

INDUCCION Y MULTIPLICACION DE CALLOS *in vitro* EN TRES CULTIVARES COMERCIALES DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum spp*)^{1/*}

Ilse Villalobos**

Oscar Arias**

ABSTRACT

In vitro induction and multiplication of callus in three commercial cultivars of sugar cane (*Saccharum spp*). Shoot tips of three commercial cultivars of sugar cane B 4362, H 44-3098 and H 54-775, were grown *in vitro* in the Murashige and Skoog's medium supplement with 0, 1.5, 3, 4.5, and 6 mg/L of 2,4-D in order to induce callus formation. After a month of incubation, the size, the organogenesis and the fresh weight of the callus for each treatment, were determined. The results showed that 3 mg/L of 2,4-D produced the most vigorous callus. For the differentiation of the callus, 2,4-D was substituted by 1 mg/L of kinetin and the plantlets obtained were placed in the greenhouse and later in the field. Calluses lost their capacity to regenerate plantlets after being incubated for twenty two weeks, and subcultivated in one month intervals, in a medium containing 3 mg/L of 2,4-D.

INTRODUCCION

Las necesidades de mejoramiento genético en la caña de azúcar han conducido a los fitomejoradores a establecer, junto a los programas convencionales de mejoramiento, la técnica del cultivo *in vitro* de células y tejidos como una nueva alternativa para obtener variabilidad genética. La técnica consiste en la formación de callos a partir de tejidos somáticos y la diferenciación posterior de plantas a partir de éstos, lo que permite, en el caso de la caña de azúcar, obtener variabilidad genética. Esta se produce debido a que los tejidos de esta especie, al cultivarse *in vitro*, manifiestan como producto del mosaico cromosómico que poseen, una alta frecuencia de variación, que da como resultado plántulas con características diferentes a las de la planta de donde se tomó el material de propagación (Liu, 1981).

Los estudios sobre el cultivo de células y tejidos de caña de azúcar se iniciaron en Hawaii, por Nickell (1964) quien desarrolló la técnica para obtener masas callosas a partir de trozos de parénquima.

Posteriormente, Barba y Nickell (1969) y Heinz y Mee (1969) lograron regenerar plántulas de caña de azúcar a partir de las masas callosas, las que tienen capacidad de formar meristemas apicales, radicales o embrioides. Estas estructuras organizadas pueden llegar a desarrollar plantas (Ho y Vasil, 1983).

En investigaciones posteriores se han cultivado *in vitro*, con éxito, diferentes tejidos de caña de azúcar (Liu, 1981) y se han estudiado sustancias auxínicas para inducir y mantener la formación de callos. El 2,4-D es la auxina más utilizada para este proceso ya que promueve una división acelerada de las células (Irvine, 1983).

Hoy día la inducción de la variabilidad genética en la caña de azúcar por cultivo de callos genera resultados prácticos en la obtención de subclones resistentes a enfermedades (Krishnamurti, 1977; Larkin y Scowcroft, 1983) tolerantes a la salinidad (Liu, 1981), y de alta producción y contenido de sacarosa (Liu, 1981). También se ha encontrado una técnica para la propagación ma-

1/ Recibido para su publicación el 7 de noviembre de 1986.

* Parte de la Tesis de Licenciatura en Fitotecnia de la primera autora.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

siva y rápida de subclones ya mejorados o libres de virus (Hendre *et al.*, 1983; Lee, 1984).

Este trabajo tuvo como objetivo establecer los niveles apropiados de 2,4-D para la inducción y cultivo de callos de caña de azúcar *in vitro* a partir de ápices de cultivares comerciales y diferenciar plántulas a partir de éstos.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron plantas de tres meses de edad de los cultivares B 4362, H 44-3098 y H 54-775. Después de eliminar el sistema radical y el exceso de follaje se cortó un trozo de tallo de 5 cm que incluyera el ápice. Este material se desinfectó con estreptomomicina y benomil 2 g/L (1:1) por 15 minutos, luego se sumergió 1 minuto en alcohol de 70% y posteriormente se agitó durante 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5%. Por último, los trozos de tallo se lavaron tres veces con agua destilada estéril en una cámara de flujo laminar.

Luego de la desinfección se procedió a la disección para extraer los ápices con un tamaño aproximado de 0,5 cm y cultivarlos en tubos de ensayo de 150 x 18 mm conteniendo 10 ml de medio.

El medio de cultivo consistió de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), 100 mg/L de inositol, 1 mg/L de tiamina-HCl, 2% de sacarosa, 10% v/v de agua de coco y 100 mg/L de cisteína como antioxidante. El medio se ajustó a un pH de 5,7 antes de autoclavarse y se solidificó con 9 g/L de agar.

Se utilizaron como tratamientos diferentes niveles de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético): testigo, 1,5; 3,0; 4,5 y 6,0 mg/L. Para cada tratamiento se hicieron 30 repeticiones.

Los explantes se incubaron a la oscuridad una semana y luego se colocaron a la luz con un fotoperíodo de 12 horas, una intensidad lumínica de 45 $\mu\text{E}/\text{seg}/\text{m}^2$ y una temperatura de 21 C por la noche y 29 C en el día.

Un mes después del inicio del experimento se evaluó la formación de callo de acuerdo a su tamaño y diferenciación, expresados en relación porcentual. También se hizo una relación de pesos frescos para obtener el índice de crecimiento relativo de los explantes y se realizó un análisis de varianza a los valores de peso fresco final de los callos.

Se hicieron cuatro subcultivos de los callos, los dos primeros en medio para proliferación. En el tercer subcultivo una parte de los callos se mantuvo en el medio de proliferación y otra parte en un medio promotor de diferenciación. Por último se pasó el material en su totalidad al medio de diferenciación.

Los subcultivos se realizaron a intervalos de un mes, y en cada uno se evaluó el potencial morfogénico de los callos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Formación de callos

En general, todos los tratamientos presentaron formación de callo a partir de los ápices de caña de azúcar.

El cultivar B 4362 (Figura 1A) mostró el mayor porcentaje de callo grande en los tratamientos de 3,0 mg/L y 4,5 mg/L de 2,4-D y presentó una disminución del porcentaje en la dosis más alta. Por el contrario el porcentaje de callos de tamaño mediano, se incrementó con esta última concentración.

En el cultivar H 44-3098 el comportamiento fue similar al anterior (Figura 1B), solamente varió en que el mayor porcentaje de callo grande se obtuvo con 3 mg/L de 2,4-D y disminuyó a partir de 4,5 mg/L.

La producción de callo de tamaño grande fue constante a partir de 3,0 mg/L de 2,4-D en el cultivar H 54-775 (Figura 1C) y el porcentaje de callo mediano se mantuvo también constante a partir de esa dosis.

En los tres cultivares se observó que la formación de callo organogénico fue inversamente proporcional a la concentración de 2,4-D.

Los resultados expuestos anteriormente indican que en general, la dosis de 3 mg/L de 2,4-D induce un desarrollo adecuado del tamaño del callo, lo que coincide con lo que reportan varios investigadores para otros cultivares de caña de azúcar (Liu, 1981). El tamaño del callo no determina el potencial morfogénico de éste, pero en esta especie un callo grande significa la posibilidad de un mayor fraccionamiento del mismo en el momento de subcultivarlo, lo que produce un número elevado de nuevos callos en cultivo y aumenta la probabilidad de inducir variabilidad genética.

Las concentraciones menores a 3 mg/L de 2,4-D no son adecuadas porque permiten la

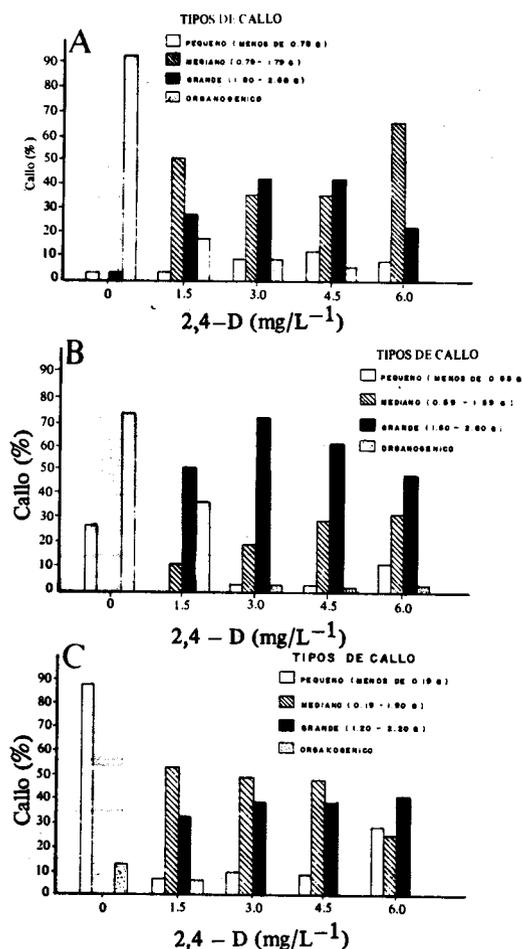


Fig. 1. Efecto de las dosis de 2,4-D en medio Murashige y Skoog (1962) sobre el tamaño de callos de los cultivares: A) B 4362 B) H 44-3098 C) H 54-775 después de seis semanas de iniciado el cultivo.

diferenciación rápida del callo lo que limita el número de subcultivos que se pueden realizar.

El desarrollo de callos que se observó en el tratamiento testigo, en ausencia de 2,4-D, puede explicarse por la presencia en el explante inicial de un nivel endógeno de auxina elevado que permite la proliferación celular; o por la aplicación exógena de agua de coco al medio, ya que se informa que ésta posee contenidos variables de auxina, giberelinas y citocininas, las cuales, solas o en combinación, suelen estimular el desarrollo del callo en algunas especies (Dix y Van Staden, 1982; Van Staden y Orewes, 1974).

La Figura 2 indica que la curva de crecimiento relativo de los callos llega al punto máximo con 1,5 mg/L de 2,4-D y disminuye a partir de esta do-

Cuadro 1. Peso fresco (g) promedio de los tratamientos con 2,4-D.

Tratamientos de 2,4-D (mg/L)	Cultivar*		
	B 4362	H 44-3098	H 54-775
0,0	1,08 a**	1,44 bc	0,48 c
1,5	1,33 a	2,02 a	1,34 ab
3,0	1,21 a	1,82 a	1,28 ab
4,5	1,13 a	1,51 b	1,36 a
6,0	1,12 a	1,36 bc	1,18 b

* Cada cultivar representa un bloque.

** Valores con una misma letra son significativamente iguales entre sí, según la prueba de Duncan al 0,05.

sis. Sin embargo, el tratamiento de 1,5 mg/L de 2,4-D presenta en todos los cultivares un porcentaje considerable de callo organogénico no deseado, el cual no puede ser subcultivado porque al provocarse la regeneración inmediata de estructuras organogénicas limita las condiciones para inducir variabilidad genética, (Figura 1). Por el contrario la dosis de 3 mg/L de 2,4-D da un porcentaje alto de formación de callo grande y mediano.

El comportamiento inicial que se observa en el primer subcultivo con las dosis superiores a 3 mg/L de 2,4-D en las que el porcentaje de callo grande disminuye paralelamente al índice de crecimiento relativo y en donde aumenta el porcentaje de callo mediano, puede ser producto de varios fenómenos: a) que el suministro exógeno de auxina (2,4-D) supla las necesidades endógenas del explante y esta sustancia se almacene en forma conjugada con algunos azúcares, lo que permite mantener un crecimiento lento del callo (Gresshoff, 1978); b) que las concentraciones de 2,4-D superiores a 3 mg/L sean tóxicas al explante, lo que limitaría su crecimiento; c) que en la fase de callo la inestabilidad genética produce diferentes niveles de ploidía y variación en la estructura, morfología y bioquímica de los cromosomas, incluyendo cambios a nivel nucleótico (Scowcroft, 1984) lo que provocaría la pérdida de algunas células no aptas para multiplicarse; d) por último, se puede considerar la posibilidad de que los callos estén en la fase inicial del estado de habituación en la cual las células adquieren la capacidad de satisfacer autotróficamente las necesidades de auxina, lo que provocaría la competencia entre las células habitadas y las no habitadas, produciéndose la senescencia

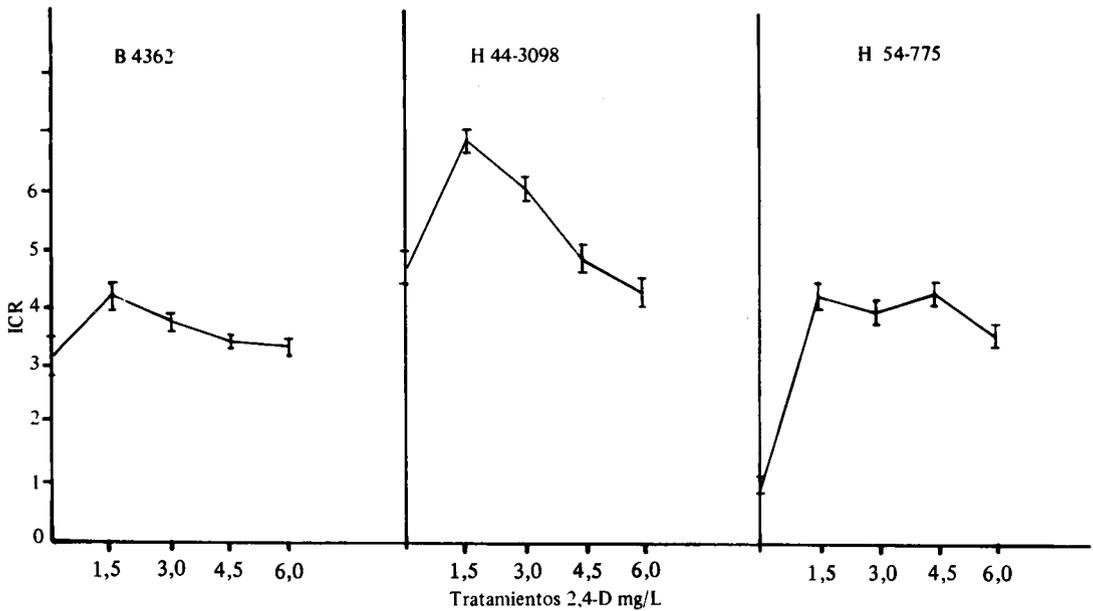


Fig. 2. Índice de crecimiento relativo (ICR) de los cultivares B 4362, H 44-3098 y H 54-775 como respuesta a los tratamientos con 2,4-D.

Cuadro 2. Desviación estándar y coeficiente de variación de cada tratamiento y cultivar.

Cultivar	Tratamientos 2,4-D mg/L									
	0		1,5		3,0		4,5		6,0	
	\sqrt{S}	CV%	\sqrt{S}	CV%	\sqrt{S}	CV%	\sqrt{S}	CV%	\sqrt{S}	CV%
B 4362	0,62	57,4	0,39	29,3	0,27	22,3	0,23	20,3	0,26	23,2
H 44-3098	0,73	50,7	0,34	16,8	0,28	15,4	0,40	26,5	0,45	33,1
H 54-775	0,21	43,7	0,33	24,6	0,38	29,7	0,36	26,5	0,44	37,3

de éstas últimas (Pech, 1978). Cualquiera de estos cuatro fenómenos podrían ser la explicación de la pérdida de peso de los callos que se observa en la Figura 2. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la pérdida de peso entre los tratamientos.

El análisis de varianza que se realizó a los datos de peso fresco final de los callos de cada cultivar (Cuadro 1) indica que el B 4362 no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. En el cultivar H 44-3098 no se encontró diferencias significativas entre 1,5 mg/L y 3,0 mg/L de 2,4-D, pero sí entre éstos y los demás tratamientos. El cultivar H 54-775 no dio diferencias significativas entre las dosis 2,4-D, únicamente entre los tratamientos con auxina y el testigo.

El coeficiente de variación y la desviación estándar (Cuadro 2) tendieron a disminuir a medida que aumentó la concentración de 2,4-D, en todos los cultivares.

Este fenómeno se puede atribuir a que en el tratamiento testigo el explante inicial posee células diferenciadas que expresan su potencialidad y continúan el crecimiento sin que se interrumpa este proceso por un factor externo, por lo que la respuesta organogénica se va a manifestar de acuerdo a la diversidad de tejidos presentes, lo que podría inducir un mayor coeficiente de variación y desviación estándar.

En el caso en que se suministra exógenamente un regulador de crecimiento, el proceso de diferenciación celular se bloquea para inducir

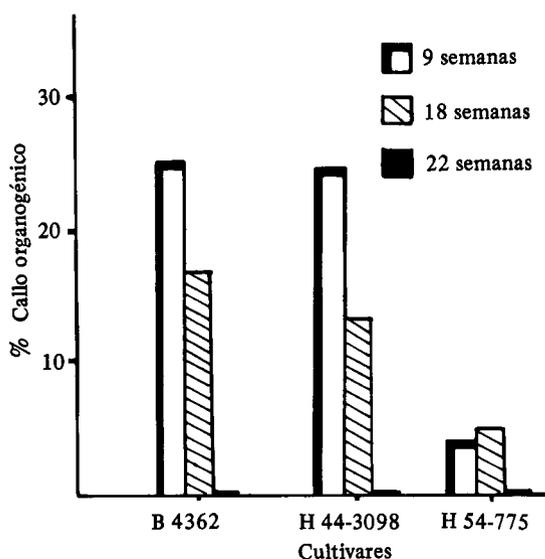


Fig. 3. Disminución del potencial morfogénico de los callos, al cabo de 22 semanas de iniciado el cultivo.

una dediferenciación de los tejidos y establecer la fase de callo, en la cual todas las células presentan un estado indiferenciado, lo que se refleja en un coeficiente de variación y desviación estándar bajos.

Diferenciación de callos

Para inducir la diferenciación de los callos, se sustituyó el 2,4-D por 1 mg/L de kinetina y en este medio se favoreció el desarrollo de plántulas de los cultivares H 44-3098 y B 4362, y se logró obtener un promedio de 20 plántulas por callo. Estas se cultivaron en el invernadero y luego en el campo; en estas fases el material presentó una adaptación fácil a las condiciones no estériles. En el caso del cultivar H 54-775 los callos que se diferenciaron, desarrollaron brotes albinos, que sufrieron una rápida oxidación, por lo que no se pudo obtener plántulas de este cultivar.

Los resultados de las evaluaciones de las plántulas obtenidas en este experimento se presentarán en Villalobos y Arias (1987).

Subcultivo de callos

Los callos que no se cultivaron en el medio para la diferenciación, fueron subcultivados en el medio con 2,4-D. A medida que se realizaron sub-

cultivos sucesivos del callo el potencial morfogénico de éste disminuyó, presentando a las 18 semanas una pérdida importante de la capacidad de regeneración (Figura 3) hasta llegar a 0% luego de 22 semanas de iniciado el cultivo.

Esta pérdida del potencial morfogénico se debe a lo que se considera un estado de habituación del material, que corresponde a una alteración de los requerimientos exógenos de reguladores de crecimiento (Bins, 1981; Meins, 1982). La causa de la habituación se atribuye a un cambio epigenético en la expresión de un gen que está normalmente inactivo (Meins, 1982). Este fenómeno es característico de varias especies cultivadas *in vitro*, pero en caña de azúcar es necesario estudios más profundos que permitan detectar y controlar la causa de éste.

Sin embargo para efectos de la aplicación de esta metodología se puede concluir que la mejor dosis de 2,4-D para la formación de callo es de 3 mg/L y que esta dosis puede mantenerse en la fase de subcultivo. Para obviar en esta fase el fenómeno de habituación es recomendable que en cada subcultivo de los callos, el 50% se transfiera a un medio para la diferenciación y el otro 50% del material se mantenga en el medio para la proliferación del mismo. Esta proporción permitiría detectar el inicio de la habituación y desechar en ese momento los callos habituados e iniciar de nuevo el cultivo de ápices. Si este procedimiento se lleva a cabo la proyección en cuanto a producción de callos puede estimarse a partir de 50 ápices, en 6.500 callos seis meses después de que se inicia el cultivo *in vitro*.

Estos datos demuestran que la metodología que se siguió en esta investigación permite la inducción y cultivo de un número importante de callos que pueden regenerar plántulas con posibilidades de ser genéticamente diferentes entre sí y por lo tanto podrían integrarse a un programa de evaluación y selección para fines de mejoramiento.

RESUMEN

Se cultivaron *in vitro* ápices de tres cultivares comerciales de caña de azúcar B 4362, H 44-3098 y H 54-775, en el medio de Murashige y Skoog suplementado con 0; 1,5; 3,0; 4,5 y 6,0 mg/L de 2,4-D para inducir la formación de callo. Al cabo de un mes se evaluó el tamaño, la organogénesis y el peso fresco de los callos obtenidos en

cada tratamiento. Los resultados indicaron que la dosis de 3 mg/L de 2,4-D produce el mejor callo.

Para la diferenciación del callo se sustituyó el 2,4-D por 1 mg/L de kinetina y se obtuvo plántulas que se llevaron al invernadero y luego al campo.

Los callos se subcultivaron a intervalos de un mes, en el medio con 3 mg/L de 2,4-D y presentaron al cabo de 22 semanas de cultivo pérdida de su capacidad de regeneración.

LITERATURA CITADA

- BARBA, R.; NICKELL, L. G. 1969. Nutrition and differentiation in tissue cultures of sugar cane a monocotyledon. *Planta* 89:299-302.
- BINS, A. N. 1981. Development variation in plant tissue culture. *Environmental and Experimental Botany* 21(3/4): 325-332.
- DIX, L.; VAN STADEN, J. 1982. Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1(4):239-242.
- GRESSHOFF, P. M. 1978. Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured *in vitro*. In *Phytohormones and related compounds-a comprehensive treatise*. Ed. by Letham, Goodwin and Higgins. Elsevier, North Holland, Biomedical Press. v. 2, p. 1-29.
- HEINZ, D.; MEE, G. W. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Science* 9:346-348.
- HENDRE, R. R.; IYER, R. S.; KOTWAL, M.; KHUSPE, S.S.; MASCARENHAS, A. F. 1983. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. *International Journal of Cane. Agriculture Issue* 1:5-8.
- HO, W. J.; VASIL, I. 1983. Somatic embryogenesis in sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) I. The morphology and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118:169-180.
- IRVINE, J. E.; FETCH, M.; MOORE, P. H. 1983. The induction of callus in sugarcane tissue cultures by selected chemicals. *Plant cell, tissue and organ culture* 2(2): 141-149.
- KRISHNAMURTI, M. 1977. Sugar cane improvement through tissue culture. *Plant Breedings. Proceedings of Congress of International Society of Sugar Cane Technologists* 16 (1):23-28.
- LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugar cane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2 (2):111-121.
- LEE, T. S.. 1984. Micropropagación de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. *Saccharum* 8(35):36-39.
- LIU, M. C. 1981. *In vitro* methods applied to sugar cane improvement. In *Plant tissue culture methods and application in agriculture*. Ed. by T. A. Thorpe. New York. Academic Press. p. 299-323.
- MEINS, F. Jr. 1982. The nature of the celular, heritable, change in citokinin habituation. In *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Ed. by E. Earle and I. Demarley. New York, Proeger Publishers. p. 202-210.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NICKELL, L. G. 1964. Tissue and cell cultures of sugar cane; another research tool. *Hawaiian Planter's Record* 57:223-229.
- PECH, J. C.; BALAGUE, C.; LATSHE, A. 1978. Senescence in plant cell culture. In *Plant growth substance*. Ed. by P. F. Wareing. London, Academic Press. p. 909-1028.
- SCOWCROFT, W. R. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization. *Rome. International Board for Plant Genetic Resources*. 41 p.
- THORPE, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro* structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology Supplement* IIA: 71-111.
- VAN STADEN, J.; OREWES, S. E. 1974. Identification of cell division inducing compounds from coconut milk. *Physiologia Plantarum* 32:347-352.
- VILLALOBOS, I.; ARIAS, O. 1987. Evaluación en el campo de plantas de caña de azúcar (*Saccharum* spp, cv. B 4362) obtenidas por cultivo *in vitro*. *Agronomía Costarricense* (en prensa).