

INDUCCIÓN, MADURACIÓN Y ENCAPSULACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum sp.*) var CP 5243

✉ Raúl Tapia, Ramiro Castillo, Nadina Nieves, María A Blanco, Justo L González, Margelys Sánchez, Yania Rodríguez

Centro de Bioplantas. Carretera a Morón Km 9, Universidad de Ciego de Ávila 69450, Cuba.
Fax: (53-7) 33 5040; E-mail: bioquim@bioca.edu.cu

ABSTRACT

Three formulations of MS medium enriched with plant growth regulators and sucrose were evaluated during induction and maturation of sugarcane (*Saccharum sp.* var CP 5243) somatic embryos. Other two formulations of this medium, one of them with naftalen-acetic acid and activated charcoal, another supplemented with giberelic acid (GA₃), sucrose and amino acids, were evaluated as artificial endosperm. Sucrose was effective in inducing somatic embryos and its maturation. Also, germination and conversion of both naked and encapsulated embryos within capsules increased in the presence of GA₃, arginine and glutamic acid with 100% germination of embryogenic cell clusters and pre-germinated structures. With a second MS medium (GA₃, sucrose and glutamic acid), the best results were achieved in germination and conversion of both naked and encapsulated structures, showing 57.1% for embryogenic cell clusters and 71.4% for pre-germinated structures. Histology and scanning electron microscopy analysis of somatic embryogenesis in sugarcane embryogenic calli are shown.

Keywords: conversion, encapsulation, maturation, somatic embryogenesis, sugarcane

Biotecnología Aplicada 1999;16:20-23

RESUMEN

En el trabajo se evalúan diferentes medios de inducción y maduración de embriones somáticos obtenidos a partir de callos embriogénicos de caña de azúcar (*Saccharum sp.* var CP 5243). Con este propósito, se evaluaron tres medios MS de composición diferente, enriquecidos con hormonas y sacarosa. También, se evaluaron dos medios MS como endospermo artificial, uno que contiene ácido naftalen acético y carbón activado, y otro, ácido giberélico (AG₃), sacarosa y aminoácidos. De los medios evaluados, el de mejores resultados fue el de inducción y maduración mejorado con sacarosa (60 g/L), en el cual se logró 100% de germinación de los agregados embriogénicos y las estructuras pregerminadas. En la germinación y la conversión de las estructuras, tanto desnudas como encapsuladas, el medio de mejores resultados fue el que contiene AG₃, sacarosa y ácido glutámico que fue empleado como endospermo artificial; con el mismo, se logró 57,1% de agregados embriogénicos y 71,4% de estructuras pregerminadas. Se muestran los resultados de histología y microscopía electrónica de barrido, que evidencian la formación de embriones somáticos en los callos embriogénicos de caña de azúcar.

Palabras claves: caña de azúcar, conversión, embriogénesis somática, encapsulación, maduración

Introducción

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula que no es un gameto ni un producto de la fusión de gametos. El uso potencial de embriones somáticos para la propagación clonal de plantas, se ha reconocido desde hace algún tiempo, pero la tecnología necesaria para emplear estos embriones como un sistema análogo de propagación de semillas no se desarrolló por primera vez hasta finales de la pasada década [1].

Luego de la división celular y la histodiferenciación, ocurre la maduración, período de desarrollo del embrión en el cual ocurre la expansión celular y la deposición de las reservas [2]. En los protocolos de inducción de la maduración se han evaluado diferentes componentes del medio que desempeñan un papel importante en este proceso, entre ellos fuentes nitrogenadas, carbonadas y reguladores del crecimiento [3].

El suministro de carbohidratos durante la maduración es determinante del número y la calidad de los embriones formados. La sacarosa es uno de los más comúnmente usados a concentraciones de 3-6%.

El ácido abscísico (ABA) es considerado como un importante componente en los medios de maduración de embriones somáticos. En la ausencia del ABA, la

maduración es deficiente y el desarrollo de los embriones, asincrónico, la morfología del embrión, anormal y la germinación precoz. Sin embargo, con la adición de esta hormona en el medio de cultivo, se logran embriones de alta calidad con una frecuencia de conversión en plantas mucho mayor [4].

En el sistema de semilla artificial, el embrión somático es encapsulado en una matriz de alginato de sodio que lo soporta, protege y contiene los componentes nutritivos necesarios para los procesos de germinación y conversión.

Teniendo en cuenta esta problemática, el propósito de este trabajo es determinar las condiciones óptimas de inducción y maduración de los embriones somáticos obtenidos a partir de callos embriogénicos de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) de la variedad CP 5243, así como definir la composición del endospermo artificial para su encapsulación.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se emplearon callos embriogénicos obtenidos a partir de segmentos de inflorescencias inmaduras de

1. Redenbaugh K, Slade D, Viss P, Fujii JA. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* 1987; 22(5):803-9.

2. Bewley JD, Black M. Seed: germination, structure and composition. In: Bewley JD, Black M, editors. *Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press; 1985. p.1-3.

3. Merkle SA, Parrott WA, Flinn B S. Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: Thorpe TA, editor. *In vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers; 1995. p.155-203.

4. Gutmann M, Von Aderkas P, Label P, Lelu MA. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *Journal of Experimental Botany* 1996;47(305):1905-17.

✉ Autor de correspondencia

caña de azúcar (*Saccharum* sp.) de la variedad CP 5243, iniciados en medio MS [5] enriquecido con arginina (50 mg/L), prolina (500 mg/L) y ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D) (3 mg/L). Estos callos se subcultivaron a intervalos de 18 días durante tres meses en medio mínimo MS con suplementado con 2,4-D (1 mg/L).

Inducción y maduración

Los callos se transfirieron a diferentes medios de cultivo con combinaciones de sacarosa y ABA en placas Petri que se mantuvieron en la oscuridad durante diez días.

Tratamientos

- I. Medio MS + ANA (1 mg/L)
- II. Medio MS + sacarosa (60 g/L) + ANA (1 mg/L)
- III. Medio MS + ABA (1 mg/L) + ANA (1 mg/L)

Estudios de histología

En el proceso de microtecnia, las muestras se fijaron de 24 a 48 h en formol-alcohol-ácido acético (FAA) y se lavaron con agua corriente durante 24 h. La deshidratación se realizó al vacío en un procesador de tejidos, mediante el tratamiento de las muestras con una serie de soluciones de alcohol terbutílico. Los tejidos se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron en un micrótopo con un espesor entre 5 y 8 μ m. Se utilizó la técnica de tinción doble con hematoxilina y eosina.

Estudio de microscopía electrónica de barrido

Se tomaron muestras de callos y se fijaron en una solución de glutaraldehído a 2% en tampón fosfato a 0,1 M pH 7,2 a 4 °C, durante 4 h. Las muestras se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio (OsO₄) a 2% durante 2 h y se deshidrataron en una serie de soluciones de alcohol. Las observaciones y las microfotografías se hicieron en un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-35C.

Definición del endospermo artificial

En este experimento se evaluaron dos medios de cultivo:

1. Medio A: MS + ácido naftalenacético (ANA) (1 mg/L) + carbón activado (1 g/L)
2. Medio B: MS + sacarosa (50 g/L) + arginina (6 mg/L) + ácido glutámico (8 mg/L) + ácido giberélico (AG₃) (1 mg/L)

La selección del material se realizó mediante el uso de un estereomicroscopio (Opton, Zeiss).

Se sembraron en placas los siguientes materiales vegetales: embriones, agregados (fragmentos de callos con varias estructuras embrionarias) y estructuras pregerminadas (fragmentos de callos con varias estructuras embrionarias pregerminadas). Todos se colocaron en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h de luz. Cada tratamiento se repitió 10 veces. Se realizaron evaluaciones de la germinación (emisión de raíces y hojas *in vitro*) a los siete y catorce días después de la siembra en el medio de cultivo.

Finalmente, se llevó a cabo el proceso de encapsulación de la siguiente manera:

- encapsulación de las diferentes estructuras en el medio enriquecido con sacarosa, aminoácidos y AG₃

- acomplejamiento en alginato de sodio (2,5% m/v) y en cloruro de calcio (1% m/v) durante 5 min.

Las cápsulas se colocaron en un sustrato inerte en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad. Se realizaron las evaluaciones de la germinación y la conversión (supervivencia de las plántulas regeneradas a partir de embriones bajo condiciones *ex vitro* a los siete y catorce días después de la siembra.

Resultados y Discusión

Este estudio sobre la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) de la variedad CP 5243, nos permite concluir que el proceso de la embriogénesis somática constituye un modo de regeneración de plantas no solo para especies dicotiledóneas, sino también para monocotiledóneas.

Se ha destacado el efecto del explante y el genotipo en la formación de embriones somáticos en gramíneas; sin embargo, se ha demostrado que el primero tiene una mayor incidencia en el proceso.

En la Figura 1 se puede apreciar el estudio histológico y de microscopía electrónica de barrido de tejidos embriogénicos de la caña de azúcar, donde se observan los diferentes estadios de la embriogénesis somática en callos de la variedad CP 5243.

En las Figuras 1 A-C se observan diferentes estados de diferenciación del embrión en cortes histológicos practicados durante la regeneración, lo que corrobora que la formación de embriones somáticos ocurre en las células de la epidermis del callo que tienen una estrecha conexión vascular a través del suspensor. Las Figuras 1D-F evidencian las características de la formación de embriones en callos; con especial interés se puede observar (Figura 1F) un embrión somático maduro donde se observa su polaridad completa. Estudios similares a los aquí mostrados se han realizado en caña de azúcar y ha quedado demostrado que la principal vía de regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos es la embriogénesis somática [6-9].

Los resultados obtenidos en el proceso de inducción y maduración de los callos evidencian la efectividad de los tratamientos evaluados, ya que en todos se logró una adecuada organización de las estructuras, con mejor calidad en las formadas bajo las condiciones del medio enriquecido con sacarosa.

En el trabajo se observó que la combinación de sacarosa y ABA indujo mayor número de embriones; sin embargo, en el tratamiento donde se incrementó el contenido de sacarosa, los embriones obtenidos fueron más vigorosos que en el resto de los tratamientos.

La Tabla 1 muestra los resultados de la combinación de los diferentes tratamientos de inducción y maduración con los medios de endospermo artificial.

Los mejores resultados se alcanzaron en el medio MS + ANA y en este medio enriquecido con sacarosa, tanto para embriones aislados como para agregados embriogénicos y estructuras pregerminadas.

La sacarosa se utiliza frecuentemente como fuente de carbono en el proceso de maduración. Otros azúcares, como la galactosa y la rafinosa, también se han utilizado en el desarrollo de embriones con un retardo en la razón de crecimiento y producción del embrión [10]. Aunque la función que se le ha atribuido a

5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 1962;15:473-97.

6. Ho WJ, Vasil IK. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L). I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 1983; 118:169-80.

7. Guiderdoni E, Demarly Y. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1988; 14:71-88.

8. Brisibe EA, Nishioka D, Miyake H, Taniguchi T, Maeda E. Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. *Plant Science* 1993;89:85-92.

9. Taylor PW, Ko HL, Adkins SW, Rathus C, Birch RG. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension culture of sugarcane *Saccharum* spp. hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1992;28:69-78.

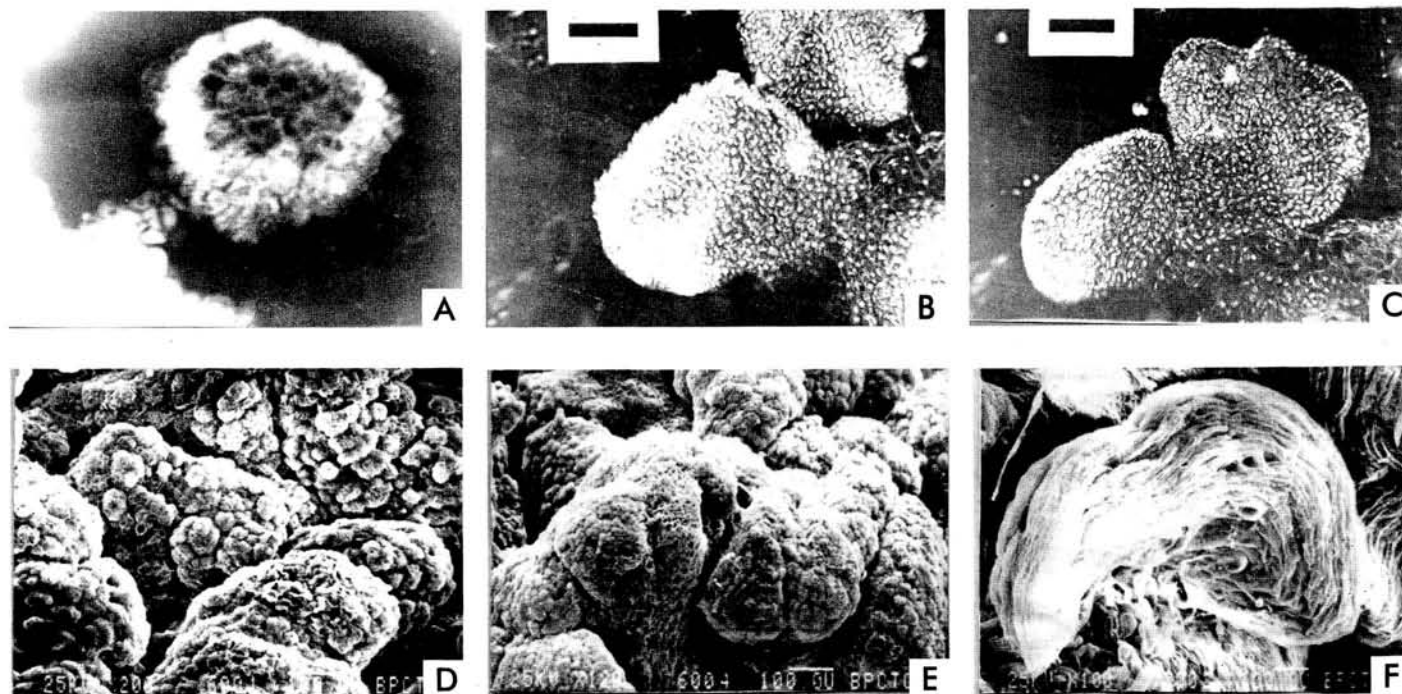


Figura 1. Estudio de histología y microscopía electrónica de barrido de callos embriogénicos de caña de azúcar. A: formación de un embrión donde se aprecia el suspensor (X 100); B: embrión globular formado en un callo embriogénico (X 100); C: embrión somático en un estado escutelar tardío (X 100); D: callo embriogénico donde se observa la formación de estructuras globulares (X 200); E: embriones somáticos en estado escutelar temprano (X 120), y F: embrión somático maduro formado en un callo embriogénico (X 100).

los carbohidratos es fundamentalmente como fuente de carbono, parte del efecto de éstos sobre el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos es osmótico. Roberts [11] evaluó el efecto de la combinación de manitol con ABA en la formación de embriones globulares; este efecto combinado duplicó la producción de embriones maduros.

En la Figura 2, se puede apreciar que, a pesar de estos resultados, el medio enriquecido con sacarosa (Figura 2B) manifiesta un mejor comportamiento morfológico (altura y coloración de las plántulas). En el medio suplementado con ABA (Figura 2C) no se formaron estructuras pregerminadas, lo cual confirma el conocido efecto de esta hormona como regulador del crecimiento sobre la prevención de la germinación precoz de embriones [3].

El tiempo de exposición de los callos en el medio con ABA durante la maduración se considera la causa de la pobre germinación de los embriones provenientes de este tratamiento, pues resultados precedentes demuestran que los embriones somáticos germinan y se desarrollan eficientemente hacia plantas bajo condiciones apropiadas [12]. Por ello,

para la evaluación del proceso de encapsulación bajo condiciones *ex vitro* se empleó el medio suplementado con sacarosa, aminoácidos y AG_3 debido a que las plantas analizadas anteriormente presentan mejores características morfológicas.

En la Tabla 2, se exponen los resultados como porcentajes de conversión en plantas a partir de embriones, agregados y estructuras pregerminadas encapsulados en perlas de alginato de calcio bajo condiciones *ex vitro*, a los catorce días de sembrados.

Los mejores resultados se lograron en el medio enriquecido con sacarosa, tanto para agregados embriogénicos como para estructuras pregerminadas. En el caso de los embriones aislados sólo se logró conversión, aunque en bajos porcentajes, en el medio suplementado con ABA; sin embargo, este medio inhibió la conversión en agregados y estructuras pregerminadas.

Estos resultados demuestran el valor de la sacarosa en los procesos de inducción y maduración de embriones somáticos de caña de azúcar. Las evidencias del valor de la sacarosa en la inducción, maduración y conversión de embriones en plantas por su marcada influencia como osmótico y fuente energética, son

10. Verman DC, Dougall UK. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiology* 1977;59:81-8.

11. Roberts DR. Abscisic acid and manitol promoted early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum* 1991; 83:247-53.

12. Lelu MA, Bastein C, Klimaszewska K, Charest PJ. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*). Control of germination and plantlet development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1994;36:117-27.

Tabla 1. Efectos de la combinación de medios en la germinación de estructuras embriogénicas desnudas.

Medio de inducción y maduración	Medio de endospermo	Porcentaje de germinación		
		Embriones	Agregados	Estructuras pregerminadas
MS + ANA	A	80	100	100
	B	40	100	100
MS + ANA + sacarosa	A	30	100	100
	B	50	100	100
MS + ANA + ABA	A	30	70	—
	B	10	90	—

A: MS + ANA + carbón activado; B: MS + sacarosa + arginina + ácido glutámico + AG_3 .

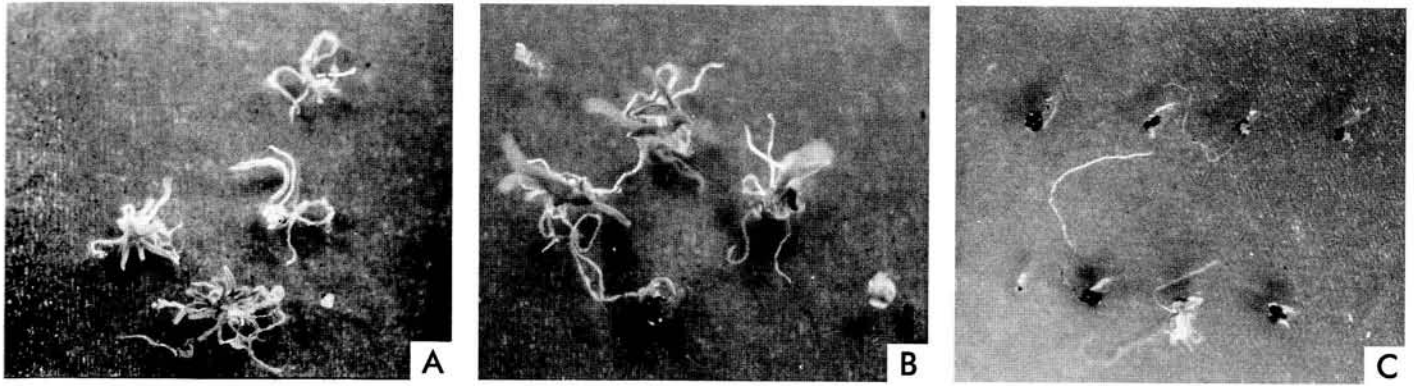


Figura 2. Regeneración de plantas a partir de embriones somáticos de caña de azúcar var CP 5243 cultivados en diferentes medios de cultivo. A: embriones en medio MS suplementado con ANA (1,0 mg/L); B: embriones cultivados en medio MS suplementado con ANA y sacarosa (60 g/L), y C: embriones cultivados en medio MS suplementado con ANA y ABA (1,0 mg/L).

Tabla 2. Efectos de los medios de inducción maduración luego de la encapsulación sobre el porcentaje de conversión en plantas.

Tratamientos	Embriones	Porcentaje de conversión	
		Agregados	Estructuras pregerminadas
MS + ANA	—	0	14,2
MS + ANA + sacarosa	—	57,1	71,4
MS + ANA + ABA	14,2	0	—

—: no evaluado (no se pudieron aislar las estructuras).

elementos que aportan importantes conocimientos a la problemática actual de la semilla artificial, en particular de la caña de azúcar.

La concentración de alginato de sodio utilizada y el tiempo de acomplejamiento fueron satisfactorios para la ruptura de la cápsula y la germinación del embrión (Figura 3). En esta figura se puede observar además la polaridad del embrión somático en el proceso de conversión en planta, y se puede apreciar el adecuado desarrollo de la raíz y el brote dentro de la cápsula.

Recibido en junio de 1997. Aprobado en septiembre de 1998.

El perfeccionamiento de este procedimiento en cuanto al incremento de los porcentajes de germinación y conversión, así como de la tasa de crecimiento de las plantas, son estudios necesarios en el futuro cercano con vistas a profundizar en esta temática de gran actualidad y complejidad biológica. A su vez, se necesita realizar estudios en plantaciones provenientes de embriones somáticos encapsulados para determinar la posible variación somaclonal inducida por esta técnica.

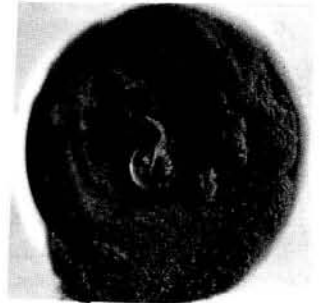


Figura 3. Germinación de un embrión somático de caña de azúcar encapsulado en alginato de sodio bajo condiciones *ex vitro*.