

Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. Sp 70-1284) en la formación de callos

Apolonio Valdez Balero*, Pedro A. Orellana Pérez, Leonardo García Rodríguez, Novisel Veitia Rodríguez, Idalmis Bermudez Carabaloso, Lourdes García Rodríguez y Yeni Padrón M.

*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Martha Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. apolonio@uclv.edu.cu

RESUMEN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido), es de los cultivos comerciales que por su importancia económica más se ha trabajado sobre aspectos biotecnológicos. Cuando se utilizan explantes de campo del híbrido SP 70-1284, una vez que se manipulan, las heridas producidas por la incisión provocan la oxidación de los tejidos. Con el fin de reducir la fenolización que afecta en el desarrollo de la calogénesis, en esta variedad se probó un protocolo el cual mostró buenos resultados al seccionar los spindles sumergidos en una solución con 200 mg.l⁻¹ de ácido cítrico como agente antioxidante, así como adicionar al medio de cultivo antioxidante ácido a razón de 50 mg.l⁻¹. La sección del explante que generó la mayor cantidad de callo fresco y la mejor calidad del mismo, fueron los segmentos de las hojas más jóvenes situadas en los primeros cinco centímetros por encima del meristemo apical.

Palabras clave: contaminación, cultivo de tejidos, callo

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) is the crop where more work has been done on biotechnological aspects because of its economical importance among the commercial crops. When the explants from the field of the hybrid SP 70-1284 are used and manipulated, the lesions produced by the incision become oxidizable. With the objective to reduce the phenolization that is present in the development of callogenesis, a protocol was tested, which showed good results when the spindles were submerged and sectioned in a solution with 200 mg.l⁻¹ of citric acid, as well as the addition of the antioxidant at 50 mg.l⁻¹ to the *in vitro* culture medium. The section of the explants that generated the greatest amount of fresh biomass of callus and the best quality of them were the more young leaves situated above the meristem in the first 5 cm.

Key words: contamination, tissue culture, callus

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de calogénesis en la caña de azúcar generalmente es afectado por la oxidación fenólica que ocurre en las heridas causadas por el corte en los tejidos jóvenes. Para reducir este efecto, Enríquez (1997), Arencibia (1997) y (1999) recomiendan la utilización de agentes químicos antifenolizantes al momento de la incisión.

El explante más utilizado para la inducción de calogénesis son los segmentos inferiores de las hojas más jóvenes situadas por encima de la última zona visible en plantas de entre seis y nueve meses de edad. Algunos autores como Guiderdoni (1986) y Freire (1998) y (2001) han sugerido utilizar hojas jóvenes de plantas *in vitro*, otros como Ho y Vasil (1983); Ahloocualia *et al.* (1983) y De García (1988) emplearon hojas jóvenes pero de plantas crecidas en campo o en invernadero; estos estudios se han efectuado en diferentes variedades de caña de azúcar.

Pérez (1993) mencionó que en la práctica se recomienda la utilización de hojas jóvenes que tengan un rápido y vigoroso crecimiento y que se tomen 10 secciones de 0.5 a 1.0 cm de longitud por tallo, pero que no se utilicen los meristemos subapicales por la alta contaminación microbiana y fenolización que presentan.

Guiderdoni (1986) puso en evidencia la existencia de un gradiente de calogénesis, en dependencia de la posición de las hojas, concluyendo que la hoja A y B (las más cercanas al meristemo) son las formadoras de callos nodulares embriogénicos, anteriormente Ho y Vasil (1983) observaron algo similar en las hojas cuatro y cinco de sus ensayos que sufrieron oxidación fenólica.

Se ha establecido un gradiente de respuesta para la calogénesis desde la base hasta el ápice y también en segmentos de hojas en los que el tejido vascular está completamente diferenciado (Haydu y Vasil, 1981 y Liu y Vasil, 1981).

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó el presente trabajo con el objetivo de controlar el fenómeno de la fenolización en los explantes mediante la utilización de un agente antioxidante, así como determinar la sección más adecuada para la inducción de callo mediante el incremento de peso en biomasa fresca de callo y de su mejor calidad en la variedad SP 70 1284.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizaron tallos tiernos de caña de azúcar de la variedad SP 70-1284 suministrados por el EPICA, el medio de cultivo utilizado en todos los experimentos para la fase de establecimiento *in vitro*, fue el propuesto por Payan (1967) que contenían 3 mg.l⁻¹ de la auxina 2, 4-D y solidificado con 8 g.l⁻¹ agar. Se utilizaron en cada caso 10 frascos de cristal de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo y una densidad de cuatro explantes (secciones de hojas jóvenes enrolladas de un cm de longitud y 0.5 cm de diámetro) por frasco. Los explantes una vez inoculados en el medio de cultivo se mantuvieron en condiciones de oscuridad a una temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$.

Estudio de Antioxidantes

Inicialmente se montó un experimento para determinar que antioxidante podría reducir o atenuar la oxidación que presentan los explantes derivados del híbrido de caña de azúcar 'SP 70-1284' después de inoculados sobre el medio de cultivo. Se evaluaron tres antioxidantes por separado, bajo un arreglo factorial 2x2x2, con ácido cítrico, ácido ascórbico y cisteína, y dosis 50 y 100 mg.l⁻¹ para cada componente añadidos al medio de cultivo. El desarrollo de la fenolización fue evaluada durante 120 horas posteriores a la inoculación del explante con una periodicidad de 24 horas, determinándose el número de explantes no fenolizados para cada tratamiento y dosis.

Los datos obtenidos fueron analizados en el paquete de diseños experimentales FAUNAL, Ver 2.5, según Olivares (1994).

Tiempo de exposición e inmersión de explantes en ácido cítrico

Para determinar el tiempo que el explante debe permanecer en la solución compuesta por 200 mg.l⁻¹ de ácido cítrico, recomendada por Enríquez *et al.* (1998), se estableció un experimento con cinco tratamientos, tres de ellos fueron tiempos de inmersión de 20, 30 y 40 segundos de permanencia en la solución, después de realizados los cortes. Un cuarto tratamiento donde el corte de los tejidos para conformar el explante se realizó dentro de la solución e inmediatamente el explante fue colocado en el medio de cultivo. El quinto tratamiento

(control), fue donde el corte de los segmentos de hojas se realizó en condiciones normales sin estar expuesto al ácido cítrico. Posterior a los tratamientos con la solución, los explantes se sembraron en el medio de cultivo a una densidad de cuatro explantes por frasco y 10 réplicas de cada tratamiento. La evaluación del efecto de la fenolización se realizó durante 96 horas con una periodicidad cada 24 horas y se cuantificó el número de explantes no afectados por la fenolización.

Selección del mejor explante para la formación de callo

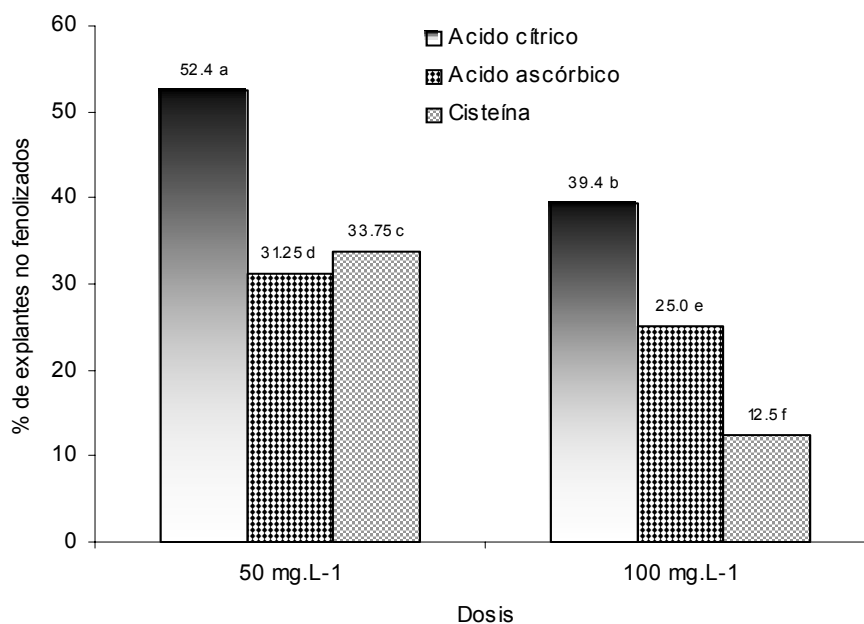
Con el objetivo de estudiar la fracción del segmento de hojas enrolladas en la cual se formaba la mayor cantidad de callo peso en masa fresca y de mejor calidad, se fraccionó el segmento total de 10 centímetros de longitud en tres partes: la primera, la más cercana a la base del meristemo; la segunda la sección intermedia, considerando tres centímetros por encima de la primera y la última sección considerada seis centímetros, después del meristemo. De cada parte se tomaron tres explantes que se colocaron conjuntamente en un frasco conteniendo el medio de cultivo. Se utilizaron 10 repeticiones en cada caso. La evaluación final se realizó a los 21 días posteriores a la inoculación, determinándose el incremento en peso de masa fresca de callo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de Antioxidantes

Los explantes de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. SP 70-1284) tratados con los diferentes antioxidantes, mostraron un comportamiento diferenciado según el tipo de antioxidante y la dosis utilizada (Figura 1). Se puede apreciar que el mayor porcentaje de explantes no fenolizados y con buen crecimiento se logró al añadir ácido cítrico a una concentración de 50 mg.l⁻¹ al medio de cultivo, con diferencias significativas respecto al empleo de la cisteína y el ácido ascórbico. La dosis de 100 mg.l⁻¹ presentó un comportamiento inferior con respecto a la de 50 mg.l⁻¹, pero igualmente el ácido cítrico presentó un mejor comportamiento para reducir la fenolización que el ácido ascórbico y la cisteína.

El control de la fenolización es un aspecto crucial para el éxito de cualquier procedimiento de cultivo de tejidos en caña de azúcar. Una vez que se desencadenan las reacciones de oxidación de fenoles en los tejidos dañados por la manipulación, este proceso se hace irreversible, lo que conlleva a una pérdida significativa de la calidad de los explantes y compromete la posterior regeneración de plantas (Perl *et al.* 1996).



Letras no comunes difieren para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Tuckey

Figura 1. Efecto de tres antioxidantes en el control de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar en la variedad 'SP 70-1284'.

La fenolización afecta a los explantes de caña de azúcar causándole la muerte o afectando la formación y calidad del callo. Enríquez *et al.* (1997) han recomendado la utilización de estos compuestos como vía para reducir o atenuar el daño que causan las sustancias oxidantes que se originan en los cortes a los tejidos al momento de su manipulación en el proceso de su implantación *in vitro*.

Manejo y tiempo de exposición e inmersión del explante en la solución de ácido cítrico

El tratamiento (corte y siembra) en el cual se realizó el corte del segmento de hojas jóvenes dentro de la solución de ácido cítrico a 200 mg.l⁻¹ y de inmediato la implantación en el medio de cultivo resultó el mejor con 68% de explantes no fenolizados en las primeras 24 horas y 65% a las 48 horas, manteniéndose con valores superiores a 60 % a partir de ese momento sin diferencias significativas, entre los períodos evaluativos (Figura 2). El tratamiento de inmersión durante 30 segundos y luego seccionar para formar los explantes mostró un 60 % de explantes no fenolizados a las 24 horas, pero este valor bajó a menos de un 40 % a las 48 horas y su tendencia posterior fue a disminuir. El resto de los tratamientos presentaron un bajo efecto para impedir la fenolización en las zonas de corte.

El daño por la fenolización impidió la formación de callos en la mayoría de los explantes (Figura

3A). Los resultados indicaron la necesidad de que los cortes del segmento de hojas jóvenes se realizaran dentro de la solución de ácido cítrico para disminuir el efecto de la oxidación fenólica en las zonas de corte y obtener un explante sin afectación (Figura 3C). No todo el tejido fue afectado por la fenolización, sin embargo, la formación de callo se inició en las zonas extremas del segmento (Figura 3B) que forma el explante y continuó posteriormente en otras zonas del mismo hasta formar una masa de callo friable y compacta (Figura 3D).

Zona del segmento de tallo con mayor eficiencia en la generación de callos

La sección del segmento de tallo que mostró tener los valores más altos en explantes no fenolizados fue la más cercana al meristemo (primera sección), durante 120 horas posteriores al establecimiento (Figura 4). Se pudo apreciar que en la primera evaluación realizada transcurridas 24 horas esta sección presentó el 95% de explantes sanos, una vez transcurridas 72 horas mostró una tendencia hacia la estabilidad con valores superiores al 75%. En la segunda sección el valor más alto se observó a las 24 horas y luego descendió a valores muy bajos a partir de las 24 horas obteniéndose finalmente sólo un 8% de explantes sanos. La tercera sección fue fuertemente afectada por la oxidación fenólica llegando a obtenerse solo el 2% de explantes sanos.

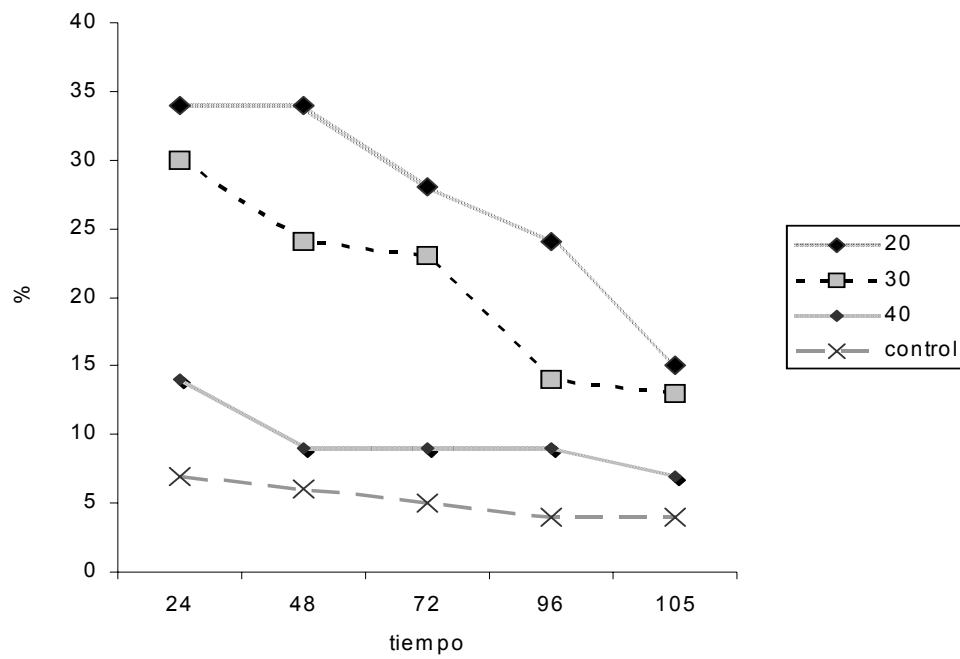


Figura 2. Influencia del manejo del explante y tiempo de exposición en la solución de ácido cítrico sobre el grado de fenolización en las zonas dañadas por corte.

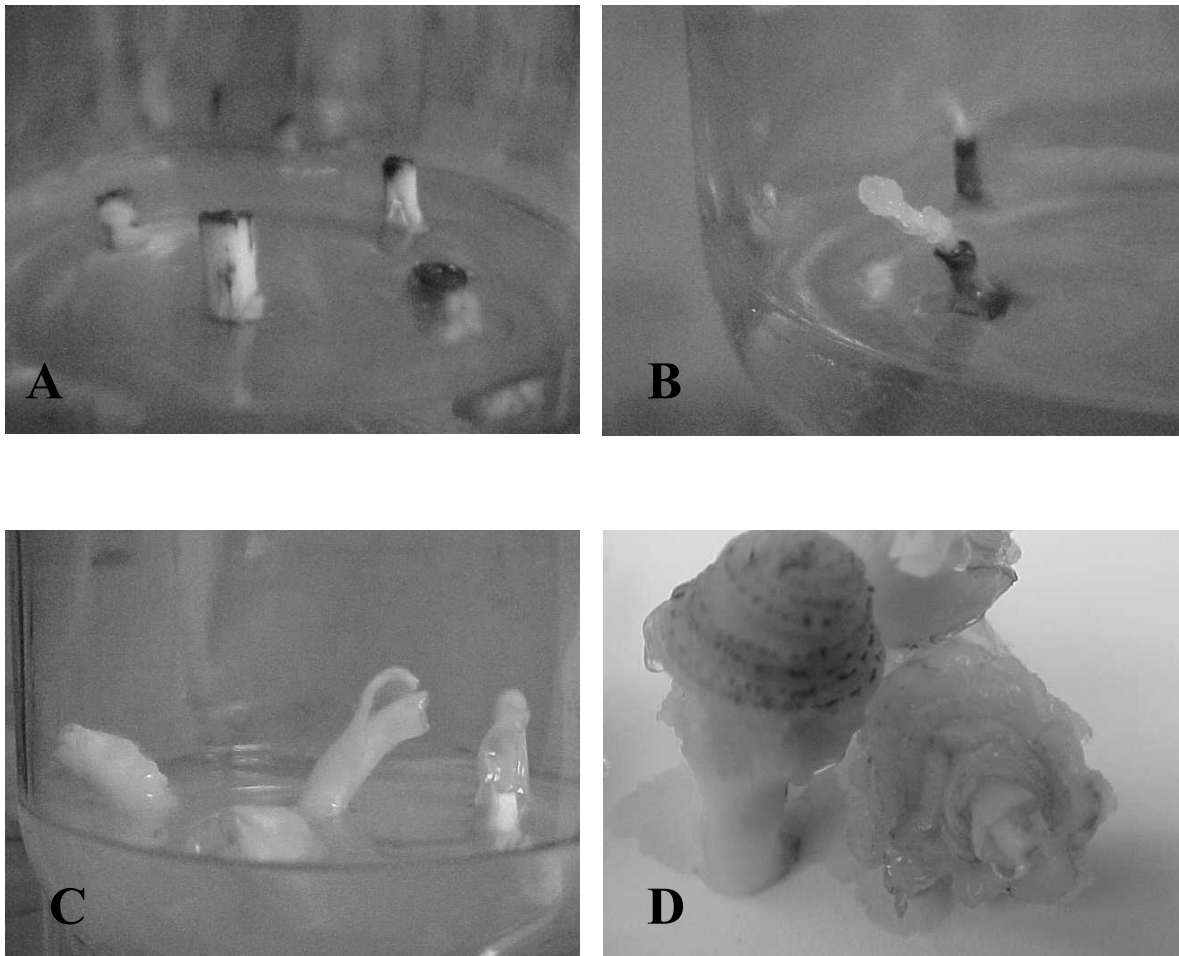


Figura 3. Efecto de la fenolización en la formación de callo: A) explante mostrando la fenolización en la zona del corte, B) explante con pobre formación de callo por el efecto de la fenolización, C) explante tratados con ácido cítrico a 200 mg.l^{-1} al momento de realizar los cortes y D) explantes mostrando una adecuada formación de callos a los 20 días de inoculado cuando no fueron afectados por la fenolización.

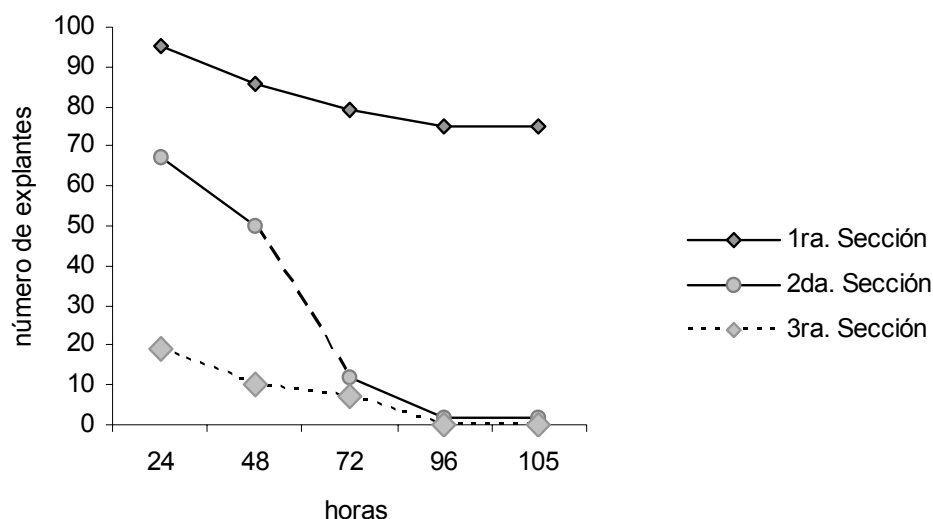


Figura 4. Influencia de la sección del segmento de hojas jóvenes en la fenolización del explante en la variedad SP 70 1284

Los callos formados en la primera sección presentaron la mayor ganancia en peso fresco así como la mejor calidad en cuanto a consistencia y color. Similares resultados obtuvieron Gnappagasan y Vasil (1990), citados por Arencibia (1999), estos autores demostraron

que los explantes localizados entre 1-5 cm de la base de las hojas 4 y 5 son los que producen callo tipo II (compacto de color amarillo, formado por células pequeñas, redondeadas y con citoplasma denso) con alta capacidad regenerativa.

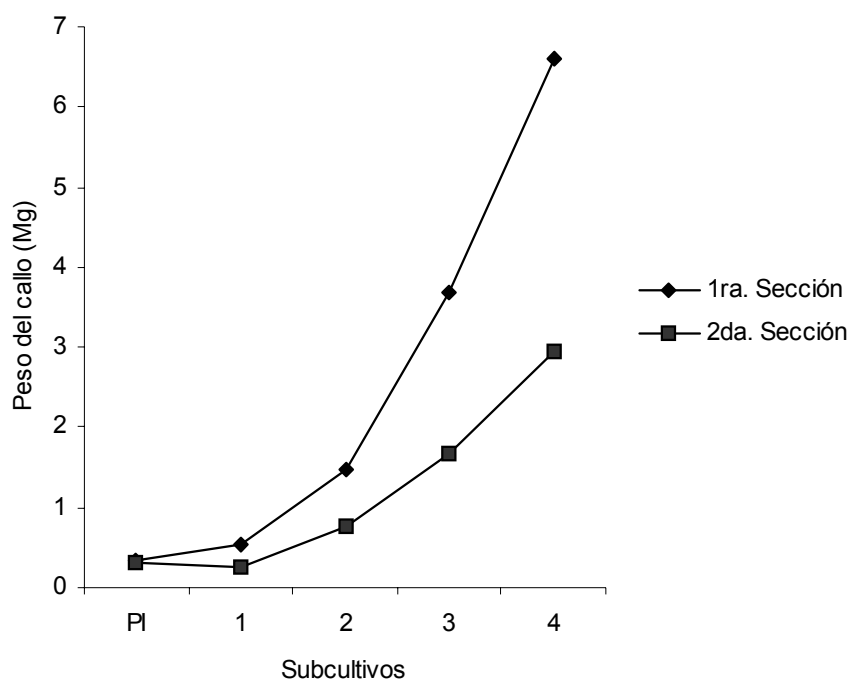


Figura 5. Incremento del peso fresco de callos en dependencia de la sección del segmento de hojas jóvenes

CONCLUSIONES

El ácido cítrico añadido al medio de cultivo de Payan *et al.* (1967) a la dosis de 50 mg.l⁻¹ o el corte de los explantes dentro de una solución del mismo ácido a 200 mg.l⁻¹, permitió un adecuado control de la oxidación fenólica en la implantación *in vitro* de segmentos de hojas jóvenes de caña de azúcar var. 'SP 70 1284'.

La sección de hojas jóvenes más cercana al meristemo apical (hasta tres centímetros por encima) fue la que presenta la menor oxidación fenólica y la que desarrolla la mayor cantidad de masa fresca de callos con una buena calidad para el cultivo *in vitro* de explantes de la variedad de caña 'SP 70 1284'.

AGRADECIMIENTOS

ANUIES-México. Por la beca otorgada para la realización de la estancia doctoral COLEGIO DE POSTGRADUADOS-CAMPUS TABASCO-México. Por las facilidades brindadas para la realización del doctorado

REFERENCIAS

- Ahloowalia, B y Maretzki A (1983) Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. *Plant Cell. Rep.* 2: 21-25
- Arencibia, A y Cornide M T (1999) Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. Métodos de transformación genética de la caña de azúcar. 107-119
- Arencibia, A (1997) Transformación directa de la caña de azúcar (*Saccharum* spp) mediante electroporación de células intactas: Producción de plantas resistentes al ataque de bórer (*Diatraea saccharalis* Fab). Tesis de Doctorado en Ciencias. CIGB. La Habana, Cuba.
- De García, E (1988) Variaciones somaclonales y su aplicación en los estudios de mejoramiento genético de la caña de azúcar. En: Leopoldo Villegas, Cultivo de tejidos vegetales aplicados a la producción agrícola. IDEA. Caracas, Venezuela
- Enríquez, GA, Vázquez P Roberto I, Dmitri L, Prieto-Samsonov, De la Riva G y Selman-Housein G (1998) Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* 206: 20-27
- Enríquez, GA, Roberto I, Vázquez P, Dmitri L, Prieto-Samsonov, Pérez M y Selman-Housein G. (1997) Genetics transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnol Appl.* 14: 169-174
- Freire, M (1998) Embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido var. Cuba 87-51). Tesis para obtener el grado de Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba
- Freire, M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. C 87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. IBP. Universidad central de las Villas.
- Gnanapragasam, S y Vasil, I (1990) Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp). 9: 419-423
- Haydu, Z y Vasil, I (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue and anthers of *Penisetum purpureum*. *Theoret. Appl. Genet* 59: 269-273
- Ho, W y Vasil, I (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*. 118 p: 169-180
- Liu, M y Vasil, I (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum amximum*. *Jacq. Theor. Appl. Genet.* 59: 275-280
- Olivares, S (1994) Paquete de diseño experimentales, FAUANL. Ver 2.5
- Payán, F y Tarcon, G (1977) Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar mediante el cultivo de tejidos y yemas axilares. *Acta agronómica*. 27: 43-49
- Pérez, J (1993) Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. En: Roca W y Mrogrinski Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. P. 555
- Perl A, Lotan O, Abu-Abied M (1996) Holland D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for Grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during the grape-*agrobacterium* interaction. *Nature Biotechnology* 8: 535-542