

EFFECTO DE ANTIOXIDANTES EN LA INDUCCIÓN DE CALLO EMBRIOGÉNICO EN DOS GENOTIPOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

USE OF ANTIOXIDANTS ON SOMATIC EMBRYO INDUCTION OF TWO SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) VARIETIES

R E S U M E N

La propagación convencional de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) ha sido larga y tediosa, esto puede llevar hasta 10 años. Por esto, la propagación *in vitro* es de gran importancia, ya que se puede obtener plantas libres de patógenos y propagación masiva. El objetivo del presente trabajo fue valorar diferentes tipos de antioxidantes tales como nitrato de plata, ácido ascórbico y cisteína, sobre la inducción de callo de las variedades "CP722086" (CP72) y "MEX69290" (290) de caña de azúcar a una concentración de 5 mg·L⁻¹. No se pudo establecer una correlación entre el uso de antioxidantes y la presencia de microorganismos contaminantes en el medio de cultivo; sin embargo, se determinó una mayor contaminación en la variedad CP72 y mayor oxidación en la variedad 290. Se comprobó que los medios adicionados con cisteína y ácido ascórbico favorecen la formación de callo embriogénico en ambas variedades, mientras que el uso de nitrato de plata tiene un efecto inhibitorio en la inducción de callo embriogénico para las variedades CP72 y 290.

ABSTRACT

Conventional methods for plant breeding of sugar cane (*Saccharum officinarum*) and their propagation has been long and tedious, which can take up to ten years. That is why *in vitro* propagation is of great importance, as it is possible to obtain plants free of pathogens and obtain large amount of plantlets starting from a single explant. The objective of the present study was to evaluate different types of antioxidants such as silver nitrate, ascorbic acid and cysteine at 5 mg·L⁻¹ on somatic embryo induction for "CP722086" (CP72) and "MEX69290" (290) sugarcane cultivars. It was not possible to establish a correlation between the use of antioxidants and the presence of contaminating microorganisms in the culture medium; however, a greater contamination was determined on the CP72 cultivar and greater oxidation on the 290 cultivar. It was also observed that media added with cysteine and ascorbic acid favor the formation of embryogenic callus in both cultivars, whereas the use of Silver nitrate had an inhibitory effect on the induction of embryogenic callus for both cultivars.

Key words: sugarcane, *Saccharum officinarum*, embryogenic callus, antioxidants.

Marco Tulio Buenrostro Nava*
 Nicxi Liliana Adame Gómez,
 Salvador Guzmán González,
 Juan Alberto Osuna Castro,
 Gilberto Manzo Sánchez.
 LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
 DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
 BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DE LA
 UNIVERSIDAD DE COLIMA

*Autor responsable
mbuenrostro0@ucol.mx

Palabras clave: Caña de
 azúcar, *Saccharum officinarum*, callo
 embriogénico, antioxidantes.

I N T R O D U C C I Ó N

La caña de azúcar (*Saccharum* sp.) se cultiva en más de 100 países en condiciones templadas, subtropicales y tropicales; a nivel mundial se producen 1,450 millones de toneladas de azúcar proveniente de 22 millones de hectáreas (FAO, 2007).

El desarrollo de nuevas variedades mediante mejoramiento genético convencional ha permitido aumentar la producción de sacarosa; sin embargo, enfrenta grandes desafíos, como el tiempo promedio de diez años que se requieren para generar una variedad (Alejandro, *et al.*, 2010).

Debido a la importancia económica que representa la caña de azúcar a nivel mundial, se han mejorado algunas de sus características agronómicas mediante la ingeniería genética como son: tolerancia a virus, resistencia a insectos y resistencia a enfermedades causadas por hongos, resistencia a herbicidas, mejora de la calidad de la fibra y el uso de plantas de caña de azúcar como biorreactores (Alejandro *et al.*, 1998).

La eficiencia de inducción de embriones somáticos y de transformación también es limitada por la formación de fenoles y la oxidación de los tejidos, como respuesta al estrés mecánico producido al momento del establecimiento del cultivo de tejidos *in vitro*, o como respuesta hipersensitiva a la presencia de *Agrobacterium* spp., son dos de los factores que reducen de forma notable la eficiencia de inducción de callo y de transformación, respectivamente. Con el propósito de reducir la oxidación de los tejidos en los cultivos *in vitro*, se ha reportado el uso de algunos antioxidantes tales como ascorbato de sodio, ácido ascórbico, cisteína, ditioneitol (DTT), el glutatión y tocoferol en dicotiledóneas y también se utilizaron con éxito en especies de plantas monocotiledóneas (Khanam *et al.*, 2007).

M E T O D O L O G Í A

Se utilizaron ápices de caña de azúcar de las variedades “CP722086” (CP72) y “MEX69290” (290) del INIFAP campus Tecmán. De los ápices se obtuvieron discos de la región de meristemo apical y se desinfectaron usando Clorox® 20% (v/v) y Tween® 20 al 0.002% (v/v) por 20 min.

Posteriormente, se procedió a exponer una región de 1.5 a 2 cm de largo del meristemo apical. Se realizaron cortes transversales de dos mm de grosor siguiendo metodología reportada (Zúñiga, 2012),

y se colocaron en frascos tipo Gerber® con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), mio-inositol 100 mg·L⁻¹, tiamina 1 mg·L⁻¹, caseína hidrolizada 500 mg·L⁻¹, 2,4-D 5 mg·L⁻¹, sacarosa 30 g·L⁻¹, PhytigelTM 3 g·L⁻¹ y un pH de 5.7 (MIC1). Los tratamientos consistieron de medio MIC1 adicionados con AgNO₃ (MIC2), ácido ascórbico (MIC3) o cisteína (MIC4) a una concentración de 5 mg·L⁻¹. Los explantes fueron incubados a 25 ± 2 °C, bajo condiciones de oscuridad.

Se evaluó la presencia o ausencia de contaminantes de 0-36 días después del establecimiento, porcentaje de oxidación, y la eficiencia de formación de callo embriogénico. Los datos fueron transformados mediante la $\sqrt{x + 1}$ (Steel *et al.*, 1996) y sometidos a análisis estadístico (SAS, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que no hay diferencias significativas en la adición de antioxidantes sobre la incidencia de contaminantes por microorganismos en los explantes a los 8, 15 y 36 días después de iniciado el experimento (Cuadro 1).

Gen	Trat ¹	Días después de establecido el experimento					
		% de contaminación ²				% de oxidación	
		8	22	29	36	15	29
290	MIC1	0a	4ab	0b	0a	16a	4a
290	MIC2	0a	0b	2b	2a	10ab	4a
290	MIC3	12a	0b	0b	0a	4ab	2a
290	MIC4	0a	0b	0b	0a	4ab	2a
Cp72	MIC1	2a	22 ^a	58 ^a	0a	2ab	10a
Cp72	MIC2	0a	8ab	60 ^a	2a	6ab	6a
Cp72	MIC3	0a	0b	0b	2a	4ab	0a
Cp72	MIC4	0a	6ab	8b	0a	0b	2a
P trat		0.05	0.049	0.0001	0.75	0.019	0.69
C.V. (%)		11.85	18.41	20.36	8.70	16.96	17.24

CUADRO 1.

Efecto de antioxidantes sobre la contaminación y oxidación de explantes de caña de azúcar bajo condiciones *in vitro*.

¹Trat. = tratamiento. MIC1= MS; MIC2= MS + AgNO₃; MIC3= MS+ ácido ascórbico; MIC4=MS+ Cisteína. ²Cada valor representa la media de diez repeticiones, donde n = 50. Para el análisis de datos los porcentajes fueron transformados mediante $\sqrt{x + 1}$. Valores promedio seguidos por letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey 0.05).

A partir de los 29 días se presentó un 16% de oxidación en el medio sin antioxidantes, seguido por el medio adicionado con nitrato de plata (10%) para la variedad 290. Para la variedad CP72 no se observó efecto de los antioxidantes con respecto al control (Cuadro 1).

En la formación de callo embriogénico se observaron comportamientos muy diferentes entre los genotipos, ya que para la variedad 290 se observó formación de callo (14%) en los tratamientos sin antioxidantes y ácido ascórbico. En el medio adicionado con nitrato de plata no se observó la formación de callo embriogénico para ambas variedades. Los tratamientos con ácido ascórbico y cisteína favorecieron la formación de callo en un 16 y 22% en la variedad CP72 (Figura 1).

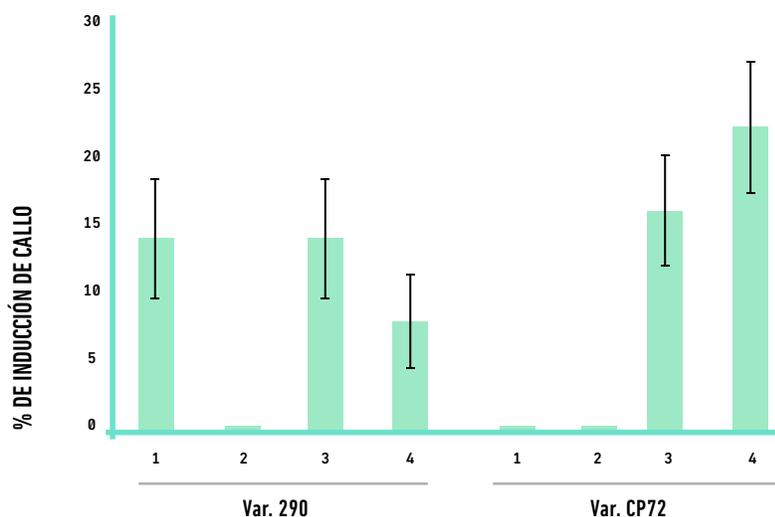
Estas diferencias podrían estar asociadas con las características fisiológicas de cada una de las variedades, ya que la variedad CP72 es considerada una variedad temprana, mientras que la variedad 290 es considerada intermedia. Esta respuesta dependiente de la fenología del tejido coincide con reportes previos donde se indica que la mayor eficiencia en la formación de callo embriogénico, se obtiene cuando los meristemos vegetativos están en proceso de diferenciación floral (Yinghui, 2008).

FIGURA 1.

Efecto de antioxidantes.

1 = MS; 2 = MS + AgNO₃; 3= MS+ ácido ascórbico; 4 = MS+ Cisteína.

Cada barra representa la media de al menos cinco repeticiones y las líneas representan ± el error estándar.



Estas diferencias también podrían estar asociadas con las condiciones de campo, ya que a pesar de que provienen del mismo lote y reciben el mismo manejo agronómico, su asociación con microorganismos endófitos podría ser diferente. La presencia de microorganismos endófitos en los explantes se observó a los 29 días después de establecido el cultivo, a diferencia que cuando el proceso de desinfección es ineficiente y se observa durante las primeras dos semanas (Azofeifa, 2009).

La adición de antioxidantes al medio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ha sido eficaz en la prevención de oxidación, logrando así un incremento en la eficiencia de regeneración de brotes sanos (Martínez, *et al.*, 2012).

En el medio adicionado con $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato de plata se obtuvo un necrosamiento total del tejido vegetal, sin embargo, una baja concentración de nitrato de plata ($1.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) favoreció la embriogénesis somática en el cultivo de caña de azúcar (Nieves, *et al.*, 2007), por lo cual se puede deducir que una concentración alta de nitrato de plata, puede causar toxicidad en el tejido vegetal. Estudios similares han demostrado que el uso de nitrato de plata puede ayudar a la inducción de brotes; sin embargo, éste puede tener efectos negativos en la inducción de callo, en donde se observó una reducción de hasta un 86% al usar una concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en cultivo *in vitro* de ajeno dulce (*Artemisia annua* L.) (Lei, *et al.*, 2013).

El uso de ácido ascórbico como antioxidante, adicionado al medio de cultivo en una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con agua de coco (5% v/v) fueron fundamentales para la regeneración en los genotipos de sorgo (Martínez, *et al.*, 2012). La adición de cisteína ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) o nitrato de plata ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mejoraron la máxima recuperación de plántulas de garbanzo *in vitro* después de la agro-inoculación (Snyman, *et al.*, 2006), del mismo modo, una concentración de cisteína ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en el medio de crecimiento reduce explantes necrosados en el cultivo de tejidos de banano (Strosse, *et al.*, 2004).

La inducción de callo y su continuo crecimiento depende de factores como las condiciones de cultivo, genotipo, estado fisiológico del explante, combinación y niveles de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, así como las condiciones ambientales en las que se mantienen los cultivos (Lagunes, *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

El uso de ácido ascórbico y cisteína favoreció la inducción de callo embriogénico para la variedad CP72 de caña de azúcar, mientras que para la variedad 290 no tuvo un efecto positivo.

El uso de nitrato de plata a una concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ tiene un efecto inhibitorio en la inducción de callo embriogénico para las variedades CP72 y 290.

Para posteriores trabajos, se recomienda estudiar el efecto de nitrato de plata, ácido ascórbico y cisteína en diferentes dosis, para así poder determinar sus efectos.

AGRADECIMIENTOS:

Al M.C. Arturo Vizcaíno Guardado y al Ing. Marco Antonio Vizcaíno del INIFAP-Tecomán por su asesoría y proveer el material vegetal.

REFERENCIAS

- FAO. (2007) Perspectivas agroalimentarias. <http://www.fao.org/docrep/010/ah876s/ah876s07.htm> (Consultada el 04/10/13).
- ALEJANDRE, R.J.A., Galindo T.M.E, Espinosa L.H.E y Alvarado G.O.G. (2010) Variabilidad genética en 22 variedades híbridas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) Revista Internacional de BOTÁNICA Experimental. 79: 87-94.
- ARENCIBIE, D.A., Carmona R.E., Tellez P., Chan M.T., Su MayYu, Trujillo E.L. y Oramas P. (1998) An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. 7: 1-10.
- KHANAM, J., Begum M., Ara J., Jesmin M., Taher M. y Ali S. (2007) Antimicrobial Activity of Metal Cystine Complexes. Dhaka University. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 5: 29-32.
- ZÚÑIGA, P. A. I. (2012) Establecimiento in vitro de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) -variedad CP 73-1547- Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. Honduras. 25 p.
- MURASHIGE T. y Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- STEEL, R.G., Torrie J.H., Dickey D.A. (1996) Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd. Edition. New York, New York McGraw-Hill Co. Inc. 666 pp.
- SAS (1998) Institute Inc. SAS/STAT user guide. Release 6.03 SAS. Instit., Copy, N.C.
- YINGHUI, D. (2008) Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cell and Developmental. Biology-Plant*. 44: 149-161.
- AZOFEIFA, A. (2009) Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. Centro para la Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS). Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. 20: 153-175.
- MARTÍNEZ, M. S. de J., Gómez K.R., Posada P.L., Barbón R. R.; Acosta S.M., Reyes V.M., Pérez B.M., Torres R.D., Pons C.M., La O C.M., Aguilera C.A. y Tejeda G. M. (2012) Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 101-110.
- NIEVES, N., Cid M., Pina D, Lezcano Y. y Torne J.M. (2007) Efecto del tiosulfato de plata sobre la embriogénesis somática y la semilla artificial de caña de azúcar. *Agronomía Costarricense*. 31: 87-94.
- LEI, C., Wang H., Liu B. y Ye H. (2013) Effects of silver nitrate on shoot regeneration of *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnology*. 31: 71-75.

- SANYAL, I., Singh A.K., Kaushik M. y Amla, D.V. (2005) Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Sciences* 168: 1135-1146.
- SNYMAN, S.J., Meyer G.M., Richards J.M., Haricharan N., Ramgareeb S. y Hockett B.I. (2006). Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant Cell Reports*. 25: 1016–1023.
- STROSSE, H., Van den Houwe I. y Panis B. (2004) Banana cell and tissue culture – review. In: Jain SM, Swennen R (eds.) *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA. pp. 1-12.
- LAGUNES, F. E. (2009) Transformación genética de ajo (*Allium sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 95 pp.