

Nota Técnica

EVALUACION PRELIMINAR EN EL CAMPO DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp. cv. B 4362) OBTENIDAS POR CULTIVO *in vitro*¹ /*

Ilse Villalobos **

Oscar Arias **

ABSTRACT

Preliminary field evaluation of sugar cane (*Saccharum* spp. cv B 4362) plants obtained by *in vitro* culture. Plantlets of sugar cane from the susceptible rust cultivar B 4362 were differentiated beginning from the calluses cultivated *in vitro*, in a Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg/L of kinetina. The organogenesis was complete and obtained plantlets were placed in a greenhouse for their adaptation in non aseptic conditions and then taken to the field. Morphological variations and incidence of rust (*Puccinia* spp.) were evaluated in this step. The most frequent morphological changes were the internodes length and diameter, leaves width bud position respect to the growth ring and the auricle size. When the incidence of rust was evaluated just seven out of 22 plants showed reductions in the incidence percentage.

INTRODUCCION

Los cultivares comerciales de caña de azúcar son híbridos interespecíficos muy complejos, que poseen complementos cromosómicos de alta poliploidía y que se obtuvieron a partir de las cinco especies de *Saccharum*, gracias a muchos años de selección y mejoramiento utilizando los métodos convencionales.

Debido a la riqueza de germoplasma de la caña de azúcar, se ha logrado seleccionar cultivares para satisfacer las necesidades agrícolas e industriales en un amplio rango geográfico y en diversas condiciones ambientales. Sin embargo, la selección de estos materiales por medio de los métodos convencionales requiere de 10 a 15 años para producir un cultivar mejorado.

En los últimos años, varios programas de mejoramiento de caña de azúcar incluyeron el cultivo

de tejidos como un instrumento para la inducción de variabilidad mediante la producción *in vitro* de callos. Con esta técnica en este cultivo se manifiesta una alta frecuencia de variación producto del mosaico cromosómico, por lo que es posible en poco tiempo, obtener plántulas con características cromosómicas y morfológicas diferentes a las de la planta de donde se tomó el material de propagación (Krishnamurti, 1981; Liu, 1981).

Mediante el cultivo *in vitro* de células y tejidos de caña de azúcar, generalmente ocurren variaciones en pocas características fenotípicas y (o) genotípicas (Sreenivasan y Jalaja, 1983) ya que no se presenta recombinación genética como en el caso de un cruce sexual. Por lo tanto, esta técnica permite mejorar cultivares que poseen buenas características agronómicas pero que en el proceso de selección convencional deben eliminarse por la presencia de una o dos características desfavorables.

Los informes sobre la utilización de esta técnica indican que se ha logrado seleccionar subclones resistentes a enfermedades (Krishnamurti, 1981; Larkin y Scowcroft, 1981), tolerantes a la salinidad y de alta producción y contenido de sacarosa (Liu, 1981). También se mejoró la forma, el tamaño y la apariencia de la hoja, el porte de la planta y el diámetro de los tallos (Irvine, 1984;

1/ Recibido para publicación el 3 de diciembre de 1986.

* Parte de la tesis de Licenciatura en Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, de la primera autora.

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

Sreenivasan y Jalaja, 1983). Otras investigaciones mencionan mejoramiento en la brotadura, floración, porcentaje de fibra y otros (Krishnamurti, 1981).

El propósito de esta investigación fue evaluar algunas características morfológicas y la incidencia de la roya (*Puccinia* spp.) en las plantas regeneradas por cultivo *in vitro* de callos del cultivar B 4362, en comparación con plantas propagadas por el método convencional.

MATERIALES Y METODOS

Para la inducción de callos se aplicó la metodología establecida por Villalobos y Arias (1987); en el cultivar B 4362, de buenas características agronómicas pero susceptible a la roya.

Una vez que se desarrollaron los callos se dividieron y subcultivaron cuatro veces a intervalos de un mes para tratar de inducir variabilidad.

En la fase de diferenciación del callo se usó el medio de Murashige y Skoog, (1962) suplementado con 10 % (v/v) de agua de coco, 0,4 g/L de caseína y 1 mg/L de kinetina. El pH se ajustó a 5,7, el medio se solidificó con 8 g/L de agar y se autoclavó a 1,5 kg/cm² y 121 °C durante 15 minutos.

Cuando las plántulas alcanzaron aproximadamente 10 cm de altura se transfirieron al invernadero y se cultivaron en una mezcla de arena y vermiculita (2:1) estéril. Una vez por semana se aplicó solución Hoagland hasta que las plantas alcanzaron una altura de 20 cm. Finalmente se tomó una muestra de 30 plantas y se llevó al campo.

La etapa de campo se realizó en la finca del Departamento de Investigaciones y Extensión de la Caña de Azúcar ubicada en Santa Gertrudis de Grecia, provincia de Alajuela.

Las plantas se mantuvieron una semana en un invernadero abierto para que se adaptaran a las condiciones de la zona y, posteriormente, se sembraron en el campo. Al cabo de seis meses se realizó la evaluación de la incidencia de la roya *Puccinia* spp., mediante una escala visual utilizada por IIA/PLANALSUCAR en Brasil (1977). Luego de 10 meses de cultivo se evaluaron las siguientes características morfológicas, comparándolas con las del cultivar B 4362 propagado convencionalmente: apariencia general (porte, color y despaje); hoja (forma, color y ancho); vaina (pubescencia, color externo e interno y tamaño de la aurícula); entrenudo (forma, color, depresión, anillo ceroso, estrías y diámetro); nudo (anillo de crecimiento,

punto de germinación, alas y pubescencia). Todos los datos se expresaron en relación porcentual. No se realizó análisis estadístico por tratarse de una evaluación preliminar.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 1 resume los resultados obtenidos desde la fase de diferenciación de callos *in vitro*, hasta el cultivo de los materiales en el campo. Se observa como el callo se diferenció; posteriormente las plántulas se desarrollaron en el invernadero, para luego crecer en el campo, con el manejo agronómico tradicional para caña de azúcar. En general, se encontró que las plántulas de caña de azúcar obtenidas por cultivo *in vitro* se adaptaron con facilidad a las condiciones no asépticas siempre que existiera buen drenaje, lo que demuestra que son muy rústicas y soportan bien el cambio de condiciones ambientales.

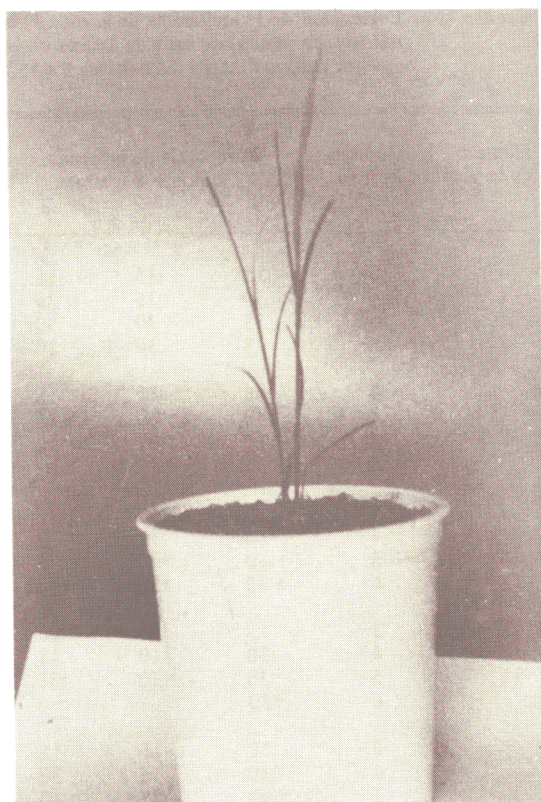
Al cabo de seis meses en el campo se evaluó la incidencia de la roya, comparando las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* con las plantas originales del cultivar B 4362, susceptible a este patógeno, que sirvieron como testigo. Este testigo presentó en las hojas evaluadas de tres tallos de la planta, más del 30 % de incidencia. Se encontró (Cuadro 1) que de los materiales derivados *in vitro* del cultivar B 4362 solamente las plantas número 1, 12, 14, 16, 20, 21 y 22 presentaron en las hojas 3 y 4 un 15 % y 30 % de incidencia, respectivamente. Las hojas 5 y 6 mostraron una incidencia mayor al 30 %. Las restantes 15 plantas presentaron en todas sus hojas un 30 % o más de incidencia del patógeno, similar a lo que se encontró en el testigo.

Las reducciones que se encontraron en el porcentaje de incidencia de la roya fueron pocas, concentradas principalmente en las hojas 3 y 4 que son las más jóvenes, lo que indica poca variación con respecto a la susceptibilidad al patógeno. Sin embargo, estos materiales pueden ser sometidos a un nuevo ciclo de cultivo *in vitro* para tratar de inducir mayor tolerancia.

La otra variable que se evaluó fue el cambio en las características morfológicas de los materiales. Es importante mencionar que se usó este tipo de evaluación cualitativa, ya que en la caña de azúcar el conteo de cromosomas y la detección de variaciones en la estructura de estos es muy laboriosa debido a su gran número y tamaño reducido. Para los fines de esta investigación se consideró que las



A



B



C



D

Fig. 1. A. Diferenciación del callo.
B. Planta en la fase de invernadero lista para llevar al campo.
C. Plantas con cuatro semanas del transplante al campo.
D. Parcela de plantas obtenidas del cultivar B 4362 por cultivo *in vitro*, al cabo de 24 semanas del transplante al campo.

Cuadro 1. Evaluación de la incidencia de la roya *Puccinia* spp. en plantas de caña de azúcar obtenidas por cultivo *in vitro* del cultivar B 4362.

Número de la planta	Número de hoja	Porcentaje de infección número de tallos		
		1	2	3
1	3	15	15	15
	4	30	15	30
	5	15	30	30
	6	15	30	30
12	3	15	15	15
	4	30	30	15
	5	30	+ 30	30
	6	30	+ 30	+ 30
14	3	15	15	15
	4	30	30	30
	5	+ 30	+30	+30
	6	+ 30	+30	+30
16	3	15	15	30
	4	30	30	15
	5	30	+30	+30
	6	+30	--	--
20	3	30	15	15
	4	30	15	30
	5	+ 30	15	30
	6	+ 30	--	+ 30
21	3	15	15	15
	4	30	30	30
	5	+ 30	--	+30
	6	+ 30	--	+30
22	3	30	15	15
	4	30	15	30
	5	+ 30	+30	+30
	6	+ 30	--	--

variaciones fenotípicas son indicativas del potencial de variabilidad que presenta el cultivar B 4362.

En el Cuadro 2 se observan las características que presentaron mayor frecuencia de variación y el porcentaje de plantas que sufrieron cambios en la morfología. Se encontró que el ancho de la hoja, la pubescencia de la vaina, el tamaño de las aurículas y el diámetro del tallo fueron las características que variaron en más del 60 % de las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro*. Las características como porte, largo de los entrenudos y posición de la yema con respecto al anillo de crecimiento, presentaron menos del 50 % de variación.

Cuadro 2. Evaluación de algunas características morfológicas de plantas de caña de azúcar, cultivar B 4362 obtenidas del cultivo de callos en comparación con el cultivar original *.

Características morfológicas	Porcentaje de plantas diferentes a B 4362	Porcentaje de plantas similares a B 4362
Porte	40,9	59,1
Ancho de la hoja	68,2	31,8
Pubescencia de la vaina	63,6	36,4
Tamaño de las aurículas	68,0	32,0
Posición de la yema	54,5	45,5
Largo de los entrenudos	13,6	86,4
Diámetro del tallo	63,6	36,4

* Muestra evaluada: 22 plantas.

En la Figura 2 se observaron los casos más evidentes en que se encontró diferencias morfológicas con el cultivar B 4362.

Los resultados sugieren que es posible obtener cambios en la morfología de los cultivares que presentan características fenotípicas limitantes en la selección y que podrían corregirse con la aplicación de la técnica del cultivo *in vitro*, tal y como se realizó en los cultivares Co 7704 (Sreenivasan y Jalaja, 1983) y en los cultivares H 68-56, CP 63-357, CP 76-366, NCO 310 y CP 55-30 (Irvine, 1984).

La variación en las características morfológicas obtenidas en esta investigación son concordantes con las obtenidas por otros investigadores en caña de azúcar (Frias *et al.*, 1975; Irvine, 1984; Scowcroft y Larkin, 1982; Heinz y Mee, 1971) quienes informan haber obtenido una alta frecuencia de variación en las características morfológicas del tallo y las hojas.

Estas variaciones son atribuidas principalmente a las características intrínsecas de la caña que se modifica fácilmente cuando se cultiva *in vitro* y al efecto de los reguladores de crecimiento en el medio, particularmente el 2,4-D. Este compuesto ha sido señalado como mutagénico cuando se

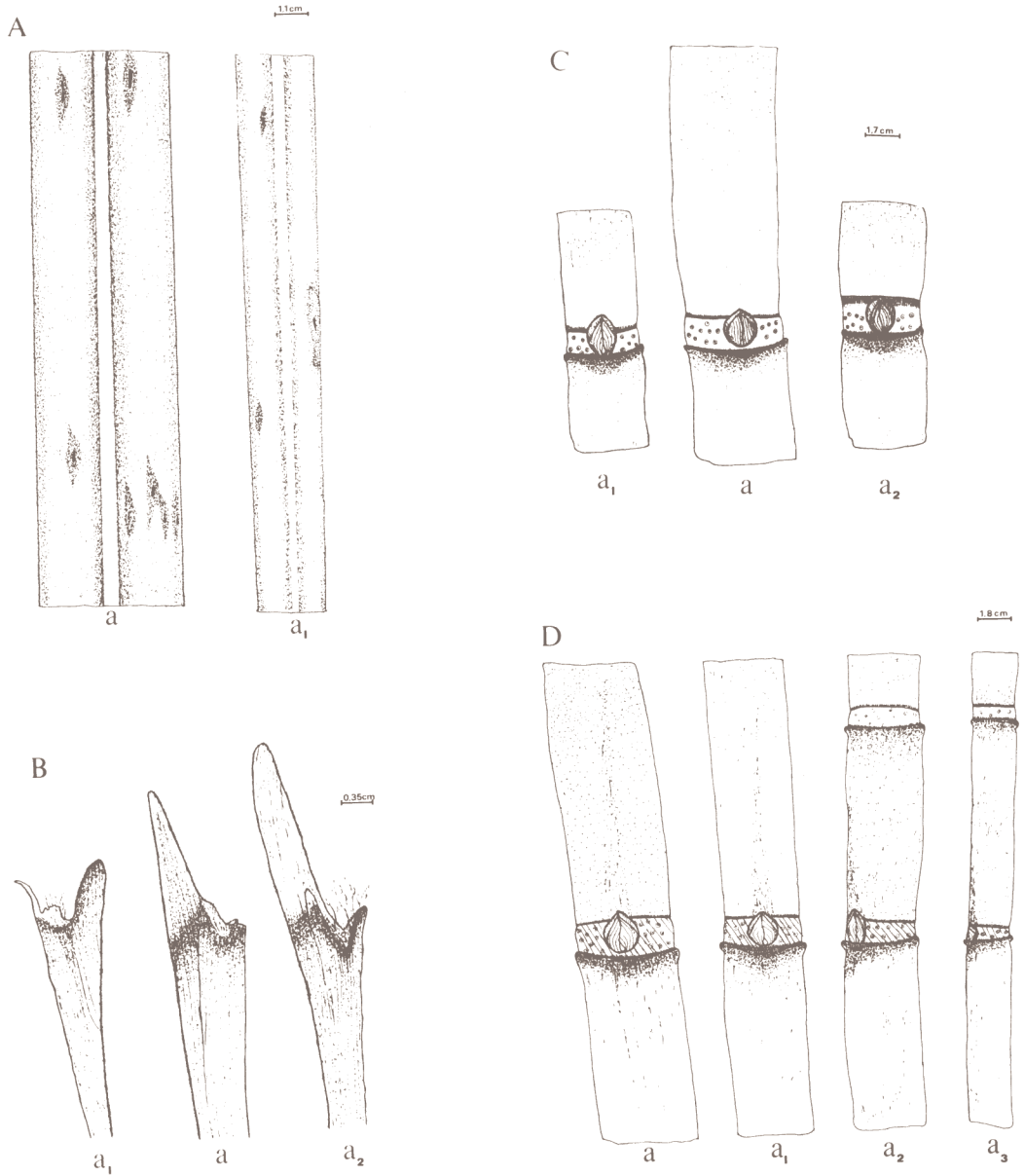


Fig. 2. A. Variación en el ancho de las hojas.
 B. Variación en el tamaño de la aurícula.
 C. Diferencia en la posición de la yema con respecto al anillo de crecimiento.
 D. Cambios en el largo y diámetro de los entrenudos.

(a) cultivar B 4362 y (a₁, a₂,...) materiales derivados del B 4362 por cultivo *in vitro*.

usa como agente inductor de callo (Bayliss, 1980; Irvine *et al.*, 1983; Yeoman y Forche, 1980).

En conclusión, los resultados de esta investigación indican dos aspectos sobresalientes que ameritan un seguimiento futuro de las plantas obtenidas: el primero es la aparente tolerancia a la roya observada en algunas de las plantas obtenidas y en segundo término la variación en las características morfológicas que se evaluaron 10 meses después de la siembra definitiva en el campo y que muy probablemente no estén influidas por cambios epigenéticos de carácter temporal. Ambos fenómenos, puestos en evidencia en esta investigación, demuestran que el cultivar B 4362 podría, muy probablemente, mejorarse en algunas de sus características agronómicas mediante el uso de las técnicas del cultivo de tejidos.

Finalmente, conviene señalar que con los datos acumulados en esta investigación se estima que se podrían obtener 200.000 plantas, cinco meses después de que se inicia el cultivo *in vitro*, todas con posibilidades de ser diferentes al cultivar que se usó como material de propagación.

RESUMEN

Se diferenciaron plántulas de caña de azúcar del cultivar B 4362 susceptible a la roya, a partir de callos cultivados *in vitro*, en un medio de Murashige y Skoog suplementado con 1 mg/L de kinitina. La organogénesis fue completa y se obtuvieron plántulas, que se llevaron al invernadero para su adaptación a condiciones no asépticas y luego al campo. En esta fase se evaluaron en forma semicuantitativa dos variables: las variaciones morfológicas y la incidencia de la roya (*Puccinia* spp.). Los cambios morfológicos más frecuentes fueron el diámetro y el largo de los entrenudos, el ancho de las hojas, la posición de la yema con respecto al anillo de crecimiento y el tamaño de las aurículas. De 22 plantas, sólo siete presentaron reducciones en el porcentaje de incidencia de la roya.

LITERATURA CITADA

- BAYLISS, M.W. 1980. Chromosomal variation in plant tissue culture. International Review of Cytology, Supplement 11a:113-144.
- FRIAS, A.M.; ANTONY, H.J.; LOZZIA, M.E. 1975. Estudios sobre variabilidad genética de isoperoxidadas y caracteres morfológicos en subclones de caña de azúcar obtenidos mediante cultivo *in vitro*. Revista Agronomía del Noreste de Argentina 7 (1-2):79-85.
- HEINZ, D.J. y MEE, G.W. 1971. Morphological, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus culture. American Journal of Botany 58(3):257-262.
- INSTITUTO DO ACUCAR E DO ALCOHOL-PLANAL-SUCAR. 1977. Tesis de variedades brasileiras ou cultivadas no Brasil quanto a resistencia a ferrugem (*Puccinia melanocephala*) Brasil. Anexo 1. s.p.
- IRVINE, J.E.; FITCH, M.; MOORE, P.H. 1983. The induction of callus in sugar cane tissue cultures by selected chemicals. Plant cell Tissue and Organ Culture 2(2):141-149.
- IRVINE, J.E. 1984. The frequency of marker changes in sugar cane plants regenerated from callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 3(3):201-209.
- KRISHNAMURTHI, M. 1981. Sugar cane improvement through tissue culture and review of progress. In Symposium on tissue culture of economically important plants, Ed. by A.N. Rao. Singapore. p. 70-77.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetic 60:197-214.
- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- SCOWCROFT, W.R.; LARKIN, P.J. 1982. Somaclonal variation; a new option for plant improvement. In. Plant improvement and somatic cell genetic. Ed. by I.K. Vasil. New York, Academic Press. p. 159-178.
- SREENIVASAN; JALAPA, N. 1983. Sugar cane varietal improvement through tissue culture. In Plant cell culture in crop improvement. Ed. by S.K. Sen and K.L. Giles. New York, Plenum Press. p.371-376.
- VILLALOBOS, I.; ARIAS, O. 1987. Inducción y multiplicación de callos *in vitro* en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Agronomía Costarricense 11(1):39-44.
- YEOMAN, M.M.; FORCHE, E. 1980. Cell proliferation and growth in callus cultures. International Review of Cytology, Supplement 11A: 1-24.