

Regeneración de las plantas a partir de suspensiones y callos celulares por los métodos de cultivo de tejido

J. DEL SOL

Dpto. de Farmacología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 18 de diciembre de 1981

Recibido: 13 de enero de 1982

ABSTRACT. Cell callus formation by tobacco tissue culture and isolation of cell suspensions from this callus in liquid medium were studied. The plant regeneration ability of both cell lines was evaluated by "in vitro" organogenesis. Callus and cells suspensions cultures with adequate growth velocities were obtained. This cell lines have been kept alive for more than 6 months. In both cell lines, induction of organogenesis and plant regeneration "in vitro" was possible. The plants isolated have been growing normally after transfer to the greenhouse.

RESUMEN. Se estudió la formación de callos celulares por cultivo de tejido de tabaco y se ensayó la obtención de suspensiones celulares en medio líquido a partir de los callos obtenidos. Ambas líneas celulares fueron evaluadas en su capacidad de regenerar plantas por organogénesis. Se lograron callos y suspensiones celulares con adecuada velocidad de crecimiento en cultivo. Estas líneas celulares se mantuvieron vivas por más de 6 meses. En ambas líneas celulares, se logró la inducción de la organogénesis y la regeneración de plantas "in vitro" que han crecido normalmente al pasarlas a tierras.

INTRODUCCION

Cuando un tejido de plantas superiores se cultiva "in vitro" en un medio apropiado da lugar a un callo celular en un gran número de especies¹. Este fenómeno en particular en tabaco ha sido bien estudiado². Los callos celulares resultantes en tabaco son friables en determinados estadios de crecimiento y al pasarlos a medio líquido se disgregan sus células, y por agitación continua, es posible establecer suspensiones celulares de rango de una a cientos de células estables³. Estas suspensiones celulares pueden llevarse a escala de fermentadores y de tanques industriales.

Lo anterior posibilita disponer por primera vez en plantas de un sistema homólogo al de microorganismos, sobre el que pueden emplearse los esquemas tradicionales de mejoramiento genético y bioquímico. Podemos, por tanto, obtener líneas de células resistentes a enfermedades, hiperproductoras de determinados metabolitos, etc.⁴⁻⁶.

Para aprovechar y comprobar las propiedades observadas en las líneas celulares es necesario, regenerar plantas de las mismas. Esto es posible por el hecho de que a partir de células de plantas se puede, por combinación de hormonas del crecimiento, inducir la formación de hojas y raíces (organogénesis) o directamente inducir la formación de embriones de plantas (embriogénesis). A esta propiedad específica a las plantas se denomina totipotencia.

La totipotencia de callos celulares en suspensión se puede perder después de mucho tiempo en condiciones de cultivo¹.

El objetivo de este trabajo fue el establecimiento de callos y suspensiones celulares de tabaco por los métodos de cultivo de tejido y la regeneración de plantas de los mismos por la vía de la organogénesis, después de varios meses del establecimiento de las líneas celulares.

MATERIALES Y METODOS

Obtención y propagación de plantas en condiciones estériles. Semillas de *Nicotiana tabacum* de la variedad comercial Corojo, fueron esterilizadas durante 30 minutos con hipoclorito comercial diluido 1:1 en agua. Se lavaron 2 veces con agua estéril y fueron distribuidas sobre medio RM (Tabla I) en pomos de 500 ml con tapas metálicas. (A partir de este paso, todas las operaciones a menos que se indique fueron realizadas estérilmente). Los pomos fueron colocados a 25°C con una iluminación de 4000 luxs hasta la germinación. Plántulas germinadas de 2 cm de alto, fueron transferidas individualmente a medio RM en pomos cuyas tapas fueron horadadas y selladas con algodón, para facilitar la respiración. Las plantas de 8-12 cm así obtenidas, fueron extraídas, y sus yemas terminales y axilares cortadas de las hojas y tallos.

Dos yemas fueron introducidas en el agar de cada pomo conteniendo medio RM, de forma que el punto de crecimiento quedara hacia arriba. Las plantas resultantes de estas yemas sirvieron como fuente de tejido y como fuente de yemas para continuar la propagación por esta vía.

TABLA I

Medios de cultivos empleados

Compuesto	RM	Concentración en mg/l		RMO
		RMNO	RMPG	
NH_4NO_3	1650	1650	1650	1650
KNO_3	1900	1900	1900	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	655	655	655	655
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370
KH_2PO_4	170	170	170	170
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8	27,8
EDTA	37	37	37	37
H_3BO_3	6,2	6,2	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6	8,6
KI	0,83	0,83	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025
$\text{Co} + \text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025
Meso-inositol	100	100	100	100
Glutamina	—	—	200	—
Tiamina	1,0	10,0	1,0	—
Kinetina	—	0,04	0,1	0,5
Acido Indolacético	—	3,0	—	2,0
Acido 2,4, diclorofenoxiacético	—	0,1	0,1	—
Agar No. 3	8000	8000	—	8000
pH	5,8	5,8	5,8	5,8

Esterilizar 25-30 minutos a 0,7 atmósferas

Obtención de callos celulares. Hojas de 2-3 cm de largo fueron extraídas de plantas crecidas durante 30-40 días en pomos de 500 ml. Se cortaron en piezas de 0.5-1 cm² y se depositaron sobre el medio agar RMNO (Tabla I) en tubos de ensayos. Porciones de 100-200 mg de los callos resultantes, fueron transferidos a medio RMNO fresco cada 30 días. Estos agregados celulares friables, sirvieron para iniciar suspensiones celulares y regenerar plantas directamente de los mismos.

Obtención de suspensiones celulares. Aproximadamente 500-800 mg de callos celulares fueron transferidos a erlenmeyers de 500 ml conteniendo de 50-80 ml de medio líquido RMPG (Tabla I). Los frascos fueron colocados en una zaranda reciprocante a 60 rpm y 30°C en la oscuridad. Cada 20 días se dejaron reposar 10-20 minutos y los agregados celulares fueron desechados de la suspensión por decantación a otros frascos de 500 ml estériles. Se adicionó el volumen de medio RMPG necesario y se colocó en las mismas condiciones.

Regeneración de plantas a partir de callos celulares. Porciones de 50-100 mg de callos fueron pasados a medio RMO (Tabla I) en erlenmeyers de 100 ml. Se colocaron a 25°C y 5000 lux hasta la inducción de múltiples plántulas sin raíces. Estas plántulas fueron extraídas y sus yemas terminales cortadas como anteriormente y transferidas a frascos de 500 ml conteniendo medio RM.

Las plantas resultantes de las yemas, fueron transferidas a tierra estéril después de desarrollar un buen sistema radical. Estas plantas se dejaron en condiciones artificiales de 25°C y 5000 lux de iluminación durante una semana con suministro diario de agua y fueron trasladadas a un vivero con luz natural atenuada y regadío diario.

Regeneración de plantas de suspensiones celulares. Aproximadamente 5 ml de la suspensión celular en fase exponencial de crecimiento fueron transferidos sobre la superficie del medio RMPG solidificado con 0,8% de agar en placas Petri. De cada célula o agregado celular resultaron colonias semejantes a las microbianas, cuyo crecimiento ulterior cubrió toda la superficie de las placas de callos celulares semejantes a los obtenidos de tejido de tabaco. De estos callos se regeneraron plantas por la misma vía descrita anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Plantas en condiciones estériles. Se confrontaron problemas con la esterilización directa del tejido a usar para la formación de callos celulares, dado que el hipoclorito comercial empleado resultó tóxico para el tejido. Por ello se decidió esterilizar las semillas que son más resistentes al hipoclorito y propagar el semillero obtenido. Las plantas resultantes de esta forma, fueron propagadas vegetativamente. Después de sembrar las yemas en medio RM, a los 20-25 días resultaron plantas de 8-10 cm (Fig. 1) con un sistema radical vigoroso. Este proceso se repitió durante 5 generaciones sin cambios morfológicos ni de velocidad de crecimiento apreciables.

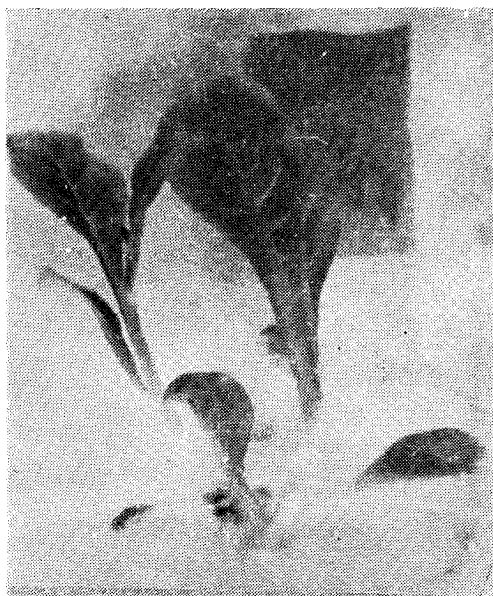


Fig. 1. Plantas regeneradas de yemas terminales de crecimiento.

Callos celulares. Después de 15 días de cultivo más del 20% del tejido formaba agregados celulares. A los 40 días la callosidad celular cubría todo el tejido inicial, realizándose el primer pase a medio nuevo. Los pases siguientes fueron realizados cada 30 días. Durante este tiempo el

volumen inicial del callo celular aumentó de 5 a 8 veces. La mayor velocidad de crecimiento se observó después de 15 días del pase. En este estado, una masa celular friable de color carmelita blanquecino se produjo (Fig. 2). Esta línea celular se ha conservado viva durante 8 meses.

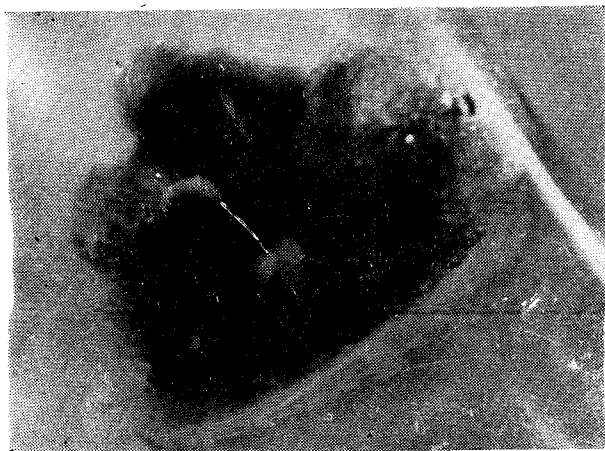


Fig. 2. Callos celulares después de 15 días de cultivo.

Suspensiones celulares. Después de 12 a 15 días del inóculo del callo celular en medio líquido era apreciable el aumento de turbidez en los frascos en agitación. La Fig. 3 muestra la curva de crecimiento obtenida para las suspensiones celulares. Se observa que entre los 18 y 20 días se alcanza la fase estacionaria por cuya razón, los cambios a medio del cultivo se realizaron cada 20 días.

Las células y agregados celulares resultantes (Fig. 4) tienen una morfología similar a la reportada en la literatura¹, observándose células en división. Sin embargo, debido a que las condiciones de agitación no fueron las idóneas (zaranda rotatoria a 100-150 rpm) el tiempo de duplicación celular calculado de la curva de crecimiento fue de 72 horas cuando debía esperarse de 24 a 48 horas de acuerdo con la práctica. No obstante, los rendimientos celulares en el orden de $2-3 \times 10^6$ células/ml corresponden a lo esperado.

Regeneración de plantas. Los callos celulares pasados a medio RMO después de 5 meses de cultivo aumentaron en volumen inicialmente y a

los 15 días aparecieron puntos verdes en su superficie. De estos puntos surgieron múltiples plántulas sin raíces que a los 30 días cubrían toda la superficie del frasco. De las yemas de estas plántulas primordiales resultaron plantas más vigorosas que desarrollan raíces a los 15-20 días de cultivo. Estas plantas al alcanzar un tamaño de 8-10 cm fueron pasadas a tierra.

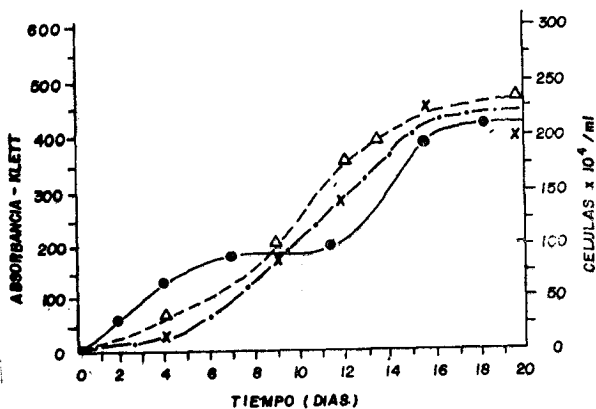


Fig. 3. Curva de crecimiento de la suspensión celular. \times y \bullet : Absorbancia de las muestras, Δ : Concentración celular.



Fig. 4. Células libres y agregados de la suspensión celular.

La Fig. 5 muestra las plantas obtenidas de callos celulares después de 3 meses de pasadas a tierra. El crecimiento de éstos ha sido un poco retardado en relación a las plantas normales posiblemente por las manipulaciones efectuadas. La morfología sin embargo, es similar a los controles. Pruebas en cuanto a germinación y características genotípicas, quedan por realizar.



Fig. 5. Plantas regeneradas por cultivo de tejido de callos celulares, pasadas a tierra.

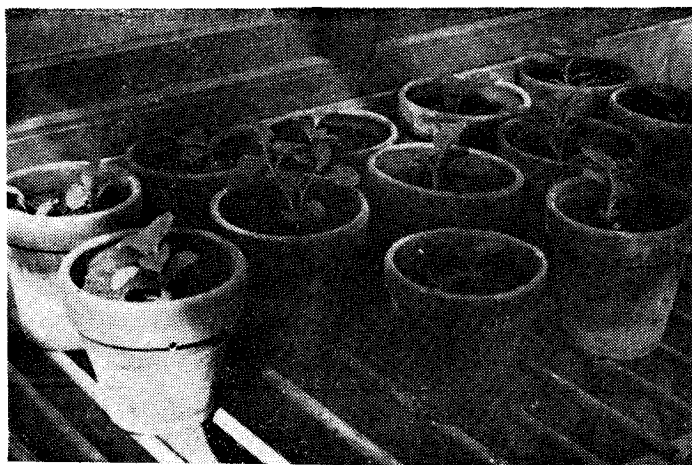


Fig. 6. Plantas regeneradas a partir de suspensiones celulares pasadas a tierra.

Las plantas regeneradas de suspensiones celulares mostraron un desarrollo similar a las anteriores. El paso crítico en este caso fue obtener primero el callo celular de las suspensiones. Estos callos fueron obtenidos después de distribuir las células de la suspensión celular sobre medio agar. A los 15 días se formaron pequeñas colonias celulares de cada célula o agregado celular y a los 40 días, todas las placas Petri estaban cubiertas por el callo celular derivado por divisiones sucesivas de estas colonias. De estos callos celulares se regeneraron las plantas.

La Fig. 6, muestra las plantas regeneradas a partir de suspensiones celulares después de 1 mes de pasadas a tierra. Estas plantas fueron regeneradas de suspensiones celulares iniciadas 4 meses antes. Es conocido que después de prolongados cultivos, estos sistemas pierden la capacidad de regeneración de plantas o se obtienen plantas atrofiadas en su germinación o morfología⁶. Sin embargo, en nuestras condiciones para suspensiones con esa vejez, se observaron plantas de morfología y vitalidad semejante a las plantas obtenidas por la vía tradicional.

CONCLUSIONES

Este sistema que brinda la posibilidad de desarrollar a partir de tejidos de tabaco, callos y suspensiones celulares y de éstos inducir y regenerar plantas completas, puede ser empleado en la búsqueda de nuevas variedades por los métodos de cultivo de tejido en nuestro país.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Pal Maliga, del Centro Biológico de Szeged, Hungría, por suministrarnos gentilmente la composición de los medios de cultivo utilizados.

REFERENCIAS

1. STREET H. E. Cell (suspension) cultures-technique. In: "Plant tissue and cell culture 61-102. Ed H. E. Street. Blacwell Scientific Publication. Oxford London. Edinburgh-Melbourne, 1977.
2. BERMAN CHRIS. N. Z. *Pflanzenphysiol.* 82, 322, 1977.
3. NATO A. S. Bazeteux and Mathieu. *Physiol. Plant.* 41, 116, 1977.

4. MALIGA P. Isolation of mutants of Higher Plants (Eds D. Dudits, G.L. Farkas and P. Maliga). Budapest Publishing House Hungariam Academy of Sciences, 1976.
5. KRISHNAMURTHY M. AND HASKAI J. *Proc. Congr. Int. Soc. Sugar Cane Technol. (South Africa)* 15, 130, 1974.
6. CARLSON P. S. *Science, N.Y.* 180, 1366, 1973.