

# Estabilidad genética in vitro en cultivares de caña de azúcar<sup>1,2</sup>

Asia Yusely Zambrano<sup>3</sup>, Jhonny R. Demey<sup>4</sup> y V. González R.<sup>3</sup>

J. Agric. Univ. P.R. 85(1-2):49-61 (2001)

## RESUMEN

Se evaluó la estabilidad y uniformidad de los genotipos de plantas de campo de cultivares de caña de azúcar después de haber pasado por condiciones in vitro (callos y suspensiones celulares), a través del análisis isoenzimático de peroxidasa en plántulas regeneradas. Los fenotipos de las plantas de campo exhibieron uniformidad para cada cultivar y diferencias entre los distintos cultivares. La distribución de las isoenzimas de PRX en la constitución de los fenotipos de callos mostró diferencias entre cultivares así como dentro del mismo cultivar. El genotipo PR980 alcanzó un coeficiente de heterogeneidad de 60%. Para los callos de los cultivares PR62258, PR641791, PR692176, V58-4, V64-10 y V71-51 no mostró variación, señalándose un coeficiente de identidad de 100%. El patrón isoenzimático de PRX para la conformación de los fenotipos de las suspensiones celulares fue diferente en los cuatro cultivares usados, así como también dentro de los cultivares PR980 y V64-10, los cuales exhibieron coeficientes de heterogeneidad de 50 y 22%, respectivamente. Sin embargo, los regenerantes exhibieron un coeficiente de identidad del 100%. La isoenzima PRX1 está relacionada a tejido diferenciado en caña de azúcar ya que sólo está presente en los fenotipos de plantas de campo y regenerantes. PRX4 es inducida bajo condiciones de cultivo in vitro, visualizándose exclusivamente en tejido calloso y suspensiones celulares. Este estudio detectó, en todos los cultivares de caña de azúcar usados, una alta uniformidad y estabilidad genética entre las plántulas regeneradas.

## ABSTRACT

### In vitro genetic variability of sugarcane cultivars

Genotypic stability and uniformity of field plants from sugarcane cultivars grown in vitro (calli and cell suspensions) were evaluated by isoenzymatic peroxidase analysis after regeneration. Phenotypes of field plants exhibited uniformity within cultivars and differences among cultivars. Distribution of PRX isoenzymes was different in the constitution of the calli phenotypes, not only among cultivars but also within the same cultivar.

<sup>1</sup>Manuscrito sometido a la junta editorial el 12 de enero de 1998.

<sup>2</sup>Trabajo financiado por el Departamento de Biotecnología del CENIAP-FONAIAP; FUNDACITE ARAGUA, Proyecto PCBT0002 y Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

<sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. CENIAP-FONAIAP. Apdo. 4521. Maracay, 2101. Venezuela. e-mail:azambra@reacciun.ve.

<sup>4</sup>Facultad de Agronomía, UCV. Apdo. 2392. Maracay, 2101. Venezuela. e-mail: jdemey@reacciun.ve.

Genotype PR980 showed a 60% heterogeneity coefficient, whereas the calli of cultivars PR62258, PR641791, PR692176, V64-10 and V71-51 showed identity coefficient of 100%. The isoenzymatic pattern of PRX for the phenotypes of cell suspensions was different among the four cultivars used, as well as within cultivars PR980 and V64-10, all of which showed heterogeneity coefficients of 50 and 22%, respectively. Nevertheless, the identity coefficient for regenerated plants of all genotypes was 100%. In sugarcane, the isoenzyme PRX1 is related to differentiated tissue, since it is present only in phenotypes from field and regenerated plants. PRX4 is induced in vitro conditions since it was observed only in callus tissue and cell suspensions. This study detected high uniformity and genetic stability within the regenerated plants in 100% of the sugarcane cultivars used.

**Key words:** *Saccharum* spp, genetic stability, calli, cell suspensions, peroxidase

### INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas a partir de callos, suspensiones celulares, y protoplastos ha establecido las bases de la manipulación genética in vitro de la caña de azúcar (Ho y Vasil, 1983 a, b; Srinivasan y Vasil, 1986; Chen et al., 1988; Faheem et al., 1996). El cultivo de callos y suspensiones celulares se ha usado ampliamente en programas de mejoramiento ya que, además de permitir aplicar metodologías de selección en un mayor número de individuos, se puede hacer en menores superficies y con mejor control de las condiciones ambientales que en un proceso tradicional de mejoramiento. Un resultado del uso de esta metodología es la generación frecuente de un número de variantes somaclonales superior al esperado en un proceso regular de propagación clonal.

Sin embargo, aunque la generación de estos variantes en cultivo de callos y suspensiones celulares está bien sustentada, existen numerosas evidencias en gramíneas de que los regenerantes originados de embriones somáticos exhiben poca o ninguna variación (Swedlund y Vasil, 1985; Morrish et al., 1990; Salet et al., 1990; Shimron-Abarbanell y Breiman, 1991; Shenoy y Vasil, 1992; Chowdhury y Vasil, 1993; Mangolin et al., 1994).

Existen dos herramientas muy utilizadas para la detección y estudio de la estabilidad y uniformidad de los genotipos de plantas y de la evaluación del cultivo in vitro de tejidos vegetales. La primera evalúa directamente la estructura del gen a través del estudio del ADN, la segunda evalúa indirectamente al gen al evaluar su función a través del estudio de las proteínas específicas o enzimas, constituyendo éste el método más comúnmente empleado por su rapidez y economía. La electroforesis de proteínas específicas es un método comúnmente empleado para establecer la estabilidad y uniformidad de los genotipos de plantas y es a su vez una herramienta eficaz en la evaluación del cultivo in vitro de tejidos vegetales (Mangolin et al., 1994). En caña de azúcar es de gran utilidad el uso del establecimiento de los patrones isoenzimáticos

de peroxidasa. La distribución de las isoenzimas en los patrones establecidos permite la conformación de los fenotipos de los tejidos bajo estudio (Mangolin et al., 1994).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar y comparar la estabilidad y uniformidad de los regenerantes de cultivares de caña de azúcar después de haber pasado por condiciones *in vitro*, callos y suspensiones celulares, a través del análisis isoenzimático de peroxidasa (PRX; EC.1.11.1.7).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se utilizaron los cultivares de caña de azúcar PR980, PR62258, PR641791, PR692176, V58-4, V71-51, y V64-10 para determinar la estabilidad y uniformidad de los genotipos en plantas de campo, callos, y sus regenerantes. Además, en los cultivares PR980, PR62258, V71-51 y V64-10, se evaluaron la estabilidad y uniformidad de suspensiones celulares y los regenerantes de los cultivares, seleccionados. Estos cultivares son de gran interés en los proyectos de generación de variabilidad y selección *in vitro* de líneas celulares sometidas a condiciones bióticas o abióticas limitantes. El material vegetal se tomó de plantas de dos meses de edad provenientes del Campo Experimental del CENIAP-Maracay, Venezuela.

### *Establecimiento del tejido calloso*

La desinfección del material vegetal proveniente del campo y la extracción e implantación de los explantes se realizó según metodología descrita por Zambrano et al. (1995). Los explantes se implantaron en medio sólido de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado por Liu (1984), constituido por las sales minerales MS suplementadas con 100 mg/L de mio-inositol, 1 mg/L de tiamina.HCl, 0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina, 2 mg/L de glicina, 50 mg/L de arginina, 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 400 mg/L de caseína hidrolizada, 20 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar. El pH se ajustó a 5.8. Los explantes recién implantados se colocaron en una cámara de crecimiento, en la obscuridad a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante dos semanas, transcurridas las cuales se trasladaron a un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de 16 h de intensidad lumínica de  $30 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$  y 8 h de obscuridad. Se realizaron cambios de medio cada dos semanas.

### *Regeneración de plántulas a partir de tejido calloso*

Se transfirieron callos embriogénicos al medio descrito para el establecimiento de callos, excepto que el 2,4-D se redujo a 1 mg/L y se

añadió 0.5 mg/L de bencil aminopurina. Los callos se mantuvieron en una cámara de crecimiento, a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con fotoperíodo de 16 h de intensidad lumínica de 90 a 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  y 8 h de oscuridad. El medio se cambió cada tres semanas. Los brotes de 4 a 5 cm de tamaño se transfirieron a un medio para enraizar. Este medio estuvo constituido por sales minerales MS suplementado con 3 mg/L de ácido naftalenacético, 100 mg/L de mio-inositol, 1 mg/L de tiamina.HCl, 20 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar. El pH se ajustó a 5.8. Los regenerantes se mantuvieron en una cámara de crecimiento, a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con fotoperíodo de 16 h de intensidad lumínica de 90 a 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  y 8 h de oscuridad. La evaluación isoenzimática se realizó a los dos meses de edad.

#### *Establecimiento de suspensiones celulares*

Una vez obtenidos los callos, en un lapso entre ocho y diez semanas, se procedió a la obtención de cultivos de células en suspensión, según metodología descrita por Ho y Vasil (1983b), colocando 500 mg de callo en 50 ml de medio líquido MS modificado por Liu (1984). Este medio está constituido por las sales minerales MS suplementadas con 100 mg/L de mio-inositol, 1 mg/L de tiamina. HCl, 0.5 mg/L de ácido nicotínico, 0.5 mg/L de piridoxina, 2 mg/L de glicina, 50 mg/L de arginina, 3 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 500 mg/L de caseína hidrolizada y 30 g/L de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. Los callos se colocaron en una mesa de agitación a 100 rpm, a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y 20 a 30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  de intensidad lumínica y 8 h de oscuridad. Se cambiaron los medios cada cinco días.

#### *Regeneración de plántulas a partir de suspensiones celulares*

Para la regeneración de suspensiones celulares se utilizó la metodología descrita por Ho y Vasil (1983b), la cual consiste en inducir las suspensiones celulares a la formación de callo embriogénico colocándolas en medio sólido MS suplementado con 2 mg/L de 2,4-D, 5% de agua de coco, 500 mg/L de caseína hidrolizada y 40 g/L de sacarosa, ajustando el pH a 5.8. Luego se promovió la embriogénesis transfiriendo estos mini-callos a medio con bajas concentraciones de 2,4-D, 1 mg/L y 0.5 mg/L, para posteriormente regenerar las plántulas por transferencia de los embriones obtenidos a medio sólido con la mitad de las sales MS y 60 g/L de sacarosa. Se realizó la cuantificación isoenzimática en tejido tomado de plántulas de dos meses de edad.

#### *Cuantificación de isoenzimas de peroxidasa*

La cuantificación de isoenzimas de PRX (EC.1.11.1.7) se realizó en extracto de tejido de plantas de campo (hoja más joven completamente

extendida), tejido calloso (separado del explante) establecido de las plantas de campo y sus regenerantes, y en plantas de campo, suspensiones celulares y sus regenerantes de los cultivares de caña de azúcar bajo estudio. Luego de macerado el tejido (plantas de campo, tejido calloso y regenerantes) en cada caso en amortiguador tris glicina, pH 8.3, se centrifugó a 3,000 rpm y -5°C durante 10 min, en tanto que para las suspensiones celulares simplemente se eliminó el exceso de medio antes de centrifugar. La separación de las isoenzimas se efectuó sobre membranas gelatinosas de poliacrilamida DIS-PAGE 8:12 en Tris-Glicina pH 8.3, usando para la visualización de la actividad de PRX la reacción  $H_2O_2$ -o-dianisidina fosfato 0.15 M según Shannon (1968). Se cuantificaron las isoenzimas presentes en cada caso a través de la asociación con su movilidad absoluta. Se construyeron los patrones isoenzimáticos de PRX para cada cultivar, se identificaron los diferentes fenotipos y se calculó el coeficiente de identidad de los tejidos en estudio en cada cultivar (Mangolin et al., 1994). A fin de garantizar la precisión de las estimaciones se utilizaron diez repeticiones por cultivar (cada repetición constituida por un grupo de muestras) para cada evaluación isoenzimática, como es recomendado por Demey y Zambrano (1997).

### RESULTADOS

Se establecieron los patrones isoenzimáticos de PRX en plantas de campo, tejido calloso y plántulas regeneradas de callos en siete cultivares, y en plantas de campo, suspensiones celulares y sus regenerantes en cuatro cultivares de caña de azúcar. Los patrones isoenzimáticos fueron específicos para cada cultivar. Se encontraron movilidades desde 0.5 cm designada como PRX1 hasta 4.7 cm (PRX43) con intervalos de 1 mm para un total de 43 movilidades o isoenzimas. Estos resultados se muestran en las Figuras y Cuadros que se presentan en las próximas páginas.

### DISCUSIÓN

Los fenotipos de las plantas de campo usadas como fuente para el establecimiento de tejido calloso, evaluados a través de la cuantificación isoenzimática de PRX, exhibieron uniformidad dentro de cada cultivar y diferencias entre los distintos cultivares usados. El coeficiente de identidad de las plantas de campo fue de 100% en los siete cultivares usados.

La distribución de las isoenzimas de PRX en la constitución de los fenotipos de callos mostró diferencias entre los siete cultivares usados, así como también dentro del mismo cultivar en PR980 el cual alcanzó un coeficiente de heterogeneidad de 60%, y el coeficiente de identidad fue de 100% para los callos de los otros seis cultivares. La ausencia de

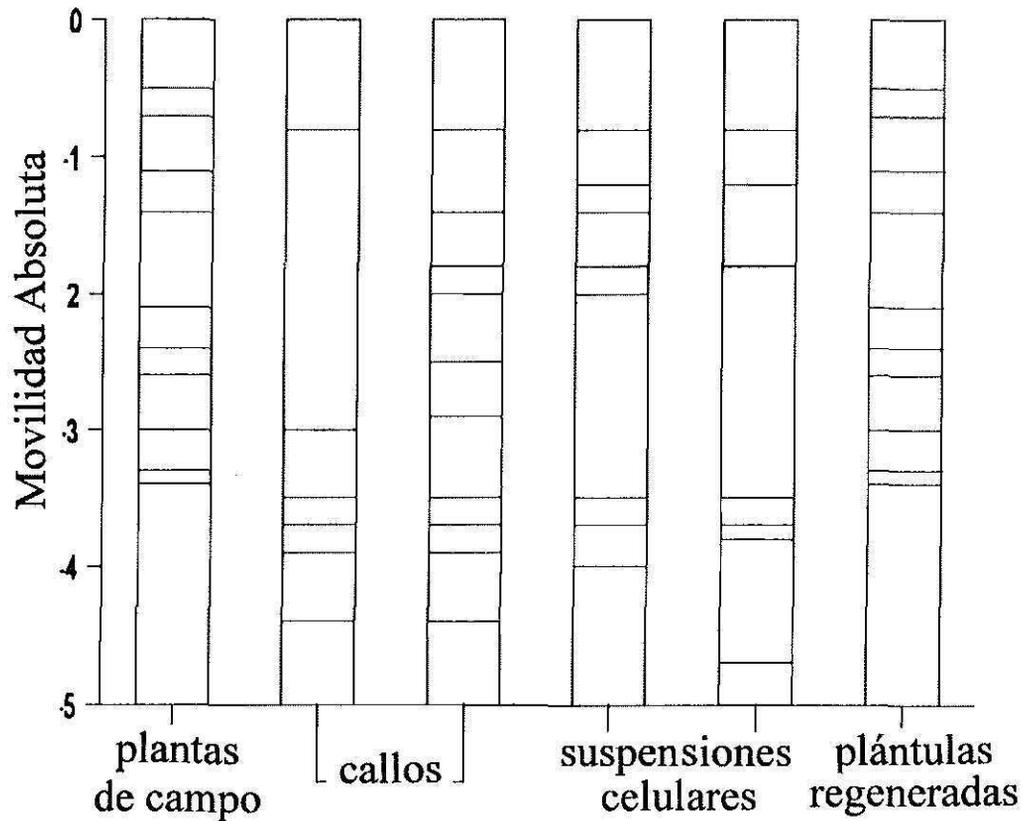


Figura 1. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar PR980.

variación fenotípica en las plántulas regeneradas del cultivar PR980 es indicativo de que las variaciones observadas bajo cultivo in vitro son de expresión transitoria y no tienen efecto sobre la expresión fenotípica de los regenerantes. Esto puede deberse a que bajo cultivo in vitro ocurre la expresión transitoria de genes necesarios para la adaptación al me-

CUADRO 1.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar PR980.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX					Total	Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V		
Plantas de campo	10					10	10
Callos		1				10	6
Suspensiones celulares			9			10	9
Plántulas regeneradas				3		10	9
					7	10	7
Plántulas regeneradas	10					10	10

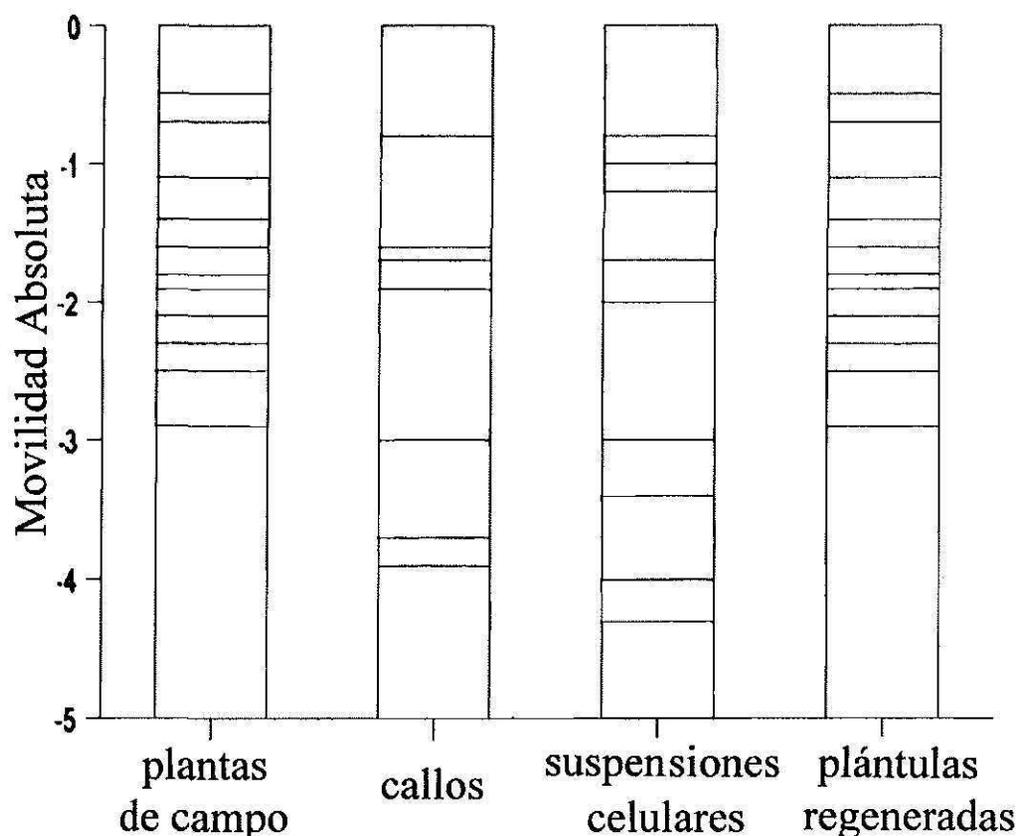


Figura 2. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar PR62258.

dio y crecimiento de células no diferenciadas. Al diferenciarse como es el caso luego de la regeneración, estos genes cesan su expresión.

El patrón isoenzimático de PRX para la conformación de los fenotipos de las suspensiones celulares fue diferente en los cuatro cultivares usados, así como también dentro de los cultivares PR980 y V64-10, los cuales exhibieron coeficientes de heterogeneidad de 50 y 22%, respecti-

CUADRO 2.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar PR62258.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX					Total	Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V		
Plantas de campo	10					10	11
Callos		10				10	7
Suspensiones celulares			10			10	9
Plántulas regeneradas	10					10	11

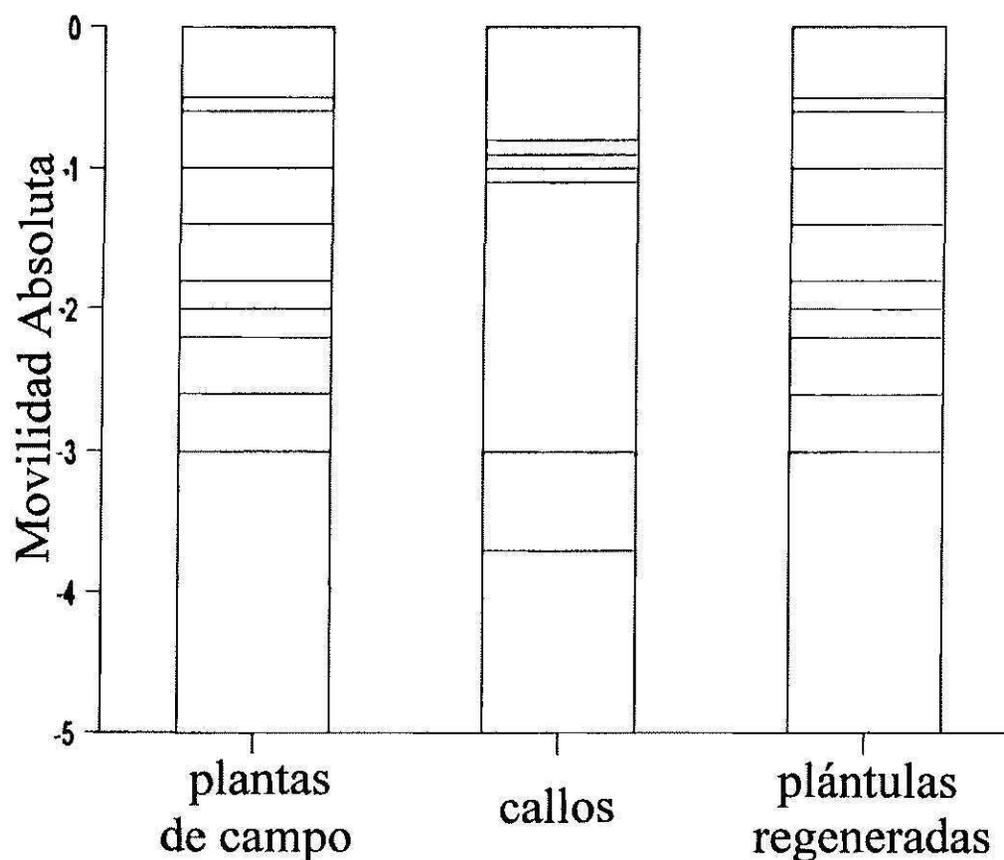


Figura 3. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar PR641791.

vamente. Sin embargo, los regenerantes exhibieron un coeficiente de identidad del 100%. La ausencia de variación en las plántulas regeneradas puede ser debida a la producción de alteraciones génicas mayores en uno de los fenotipos observados in vitro que produjeron la inhibición de la capacidad regenerativa en el mismo.

CUADRO 3.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar PR641791.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX					Total	Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V		
Plantas de campo	10					10	9
Callos		10				10	6
Plántulas regeneradas	10					10	9

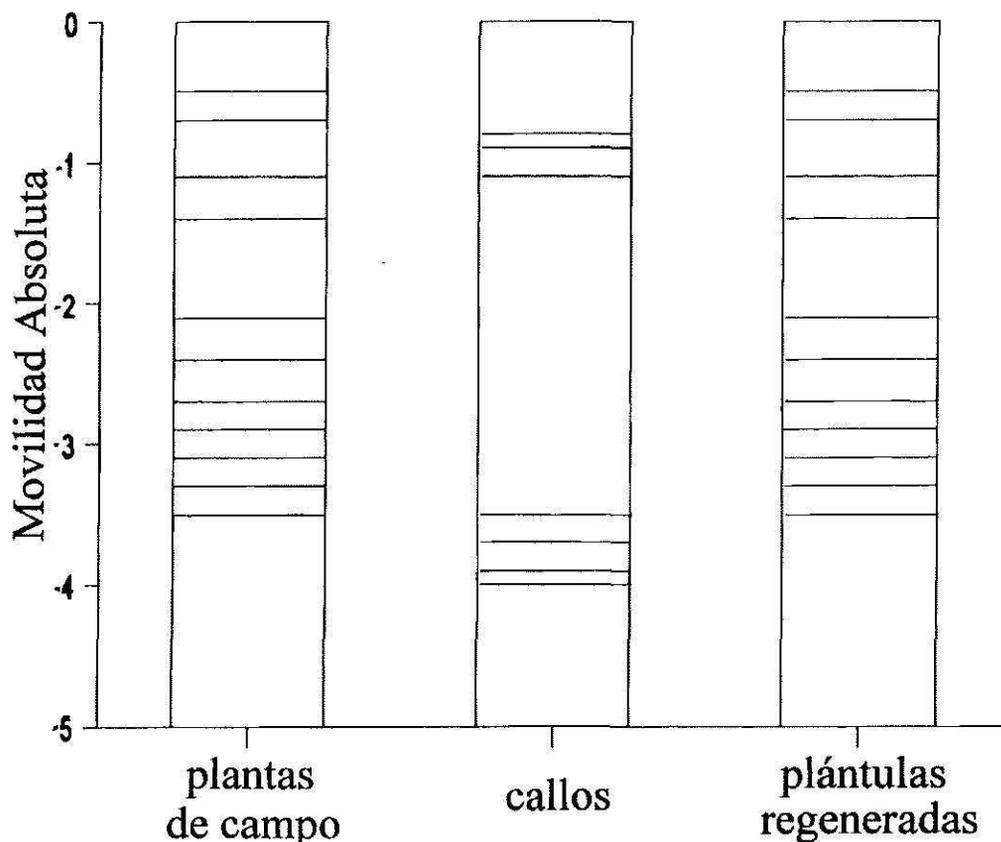


Figura 4. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar PR692176.

La isoenzima PRX1 está relacionada a tejido diferenciado en caña de azúcar ya que sólo está presente en los fenotipos de plantas de campo y regenerantes. PRX4 es inducida bajo condiciones de cultivo in vitro, visualizándose exclusivamente en tejido calloso y suspensiones celulares, lo cual podría relacionarse con una alta proliferación celular in vitro, tal como ha sido señalado por Mangolin et al. (1994).

CUADRO 4.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar PR692176.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX					Total	Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V		
Plantas de campo	10					10	11
Callos		10				10	7
Plántulas regeneradas	10					10	11

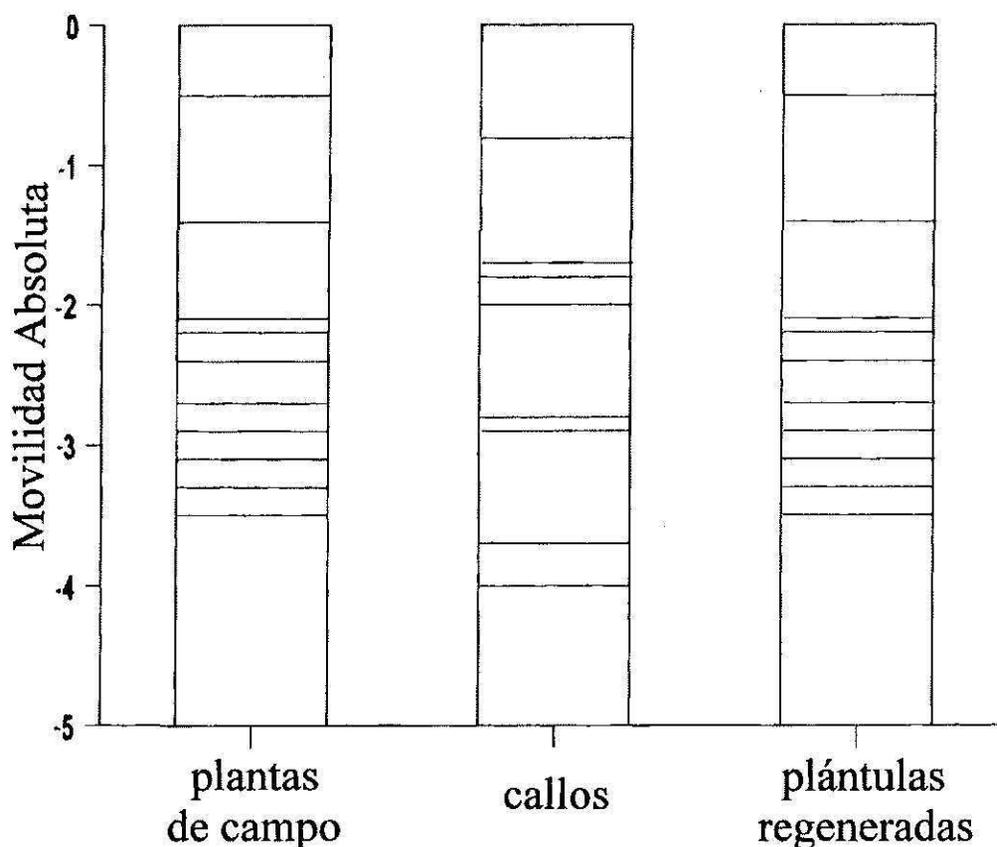


Figura 5. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar V58-4.

El coeficiente de identidad de las plántulas regeneradas fue de 100% para todos los cultivares usados. Los resultados obtenidos muestran entre los regenerantes la ausencia de variaciones significativas como resultado del cultivo *in vitro*. Resultados similares han sido señalados en arroz por Saleh et al. (1990), en cebada por Shimron-Abarbanell y Breiman (1991) y en caña de azúcar por Chowdhury y

CUADRO 5.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar V58-4.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX						Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V	Total	
Plantas de campo	10					10	10
Callos		10				10	8
Plántulas regeneradas	10					10	10

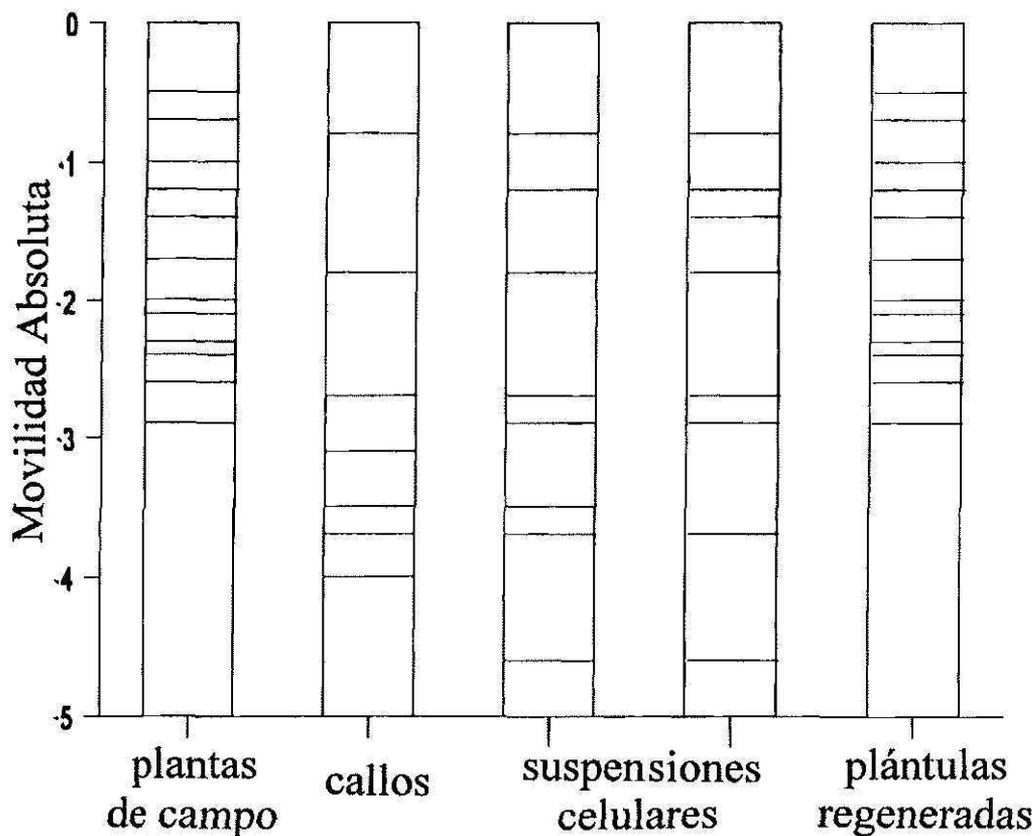


Figura 6. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar V64-10.

Vasil (1993). En caña de azúcar Shenoy y Vasil (1992) señalan que la ausencia de variación en regenerantes puede ser explicada ya que en esta especie la regeneración fundamentalmente ocurre a partir de embriogénesis, la cual es menos propensa a cambios genéticos debido a la fuerte selección de células normales durante la formación de los embriones somáticos.

CUADRO 6.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar V64-10.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX					Total	Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V		
Plantas de campo	10					10	12
Callos		10				10	7
Suspensiones celulares			2			10	8
Plántulas regeneradas				8		10	8
	10					10	12

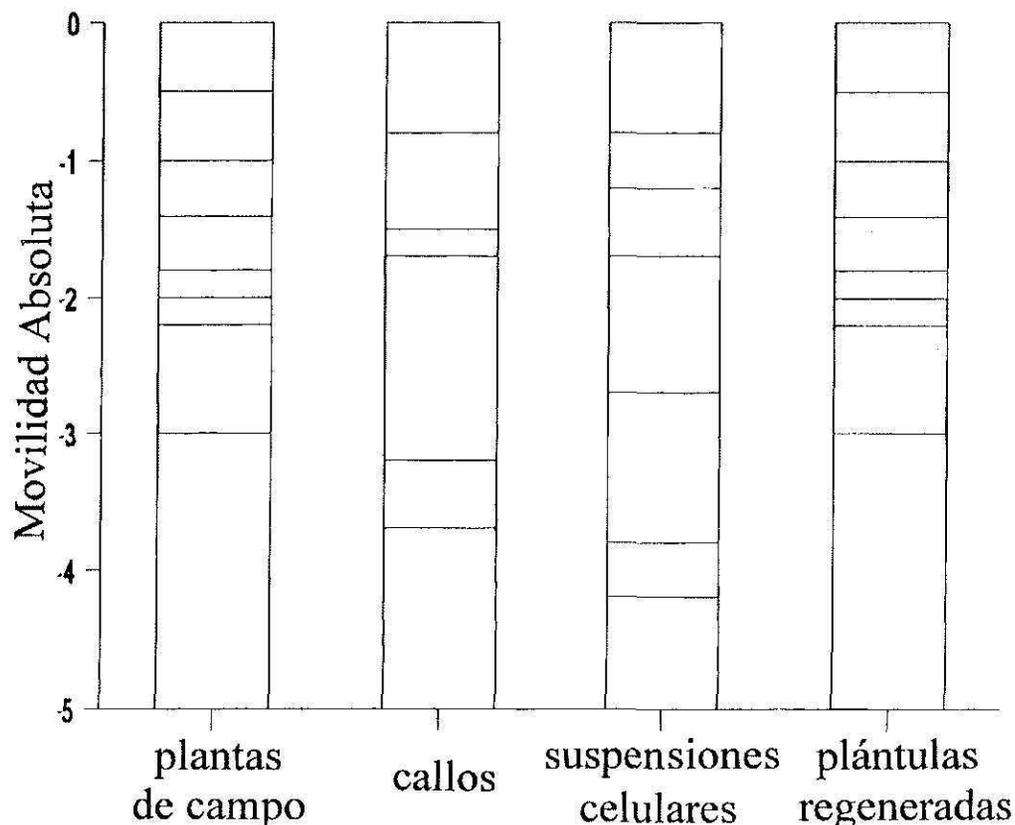


Figura 7. Fenotipos de PRX en diferentes tejidos de caña de azúcar, Cultivar V71-51.

La alta uniformidad y estabilidad genética entre las plántulas regeneradas observadas en este estudio indican que la perpetuación de características deseables de adaptación a condiciones limitantes inducidas o seleccionadas a través del uso de técnicas de manipulación in vitro de esta especie, así como también el uso de callos o suspensiones celulares en bancos de germoplasma, es muy factible. Es importante se-

CUADRO 7.—Relación entre el número de muestras y fenotipos de PRX para cada tejido, Cultivar V71-51.

Tejido	Número de muestras y fenotipos de PRX					Total	Número de isoenzimas
	I	II	III	IV	V		
Plantas de campo	10					10	7
Callos		10				10	5
Suspensiones celulares			10			10	6
Plántulas regeneradas	10					10	7

ñalar la gran importancia que tiene la estricta selección de callos embriogénicos que garanticen la regeneración por embriogénesis somática que permita mantener la fidelidad genética.

#### LITERATURA CITADA

- Chen, W., M. Davey, J. Power y E. Cocking, 1988. Sugarcane protoplast: factors affecting division and plant regeneration. *Plant Cell Reports* 7:344-347.
- Chowdhury, M. K. U. y I. K. Vasil, 1993. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp). *Theor. Appl. Genet.* 86:181-188.
- Demey, J. R. y A.Y. Zambrano, 1997. Sample size determination in biotechnology experiments with cell suspensions culture. V Reunión de la Red de la Sociedad Internacional de Biometría para Centro América, el Caribe, Colombia y Venezuela. Xalapa-Veracruz, México. VII(4):309-316.
- Faheem, A., Y. Zafar, K. Malik y J. Iqbal, 1996. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* spp. *hybrid* cv. CoL-54). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44:71-78.
- Ho, W. J. e I. K. Vasil, 1983a. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118:169-180.
- Ho, W. J. e I.K. Vasil, 1983b. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann Bot.* 51:719-726.
- Liu, M., 1984. Sugarcane. pp. 572-605. In: Sharp, W. R., D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). Handbook of plant cell culture. New York.
- Mangolin, C. A., A. J. Prioli y M. F. P. S. Machado, 1994. Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics* 32(7/8):237-247.
- Morrish, F. M., W. W. Hanna e I. K. Vasil, 1990. The expression and perpetuation of inherent somatic variation in regenerants from embryogenic cultures of *Pennisetum glaucum* (L) R. Br. (Pearl millet) *Theor. Appl. Genet.* 80:409-416.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Salet, N. M., H. S. Gupta, R. P. Finch, E. C. Cocking y B. J. Mulligan, 1990. Stability of mitochondrial DNA in tissue-cultured cells of rice. *Theor. Appl. Genet.* 79:342-346.
- Shannon, L. M., 1968. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19:187-210.
- Shenoy, V. B. e I. K. Vasil, 1992. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theor. Appl. Genet.* 83:947-955.
- Shimron-Abarbanell, D. y A. Breiman, 1991. Comprehensive molecular characterization of tissue-culture-derived *Hordeum marinum* plants. *Theor. Appl. Genet.* 83:71-80.
- Srinivasan, C. e I. K. Vasil, 1986. Plant regeneration from protoplasts of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Plant Physiol.* 126:41-48.
- Swedlund, B. e I. K. Vasil, 1985. Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L) K. Shum. *Theor. Appl. Genet.* 69:575-581.
- Zambrano, A. Y., J. R. Demey y V. Gonzalez, 1995. Grupos homogéneos de crecimiento y manipulación *in vitro* de seis cultivares comerciales de caña de azúcar *Saccharum* spp. en Venezuela. *Agronomía Tropical* 45(1):51-72.