

Evaluación cualitativa del crecimiento de los callos y la regeneración de plántulas de caña de azúcar

Sergio González Suárez, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se estudia el efecto de dos concentraciones de kinetina sobre el crecimiento de los callos y la regeneración de plántulas, de dos variedades de caña de azúcar en estudio, evaluándose estos parámetros mediante una escala de rangos, para no destruir los cultivos. Se aplicaron el test de Kruskal-Wallis, el método de Newman-Keuls y la correlación de Spearman. Se detectan diferencias significativas en la calogénesis superior, el crecimiento, color y contenido de fenoles de los callos. Se obtiene una correlación negativa entre la calogénesis inferior y el contenido de fenoles. Se detectan respuestas diferentes entre las dos variedades.

ABSTRACT

The effect of two kinetin concentrations on callus induction from spindle and callus growth and plantlet regeneration on two sugarcane varieties in study is evaluated with a range scale without culture destruction. Kruskal-Wallis test, Newman-Keuls method and Spearman correlation were applied. Significant differences in upper callogenesis, callus growth, color and phenol content are detected. A negative correlation between lower callogenesis and phenol content is obtained. Differences between two varieties response is obtained.

INTRODUCCIÓN

Los avances en el cultivo de células y tejidos han incrementado el uso de muchos resultados obtenidos por esta técnica en problemas prácticos de la agricultura. El conocimiento y uso de las técnicas de cultivo de tejidos de la caña de azúcar se ha desarrollado rápidamente en los últimos veinte años, a partir de los trabajos de Nickell. El cultivo de células y

tejidos de la caña de azúcar comenzó en Hawaii en 1961 y actualmente se desarrolla en Fiji, Taiwán, Estados Unidos, Argentina, Brasil, República Dominicana, Puerto Rico y Cuba (Nickell, 1977; Antoni, 1974; Liu y Chen, 1973, 1976; Nadar y cols., 1978; entre otros).

Uno de los factores más importantes que influye sobre el crecimen-

to de los callos y la regeneración de las plántulas es el medio de cultivo. Hay una gran cantidad de trabajos acerca de los medios de cultivo óptimos para algunas variedades de la caña de azúcar, pero en otras variedades, la respuesta de crecimiento es inadecuada. Los medios óptimos para las variedades cubanas deben ser desarrollados, variando diferentes concentraciones de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), kinetina (6-furfuril-amino-purina), vitaminas, aminoácidos, etcétera. (Heinz y Mee,

1969; Heinz y cols., 1977; Barba y Nickell, 1969; Nadar y Heinz, 1977)

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de dos concentraciones de kinetina sobre el crecimiento de los callos y la regeneración de plántulas de dos variedades de caña de azúcar en estudio, así como evaluar algunas de las características de la calogénesis, las características de los callos y la regeneración de plántulas mediante una escala de rangos, para no destruir los cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se emplearon dos variedades (A y B) de caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L., en estudio. Las hojas enrolladas del cogollo (spindles) se esterilizaron con hipoclorito de sodio comercial, diluido al 2 %, durante 10 minutos.

Medios de cultivo. El medio basal se preparó con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), sacarosa al 2 %, mioinositol 100 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, glicina 2.0 mg/l, piridoxina-HCl 0.5 mg/l, tiamina-HCl 0.1 mg/l y agar 10 g/l. También se añadieron otros componentes orgánicos, en diferentes concentraciones, para preparar cuatro medios de cultivo; agua de coco, ácido 3-indolacético (AIA), kinetina y 2,4-D (tabla 1).

Esquema de trabajo. Se sembraron pequeños pedazos (5-8 mm de grosor) del spindle en los diferentes medios de cultivo (figura 1). Los mismos se mantuvieron en un régimen de 16 horas de luz y 20°C (aprox.) durante 30 días. Al cabo de este tiempo los callos produ-

cidos se evaluaron cualitativamente: calogénesis superior e inferior y contenido de fenoles, usando una escala de rangos modificada a partir de la propuesta por Chagvardieff (1980) (tabla 2). Posteriormente los callos se trasplantaron a los mismos medios de cultivo y otra parte de los mismos hacia el medio sin 2,4-D (medio 5), para la regeneración de las plántulas. En este caso, el crecimiento de los callos, su color y contenido de fenoles y la regeneración de plántulas, se evaluaron cualitativamente utilizando una escala de rangos (tabla 2).

Análisis biométricos. Los datos se analizaron por el test de Kruskal-Wallis. El método de Newman-Keuls para la comparación múltiple no paramétrica de rangos también fue empleado. La correlación de Spearman fue aplicada para evaluar la correlación entre la calogénesis inferior y el contenido de fenoles (Lerch, 1977; Zar, 1974).

RESULTADOS

Inducción de la calogénesis. La inducción de los callos a partir de los spindles fue evidente después de una semana de la siembra; los pedazos blancos del spindle tomaron un color verde y la proliferación del callo comenzó, tanto en la superficie inferior

en contacto con el agar, como en la superficie superior.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la evaluación de la calogénesis para los distintos rangos, en los diferentes medios de cultivo y para las dos varie-

dades. La evaluación cualitativa de la calogénesis inferior para ambas variedades se realizó y expresó en % acumulado de los rangos. Para la variedad A (figura 2) los mejores resultados se obtuvieron con el medio 1, mientras que con los medios 2 y 3 la inducción del callo fue menor. El análisis biométrico demostró diferencias significativas entre los medios (tabla 4). Para la calogénesis superior la respuesta es muy similar para los diferentes medios y mediante el análisis biométrico no obtuvimos diferencias significativas entre cada uno.

Para la variedad B obtuvimos resultados diferentes (figura 3). No hay diferencias en el caso de la calogénesis inferior. Sin embargo, para la calogénesis superior obtuvimos diferencias entre el medio 1, que fue menor, y los medios 2 y 3 (tabla 5).

La producción de fenoles por los callos está relacionada con el crecimiento de los mismos. Para ambas variedades calculamos el coeficiente de correlación de rangos de Spearman entre la calogénesis inferior y la producción de fenoles. Los datos se presentan en la tabla 6. Para la variedad B se obtuvo una correlación negativa entre ambos parámetros. Pero en el caso de la variedad A la misma respuesta fue obtenida solamente para los medios 2 y 3, mientras que para el medio 1 no es significativo el coeficiente de correlación de rangos calculados. En este último caso, los datos demuestran una correlación negativa evidente entre la producción de callos y el contenido de fenoles, pero suponemos que hay una superposición de datos que interfiere con el análisis estadístico, en el caso en que no obtenemos un valor significativo.

Evaluación de los callos. La estabilización del cultivo de tejidos se logra poco a poco, una vez que los callos son separados del spindle y trasplantados nuevamente a los medios 1, 2 y 3. En la tabla 7 podemos observar la evaluación morfológica de los callos: se evaluó el crecimiento y color de los mismos, así como el contenido de fenoles de cada variedad. En este caso tomamos la máxima respuesta para cada uno de los rangos, con vistas a caracterizar los diferentes parámetros. Se evidencia una respuesta diferente entre las variedades (tabla 8).

El crecimiento del callo es similar para ambas variedades. En ambas la menor respuesta de crecimiento del callo se obtuvo trasplantando los callos al medio 1. El color de los callos es homogéneo, amarillo pálido para la variedad A, pero es diferente para la variedad B, donde el callo que creció en el medio 1 tomó color gris, mientras que el cultivado en los medios 2 y 3 era amarillo pálido.

El contenido de fenoles del callo es grande en los medios 1 y 3, los cuales difieren de la menor respuesta obtenida con el callo cultivado en el medio 2, para la variedad B. En la variedad A no hay diferencias entre el contenido de fenoles de los callos cultivados en los diferentes medios, pero la respuesta es menor que la obtenida para la variedad B.

Regeneración de plántulas. En general la regeneración de plántulas fue muy pobre para ambas variedades pero fue ligeramente superior para la variedad B. El test de Kruskal-Wallis demostró que no hay diferencias significativas entre las medias para cada variedad (tabla 9).

DISCUSIÓN

Se ha reportado que para el cultivo de tejidos de la caña de azúcar el medio debe ser suplementado con 2,4-D. pero que si se añade kinetina, la regeneración de

plántulas a partir de los callos podría ser negativa o mínima (Heinz y Mee 1969; Heinz y cols., 1977). Sin embargo obtuvimos la inducción de los callos a partir del spindle

y el crecimiento del callo en un medio suplementado con kinetina, el cual difiere del medio sin kinetina. Chagvardieff (1980) reportó que el 2,4-D y la kinetina en un rango de concentración específico ($r=10$) produjo una calogénesis del spindle, superior a la obtenida en un medio con 2,4-D solamente y asumió que dicha respuesta era debida a un efecto sinérgico.

Cada variedad responde diferente a los medios de cultivo. En ambos casos la inducción de la calogénesis del spindle se obtuvo con el medio 1 sin kinetina. Pero el crecimiento del callo trasplantado (R_1), en el mismo medio, produjo una menor respuesta que el callo cultivado en los medios 2 ó 3, suplementados con kinetina.

La producción de fenoles al medio de cultivo inhibe la calogénesis, lo cual se demostró con la correlación negativa obtenida entre la calogénesis inferior y la producción de fenoles por el spindle. También se obtuvo que la producción de fenoles inhibe el crecimiento de los callos, donde se obtuvo una correlación negativa evidente. Chagvardieff (1980) también reportó el mismo efecto.

La regeneración de plántulas se obtuvo a partir de los callos

procedentes de los diferentes medios. No se obtuvo diferencias estadísticas entre la regeneración de plántulas en ambas variedades, pero la mejor respuesta se obtuvo con el callo procedente de los medios con kinetina y ligeramente superior en la variedad A con respecto a la variedad B. Estos resultados no coinciden con lo señalado en la literatura, donde se plantea (Heinz y Mee, 1969) que la regeneración está estrechamente ligada a la procedencia del callo que se utiliza, si es cultivado en un medio con kinetina o no.

A través de este trabajo se evidencia la utilidad de la evaluación de los callos y la regeneración de plántulas a partir de los mismos, con el empleo de una escala de rangos y con un análisis biométrico adecuado, sin necesidad de destruir los cultivos. Debe realizarse un estudio más amplio, con un mayor número de réplicas y donde se evalúe el comportamiento de los callos y la regeneración de plántulas en trasplantes sucesivos: R_2, R_3, R_4 , etcétera con vistas a determinar los medios óptimos para cada variedad y para cada proceso: inducción, crecimiento óptimo de los callos, regeneración de plántulas, etcétera.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados hasta el momento obtenidos podemos plantear las siguientes conclusiones:

- Se detectan diferencias significativas en la calogénesis superior, el crecimiento, color y

contenido de fenoles de los callos.

- Se obtuvo una correlación negativa entre la calogénesis inferior y el contenido de fenoles.
- Se detectan respuestas diferentes entre las dos variedades.

AGRADECIMIENTOS

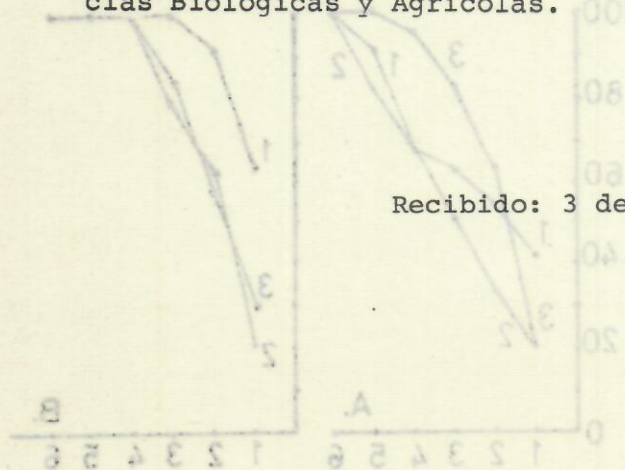
Queremos expresar nuestro agradecimiento a los compañeros del Laboratorio de Biología de las Plantas del CENIC, donde se realizó este trabajo, así como al Lic. Antonio Sigarroa del Departamento

de Genética, Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, por sus valiosas sugerencias para la realización de los análisis biométricos.

BIBLIOGRAFÍA

- Antoni, H.J. (1974)
Obtención de nuevos clones de caña de azúcar a partir de tejidos somáticos mediante cultivo in vitro. Rev. Agron. del Noroeste Argentino 11,1/2: 37-46.
- Barba, R. and L.G. Nickell (1969)
Nutrition and Organ Differentiation in Tissue Cultures of Sugarcane, a Monocotyledon. Planta 89, 299-302.
- Chagvardieff, P. (1980).
Culture in vitro de tissus de canne à sucre (*Saccharum sp.*): Etude de facteurs de la callogenèse et de la regeneration. Analyse de la variabilité des sous-clones obtenus. These présentée pour l'obtention du Diplôme de Docteur Ingenieur, L'Université de Paris-Sud, Centre D'Orsay, France.
- Heinz, J.D.; M. Krishnamurthi; L.G. Nickell and A. Marezki (1977)
Cell, Tissue and Organ Culture in Sugarcane Improvement. Chapter 1.1 p 3-17. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer-Verlag, Berlin.
- Heinz, D.J. and G.W.P. Mee (1969)
Plant Differentiation from Callus Tissue of *Saccharum* species. Crop. Sci.9: 346-348.
- Lerch, G. (1977)
La Experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas.
- Ed. Ciencia y Técnica La Habana, 452 p.
- Liu, M.C. and W.H. Chen (1973)
A Progress Report on the Sugarcane Tissue and Cell Culture Program. Taiwan Sugar, sept.-oct.- 209-215.
- Liu, M.C. and W.H. Chen (1976)
Tissue and Cell Culture as Aids to Sugarcane Breeding. I.- Creation of Genetic Variation Through Callus Culture. Euphytica 25,2:393-403.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962)
A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Phys. Plantarum 15: 473-497.
- Nadar, H.M. and D.J. Heinz (1977)
Root and Shoot Development from Sugarcane Callus Tissue. Crop Sci. 17, sept-oct. 814-816.
- 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 Embriogenesis. Crop Sci. 18: 210-216
- Nickell, L. (1977)
Crop Improvement in Sugarcane: Studies Using in Vitro Methods. Crop Sci. 17, sept-oct., 717-719.
- Zar, J.H. (1974)
Biostatistical Analysis. Academic Press, New York, 350 p.

Recibido: 3 de febrero de 1984



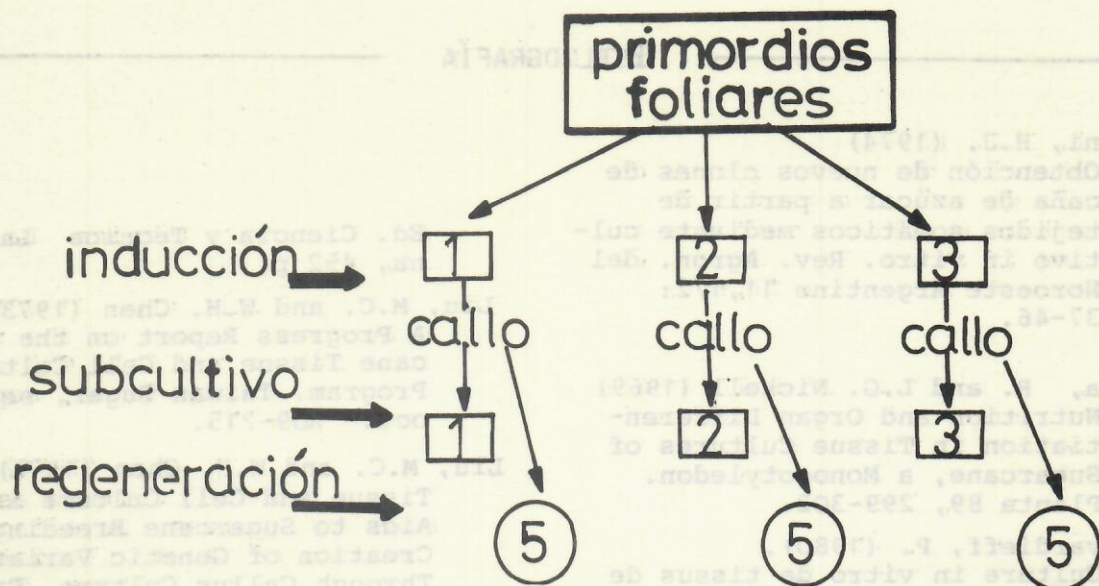


Figura 1.

Esquema de trabajo para la inducción y el crecimiento de los callos y la regeneración de plántulas.

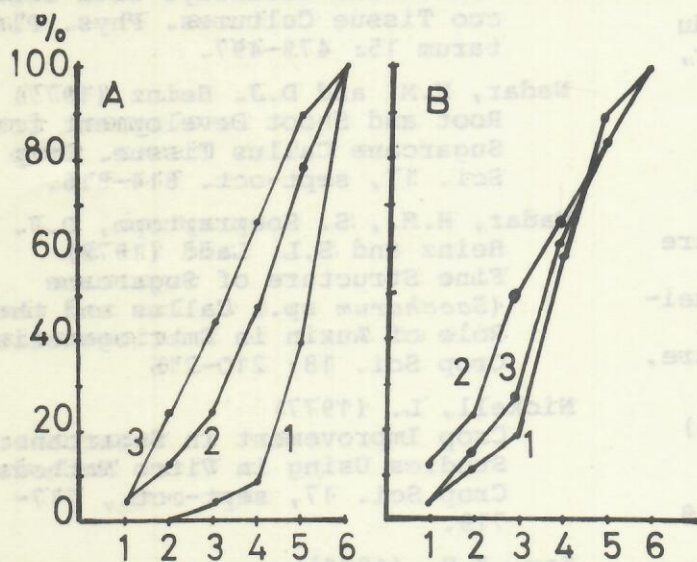
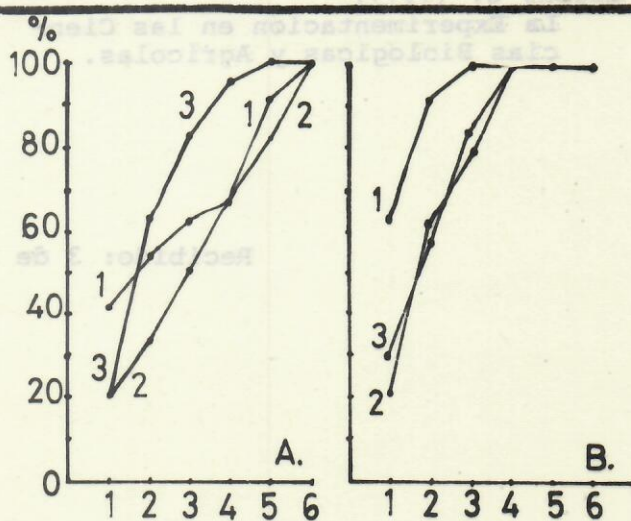


Figura 2:

Inducción de los callos en la variedad A, datos expresados en por ciento acumulado. (A)-calogénesis inferior, (B) calogénesis superior. Medios: (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; y (3) Kin 1.0 mg/l.

Figura 3:

Inducción de los callos en la variedad B, datos expresados en por ciento acumulado. (A)- calogénesis inferior, (B) calogénesis superior. Medios: (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; y (3) Kin 1,0 mg/l.



COMPONENTES	MEDIOS			
	1	2	3	5
Agua de coco 10%	+	+	+	+
AIA 1.0 mg/l	+	+	+	+
2,4D 3 mg/l	+	+	+	+
Kinetina 0.1 mg/l	-	+	-	-
Kinetina 1.0 mg/l	-	-	+	+

Tabla 1:

Composición de reguladores del crecimiento de los distintos medios de cultivo

Tabla 2.

Escala de rangos empleada para evaluar los distintos parámetros estudiados.

PARAMETROS	ESCALA
Inducción de callos a partir de spindle - calogénesis superior - calogénesis inferior - fenoles en el medio	1- Sin respuesta 2- Mínima 3- Mediocre 4- Media 5- Activa 6- Máxima
. Sub_cultivo de callos - color del callo	1- Blanco 2- Gris 3- Amarillo pálido 4- Amarillo 5- Pardo claro 6- Pardo oscuro 7- Verde claro
- crecimiento del callo - fenoles en el callo	1- Sin respuesta 2- Mínima 3- Mediocre 4- Media 5- Activa 6- Máxima
. Nivel de regeneración de brotes	1- Sin respuesta 2- 1-10 3- 11-20 4- 21-30 5- 31-40 6- 41-50 7- más de 50

VARIEDAD	ESCALA DE RANGOS	MEDIOS		
		1	2	3
A n=26 CI	1	0	1	1
	2	0	2	5
	3	1	3	5
	4	1	6	6
	5	8	8	6
	6	16	6	3
A n=26 CS	1	1	3	1
	2	2	3	3
	3	2	7	3
	4	10	4	9
	5	8	5	6
	6	3	4	4
B n=24 CI	1	10	5	5
	2	3	3	10
	3	2	4	5
	4	1	4	3
	5	6	4	1
	6	2	4	0
B n=24 CS	1	15	5	7
	2	7	10	7
	3	2	4	6
	4	0	5	4
	5	0	0	0
	6	0	0	0

Tabla 3.

Evaluación de la calogénesis para los distintos rangos: (CI), calogénesis inferior; (CS), Calogénesis superior. Medios: (1) sin kinetina; (2) Kin 0.1 mg/1; (3) Kin. 1.0 mg/1.

M	SUMA DE RANGOS	Comp.	$R_A - R_B$	SE	q	$q_{0.05}$
1	1435.0	1-3	730.50	115.55	6.32	3.314
2	941.5	1-2	493.50	77.27	6.39	2.772
3	704.5	2-3	237.00	77.27	3.06	2.772

$$H = 20.75 \quad n = 26 \quad \chi^2_{0.01} = 9.21$$

2 fd

Tabla 4: Comparación múltiple no paramétrica para la calogénesis inferior de la variedad A. Medios: (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/1; (3) Kin 1.0 mg/1.

M	SUMA DE RANGOS	Comp.	$R_A - R_B$	SE	q	q 0.05
1	601.5	2-1	433.5	102.59	4.23	3.314
2	1035.0	2-3	43.5	68.59	0.63	2.772
3	991.5	3-1	390.0	68.59	5.69	2.772

$$H = 10.89 \quad n = 24 \quad X^2_{0.01} = 9.21$$

$$2 \text{ fd}$$

Tabla 5:

Comparación múltiple no paramétrica para la calogénesis superior de la variedad B. Medios: (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; (3) Kin 1.0 mg/l.

VAR	MEDIO	r_s	SIG.	r_s Tabla
A n=26	1	-0.050	NS	5% 0.329 1% 0.465
	2	-0.718	* *	
	3	-0.590	* *	
B n=24	1	-0.719	* *	5% 0.343 1% 0.465
	2	-0.817	* *	
	3	-0.469	* *	

Tabla 6:

Coefficientes de correlación de rangos de Spearman calculados para la calogénesis inferior y la producción de fenoles al medio. Medios: (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; (3) Kin 1.0 mg/l.

PARÁMETRO	VAR	MEDIO	RESPUESTA
Crecimiento del callo	A	1	(2) mínima
		2	(6) máxima
		3	(4) intermedia
	B	1	(4) intermedia
		2	(6) máxima
		3	(6) máxima
Color del callo	A	1	(3) amarillo pálido
		2	(3) amarillo pálido
		3	(3) amarillo pálido
	B	1	(2) gris
		2	(3) amarillo pálido
		3	(3) amarillo pálido
Producción de fenoles	A	1	(4) intermedia
		2	(3) mediocre
		3	(4) intermedia
	B	1	(3) mediocre
		2	(1) negativa
		3	(2) mínima

Tabla 7:

Evaluación de los diferentes parámetros de los callos (R_1). Medios: (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; (3) Kin 1.0 mg/l.

VAR	PARÁMETRO	MEDIOS			H
		1	2	3	
A	Crecimiento del callo	167.00	337.00	276.00	8.78
	Color del callo	320.00	239.00	221.00	3.29
	Producción de fenoles	298.00	190.00	291.00	4.36
B	Crecimiento del callo	249.50	516.00	410.50	11.49
	Color del callo	257.00	522.00	396.50	11.25
	Producción de fenoles	493.50	284.50	398.50	6.98

Tabla 8:

Resultados del test de Kruskal-Wallis para el crecimiento y color de los callos y la producción de fenoles. Valores de la suma de rangos de los diferentes parámetros. Medios (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; (3) Kin 1.0 mg/l

VAR	MEDIOS			H
	1	2	3	
A	60.5	42.0	68.5	2.16
B	199.0	256.5	320.5	3.41

$\chi^2_{0.05} = 5.99$
2fd

Tabla 9:

Resultados del test de Kruskal-Wallis para la regeneración de plántulas en el medio 5 a partir de callos que proceden de los medios (1) sin Kin; (2) Kin 0.1 mg/l; y (3) Kin 1.0 mc/l.

NOTA: (*) Realizado en el Laboratorio de Biología de las Plantas del CENIC. Presentado en el Segundo Congreso de la Sociedad de Ciencias Biológicas de Cuba, 1984.