

CORPORACION ANDINA DE FOMENTO



I CURSO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES APLICADO A LA PRODUCCION AGRICOLA

PROGRAMA ANDINO DE BIOTECNOLOGIA
DE LA CAF

LEOPOLDO VILLEGAS, EDITOR

Curso realizado en el
Instituto Internacional de Estudios Avanzados
Caracas, Venezuela, del 9 al 20 de mayo de 1988

CAPITULO 5

VARIACIONES SOMACLONALES
Y SU APLICACION EN LOS ESTUDIOS
DE MEJORAMIENTO DE
LA CAÑA DE AZUCAR

Eva de García

Escuela de Biología. Centro de Botánica Tropical, Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Vegetales. Universidad Central de Venezuela.

VARIACIONES SOMACLONALES Y SU APLICACION EN LOS ESTUDIOS DE MEJORAMIENTO DE LA CAÑA DE AZUCAR

Las células vegetales que crecen en condiciones de cultivo sufren cambios genéticos. El desplazamiento de las células eucariotes de su curso normal de desarrollo conduce a la perturbación de sus genes, supuestamente "estables", esto se hace aparente cuando el tejido vegetal se somete al régimen de cultivo *in vitro*. Los análisis citológicos revelan cambios en número cromosómico (poliploidias, aneuploidias); alteraciones estructurales como deleciones, duplicaciones y translocaciones.

De ahí entonces que la capacidad de regenerar plantas completas, maduras y fértiles a partir del cultivo de tejidos vegetales provee una nueva fuente de variaciones que se originan durante el cultivo de ese tejido. El análisis de las plantas obtenidas *in vitro* permite la aplicación de la genética y particularmente la Mendeliana a las variaciones obtenidas en cultivo.

El término "variación somaclonal" fue propuesto por Larkin y Scowcroft⁴ para referirse a la variabilidad genética que aparece en el cultivo de tejidos, ellos se basaron en el hecho de que ese fenó-

meno estaba suficientemente extendido a todos los cultivos, como para ignorarlo.

Desde ese momento la variación somaclonal se ha estudiado ampliamente y se ha analizado su impacto en el mejoramiento de plantas, inclusive se ha publicado una lista de especies que han mostrado variación somaclonal ⁷ y se ha hecho análisis del origen genómico de las variaciones somaclonales. ⁸

Las primeras observaciones de variaciones en plantas regeneradas *in vitro* fueron realizadas por Murashige y Nakano ⁵ y Sacristán y Melcher, ⁶ ellos hicieron un análisis histológico y reportan aneuploidia en las células del ápice de la raíz. Ellos sugirieron que en alguna extensión ese número de cromosomas presentes en la raíz es un reflejo presentado por células usadas para la regeneración.

En 1977 Heins y colaboradores ² proponen que las plantas variantes obtenidas por cultivo de tejidos de caña de azúcar, pueden tener alto valor económico. Ellos partiendo del hecho de que las variedades comerciales de caña de azúcar son mosaicos cromosómicos, hipotizaron que la caña de azúcar podría tolerar variación en el número de cromosomas.

Posteriormente Krishnamurthi ³ demostró que las plantas de caña de azúcar, regeneradas a partir de tejidos en cultivo presentaban más variabilidad en el número de cromosomas que el tejido donante. En los años sucesivos se han aislado variantes de caña de azúcar que expresan resistencia al Fiji (enfermedad viral); mildew lanoso, carbón, etc., en adición se aislaron variantes que producían mayor cantidad de azúcares.

En algunos casos los somaclonales son inestables, mientras otras como el caso de somaclonales resistentes a la enfermedad del Fiji y el mildew lanoso, se ha observado su estabilidad por unos cinco años.

El mayor beneficio de las variaciones somaclonales radica en su uso en los programas de mejoramiento, y uno de los usos de mayor potencial es la creación de variabilidad genética adicional en cultivos agronómicos de utilidad económica, sin la necesidad de hibridar. La variación somaclonal es más atractiva aún si se puede

realizar la selección *in vitro* o si se aplica un procedimiento rápido para la selección de plantas.

La idea de la variación somaclonal es obtener nuevas variantes que retengan todas las cualidades favorables de la variedad existente y a la cual se le añadan características mejoradas adicionales; como por ejemplo resistencia a enfermedades, a herbicidas, (caracteres monogénicos). Una vez obtenida la variante debe determinarse el valor y la base genética del somaclón. La aparición de variaciones somaclonales puede ser desventajosa en los casos en que se requiera uniformidad clonal: en la industria de horticultura y forestal, en las cuales el cultivo de tejidos es utilizado para reproducir genotipos élitos; y también en la conservación de germoplasma, pero ello puede evitarse siguiendo protocolos que eviten su incidencia.

Inducción de Variantes Somaclonales en Caña de Azúcar en Variedades Cultivadas en Venezuela.

Esta investigación la estamos realizando en el laboratorio de cultivo de tejidos, del Centro de Botánica Tropical, Escuela de Biología, U.C.V., y tiene como finalidad colaborar con los programas de mejoramiento que se realizan en la sección Caña de Azúcar del FONAIAP bajo la coordinación del Dr. Ventura González.

En este sentido se diseñó un protocolo para obtener regeneración de plantas por la vía de embriogénesis somática indirecta a partir de callos sometidos a la acción de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, una auxina) durante diferentes períodos de tiempo. Se utilizó para estos estudios secciones de bases de hojas jóvenes de caña de azúcar vr. PR 62258, ésta es una variedad foránea comercial, susceptible al virus del mosaico. El objetivo principal de este trabajo es obtener plantas regeneradas *in vitro* resistentes a este virus, mediante la inducción de variación somaclonal.

Para esto se establecieron 4 fases en la investigación:

— Primera Fase: establecimiento de un callo proembriónico que se logró en un medio de Murashige y Skoog (MS 1962), al cual se le adicionó 2,4-D (3 mg/l), 5% de agua de coco y 20 g/l de sacarosa.

En la fase de callo proembrionario se someten tejidos a los tratamientos con 2,4-D (3 mg/l) a diferentes períodos de tiempo, estableciéndose las cepas G¹, G² y G³, de acuerdo al número de semanas que se mantienen bajo el efecto de esa fitohormona (Tabla 1).

— Segunda Fase: diferenciación de embrioides la cual se logra en un medio con las sales del medio MS 1962, completas o diluidas a la mitad y suplementación con agua de coco al 5% con o sin 0,5 mg/l de 2,4-D y sacarosa 60 g/l (Figura 1).

— Tercera Fase: germinación de embrioides. Estas estructuras cuya iniciación comienza en el medio anterior, necesitan un cambio de medios para el desarrollo completo de la plántula, para ello se utilizaron las sales del medio MS 1962, diluidas a la mitad con 10% de agua de coco y 60 g/l de sacarosa y sin sustancia de crecimiento. ¹ En este medio pueden mantenerse hasta que se transfiera a la tierra. (Figura 2).

— Cuarta Fase: fase de establecimiento en tierra. Se logra al sembrar las plántulas en una mezcla de turba y tierra; y colocarlas en cámaras húmedas por un tiempo de cinco días, previo a su exposición al medio ambiente.

En estas experiencias se hace evidente el efecto inhibitorio del 2,4-D sobre la capacidad regenerativa de los tejidos del callo. Cuando los mismos se cultivan por un período de 12 semanas en presencia del 2,4-D (cepa G³), se obtiene un total de 9 plantas por fiola, en relación de 80 plántulas por fiola obtenidas a partir de la cepa G¹ (4 semanas cultivadas en medio con 2,4-D). (Tabla 2). Los tejidos de la cepa G¹ conservaron una alta capacidad regenerativa por un largo período de tiempo.

Una vez que las plantas se han mantenido por 15 días en el vivero son trasladadas al CENIAP, sección caña de azúcar donde son transplantadas al campo. Las observaciones de plantas regeneradas en estas experiencias, han demostrado que algunas de ellas resisten la infección del virus del mosaico, pero se necesitan nuevas pruebas

y un tiempo mayor de observación para demostrar el establecimiento de ese nuevo carácter.

Se realizaron también análisis sobre los aspectos morfogénicos de la formación de embrioides, su ontogenia y desarrollo, para ellos se realizaron cortes seriados de los explantes a tiempos secuenciales después de su establecimiento en el medio. Se pudo concluir que estos embrioides tienen origen unicelular, y que se inician con la formación de paredes gruesas en células que posteriormente van a dar origen a dichas estructuras. Estas células están en la superficie externa del callo en caso de embriogénesis indirecta, o en un tejido organizado en caso de la embriogénesis directa. El origen unicelular es de estos embrioides, explica la obtención de plantas resistentes al virus del mosaico entre las poblaciones de plantas regeneradas.

Esta investigación es un ejemplo ilustrativo del empleo de las técnicas de cultivo de tejidos y en especial de la variación somaclonal en los programas de mejoramiento de caña de azúcar.