

OBTENCION DE CALLOS Y SUSPENSIONES CELULARES DE *GLYCINE MAX* (L.) MERR., CV. G7R- 315.

Amelia Capote Rodríguez y Odalys Pérez Díaz..

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
e-mail: acapote@inifat.co.cu**

RESUMEN

El proceso de callogénesis resulta esencial en la iniciación de los cultivos y en el desencadenamiento de los eventos morfogénéticos en condiciones *in vitro*. Se estudió el efecto de diferentes explantes (hojas, hipocotilos y cotiledones) y medios de cultivo (MS, B5 y PCL-2) en la formación de callos de soya cv. G7R-315. El medio de Gamborg *et al.* (B5) favoreció la callogénesis al utilizar segmentos de hojas como explantes. A partir de estos callos se obtuvieron las suspensiones celulares y se evaluó el efecto de los medios de cultivo en el establecimiento de las mismas. Los resultados obtenidos permiten seleccionar las hojas de soya como explantes para la obtención de callos y suspensiones celulares, utilizando el medio mineral B5, en el cual se obtiene un mayor crecimiento y gran cantidad de formaciones globulares.

Palabras claves: crecimiento celular, medios de cultivo, reguladores del crecimiento, soya

OBTENTION OF CALLUS AND CELL SUSPENSIONS OF *GLYCINE MAX* (L.) MERR., CV. G7R- 315.

ABSTRACT

Callogenesis is essential to culture initiation and unleashing of *in vitro* morphogenetic events. The effects of different explant and culture medium on obtain of embryogenic callos of soybean cv. G7R-315 was studied. Callogenesis was enhanced by media of Gamborg *et al.* (B5) when the leaves were using as explants. The cell suspension were obtained and was evaluated the effect of culture medium on establishment of them. The results obtained allow use the soybean leaves as explant for the callus obtain and cell suspension use the mineral medium B5, where it is possible to get a better growth and a lot of globular formation.

Key words: cell growth, explants, culture medium, growth regulators, soybean.

INTRODUCCIÓN

Las suspensiones celulares tienen numerosas ventajas en relación con los medios estacionarios, debido a que constituyen un método adecuado para estudiar las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares de la diferenciación de órganos (Ozawa *et al.*, 1996).

Una de las principales aplicaciones de esta técnica es su utilización para obtener la propagación masiva de individuos de interés, debido a la posibilidad de explotar la totipotencia de las plantas superiores, por lo que se ha empleado para la propagación de algunas especies de importancia económica, sirviendo de base para

el estudio de complejos procesos como la organogénesis (Pattnaik *et al.*, 2000) y la embriogénesis somática (Cevallos, 2000).

La soya (*Glycine max* (L.) Merr.) es una de las principales especies de oleaginosas en el mundo por su alto contenido de aceites y proteínas, por lo que en los últimos años se han desarrollado las técnicas de cultivo de tejidos como apoyo a los programas de mejoramiento genético de este cultivo.

Específicamente, en el cultivo de la soya las suspensiones celulares se han empleado para la selección *in vitro* de líneas tolerantes a enfermedades (Jin *et al.*, 1996), la obtención de métodos eficientes de transformación genética (Trick *et al.*, 1997) y la regeneración de plantas (Samoylov *et al.*, 1998).

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de los explantes y medios de cultivo en el proceso de callogénesis y establecimiento de las suspensiones celulares, y la caracterización morfofisiológica de ambos procesos, con vistas a obtener la embriogénesis somática en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio morfológico de la callogénesis.

Se utilizaron semillas del cv 'G7R-315', provenientes del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT); las mismas fueron desinfectadas con lejía comercial (2,5% de cloro activo) y tres enjuagues de agua destilada estéril. Para su germinación fueron cultivadas en el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), solidificado con 5,7 g/L de agar y sin adición de reguladores del crecimiento.

A partir de las plántulas germinadas *in vitro*, se utilizaron diferentes explantes (hojas, hipocótilos y cotiledones), los cuales se sembraron en los medios de cultivo con las sales minerales de MS, B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y PCL-2 (Phillips y Collins, 1981), todos suplementados con 2 mg.l⁻¹ de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4- D), 0,1 mg.l⁻¹ de 6- furfural amino purina (KIN) y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

En todos los casos se utilizaron tubos de ensayo a los que se le adicionó 15 mL de medio de cultivo, el pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5,6 antes de añadir el agar (7 g/L), y se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1,2 atm de presión durante 20 minutos.

Los cultivos se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 16 horas luz, a una temperatura de 25± 2 °C, durante 45 días, al cabo de los cuales se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de formación de callos, crecimiento de los mismos expresado en índice de crecimiento (IC) dado por la relación entre la masa fresca y masa seca de los callos, el porcentaje de callos con estructuras embriogénicas (presencia de estructuras globulares). la consistencia y color de los mismos.

Una vez obtenidos los callos se les realizó un estudio histológico. Se tomaron muestras de los callos cultivados en los medios de cultivo estudiados; las mismas se fijaron en una solución fijadora FAA (Alcohol absoluto- Formaldehído- Ácido Acético Glacial) y se procesaron según la técnica descrita por Johansen (1940), hasta su inclusión en parafina. Los cortes se realizaron en un micrótopo manual, a 8 mm de espesor y se observaron en un microscopio óptico con aumento de 10X.

Establecimiento y multiplicación de las suspensiones celulares.

Los callos provenientes de hoja cultivadas en medio B5 (25 gMF.l^{-1}) se colocaron en el mismo medio líquido, con el objetivo de iniciar las suspensiones celulares. Se emplearon Erlenmeyers de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio de cultivo. Estos fueron colocados en una zaranda orbital a 110 rpm, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, durante 21 días.

Una vez obtenida la desagregación de los callos, las células en suspensión fueron filtradas por gasa (1 500 μm de diámetro de poro) y transferidas a Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio fresco, realizando subcultivos cada 21 días hasta el establecimiento de las mismas.

Con el objetivo de determinar la influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de las suspensiones celulares, estas fueron subcultivadas a los medios MS, B5 y SL-2 (Phillips y Collins, 1979); en todos los casos se utilizó una densidad inicial de inóculo del 2% de volumen de células sedimentadas (VCS).

La caracterización de las suspensiones se realizó evaluando el volumen de células sedimentadas (Schoofs, 1997) y la vitalidad de las células teñidas con Azul de Evans (% de células vivas).

Las evaluaciones se hicieron en días alternos, entre los días 0 y 24 después de iniciado el subcultivo. Al finalizar el experimento, se realizaron observaciones de la morfología celular en cada medio de cultivo, y se evaluó el número de células meristemáticas, parenquimáticas y gigantes presentes. Los conteos celulares y la clasificación de las células se efectuaron en cámara de Fuch-Rosental 0,2 mm de profundidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se observan los resultados obtenidos para la variable formación de callos, existiendo diferencias significativas para la interacción explante – medios de cultivo. En general se observa que en el medio de cultivo B5, se obtienen los mayores porcentajes de formación de callos al utilizar los explantes hojas e hipocotilos, así mismo correspondieron los valores más bajos al cultivar los explantes en el medio MS, el cual se destacó como el menos favorable para la callogénesis en la variedad estudiada.

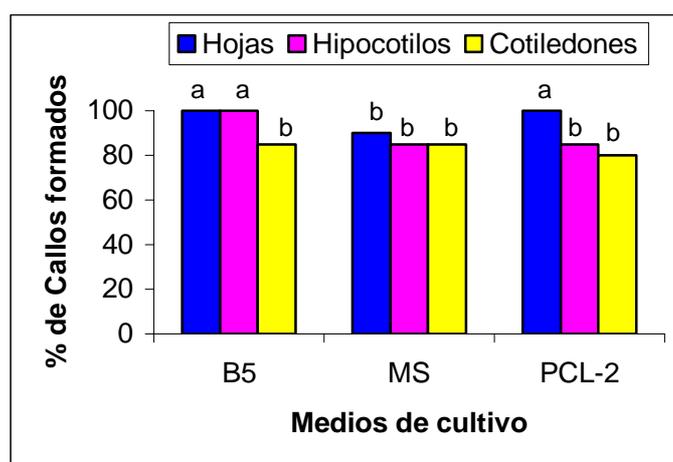


Figura 1. Efecto del explante y medio de cultivo sobre la formación de callos de soja cv. 'G7R- 315' (letras iguales no difieren significativamente entre sí para $p < 0,05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan).

Por otra parte, los resultados mostraron diferencias significativas entre los tipos de explantes y medios de cultivo utilizados en el crecimiento de los callos obtenidos. En la figura 2 se muestran los valores obtenidos del índice de crecimiento; se puede observar que, con el explante hojas, cultivadas en el medio de cultivo B5, se obtuvieron los mayores valores de crecimiento, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos estudiados.

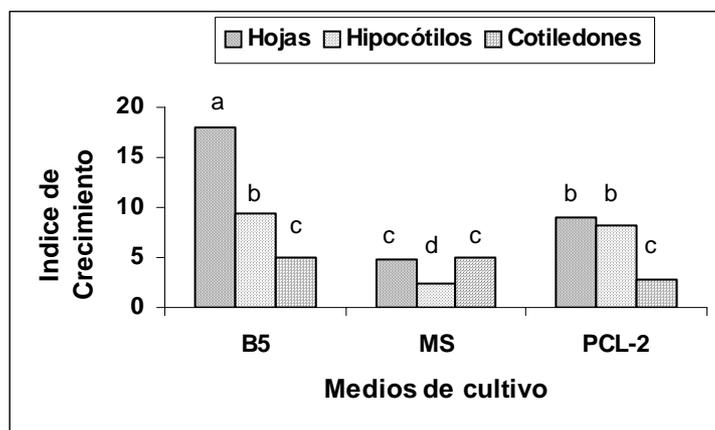


Figura 2. Efecto del explante y medio de cultivo sobre el crecimiento de callos de soya cv. 'G7R- 315' (letras iguales no difieren significativamente entre sí para $p < 0,05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan).

El comportamiento de los callos en cuanto a la coloración y consistencia fue similar en todos los explantes y medios de cultivo estudiados, los mismos se caracterizaron por presentar una superficie irregular, con estructura compacta de aspecto globular y una coloración de verde a verde carmelitoso; sin embargo, los callos obtenidos a partir de hojas fueron los únicos que presentaron gran cantidad de estructuras globulares.

En la figura 3 se pueden observar los porcentajes de callos formados que presentaron estructuras embriogénicas en los diferentes medios de cultivos utilizados, observándose que las mejores respuestas se obtienen en el medio mineral B5 donde el 95% de los callos presentaron estructuras embriogénicas, las cuales fallaron en su posterior desarrollo al ser subcultivadas a medios suplementados con diferentes reguladores del crecimiento, sufriendo un proceso reversible formando callos nuevamente.

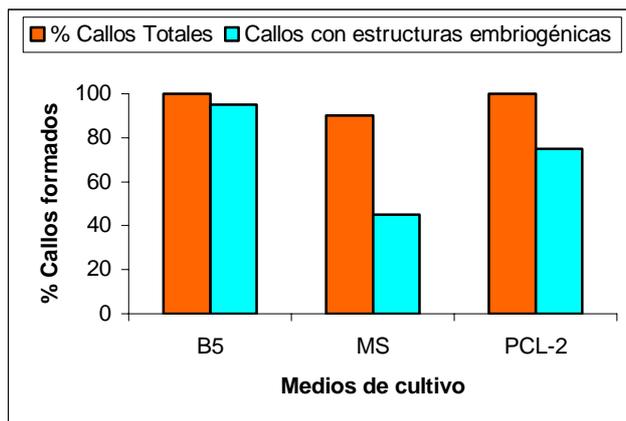
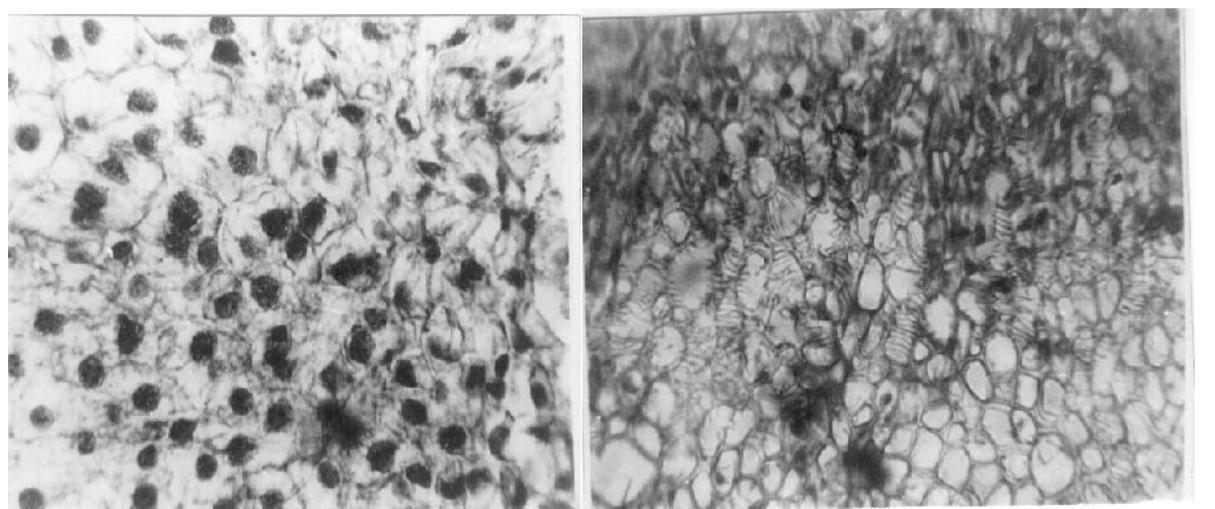


Figura 3. Efecto del medio de cultivo sobre la obtención de callos de soya con estructuras embriogénicas.

Los cortes histológicos mostraron que las células de los callos con estructuras embriogénicas obtenidos en medio B5, fueron isodiamétricas, con un gran núcleo central, formando centros meristemáticos (Figura 4a), y se observaron además células parenquimatosas y epidérmicas, así como gran cantidad de elementos traqueales (Figura 4b).



a) centros meristemáticos

b) células parenquimatosas y elementos traqueales.

Figura 4. Cortes histológicos realizados en callos de hojas cultivadas en medio de cultivo B5.

Se considera que los primordios de los órganos se originan a partir de pequeños grupos de células parenquimáticas que dan lugar a formaciones meristemáticas, las cuales agrupadas en los que se han denominado meristemoides, constituyen los centros de posterior proliferación celular, por lo que se les ha prestado especial atención en trabajos anteriores (Prede *et al.*, 2001).

Dodds y Roberts (1995) relacionan la diferenciación de nódulos vasculares, integrados por zonas de xilema y floema separadas por cambium, con los meristemoides y plantean que la diferenciación vascular puede adoptar la forma de hileras de elementos traquiales.

Establecimiento y multiplicación de las suspensiones celulares.

Al analizar el volumen de células sedimentadas (Fig. 5) se observó un mayor crecimiento en el medio de cultivo B5 (5 mL) que el obtenido en los medios MS y SL-2 (2,75 y 4,2 mL respectivamente). El medio de cultivo B5 fue utilizado por Gamborg *et al* (1968) para cultivos en suspensión de soya. El medio SL-2 tiene como característica que incrementa los niveles de Ca^{2+} y Mg^{2+} en comparación con el MS y B5, y ha sido utilizado en cultivo de tejidos de soya debido a que es muy efectivo para el crecimiento de las suspensiones celulares.

A pesar de que el medio MS es el que ha sido más ampliamente usado en los cultivos de células de soya, se obtuvo un menor incremento de la biomasa celular, lo que puede deberse al alto contenido de sales minerales que contiene, que causa en determinados momentos una inhibición del crecimiento celular (Mroginski y Roca, 1991).

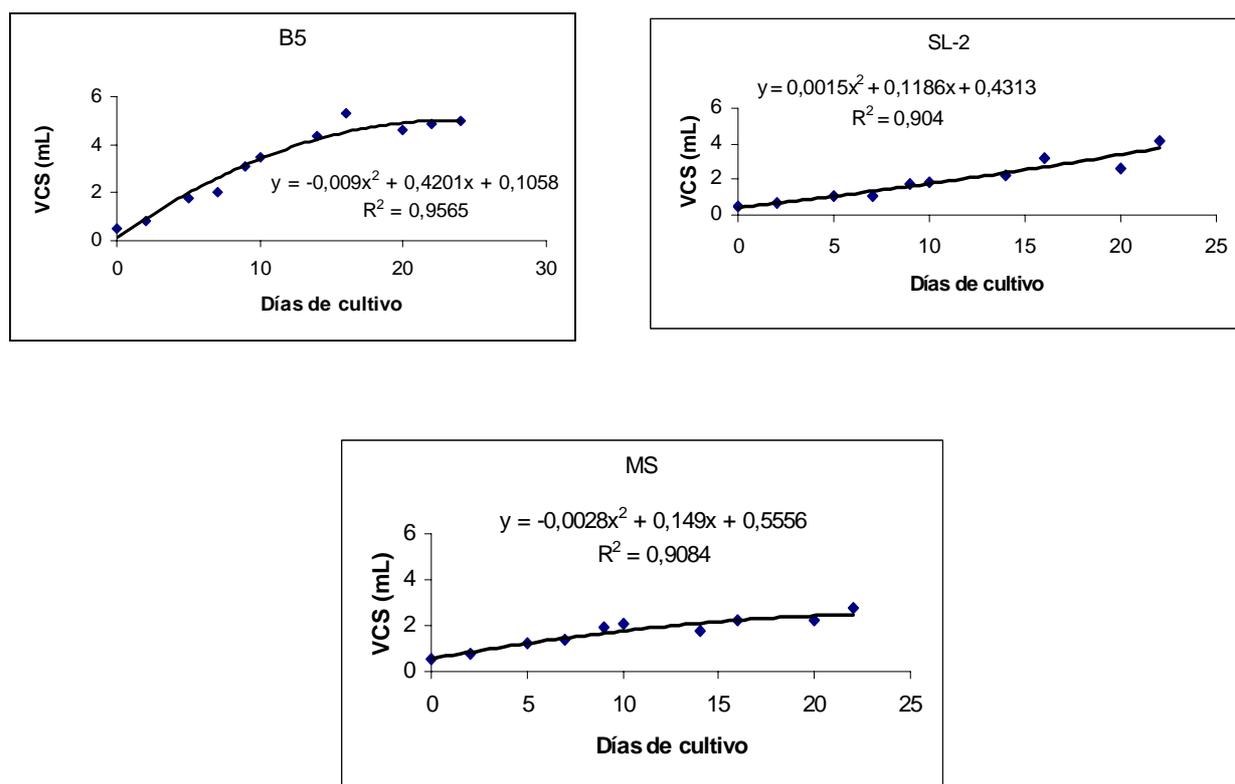


Figura 5. Comportamiento del volumen de células sedimentadas en suspensiones celulares de soya en diferentes medios de cultivo.

El medio de cultivo B5 mostró una fase de crecimiento exponencial más definida y continua, por el contrario de los medios MS y SL-2 que mostraron una fase de latencia o reposo más extendida, lo que pudo ser provocado por el empleo de medios de cultivo no adecuados para el óptimo crecimiento celular.

Si tenemos en cuenta que el subcultivo debe realizarse en la etapa de activa división celular, la cual coincide con la etapa exponencial del crecimiento, se hace evidente, al analizar los datos obtenidos, que para estas condiciones de cultivo es recomendable realizar los subcultivos entre los siete y diez días, por encontrarse las células en plena división celular (fase de crecimiento exponencial), y con una vitalidad alta. Esta última variable se comportó durante todo el período de cultivo similar en todos los medios estudiados y oscila entre valores de 60 y 85 %, después del momento máximo para el subcultivo, se observaron células alargadas y con escasos granulos de almidón, lo cual esta dado por la disminución de los nutrientes y las sustancias reguladoras del crecimiento en el medio de cultivo, particularmente el 2,4-D, que causa agrandamiento de las células y vacuolización (Niubó *et al.*, 2000).

El estudio de la morfología celular se hace necesario, ya que el tipo de células esta estrechamente relacionado con el grado de diferenciación celular y con su totipotencia. En este estudio se observó que, en los medios MS y SL-2, predominan las células meristemáticas, que, potencialmente, son las capaces de formar estructuras embriogénicas (Tabla 1). La proliferación de células meristemáticas se considera un aspecto importante cuando se desea establecer un sistema de regeneración de plantas vía embriogénesis somática, ya que se asegura una mayor conversión de este tipo de células a células embriogénicas y su posterior desarrollo.

Tabla 1.Efecto de los medios de cultivo sobre las características de las células y agregados celulares. (letras iguales no difieren significativamente entre sí para $p < 0,05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan).

Medio de cultivo	Agregados celulares (%)	Células (%)		
		meristemáticas	parenquimatosas	gigantes
MS	73	53 a	30 ns	17 b
B5	26	18 b	32 ns	50 a
SL-2	57	55 a	33 ns	12 b

El crecimiento celular en el medio MS se lleva a cabo en forma de agregados celulares con pocas células simples, a diferencia de las células en el medio SL-2, que crecieron más desagregadas.

En el caso del medio B5, durante todo el período de subcultivo predominaron las células simples, grandes y arriñonadas, lo que indicó una menor capacidad de regeneración de las mismas, por lo que puede deducirse que no siempre un intenso crecimiento va acompañado de una conservación de la totipotencia, pues a veces sucede, como en el medio B5, que el mayor crecimiento fue acompañado de un mayor volumen celular, con un aumento de la especialización de las células y la pérdida de su capacidad morfogénica.

REFERENCIAS

- Cevallos, AM 2000.** Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del caféto (*Coffea* spp.) mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.
- Dodds, JH y Roberts LW 1995.** Experimental: callus and callus derived systems. En: Dodds, JH y Roberts LW. Experiments in plant tissue culture. Third editio+n. Cambridge University Press, 67-81.
- Gamborg, OL, Miller RA y Ojima K 1968.** Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res., 50: 151- 158.
- Hodge, JE y Hofreiter BT 1962.** Dermination of reducing sugar and carbohydrates. En: Methods in carbohydrate chemistry. Whistler RL y Wolfrom ML (eds.) Vol. 1, 380 p. Academic Press.
- Jay, V, Genestier S y Courduroux JC 1994:** Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36: 205-209.
- Jin, H, Hartman GL, Huang YH, Nickell CD y Widholm JM 1996:** Regeneration of soybean plants of *Fusarium solani* and screening of regenerants for resistance. Phytopathology, 86: 714-718.
- Johansen, DA 1940:** Plant microtechnique, 503 p, Mc Graw-Hill Book Company. New York and London.
- López, J, Montano N, Swennen R, Ventura J, Schoofs H, Medero V, García M, del Sol E y Cabrera M 2000:** Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB). Biotecnología Vegetal, 1: 59 – 62.
- Martínez, M, Montes S, Rojas R y Santana N 1994:** Evaluación y crecimiento de callos en especies de café, *Coffea canephora* (var. Robusta) y *Coffea arabica* (var. 9722) en tres medios de cultivo. Cultivos Tropicales, 15 (2): 80-83.
- Mroginski, LA y Roca W. 1991:** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca W y Mroginski LA (eds) , pp 173- 210, CIAT.
- Murashige, T y Skoog F 1962:** A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473- 497.
- Niubó, E, Maribona R y Sánchez C 2000:** Caracterización morfométrica de una línea celular de caña de azúcar. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 31 (3): 173-176.
- Ozawa, K, Ling DH y Komamine A 1996:** High frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured clusters of cells of interspecific hybrid of *Oryza*. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 46: 157-159.
- Pattnaik, S, Pradhan C, Naik SK y Chand PK 2000:** Shoot organogenesis and plantlet regeneration from hypocotyls-derived cell suspensions of a tree legume, *Dalbergia sissoo* Roxb. *In vitro* Cell Dev. Biol. – Plant, 36: 407- 411.
- Phillips, GC y Collins GB 1979:** *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of Red Clover. Crop. Sci., 19 (1): 59-64.
- Phillips, GC y Collins GB 1981:** Induction and development of somatic embryos from cell suspension cultures of soybean. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 1 (2): 123-129.
- Prede, ML, Rodríguez JB, Rodríguez L y Coronado Y 2001:** Efectividad de medios de cultivo y evidencia histológica de la morfogénesis *in vitro* durante la callogénesis en arroz (*Oryza sativa* L). Rev. Jardín Bot. Nac., 22 (2): 261- 269.

Preil, W 1991: Application of bioreactors in plant propagation. En: PC Debergh y RH Zimmerman (eds.) Micropropagation, pp 425-445, Kluwer Academic Publishers.

Samoylov, VM, Tucker DM y Parrot WA 1998: A liquid medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures. Plant Cell Rep., 18: 49-54.

Trick, HN, Dinkins RD, Santarem ER, Di R, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrot WA, Finer JJ y Collins GB 1997: Recent advances in soybean transformation. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 3 (1): 9- 26