

Efecto de un stress hídrico sobre los callos y plántulas de caña de azúcar.*

Sergio González y Erik García (*)

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se trataron callos y plántulas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con tres concentraciones de polietilén glicol-4000 a diferentes tiempos. Después de los tratamientos, los callos y plántulas se pasaron a medios de cultivo normales para su crecimiento. Se evaluó el crecimiento, color y cantidad de fenoles de los callos mediante una escala de rangos, para no destruirlos, y de igual forma se evaluó la diferenciación de brotes y el estado de las plántulas. Los resultados se procesaron estadísticamente. Se detectan diferencias en los aspectos evaluados entre los distintos tratamientos. Se discuten los resultados.

ABSTRACT

Sugarcane callus and plantlets were tested with different concentrations of polyethylene glycol-4000. After treatments callus and plantlets were transplanted to normal growth culture media. Callus growth, color and phenol contents and plantlets development were evaluated by a range scale. Results were analyzed statistically. Differences between treatments were detected in some aspects evaluated. Results are discussed.

* Publicado en el I Simposio Cubano de Botánica, jul. 1985, La Habana.

I N T R O D U C C I Ó N _____

Los estudios de la resistencia a la sequía y a altas condiciones de salinidad de las variedades de caña de azúcar se han desarrollado con vistas a la selección de variedades resistentes. La resistencia a la sequía en una variedad de caña de azúcar puede ser un resultado de las diferencias morfológicas y fisiológicas inherentes a cada variedad particular. Estos estudios con plantas se han realizado con distintos objetivos por numerosos autores (Hsiao, 1973; Ortega y cols., 1983 y 1984; Gómez y cols., 1984; entre otros).

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo y propagación "in vitro" de la caña de azúcar se ha reportado la posibilidad de emplear el cultivo de células o de tejidos para estudiar la resistencia a la sequía y a la alta salinidad (Nickell, 1977). Con anterioridad, Marezki y cols. (1969) estudiaron el efecto de un stress de presión osmótica producida por el ClNa, la sacarosa, el manitol y el polietilén glicol sobre el crecimiento "in vitro" de células de la caña de azúcar, reportando un efecto negativo en el crecimiento de las mismas, al aumentar la presión osmótica, así como afectaciones en el metabolismo celular. Otros trabajos han estado encaminados a la búsqueda de líneas celulares resistentes a la alta salinidad (Liu y Yeh, 1982; Korneva y Maribona, 1984; entre otros).

Dentro de las variedades de caña de azúcar empleadas en la producción en nuestro país, se ha reportado que la Cuba-8751 es susceptible a la sequía y la Jaronú-60-5 es una variedad resistente, reportándose, además, la variedad Canal Point 5243 como intermedia con respecto a este carácter.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de un stress hídrico provocado por distintas concentraciones de polietilén glicol-4000 sobre los callos y plántulas de caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo. Los callos y plántulas de caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L. de las variedades C-8751 y Ja-60-5 se obtuvieron en un medio básico reportado por Murashige y Skoog (1965). Los callos se cultivaron en el medio básico suplementado con agua de coco al 10% (p/v), 2,4-D 3 mg/L y kinetina 0,1 mg/L (Medio 1) (Heinz y Mee, 1969). El medio básico utilizado para regenerar las plántulas fue suplementado con agua de coco al 10% (p/v), AIA 1,3 mg/L y kinetina 1,0 mg/L (Medio 2) (Heinz y cols., 1977). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 30 minutos a 120°C y 101 kPa.

Stress hídrico. Para provocar el stress hídrico en callos y plántulas se prepararon soluciones de polietilén glicol-4000 (PEG-4000) con diferentes concentraciones, para obtener presiones osmóticas de (S1) -2bar, (S2) -4bar y (S3) -8bar. Todas las soluciones utilizadas así como el control con agua

destilada se esterilizaron en la autoclave, al igual que los medios de cultivo.

Experimento 1. Se tomaron callos de generación R4 y R5 de la var. C-8751 y se trataron con las tres concentraciones de PEG-4000 descritas y un control con agua destilada, durante diferentes tiempos: 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas. Se emplearon cinco réplicas en cada caso. Después de los tratamientos, los callos se sembraron en medio normal para su crecimiento (Medio 1). A los 30 días se realizó la evaluación del crecimiento de los callos y del contenido de fenoles mediante una escala de rangos (tabla 1) (González, 1984).

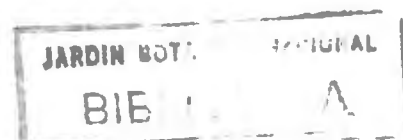
TABLA 1. Escala de rangos empleada en la evaluación de los aspectos estudiados.

Crecimiento y contenido de fenoles en los callos	Regeneración de brotes
1. Sin respuesta	1. Sin respuesta
2. Mínima	2. Mínima (1-5)
3. Mediocre	3. Mediocre (6-10)
4. Media	4. Media (11-20)
5. Activa	5. Activa (+ de 20)
6. Máxima	

Experimento 2. Se tomaron pedazos de callos de aproximadamente 5 mm³ de generación R1 de las variedades Ja-60-5 y C-8751, los cuales se trataron con las tres concentraciones de PEG-4000 (S1, S2 y S3) y agua destilada, durante 24 y 48 horas. Se montaron cinco réplicas de cada tratamiento. Los callos tratados fueron sembrados en un medio para la diferenciación de brotes (Medio 2), el cual se evaluó al cabo de los 30 días, mediante una escala de rangos (tabla 1).

Experimento 3. Las plántulas de la var. C-8751 se trataron con las tres soluciones de PEG-4000 (S1, S2 y S3) descritas anteriormente, así como con el control de agua destilada, en tubos de ensayo individuales con 5 ml de solución. A los siete días, las plántulas se pasaron a tubos con Medio 2. Al cabo de 30 días, las plántulas se evaluaron mediante una escala de rangos (1: Bien; 2: Regular y 3: Mal) para no destruirlas y seguir estudiando su comportamiento. Se utilizaron 10 réplicas para cada tratamiento.

Análisis biométrico. Los datos se analizaron por el Test de Kruskal-Wallis, realizándose, además, en algunos casos la comparación múltiple no paramétrica por el método de Newman-Keuls. La correlación de Spearman fue aplicada para evaluar la correlación entre el crecimiento de los callos y el contenido de fenoles (Zar, 1974; Dixon y Massey, 1974). Estos análisis se realizaron en una microcomputadora NEC PC-9801F.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de un stress hídrico sobre los callos. En la tabla 2 se pueden apreciar los resultados del test de Kruskal-Wallis aplicado al crecimiento de los callos de la var. C-8751, después de sometidos a un stress hídrico con las tres concentraciones de PEG-4000 (Experimento 1). Los análisis se realizaron por tiempo, no detectándose diferencias entre los callos tratados con agua destilada y los tratados con las diferentes soluciones (S1, S2 y S3). Esto puede ser debido al pequeño número de réplicas empleado, a que el tratamiento con agua destilada produjo algún tipo de efecto, o los tratamientos no son los mas adecuados en cuanto a tiempos y dosis.

TABLA 2. Crecimiento de los callos. Resultados del test de Kruskal-Wallis. (Sumas de rangos). PEG-4000 : S1 (-2bar), S2 (-4bar), S3 (-8bar).

Tiempo	T R A T A M I E N T O S				H calc.
	Agua	S1	S2	S3	
2	38,5	72,0	48,0	51,5	3,81 NS
4	42,0	36,0	61,0	71,0	4,99 NS
6	54,0	50,0	50,0	56,0	0,18 NS
8	39,0	65,0	53,0	53,0	2,20 NS
24	64,0	51,0	42,0	53,0	1,58 NS
48	52,5	39,5	49,5	59,0	1,33 NS

X² (0,05), 3 gl: 7.81

En general, podemos señalar que el crecimiento de los callos no fue muy activo, lo cual pudo estar influido por el hecho de que tomamos pequeñas porciones de callo para los tratamientos. En algunos casos, los callos presentaban abundantes fenoles, poco crecimiento y es de destacar la abundancia de callos gelatinosos.

El color de los callos fue generalmente pardo claro, debido a la abundancia de derivados fenólicos, y en algunos casos presentaban pigmentos flavonoides (antocianinas) que daban una coloración roja característica.

En la tabla 3 se pueden apreciar los resultados del test de Kruskal-Wallis aplicado a la presencia de compuestos fenólicos en los callos de la var. C-8751, después de los distintos tratamientos (S1, S2 y S3) a que fueron sometidos. Se presentan diferencias en los contenidos de fenoles entre los tratamientos efectuados a las 6 y 24 horas, no ocurriendo así en los restantes.

TABLA 3. Contenido de fenoles. Resultados del test de Kruskal-Wallis. (Sumas de rangos). PEG-4000, S1 (-2bar), S2 (-4bar), S3 (-8bar).

Tiempo Horas	T R A T A M I E N T O S				H calc.
	Agua	S1	S2	S3	
2	50,5	39,5	44,5	66,5	2,31 NS
4	63,0	50,0	50,5	46,5	0,99 NS
6	59,5	57,5	22,5	70,5	8,14 *
8	59,5	58,0	59,5	33,0	5,03 NS
24	55,0	38,5	83,5	33,0	9,65 *
48	39,0	71,0	36,5	33,5	6,74 NS

X² (0,05), 3 gl: 7.81

En los tratamientos durante seis horas el menor contenido de fenoles se presenta en los callos tratados con S2, mientras que el mayor valor se obtiene con los callos tratados con S3. Por el contrario, en los tratamientos de 24 horas, la respuesta de los callos ocurre a la inversa. Consideramos que esta respuesta es ambigua y no permite evaluar una posible tendencia en los resultados o predecir una posible respuesta a esperar.

En la tabla 4 se presentan los coeficientes de correlación de Spearman de la comparación entre el crecimiento de los callos y el contenido de fenoles, calculado global y por tiempos. En una comparación global de los 24 tratamientos se obtuvo un valor de $R_s = -0,4690$ (significativo para $p < 0,001$) para dicho coeficiente.

TABLA 4. Coeficientes de correlación de Spearman (crecimiento de los callos-fenoles)

Tiempo (h)	R _s
2	-0,6945 ***
4	-0,6843 ***
6	-0,4015 NS
8	-0,2764 NS
24	-0,2195 NS
48	-0,0494 NS

R_s global = -0,4690 *** N=20

Se ha reportado (Chagvardieff, 1980; González, 1984) que el crecimiento de los callos en la caña de azúcar presenta una correlación negativa y significativa con su contenido de fenoles. En nuestros resultados esto sólo se mantiene para los tratamientos a las dos y cuatro horas. A medida que aum...

ta el tiempo de tratamiento va disminuyendo el coeficiente de correlación, aunque aún con los tiempos empleados se mantiene la correlación negativa. Se hace necesario estudiar un rango mayor de tiempos, pues es posible que utilizando tiempos pequeños los tratamientos no sean efectivos. Por otra parte, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, se observa que tanto los tratamientos para provocar el stress hídrico como el tratamiento con agua destilada provocan alteraciones en el crecimiento de los callos y en el contenido de fenoles, lo cual no permite determinar cuáles son los mejores o peores tratamientos, ni determinar un tiempo mínimo o máximo de tratamiento, para obtener una respuesta adecuada. Es posible que al tratar los callos con agua destilada sola, se provoque un tipo de shock fisiológico que impida evaluar una respuesta al stress hídrico provocado por las tres dosis de PEG-4000 empleadas. Se hace necesario ampliar estos experimentos para poder evaluar el comportamiento fisiológico de los callos ante un stress hídrico. Por otra parte, en la literatura consultada no hemos encontrado referencias a trabajos de stress hídrico en callos cultivados "in vitro", sólo en cultivos de suspensiones celulares (Maretzki y cols. 1969).

Efecto de un stress hídrico sobre la diferenciación de brotes. En la tabla 5 se presentan los resultados del Test de Kruskal-Wallis aplicado a la diferenciación de brotes en los callos de dos variedades C-8751 y Ja-60-5, que fueron sometidas a stress hídrico con tres concentraciones de PEG-4000 (S1, S2 y S3), comparándolos con un tratamiento con agua destilada y un control sin tratamiento (Experimento 2).

TABLA 5. Diferenciación de brotes. Resultados del test de Kruskal-Wallis (Sumas de rangos). PEG-4000, S1 (-2bar), S2 (-4bar), S3 (-8bar).

Var.	Tiempo (h)	T R A T A M I E N T O S					H calc.		
		Control	Agua	S1	S2	S3			
Ja-60-5	24	26,5	74,5	74,5	81,0	68,5	7,77	NS	
	48	21,0	59,0	53,0	93,0	99,0	16,00	**	
C-8751	24	37,5	65,5	84,0	70,0	68,0	4,63	NS	
	48	23,0	91,0	46,0	86,0	79,0	13,72	**	
x ² (0,01), 4 gl:		13.28							

El análisis se hizo por tiempo para cada variedad. Como se aprecia en la tabla 5, los menores valores de las sumas de rangos se obtienen en los controles sin tratamiento alguno, para ambas variedades. Los tratamientos durante 24 horas no difieren entre sí; pero en el caso de los tratamientos durante 48 horas, sí se presentan diferencias, siendo menor la diferenciación de brotes en el control sin tratamiento, mientras que los callos tratados con agua o con las diferentes concentraciones de PEG-4000 presentan una di-

ferenciación de brotes mucho mayor que difiere del control. Esto ocurre para las dos variedades, tanto en la resistente a la sequía (Ja-60-5) como en la susceptible (C-8751).

Estos resultados nos permiten plantear que para obtener una respuesta sobre la diferenciación de brotes el tiempo mínimo de tratamiento de los callos es de 48 horas.

El tratamiento de los callos con agua destilada o con las tres dosis de PEG-4000 estimula la diferenciación de brotes en los callos. En los casos en que no se obtuvo diferenciación o esta fue muy pobre, los callos presentaban una coloración pardo oscura producto del contenido de fenoles.

En la var. Ja-60-5 (48 h) la diferenciación de brotes es mayor para los tratamientos de PEG-4000 (S2 y S3) que difieren del resto. En el caso de la var. C-8751 los mayores valores se obtienen con el agua y las soluciones S2 y S3 de PEG-4000, que no difieren entre sí, pero todos son superiores al control sin tratamiento. Analizando estos resultados podemos plantear que tanto el stress hídrico, provocado por las tres concentraciones del PEG-4000 utilizadas, como el shock de hidratación, provocado por el agua destilada, producen un estímulo superior de la diferenciación de brotes en los callos. Es necesario continuar estudiando estos aspectos.

Efecto de un stress hídrico sobre las plántulas. En la figura 1 se presentan plántulas de la var. C-8751 tratadas con tres concentraciones del PEG-4000 (Experimento 3). Las plántulas del control con agua destilada presentan un desarrollo adecuado; en el caso de las plántulas tratadas con las concentraciones S1 (-2bar) y S2 (-4bar) también presentan un buen desarrollo, aunque se manifiestan ligeros daños en el extremo de algunas hojas. Sin embargo, las plántulas tratadas con la concentración S3 (-8 bar) presentan un desarrollo menor y se manifiesta en ellas un daño en algunas hojas, que se presentan como quemadas, de color amarillento por pérdida de la clorofila.

Los resultados del análisis de varianza de clasificación simple por rangos, test de Kruskal-Wallis, (tabla 6), permiten plantear que hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 6. Efecto de un stress hídrico sobre el desarrollo de las plántulas de la var. C-8751 provocado por el PEG-4000 en tres concentraciones. (S1: -2bar; S2: -4bar; S3: -8bar).

TEST DE KRUSKAL-WALLIS				
TRATAMIENTOS	(1) Agua	(2) S1	(3) S2	(4) S3
SUMA DE Rangos	156,0	180,0	182,0	302,0
n=10	H calc.:	9,49 *	X2 (0,05),	3gl: 7,81

TEST DE NEWMAN-KEULS

COMP.	RA-RB	E.S.	q calc.	p	Conclusión
4-1	146	36,97	3,95	4	Rechazar Ho
4-2	122	27,84	4,38	3	Rechazar Ho
4-3	120	18,71	6,41	2	Rechazar Ho
3-1	26	27,84	0,93	3	Aceptar Ho
3-2	2	18,71	0,11	2	Aceptar Ho
2-1	24	18,71	1,28	2	Aceptar Ho
q,0.05,4: 3.63			q,0.05,3: 3.31	q,0.05,2: 2.17	



FIGURA 1. Plántulas tratadas con distintas concentraciones de PEG-4000 (S1:-2da; S2:-4bar; S3:-8bar). (C: Control con agua destilada)

Al efectuar la comparación múltiple no paramétrica por el test de Newman-Keuls de la suma de rangos (tabla 6) se puede apreciar que al tratar las plántulas con la solución S3 (-8bar) se provoca un stress hídrico que causa un daño en las mismas que difiere significativamente de los tratamientos S1, S2 y del control con agua destilada. Por otra parte, estos tres tratamientos no difieren entre sí. Debemos señalar que en este experimento utilizamos como control un tratamiento con agua destilada y que algunas plántulas tratadas de esta forma presentaban ligeras afectaciones, sobre todo en la coloración de los ápices foliares. Aunque no utilizamos un control sin tratamiento alguno, en las plántulas sin tratar que se mantienen en el laboratorio no se presenta esta fenómeno.

Se hace necesario continuar estos experimentos para obtener mayor información sobre el efecto fisiológico que ocasionan en los callos y plántulas las distintas dosis del PEG-4000 empleadas y tratar de precisar un tiempo y dosis adecuados para evaluar resistencia a la sequía.

CONCLUSIONES

1. Los callos de la variedad Cuba 8751 sometidos a un stress hídrico, provocado por tres dosis de PEG-4000 en diferentes tiempos, no presentan diferencias en su crecimiento al compararlos con un tratamiento con agua destilada. Se observa la proliferación de abundante callo gelatinoso.
2. Al evaluar el contenido de fenoles de los callos se detectan diferencias entre los distintos tratamientos a las 6 y 24 horas. Se detecta una correlación negativa y altamente significativa entre el crecimiento de los callos y la producción de fenoles en global y entre los tratamientos durante dos y cuatro horas.
3. Los callos de las variedades Jaronú 60-5 y Cuba 8751 tratados con tres dosis de PEG-4000 y agua destilada durante 48 horas, presentan diferencias altamente significativas, en la diferenciación de brotes, superior en los callos tratados con respecto a los callos sin tratar.
4. Una solución de PEG-4000 (S3, -8bar) aplicada durante siete días produjo efectos fisiológicos negativos en plántulas de caña de azúcar, diferentes con respecto a plántulas tratadas con dosis menores y agua destilada.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer las facilidades brindadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Genética de la Facultad de Biología donde se realizó este trabajo y en especial a la compañera Maritza Perdomo. Igualmente queremos reconocer la colaboración entusiasta brindada por los compañeros Lic. Antonio Sigarroa del Departamento de Genética y el Dr. Raúl Coyula del Centro de Investigaciones Pesqueras, en la programación de los métodos no paramétricos que empleamos para procesar nuestros resultados y en sus orientaciones para utilizar las técnicas de Computación.

BIBLIOGRAFÍA

- Dixon W.J. y F.J. Massey (1974)
Introducción al Análisis Estadístico, 489p, Ed. del Castillo S.A., Madrid.
- Gómez L., M.Ramírez y J.A.Quintana (1984)
Cambios diurnos en el déficit de saturación hídrica de dos variedades de caña de azúcar, p 24, Primer Evento Científico de las BTJ, INIFAT, Ciudad de La Habana.
- Heinz D.J., M.Krishnamurthi, L.G.Nickell and A.Maretzki (1977)
Cell, Tissue and Organ Culture in Sugarcane Improvement. Ch 1.1, p 3-17. Tomado de J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer Verlag, Berlín.
- Heinz D.J. and G.W.Mee (1969)
Plant Differentiation from callus tissue of *Saccharum* sp., Crop Science-9: 346-348.
- Hsiao T.C. (1973)
Plant Response to Water Stress, Ann. Rev. of Plant Phys. 24, 519-570.
- Korneva S. y R.H.Maribona (1984)
Obtención "in vitro" de plántulas de caña de azúcar resistentes a la salinidad. Presentado en III Jornada Científica I.N.I.C.A., MINAZ.

- Liu M.C. y H.S. Yeh (1982)
Selection of a NaCl tolerant line through stepwise sugarcane cell cultures. Proc. 5th Inter. Congress Plant Tissue and Cell Culture, Japan.
- Maretzki A., M.Thom and L.G. Nickell (1969)
The Effect of Osmotic Pressure Stress on Cell Cultures of Sugarcane, XI Intern. Bot. Congress Abs. p 140.
- Murashige T. and F. Skoog (1962)
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Phys. Plantarum 15, 473-497.
- Nickell L. (1977)
Crop Improvement in Sugarcane: Studies Using in vitro Methods, Crop. Science 17, set-oc , 717-719.
- Ortega E., J.Pardo y A.González (1983)
Alteraciones metabólicas en plantas sometidas a stress hídrico. XVIII Congreso I.S.S.C.T., Cuba.
- Ortega E., J.Pardo y A.González (1984)
Cambios metabólicos en plantas de caña de azúcar bajo stress hídrico, Ciencias de la Agricultura 21, 37-43.
- Zar, J.H. (1974)
Biostatistical Analysis, Acad. Press, 620p New York.

Recibido: 4 de noviembre de 1985