



Evaluación de callos de dos variedades de caña de azúcar.*

Sergio González y Erik García, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana
Teresita Borges, Laboratorio de Citogenética, Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se evalúan las características morfológicas, citológicas e isoenzimáticas de dos tipos de callos obtenidos de dos variedades de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) C-8751 y Ja 60-5. Para el análisis citológico se probaron diferentes combinaciones de pretratamientos, fijadores y colorantes. Las isoenzimas peroxidadas se evaluaron por la técnica de la bencidina después de separadas en gel de poliacrilamida.

Se presentan diferencias en la morfología, en las características citológicas y en los patrones isoenzimáticos entre los dos tipos de callos de cada variedad y se discuten las posibles causas de estas diferencias. Se recomienda un método de análisis citológico sencillo, económico y que da buenos resultados para el análisis citológico de los callos.

ABSTRACT

Morphologic, cytologic and isoenzymatic characteristics from two types of callus obtained from two sugarcane varieties were evaluated. For cytological analysis different pretreatments, fixative and dye combinations were tested. Peroxidase isoenzymes were evaluated by the bencidine method after separation by polyacrilamide gel electrophoresis. Differences in

(*) Presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Genética, Medellín, Colombia, octubre, 1985.

callus morphology, cytological characteristics and isoenzymatic patterns between two types of callus from each variety were detected and discussed. A good, simple and economic method for callus cytological analysis is proposed.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las características morfológicas y citológicas de los callos de la caña de azúcar ha sido reportado por diferentes autores con distintos objetivos (Liu y Chen, 1974; Liu y cols., 1980; Nadar y cols., 1978; Torroella y cols., 1982; Torroella y Kourí, 1984; Ancheta y cols., 1982; entre otros). En ellos se han empleado distintos fijadores, colorantes, tiempos de tratamientos, etcétera.

En la estructura del callo de la caña de azúcar, obtenido a partir de las células parenquimatosas de los primordios foliares enrollados del cogollo (spindle) se ha reportado la formación de tres tipos de zonas o estructuras en el callo: la gelatinosa, la blanca y la rosada (Torroella y cols., 1982).

A través de los trabajos en el laboratorio hemos detectado que se produce una mayor cantidad de callo gelatinoso cuando ocurre un stress térmico o hídrico (González y García, 1985).

Este trabajo tiene como objetivo estudiar las características morfológicas, citológicas e isoenzimáticas de callos normales y gelatinosos de dos variedades cultivadas en Cuba, así como buscar un método de análisis citológico sencillo, económico y que dé buenos resultados para el estudio de los callos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se emplearon callos de generación (R_0 , R_{-4} ó R_{-5}) de las variedades C-8751 y Ja-60-5 de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) obtenidos en el laboratorio a partir de las hojas enrolladas del cogollo (spindle) cultivados in vitro, en un medio Heinz (Heinz y Mee, 1969).

Análisis citológico. Con este objetivo se realizaron diversas combinaciones de pretratamientos, fijadores y colorantes, como se muestra en la tabla 1. (Heinz y cols., 1969; Wetter y Constabel, 1982; Borges y cols., 1983).

Tabla 1. Pretratamientos, fijadores y colorantes empleados en el análisis citológico de los callos

PRETRATAMIENTOS	FIJADORES	COLORANTES
8-hidroxiquinolina 0.02 y 0.2 %	etanol: acético 3:1	acetocarmín 4 %
colchicina 1 %	metanol: acético 3:1	acetorceína 2 %
vincubina 0.1 %		hematoxilina de Gomory

Los pretratamientos de los callos se hicieron con 8-hidroxiquinolina, colchicina y vincubina, en todos los casos durante un período de tres horas. Como fijadores se emplearon etanol: acético 3:1 y metanol: acético 3:1, pasándose los callos fijados con etanol: acético a etanol al 70 %, después de siete días en el fijador. Para la tinción se probaron distintos tipos de hidrólisis con HCl 36.5 g/l a 60°C. Se probaron tres colorantes: el acetocarmín al 4 %, precedido de la impregnación de hierro con sulfato férrico de amonio al 4 %, la hematoxilina de Gomory para la que se emplearon varios tiempos, y la acetorceína al 4 % en dos tiempos. Los squash para el montaje de las preparaciones se efectuaron de forma tradicional, con adición de unas gotas de ácido acético al 45 %, el cual también fue utilizado para decolorar el tejido cuando presentaba sobretinción. Debe flamearse varias veces, antes de hacer el squash.

Las observaciones se realizaron en un microscopio clínico con dispositivo fotográfico Orthomax acoplado.

Isoenzimas peroxidasas. Las muestras de callos fueron maceradas en mortero, con una solución de sacarosa al 20 %, almacenándose en congelación hasta su empleo. Las isoenzimas peroxidasas de los callos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, en una corrida de 4h a 50 mA, dentro de un refrigerador, a una temperatura de 10°C (González y cols., 1982). Los geles se revelaron para las isoenzimas peroxidasas por medio de la bencidina dihidroclórica. Se realizó el zimograma de los geles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas de los callos. Las características morfológicas de los callos dependen del tipo de callo, ya sea normal o gelatinoso, pero no de las variedades, en este caso C-8751 y Ja-60 5, como se puede apreciar en las figuras 1 y 2. En ambos, el callo gelatinoso se presenta como una masa más compacta, de consistencia variable, de color pardo claro a oscuro debido al parecer a la abundancia de compuestos fenólicos; y con una apariencia gelatinosa. Los callos normales presentan una coloración entre blanco y amarillo pálida, en algunos casos con zonas de color pardo claro o rojizas, debidas a la presencia de derivados fenólicos o de pigmentos flavonoides (antocianinas), respectivamente.

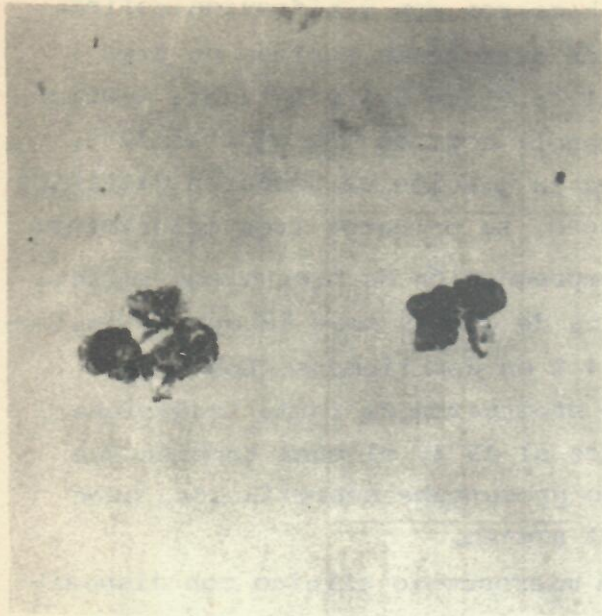


Figura 1. Callo normal (N) y gelatinoso (G) de la variedad Cuba-8751.

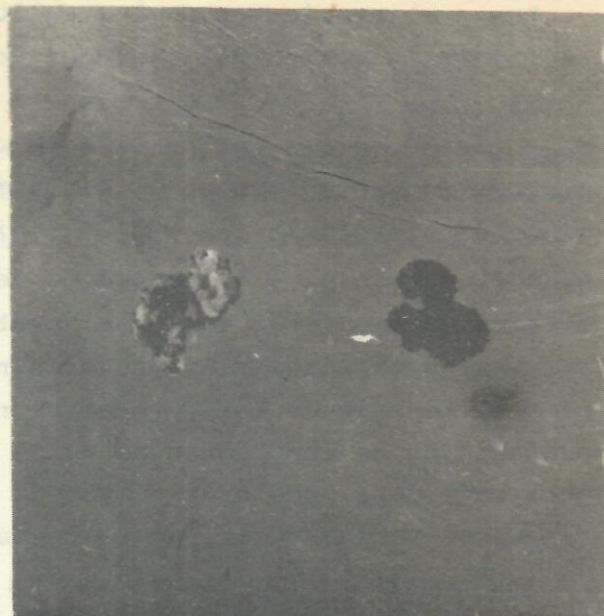


Figura 2. Callo normal (N) y gelatinoso (G) de la variedad Jaronú-60-5

Análisis citológico de los callos. Para el análisis citológico de los callos se emplearon distintas combinaciones de pretratamientos, fijadores y colorantes (tabla 1) típicos de los utilizados en estudios citogenéticos. Esto se realizó con vistas a la determinación y estandarización de una técnica económica, rápida y sencilla para el análisis de las células del callo. Fue la combinación de la 8-hidroxiquinolina al 0.2 % durante tres horas como pretratamiento, la fijación con metanol: acético y la tinción con acetocarmín al 4 %, durante una hora previo tratamiento con sulfato férrico de amonio al 4 % durante 30 minutos con la cual se obtuvieron los mejores resultados. Este método es igualmente aplicable a raíces y yemas, con muy buenos resultados (Borges y cols., 1983. (Figura 3).

En la literatura se reportan diversos métodos para el análisis citogenético de la caña de azúcar, utilizando ápices radiculares o yemas. Estos métodos varían en relación con su costo, grado de complejidad y calidad de los resultados (Price, 1962; Heinz y Mee, 1970; Barreto y Simón, 1979; Krishnamurthi, 1984; entre otros). En la mayoría de estos trabajos, se plantea la utilización de colchicina como pretratamiento y en muchos de ellos, la mezcla de Newcomer como fijador, ambos son reactivos tóxicos y costosos.

Borges y cols. (1983) reportaron una técnica para el análisis citológico de la caña de azúcar, en la que emplearon la 8-hidroxiquinolina como pretratamiento y el fijador de Farmer. Esto redujo considerablemente el costo de la técnica y permitió la obtención de resultados satisfactorios en el análisis cariológico.

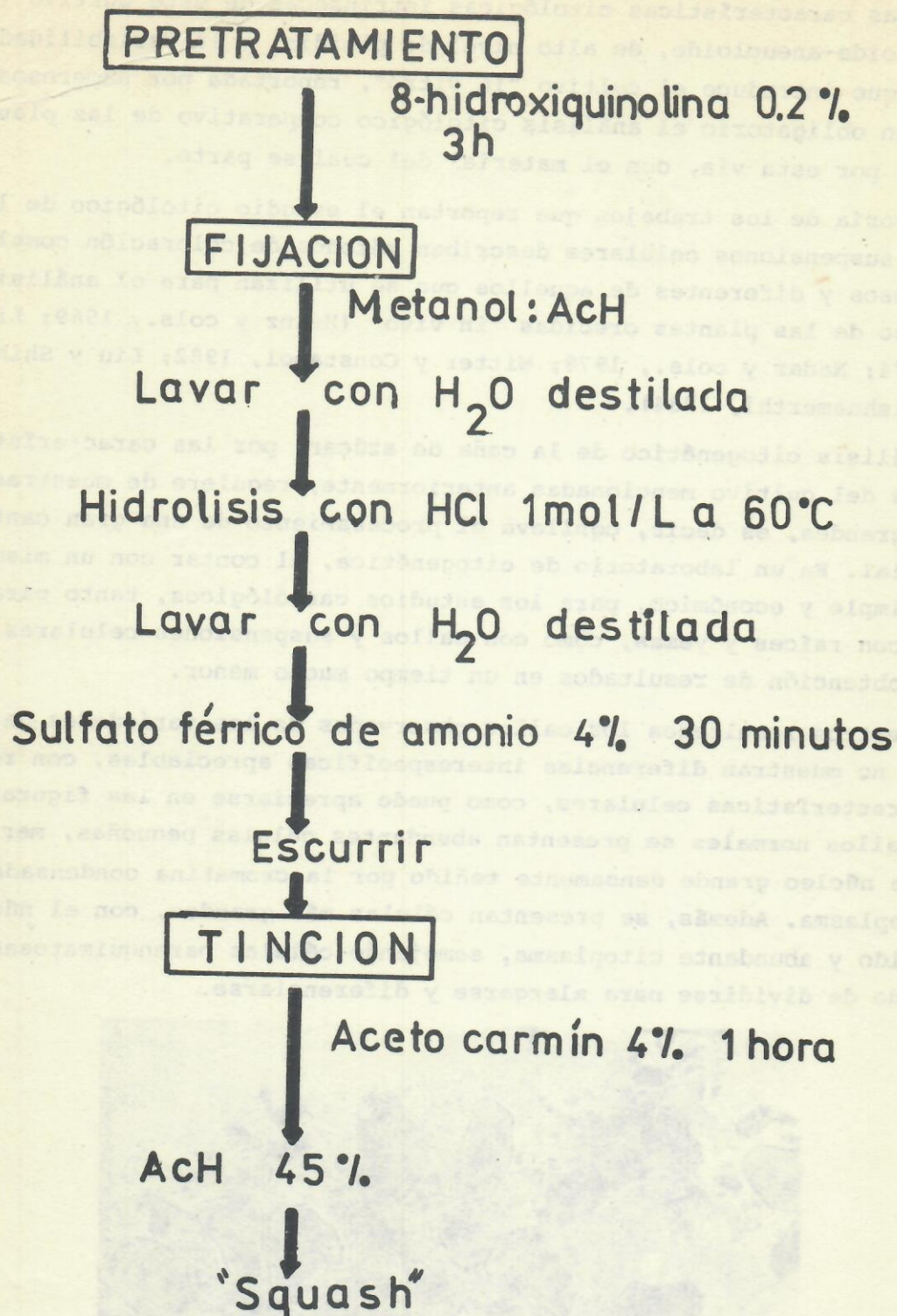


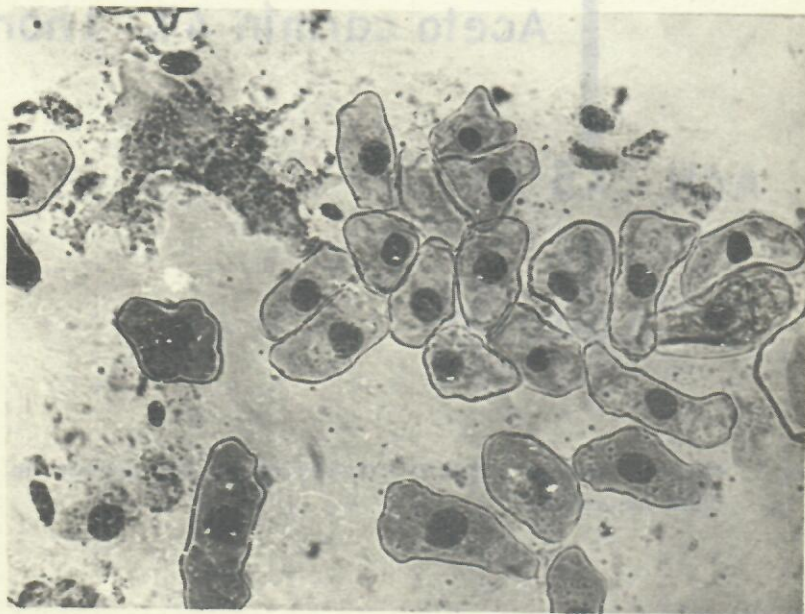
Figura 3. Método para el estudio citológico de los callos de la caña de azúcar.

Actualmente, en nuestro país el método de cultivo de células y tejidos constituye un valioso método auxiliar en el mejoramiento de la caña de azúcar. Las características citológicas intrínsecas de este cultivo (mosaico poliploide-aneuploide, de alto nivel de ploidia) y la variabilidad cromosómica que introduce el cultivo "in vitro", reportada por numerosos autores, hacen obligatorio el análisis citológico comparativo de las plantas obtenidas por esta vía, con el material del cual se parte.

La mayoría de los trabajos que reportan el estudio citológico de los callos y suspensiones celulares describen métodos de coloración complejos y/o costosos y diferentes de aquellos que se utilizan para el análisis citológico de las plantas crecidas "in vivo" (Heinz y cols., 1969; Liu y Chen, 1974; Nadar y cols., 1978; Witter y Constabel, 1982; Liu y Shih, 1983; Krishnamurthi, 1984).

El análisis citogenético de la caña de azúcar, por las características genéticas del cultivo mencionadas anteriormente, requiere de muestras celulares grandes, es decir, conlleva el procesamiento de una gran cantidad de material. En un laboratorio de citogenética, el contar con un mismo método simple y económico, para los estudios cariológicos, tanto para el trabajo con raíces y yemas, como con callos y suspensiones celulares, permite la obtención de resultados en un tiempo mucho menor.

En nuestros resultados los callos observados de las variedades Ja-60 5 y C-8751 no muestran diferencias interespecíficas apreciables, con respecto a las características celulares, como puede apreciarse en las figuras 4 y 5. En los callos normales se presentan abundantes células pequeñas, meristemáticas, de núcleo grande densamente teñido por la cromatina condensada con poco citoplasma. Además, se presentan células más grandes, con el núcleo bien teñido y abundante citoplasma, semejando células parenquimatosas que han dejado de dividirse para alargarse y diferenciarse.



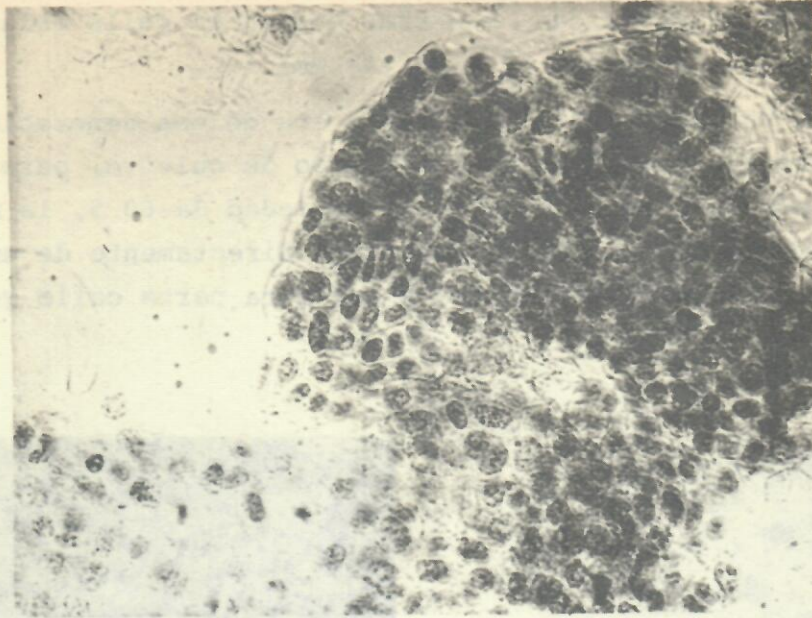


Figura 4. Microfotografía del callo normal (N) y gelatinoso (G) de la variedad Cuba 8751.

En los callos gelatinosos se observó una gran diversidad de células que va desde las células pequeñas, con el núcleo bien teñido, pero en menor cantidad que en los callos normales, hasta las denominadas células gigantes, multiformes y con un núcleo pequeño, que se observa en algunas ocasiones. Además, se observan abundantes grupos de células con distinto grado de diferenciación, que en algunos casos llega hasta la formación de elementos xilemáticos (figuras 4 y 5).

En nuestro laboratorio, hemos podido observar que la mayor o menor cantidad de callo gelatinoso puede estar influenciada por un stress térmico o hídrico (González y García, 1985). Los callos gelatinosos, trasplantados a medio para el crecimiento de los callos, generalmente continúan produciendo callos con características similares, que al ser trasplantados a un medio adecuado para la diferenciación de las plántulas, ésta no ocurre.

Evaluación de las isoenzimas peroxidadasas. Uno de los sistemas enzimáticos más utilizados en los estudios bioquímicos y fisiológicos es el de las isoenzimas peroxidadasas, ya que sirven como una medida de la actividad metabólica durante las alteraciones del crecimiento. Los estudios con las peroxidadasas no se refieren sólo a los cambios en la actividad, sino también a los cambios en los patrones isoenzimáticos, los cuales varían con el estado de desarrollo del tejido estudiado.

En nuestros resultados, que se muestran en la figura 6, se presentan diferencias entre los callos normales y gelatinosos de cada variedad. En la variedad Ja-60 5, en el callo normal se presentan ocho bandas de actividad peroxidasa, mientras que en el callo gelatinoso no se presenta la banda p7 (44 mm). Por otra parte, en la variedad C-8751, en el callo normal se pre-

sentan siete bandas de actividad, mientras que en el callo gelatinoso sólo aparecen cinco bandas, faltando p7 y p8 (48 mm).

El callo de la variedad C 8751 utilizado era de una generación R5, con callo estabilizado que creció en el mismo tubo de cultivo, pero de zonas diferentes. Sin embargo, en el caso de la variedad Ja-60 5, la muestra se obtuvo de un mismo tubo, con callo regenerado directamente de un pedazo de la hoja, en una parte, callo normal y por otra parte callo gelatinoso.

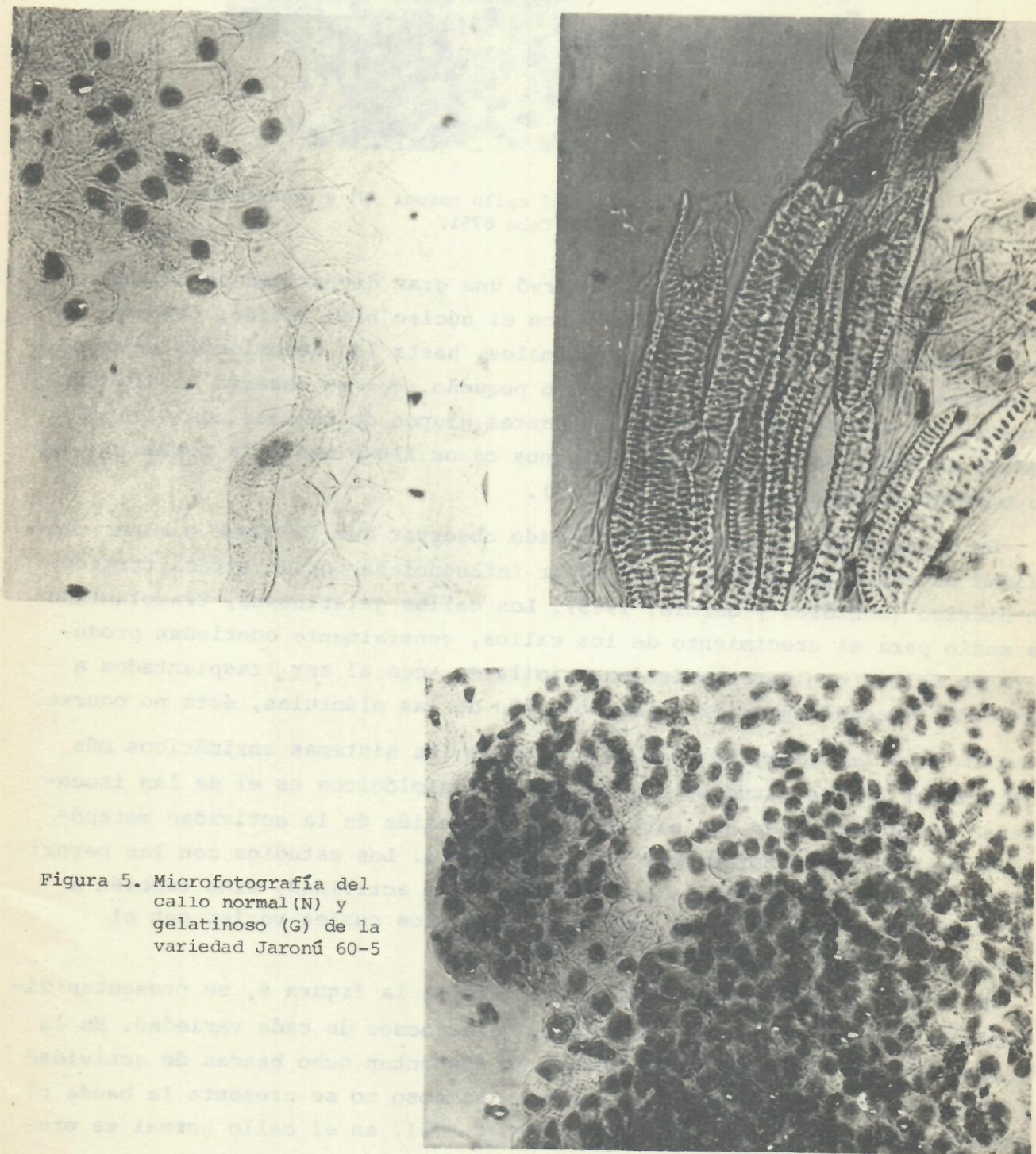


Figura 5. Microfotografía del callo normal (N) y gelatinoso (G) de la variedad Jaronú 60-5

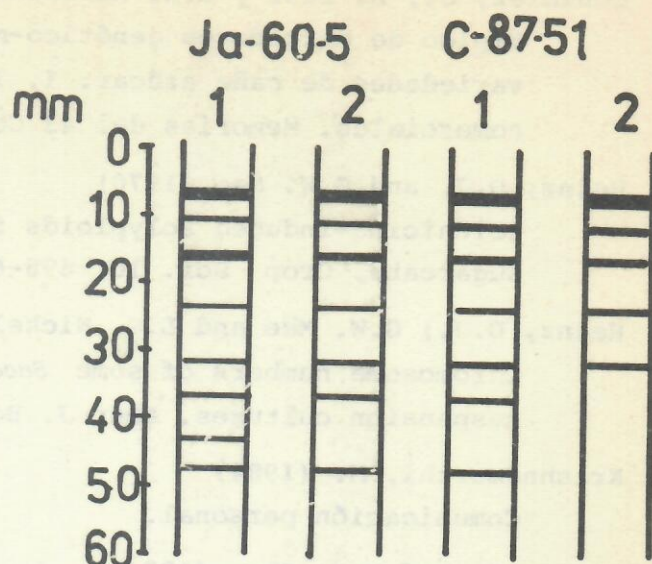
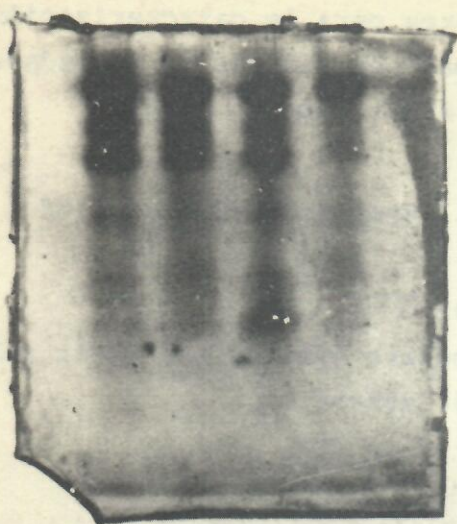


Figura 6. Foto de un gel y su zimograma de isoenzimas peroxidasas de los callos de dos variedades de caña de azúcar: Cuba 8751 y Jaronú 60-5. (1) Callo normal y (2) Callo gelatinoso.

CONCLUSIONES

1. Se presentan diferencias morfológicas, citológicas y en los patrones de isoenzimas peroxidasas entre los callos normales y gelatinosos de cada variedad estudiada (C-8751 y Ja-60-5).
2. Para el análisis citológico de los callos, se propone un método sencillo, económico y que da buenos resultados. Este método es también utilizable en estudios cariológicos con raíces y yemas de la caña de azúcar.

BIBLIOGRAFÍA

- Ancheta, O.; M.E. Ramos; M.C. de la Rosa y J.B. Kourí (1982)
Estudio al microscopio electrónico de barrido de suspensiones celulares, moristemo y callo de algunas variedades comerciales de caña de azúcar. Memoria del 8vo. Sem. Científico del CENIC, p. 236. Ciudad Habana.
- Barreto, A. y J.P. Simón (1979)
Identificación de progenies y progenitores evaluando el número cromosómico de *Saccharum*. Cultivos Tropicales, 1:3; 27-47.
- Borges, T.; C. González; A. Brito y M. Medina (1983)
Determinación del número cromosómico en 26 variedades comerciales de caña de azúcar. Sem. Científico del Lab. de Bioplasmas, CENIC. En prensa.
- González, S. y E. García (1985)
Efecto de un stress hídrico sobre los callos y plántulas de caña de azúcar. 1er. Simposio Cubano de Botánica. Ciudad Habana.

- González, S.; A. Ruiz y R.H. Maribona (1982)
 Empleo de marcadores genético-moleculares para la caracterización de variedades de caña azúcar. I. Isoenzimas peroxidadas de variedades comerciales. Memorias del 43 Congreso ATAC, tomo V, 16-28.
- Heinz, D.J. and G.W. Mee (1970)
 Colchicine-Induced Polyploids from Cell Suspension Cultures of Sugarcane. *Crop Sci.* 10, 696-699.
- Heinz, D.J.; G.W. Mee and L.G. Nickell (1969)
 Chromosome numbers of some *Saccharum* species hybrids and their cell suspension cultures. *Amer J. Bot.* 56:4, 450-56.
- Krishnamurthi, M. (1984)
 Comunicación personal.
- Liu, M.C. and W.H. Chen (1974)
 Histological Studies on the Origin and Process of Plantlet Differentiation in Sugarcane Callus Mass. *Proc. XV Congress I.S.S.C.T.*, 118-129.
- Liu, M.C.; W.H. Chen and S.S. Shih (1980)
 Sites of Sugarcane Callus Formation in Young Leaves and Stem Tip Explants. *Proc. XVII Congress I.S.S.C.T.*; 458-469.
- Liu, M.C. and S.C. Shih (1983)
 Chromosomal variation in suspension cells of sugarcane. *Taiwan Sugar* 30, 115-122.
- Nadar, H.M.; S. Soeprapto; D.J. Heinz and S.L. Ladd (1978)
 Fine Structure of Sugarcane (*Saccharum* sp.) Callus and the role of Auxin in Embryogenesis. *Crop Sci.* 18, 210-216.
- Price, S. (1962)
 A modified leaf squash technique for counting chromosomes in somatic cells of *Saccharum* and related grasses. *Proc. XII Congress I.S.S.C.T.*, 583-585.
- Torroella, T.; O. Ancheta; J.B. Kourí, M.E. Ramos y M.C. de la Rosa (1982)
 Descripción de la estructura y la ultraestructura de las células de "spindle" y de callo en variedades de caña de azúcar. *Memoria 8vo. Sem. Cient. CENIC*, p. 237, Ciudad Habana.
- Torroella, T. y J.B. Kourí (1984)
 Estudio citológico del callo en variedades de caña de azúcar *Saccharum* L. (Poaceae). 2. Embriogénesis y organogénesis. Presentado en III Jornada Científica. INICA, MINAZ, Ciudad Habana.
- Witter, L.R. and F. Constabel (1982)
Plant Tissue Culture Methods. Ed. Nat. Res. Council of Canada. Ottawa.

Recibido: 11 de noviembre de 1985.