentración de las células en las suspensiones obtenidas de los diferentes subcultivos de callos (R1, R2, R3) alcanzó un orden de 10^5 cel/ml.

Las mayores concentraciones de células fueron detectadas en las suspensiones derivadas de los callos R1 (figura 5).

Los valores superiores de eficiencia de plaqueo (EP) fueron alcanzados a partir de las suspensiones celulares obtenidas de callos R1, lo cual fue confirmado por los análisis estadísticos realizados (tablas 4 y 5).

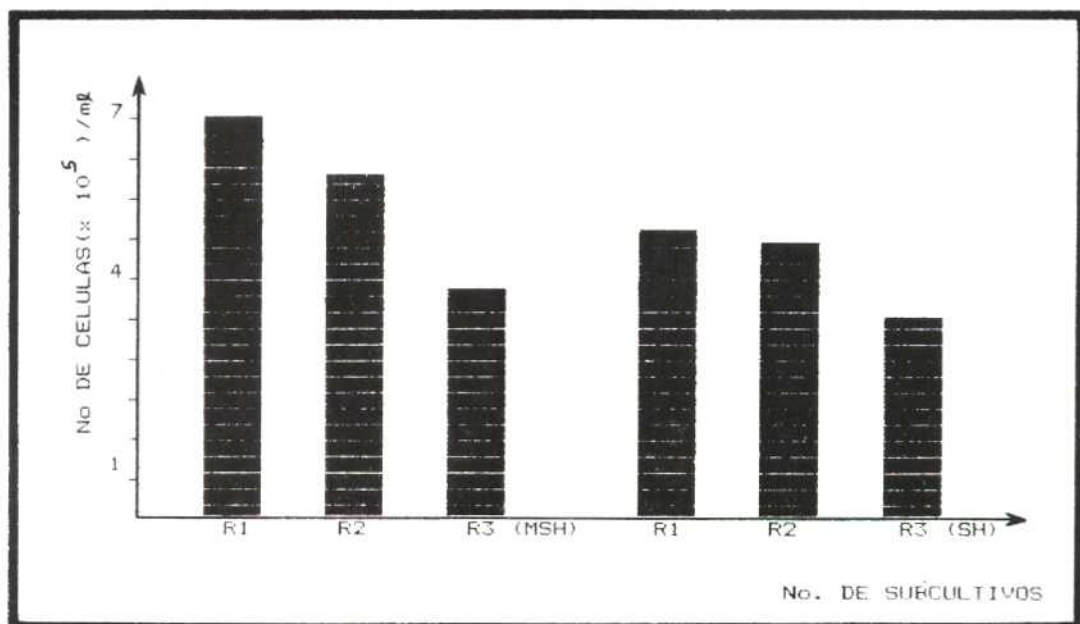


FIG. 5. Determinación del número de células en suspensiones de diferentes subcultivos en dos medios de cultivo diferentes: MSH) medio con reguladores del crecimiento; SH) medio sin reguladores del crecimiento.

Tabla 4
ANOVA TRIFACTORIAL: INFLUENCIA DEL NUMERO DE SUBCULTIVOS SOBRE LA CALOGENESIS (EP) DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

F. de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F
Tratamientos	23	6675,863	290,2549	13,229 ***
Subcultivos (A)	2	1409,906	704,953	32,131 ***
Medio desag. (B)	1	531,4673	531,4673	24,224 ***
Medio plaqueo (C)	3	210,064	70,02133	3,191 *
(A x B)	2	2280,125	1140,062	51,962 ***
(A x C)	6	765,4629	127,5772	5,811 ***
(B x C)	3	214,929	71,64298	3,265 *
(A x B x C)	6	1263,908	210,6514	9,601 ***
Error	24	526,5635	21,94015	
Total	47	7202,426		

- * = significativo para $p < 0,05$
- ** = significativo para $p < 0,01$
- *** = significativo para $p < 0,001$

Tabla 5
INFLUENCIA DEL NUMERO DE SUBCULTIVO SOBRE LA CALOGENESIS Y MORFOGENESIS DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

Número de subcultivos	Calogénesis			Morfogénesis		
	Medio desag	Medio plaqueo	X EP (x10 ⁻²)	Duncan	Brotos foliares	Brotos radiculares
R1	MSH	A	41,50	a	+	+++
	MSH	B	1,55	c	+++	+
	MSH	C	40,55	a	+++	++
	MSH	D	30,50	b	-	+
	SH	A	1,00	c	-	+
	SH	B	5,15	c	++	++
	SH	C	1,35	c	++	++
	SH	D	1,04	c	+	++
R2	MSH	A	1,90	c	-	+
	MSH	B	1,90	c	+++	++
	MSH	C	0,75	c	-	-
	MSH	D	0,00	d	-	-
	SH	A	6,50	c	-	++
	SH	B	4,10	c	+	-
	SH	C	0,34	d	-	-
	SH	D	3,75	c	-	++
R3	MSH	A	1,70	c	-	+
	MSH	B	11,00	c	-	+
	MSH	C	1,35	c	-	-
	MSH	D	1,70	c	-	-
	SH	A	7,50	c	-	++
	SH	B	5,7	e	++	+
	SH	C	12,15	c	-	+
	SH	D	4,95	c	+	++

La formación de brotes foliares y radiculares a partir de los callos neoformados en las placas, fue observada en los tres subcultivos de callos estudiados. En la tabla 5 se observa cómo la morfogénesis fue superior en R1 y cómo ésta disminuye a medida que aumenta el número de subcultivo de los callos donantes.

Estos resultados indican que para obtener suspensiones celulares morfogénicas, deben utilizarse callos de un primer subcultivo.

Numerosos autores coinciden en plantear que la utilización de subcultivos tempranos de callos permite obtener una mayor regeneración de plantas a partir de estos (Street, 1977; Wang y Vasil, 1982).

Por tanto, es de estos subcultivos de donde se obtendrán suspensiones celulares de mayor capacidad morfogénica, lo cual se demuestra en este trabajo.

Las plántulas obtenidas de estos experimentos han logrado sobrevivir en condiciones de campo.

Todos los experimentos fueron repetidos al menos dos veces, obteniéndose resultados similares.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los compañeros C.Dr. Reynaldo López Plana y al Lic. Antonio Sigarroa, de