

# CARACTERIZACIÓN MOLFOLÓGICA Y TEST DE REGENERACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE CALLOS OBTENIDOS DEL CULTIVAR RB 92 579 DE CANA DE AZÚCAR

Leticia Rios Vieira<sup>1</sup>, Amanda Moreira Lopes<sup>1</sup>, Lourdes Yabor Cabrera<sup>2</sup>, Fabricio José Pereira<sup>3</sup>, Luciano Coutinho Silva<sup>4</sup>, Antônio Chalfun Júnior<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Setor de Fisiologia Vegetal, Lavras, Brasil.
2. Universidad de Ciego de Avila (UNICA) Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba.
3. Universidade Federal de Lavras, Setor de Botânica Estrutural, Lavras, Brasil.
4. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I - João Pessoa, Brasil.

## INTRODUCCION

A nivel mundial, Brasil se considera el segundo mayor productor de etanol y produce más del 40% de azúcar. La variedad RB92579 entre sus características se destaca la buena recuperación fisiológica a largos períodos de sequía y la eficiencia e el uso del agua y los nutrientes. Por otra parte es apreciable su contenido de sacarosa, la baja floración y la resistencia a patógenos (DAROS et al., 2010).

La disponibilidad y aumento de la productividad de las especies de interés alimenticio tienen correspondencia con el crecimiento de la población (CARVALHO FILHO, 1995). Basado en esta perspectiva es que la caña de azúcar se considera dentro de los cultivos que se maneja su mejoramiento para elevar la productividad por área plantada (DAROS et al., 2010). Actualmente la mayoría de las variedades cultivadas son el resultado de mejoramiento genético a partir de los cruzamientos controlados. El mejoramiento convencional ha contribuido a la solución de parte de algunos problemas. Sin embargo, factores como el limitado conocimiento de la variabilidad del germoplasma existente y el tiempo para la obtención-selección de variedades por la vía de la hibridación tradicional, han permitido que se considere la ingeniería genética como una herramienta para el mejoramiento vegetal de este cultivo (CARVALHO & FURTADO, 2013).

La efectividad de los métodos de transformación genética dependen de un protocolo eficiente de regeneración de plantas a partir del cultivo de tejidos de la especie a mejorar (STUDART-GUIMARÃES, LACORTE E BRASILEIRO, 2003). Por lo que la selección del material a transformar y su posterior regeneración constituyen elementos básicos para la inserción y expresión del transgen. Por lo que se considera como objetivo de este trabajo es el establecimiento de un protocolo eficiente para el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar con potencial regenerativo que garantice la transformación genética de esta variedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del material y condiciones de Cultivo

La variedad de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) utilizada fue la RB 92579 la cual fue aportada por la BASF-The Chemical Company. Las hojas inmaduras, llamadas palmito, se usaron como explantes. En cámara de flujo laminar se sumergieron en alcohol al 70% durante un minuto y posteriormente se pasaron a hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos. El enjuague se realizó tres veces con agua destilada estéril.

Para la inducción de callos fue utilizado el medio basal MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), enriquecido con 3% de sacarosa, 2.3 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma), 100 mg L<sup>-1</sup> Polivinilpirrolidona (PVP), y 3,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, según lo informado para la inducción de callos (VAN DER VYVER et al., 2013). El pH se ajustó a 5.8. Los explantes de 1cm de diámetro y 2mm de espesura se cultivaron individualmente en tubos que contenían este medio de inducción. Se mantuvieron en

condiciones de oscuridad a una temperatura de 25°C, durante 30 días. Se realizaron cuatro subcultivos (R1, R2, R3, R4).

Para la regeneración de los callos fue utilizado el mismo medio de cultivo MS, libre de auxina. Se mantuvieron en una sala de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas/luz a una temperatura de 25°C. La capacidad de respuesta regenerativa de los callos se evaluó teniendo en cuenta los tres tipos de callos obtenidos en los diferentes subcultivos (R1, R2, R3, R4). y se colocaron en placas con medio de regeneración donde se evaluó el porcentaje de callos con brotes a los 15 días.

De cada subcultivo, también se tomaron muestras en tres tiempos: antes de subcultivar los callos y exponerlos a la luz para su regeneración, a los 7 y los 15 días de subcultivo. Para los estudios histológicos las muestras fueron fijadas en FAA (formaldeído, ácido acético y alcohol al 70%) y posteriormente se mantuvieron en etanol al 70% para su estudio. Las imágenes de los cortes histológicos fueron realizadas por cámara acoplada a microscopio OLYMPUS.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El protocolo de desinfección resultó ser eficiente para la variedad RB 92 579, así como el medio de cultivo utilizado donde se formó el 100% de los callos. Se aprecia de forma visual que se formaron tres tipos de callos, que anatómicamente son diferentes y que dos de ellos tienen alto potencial de regeneración. Esto conduce a que se seleccione el mejor callo para la transformación genética de la caña de azúcar.

La eficiencia del protocolo de desinfección está referida a la contaminación fúngica que fue menor del 3 % y la bacteriana de un 33.3% de un total de 150 explantes. La contaminación bacteriana fue propiamente de las réplicas de un solo palmito lo que sugiere que esta bacteria sea endógena (ESPOSITO-POLESI, 2011).

### Caracterización Morfológica de los Callos

Se identificaron tres tipos de callos: callos blanco nodular compacto (BN), callo traslúcido friable (TF) y callo mucilaginoso (M). Los callos BN (figura 1A) se visualiza un aspecto seco, opaco, con estructuras celulares en forma de nódulos, bien compacto y se logra el fácil desprendimiento. El callo TF (figura 1B) tiene un aspecto seco, brillante, y friable. El callo tipo M (figura 1C) tiene un color cenizo, con aspecto mojado y viscoso. Estas descripciones visuales coinciden con lo informado por otros autores (DIBAX et al, 2013; SOARES et al., 2014), pero ellos si refieren a la formación de estructuras embriónicas las cuales no fueron apreciadas en este estudio.



Figura 1: Tipos de callos identificados en la variedad RB92579 de caña de azúcar: A- callo blanco nodular compacto (BN); B- traslucido friable (TF); C- mucilaginoso (M)

### Potencial Regenerativo de los diferentes tipos de callos

En cada subcultivo (R1, R2, R3, R4) se separaron los callos con la finalidad de obtener 10 eventos de regeneración de cada tipo de callo. Hasta el final de R1, no estaban lo suficientemente diferenciados para poder hacer la separación de cada tipo de callo. A los 84

días los callos que fueron expuestos a la luz formaron brotes en el 100% de los eventos de regeneración en BN y TF. A los 112 días el 30% de los eventos en BN y 25% en TF se obtuvieron brotes. Mientras que a los 140 días no hubo regeneración. Los callos de tipo M no mostraron regeneración de brotes en los tiempos evaluados y esto coincide con lo referido por Alcantara et al., 2014.

### Análisis Anatómico de los Callos

La figura 2 muestra el análisis histológico realizado a los diferentes tipos de callos (BN, TF y M) y se aprecia el diferenciación de los tejidos y células que hay en ellos. Los callos subcultivados en medio de regeneración muestran una conexión directa del brote con la masa callogénica.

O En los callos de tipo BN (figura 2A) se aprecia la estructura globular donde su base se conecta con el xilema del explante. Las células de esa conexión son alargadas y tienen la función de transferir los nutrientes (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & HAYASHI, 2004). Los bordes muestran una protodermis bien definidas con células tabulares. En el centro del callo existen células meristemáticas que tienen un núcleo bien grande en relación al citoplasma, que tienen un alto potencial de división. La región del procambio está encima de la región meristemática formando un aglomerado de células que indica una gran proliferación celular. La protodermis se define claramente por encima del procambio, delimitando la parte superior de este tipo de callo.

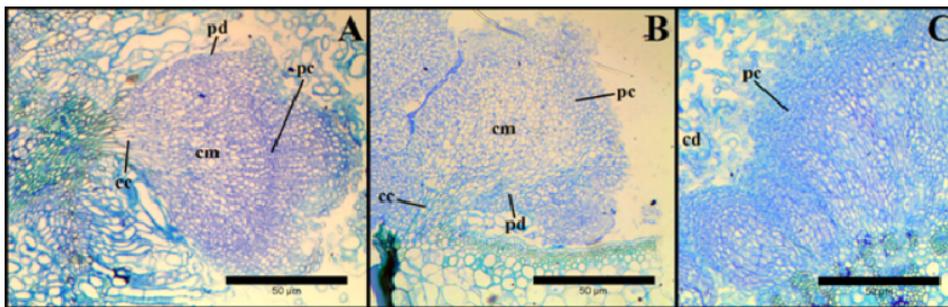


Figura 2: Diferenciación anatómica de los callos de tipo BN (A), TF (B) e M (C) de la variedad RB92579 de caña-de-azúcar. Leyenda: cc= células de conexión, pd= protodermis, cm= células meristemáticas, pc= procambio, cd= células dispersas.

Los callos tipo TF (figura 2B) también tienen un formato globular pero la protodermis no está bien organizada. La conexión es directa con la epidermis del explante. Las células de esta conexión son alargadas como en BN, pero son pequeñas. En el centro del callo se aprecian células con núcleos menores en relación a BN, por eso su potencial meristemático es menor. En la parte superior del callo existe el procambio pero con una menor aglomeración de células.

En la figura 2C se muestra la estructura de los callos tipo M. La forma es ovalada con unidades muy próximas que definen un aspecto mucilaginoso de este callo. Esta característica de cercanía de las estructuras unida a la falta de protodermis incide en que ellas no tengan una estructura delimitada. Su conexión es directa con la epidermis del explante pero no existen células alargadas lo que dificulta la nutrición del callo. Las células de la parte central del callo son ovaladas, con citoplasma grande y núcleo poco visible, lo que no se considera como células meristemáticas. En la parte apical se visualiza el procambio con células que tienen núcleo bien visible, ellas no quedan conectadas, sino que se dispensan.

El origen organogénico de los callos pueden ser comprobados por diferentes evidencias: (i) existencia de puntos meristemáticos en el interior de la masa callogénica, (ii) presencia de células del cuerpo, de la túnica, del procambio y del meristemos fundamental (figura 3), típico

de meristemas apicales (SAJO & CASTRO, 2004); (iii) después de la exposición de la luz hubo el inicio de la formación del primordio foliar con la protodermis y el meristemo fundamental todo envuelto por la masa callogénica.

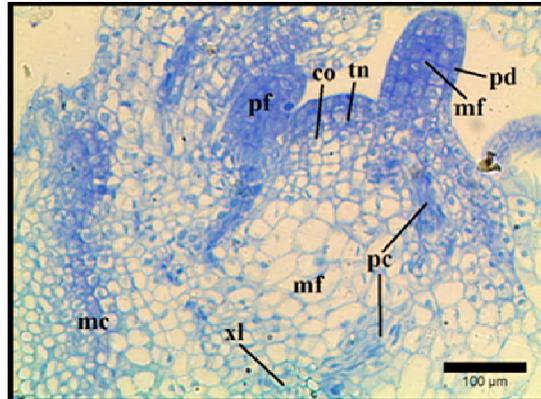


Figura 3: Corte anatómico de brotes formado a partir de callo organogénico de la variedad RB92579 de caña-de-azúcar. Leyenda: mc= masa callogénica, xl= xilema del explante, mf = meristemo fundamental, pf= primórdio foliar alterno, co= células del cuerpo, tn= células de la túnica, pd= protodermis.

El meristemo apical tiene una conexión con el xilema del callo a través del procambio. Esta evidencia comprueba que el primordio foliar utiliza las reservas nutricionales del callo para su desarrollo. No se observa ningún vestigio del meristemo apical radicular o la cofia en la parte inferior del primordio (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & HAYASHI, 2004). Como no se observan estructuras de lo sistema radicular en los brotes esto nos habla a favor de que no hay embriones. Por otra parte no existe ningún indicio de alguno de los estados de desarrollo embrionario, como proembrión, suspensor, estado de corazón o torpedo que posibilitarían la existencia de un embrión maduro (MARIATH, SANTOS e BITTENCOURT JR, 2004).

## CONCLUSIONES

Los protocolos de desinfección y formación de callos utilizados fueron eficientes para la variedad RB 92579 de caña de azúcar. Se obtuvieron callos con diferencias morfológicas y anatómicas a partir de hojas inmaduras de caña de azúcar de la variedad RB92579. El mejor tiempo para la regeneración de los callos BN y TF en el medio MS sin reguladores del crecimiento fue a los 84 días después de la inoculación. Se demostró que los callos BN y TF tienen origen organogénico y no mostraron indicios de la formación de embriones en este protocolo seguido.

## REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G.B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R.A ; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E. [Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane \(\*Saccharum spp.\*\) cultivars RB855156 and RB72454](#). Acta Scientiarum. Agronomy, v.36, n. 1, p. 63-72, 2014.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. e HAYASHI, A. H. Anatomia dos Órgãos Vegetais: Raiz. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. E; CARMELO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa-UFV, 2004.

CARVALHO FILHO, J. J. **A produção de alimentos e o problema da segurança alimentar**. *Estud. av.* v. 9, n. 24, p. 173-193. ISSN 0103-4014. 1995,

CARVALHO, S. A. D. & FURTADO, A. T.. **O melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais**. Gestão & Conexões - Management and Connections Journal, Vitória, v. 2, n. 1, p. 22-46, 2013.

DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; ZAMBON, J. L. C.; BESPALHOK FILHO, J. C. **Catálogo Nacional De Variedades RB**. Curitiba: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, 2010. 136 p.

DIBAX, R.; ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; OLIVEIRA, R. A. **.Protocol optimization and histological analysis of in vitro plant regeneration of 'RB92579' and 'RB93509' sugarcane cultivars**. Ciência Rural, v. 43, n. 1, 2013.

ESPOSITO-POLESI, N. P. **Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas**. R. bras. Bioci., Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR, N. S. Anatomia dos Órgãos Reprodutivos: Flor. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. E CARMELO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa- UFV, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. **A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures**. Plant Physiol, v. 15, p. 473-479, 1962.

SAJO, M. G. e CASTRO, N. M. Anatomia dos Órgãos Vegetais: Caule. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. E CARMELO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa- UFV, 2004.

SOARES, R. R.; FERREIRA, E. M.; GAMARANO, C. M., RIBEIRO, C. R.; SABINO, M. V.; PEREIRA, M. H. B. **The use of histological analysis for the detection of somatic embryos in sugarcane**. Afr. J. Biotechnol. v. 13, n. 6, p. 762-767, 2014.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. **Transformação genética em espécies florestais**. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.

VAN DER VYVER, C.; CONRADIE, T.; KOSSMANN, J.; LLOYD, J. **In vitro selection of transgenic sugarcane callus utilizing a plant gene encoding a mutant form of acetolactate synthase**. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant, v. 49, p. 198–206, 2013.

