

Producción de biomasa y capacidad de rediferenciación en cultivos *in vitro* de caña de azúcar sometidos a estrés por cloruro de sodio y kanamicina

Juana Juárez Muñoz, ✉ Guillermo Carrillo-Castañeda

Colegio de Postgraduados, IREGEP, Montecillo, México 56230, México.

E-mail: carrillo@colpos.colpos.mx

RESUMEN

La capacidad de desarrollo y de diferenciación celular es una característica fenotípica propia de cada organismo y está fuertemente influenciada por el ambiente. En condiciones adversas, esta potencialidad se restringe y la capacidad de desarrollo que muestran ciertos individuos para rebasar este obstáculo puede depender en gran medida de la organización de la expresión de la información genética involucrada. Cultivos desdiferenciados de caña de azúcar cultivados durante 3 ciclos consecutivos en estrés impuesto por dos condiciones experimentales muy diversas: la presencia de NaCl o del antibiótico kanamicina en el medio, ambos actuaron con el mismo patrón de respuesta. En el primer y segundo ciclos se observó una franca inhibición de la producción de biomasa, que se acentuó en el segundo ciclo. En el tercer ciclo, se observó un franco restablecimiento de los cultivos al detectarse producción de biomasa en los cultivos desarrollados en presencia de 0,8% p/v de NaCl o de 25 µg/mL de kanamicina. Estos valores representaron el 56 y 50% respectivamente de la producción de biomasa de los cultivos desarrollados simultáneamente en un medio libre de estos compuestos. La capacidad de rediferenciación también fue afectada. La kanamicina inhibió el desarrollo del sistema radical de las plántulas y del pigmento verde mientras que la sal tuvo un efecto menos severo. Para asegurar óptimos procesos de micropropagación y de transformación genética de plantas puede ser importante contar con este tipo de genotipos.

Palabras claves: Callo, inducción de brotes, antibióticos, sal

Biotecnología Aplicada 2003;20:155-159

ABSTRACT

Biomass production and redifferentiation capacity of *in vitro* sugarcane cultures grown under stress by sodium chloride and kanamycin. Cell growth and redifferentiation are two specific phenotypic traits which are strongly influenced by the environment. Under stress conditions these potentialities are restricted and the abilities that show certain individuals to circumvent this obstacle may depend on their specific genetic information, its organization, and expression. Sugarcane dedifferentiated cultures incubated along three growth cycles under stress condition imposed by the presence of NaCl or kanamycin in the medium showed the same pattern of response. In the first and second stages a clear growth inhibition was observed, which in the second stage was more severe. In the third stage, they showed a clear cell growth re-assumption. In the presence of 0.8% w/v of NaCl or 25 µg/mL of kanamycin, the biomass production of these cultures reached 56 and 50% respectively of the biomass production of simultaneously grown cultures but in NaCl and kanamycin-free media. Shoot induction capability of the stressed cultures was also affected. Kanamycin inhibited root development and the green pigments production of the plantlets; however, NaCl affected in much less extent. In biotechnology, these kind of genotypes might be useful to ensure highly efficient plant micropropagation and plant transformation processes.

Key words: Callus, shoot induction, antibiotic, salt

Introducción

La nueva industria cañera requiere de mayores niveles de producción y diversificación de productos para ser más competitiva. Las mejoras de sus procesos deben iniciarse con óptimos rendimientos de campo, continuar con procedimientos que logren altos niveles de recuperación del dulce, de los otros componentes del jugo y terminar no únicamente con alta producción de azúcar sino también con la obtención de productos que son requeridos o factibles de colocar en el mercado como son: 1. el alcohol anhidro es empleado para combustible de automóviles [1]. En Brasil su utilización va en aumento pues recientemente ya se ha decidido incrementar a 24% la proporción de alcohol en el combustible para vehículos, debido a la mayor producción de caña [2]. 2. el bagazo es utilizado para la producción de energía eléctrica [3-6] y el incremento en su utilización depende, en parte, del perfeccionamiento de los sistemas de combustión que deben ser

procedimientos más limpios, para no afectar significativamente el ambiente [7].

Nuevas estrategias se requieren para poner en práctica programas dinámicos de diversificación en esta industria y, a la fecha, existen resultados que deben ser adoptados para generar sistemas metodológicos de selección apropiados [8-14].

Es importante, desde el punto de vista biotecnológico, identificar y contar con una serie de fenotipos de caña de azúcar de extraordinaria potencialidad tanto de desarrollo a nivel celular como de regeneración de brotes (totipotencia). Para identificar dichos fenotipos, es aplicable la estrategia de exponer los cultivos a condiciones de estrés y bajo estas condiciones determinar la capacidad de expresión de dichas potencialidades [15]. De esta manera, se asegura y facilita la identificación y la selección de los clones de mayor capacidad de acuerdo a la presión de selección impuesta. Desde

1. Kaar WE, Gutiérrez CV, Kinoshita CM. Steam explosion of sugar cane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass Bioenergy* 1998;14:277-87.

2. World sugar news. Brazil to increase alcohol in gasoline. *Sugar y azúcar* 2001;96:8-10.

3. Beeharry RP. Extended sugarcane biomass utilization for exportable electricity production in Mauritius. *Biomass Bioenergy* 1996;11:441-9.

4. Jorapur R, Rajvanshi AK. Sugarcane leaf-bagasse gasifiers for industrial heating applications. *Biomass Bioenergy* 1997;13:141-6.

5. Kapur T, Kendpal TC, Garg HP. Electricity generation from rice husk in Indian rice mills: potential and financial viability. *Biomass Bioenergy* 1998;14:573-83.

el punto de vista metodológico, contar con estos fenotipos asegura la generación de nuevos cultivos y la propagación comercial de la planta. En un trabajo previo se logró con éxito diferenciar, en un período de 30 días de cultivo *in vitro*, plántulas de caña de azúcar de rápido desarrollo, comportamiento que ha concordado con la característica de precocidad de este cultivo en campo (resultados no mostrados).

El presente estudio se ha llevado a cabo con el propósito de caracterizar el patrón de desarrollo de callos (células desdiferenciadas) y la capacidad de regeneración de brotes a partir de cultivos desdiferenciados de caña de azúcar expuestos a condiciones de estrés impuestas por la presencia de NaCl o del antibiótico kanamicina. Se utilizaron como criterios de evaluación las capacidades de producción de biomasa y de regeneración de plántulas.

Materiales y métodos

Se utilizaron plantas de *Saccharum* sp (caña de azúcar) de la variedad Z- Méx. 55-32 de 8 a 10 meses de edad de ciclo plantilla proporcionadas por el Campo de Investigaciones Forestales Agropecuarias de Morelos (CIFAP-MOR).

Los medios de cultivo empleados fueron: el 5MS que contenía los compuestos inorgánicos del medio de Murashige y Skoog [16] y en cantidades por litro y medio: meso inositol, 100 mg; tiamina, 1 mg; sacarosa, 30 g; agua de coco, 180 mL; 2, 4- diclorofenoxiacético (2,4-D), 5 mg. Una serie de medios contenían kanamicina (25, 50 ó 100 mg/mL) y otra NaCl (0,5, 0,8 ó 1,2% p/v). El medio MSO, fue el 5MS sin 2,4-D. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 y fueron solidificados con 4 g de agar. Los medios fueron esterilizados en autoclave de vapor (1,05 Kg cm⁻²) durante 15 mins. El antibiótico se utilizó en su presentación comercial estéril, para agregarlo a los medios después de esterilizarlos.

Procedimiento 1. Establecimiento de cultivos desdiferenciados (callos) de caña de azúcar a partir de tejido de tallo. Para este caso se llevó a cabo el procedimiento descrito por Méndez y Carrillo [17]. Los cultivos fueron establecidos en el medio 5MS y cultivados en oscuridad a 28 ± 2 °C durante 3 subcultivos consecutivos de 30 días cada uno para obtener los cultivos de células indiferenciadas de caña de azúcar (callos).

Procedimiento 2. Determinación de la producción de biomasa. A partir del momento en que segmentos de callo (obtenidos mediante el procedimiento 1) fueron transferidos a los medios que tenían kanamicina o NaCl, como suplemento, estos cultivos fueron incubados (en las mismas condiciones descritas) durante tres subcultivos consecutivos de 20 días cada uno en el medio respectivo. Diez cultivos fueron utilizados por condición experimental en cada uno de los 3 experimentos independientes efectuados. La evaluación del desarrollo de los cultivos se hizo determinando el peso de materia fresca (biomasa), al término de cada uno de los tres subcultivos. Para cada variable se hizo el análisis de varianza mediante un diseño experimental completamente al azar. La comparación de medias fue por la prueba de Turkey ($\alpha = 0,05$).

Procedimiento 3. Inducción de la formación de brotes en los callos (obtenidos mediante el procedimiento 1) expuestos a las condiciones de estrés impuestas

por la presencia de NaCl o kanamicina. En este caso los callos (obtenidos mediante el procedimiento 1), fueron transferidos al medio MSO suplementado con kanamicina (25 a 100 mg/mL) o NaCl (0,5 a 1,2%) y se incubaron a 28 ± 2 °C, con fotoperíodo de 16h luz durante un único período de 30 días. Al término de este período, el número, tamaño y coloración de las plántulas rediferenciadas en estos callos fue determinado. Tres experimentos independientes fueron realizados y los resultados consignados corresponden al promedio de éstos.

Resultados

Determinación de la capacidad de desarrollo de cultivos de células desdiferenciadas en presencia del antibiótico kanamicina y de NaCl

Para determinar el efecto de estos compuestos fueron empleados cultivos de células desdiferenciadas de *Saccharum* sp. de 90 días de cultivo porque ya en éstos no quedan restos visibles del explante inicial. La producción de biomasa, peso de materia fresca, fue determinada al término de cada uno de tres subcultivos consecutivos de 20 días cada uno. En la Figura 1A puede observarse que al final del primer y segundo ciclo de cultivo el peso de materia fresca disminuyó en relación con la presencia y concentración del antibiótico kanamicina en el medio, sin embargo, al final del tercer ciclo la producción de biomasa se incrementó aunque únicamente en aquellos cultivos desarrollados en presencia de la menor cantidad de antibiótico, respuesta que demuestra una franca recuperación del desarrollo. El efecto del NaCl en la producción de biomasa en los cultivos de *Saccharum* también mostró un patrón de comportamiento similar al anterior. Durante el primer periodo en los cultivos desarrollados en presencia de cada una de las concentraciones de NaCl se observó disminución de la producción de biomasa cercana al 50%; sin embargo, en el tercer periodo, únicamente en los cultivos desarrollados en presencia de 0,8% de NaCl se detectó incremento considerable de producción de biomasa que correspondió a 56% de la producción de biomasa de los cultivos desarrollados simultáneamente en ausencia de NaCl (Figura 1B). En presencia de concentraciones mayores de sal, los cultivos ya no se desarrollaron a diferencia de lo que ocurrió en aquellos desarrollados en presencia de kanamicina.

El análisis estadístico de estos resultados mostró que en el tercer ciclo y en el caso de la menor concentración de kanamicina, hubo menos reducción en la producción de biomasa y una clara tendencia a la recuperación del desarrollo. En el caso de NaCl la diferencia no es significativa aun a la menor concentración probada.

Efecto del antibiótico kanamicina y de NaCl en la capacidad de diferenciación de células desdiferenciadas de *Saccharum* sp

Para el análisis del efecto de estos agentes estresantes en el proceso de rediferenciación, los callos de 90 días cultivados en el medio 5MS libre de estos agentes, fueron expuestos a la acción de la sal y la kanamicina y la evaluación de los resultados fue efec-

6. Facts about sugar. Spain's Fenosa to build power plants with Sugar Co. Sugar y Azúcar 2000;95:13.

7. Kinoshita CM, Turn SQ, Overend RP, Bain RL. Power generation potential of biomass gasification systems. J Energy Engineering 1997;123:88-99.

8. Liu MC, Chen WH. Histological studies on the origin and process of plantlet differentiation in sugarcane callus mass. Plant Breeding 1974;15:118-29.

9. Nadar HM, Soeprapto S, Heinz DJ, Ladd SL. Fine structure of sugarcane (*Saccharum* sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. Crop Sci 1978; 18:210-6.

10. Bonnel E, Demarly Y, Essad S. Anatomical development of leaf tissues of sugarcane (*Saccharum* sp.) cultured *in vitro*. Can J Bot 1983;61:830-6.

11. Chaffey N, Barnett J, Barlow P. A cytoskeletal basis for wood formation in angiosperm trees: the involvement of cortical microtubules. Planta 1999;208: 19-30.

12. Zhu JJ, Albert HH, Moore PH. Differential expression of soluble acid invertase genes in the shoots of high-sucrose and low-sucrose species of *Saccharum* and their hybrids. Aus J Plant Physiol 2000; 27:193-9.

13. Carrillo-Castañeda G, Guillen AH, Cárdenas SE. Differentiation of sugarcane cultivars for bioenergy using microscopy and tissue culture. Biotecnol Apl. 2002;19:30-33.

14. Carrillo-Castañeda G, Mata A. Succession of esterase and peroxidase isozymes associated with the *in vitro* sugarcane tissue dedifferentiation and shoot induction. Biotecnol Apl 2000;17:225-30.

15. Fieldes MA, Gerhardt KE. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. Plant Sci 1998;132: 89-99.

16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 1962;15:473-97.

17. Méndez SR, Carrillo-Castañeda G. Establecimiento de citocultivos e inducción de diferenciación en dos variedades de *Saccharum* sp. Agrociencia 1980;42:59-67.

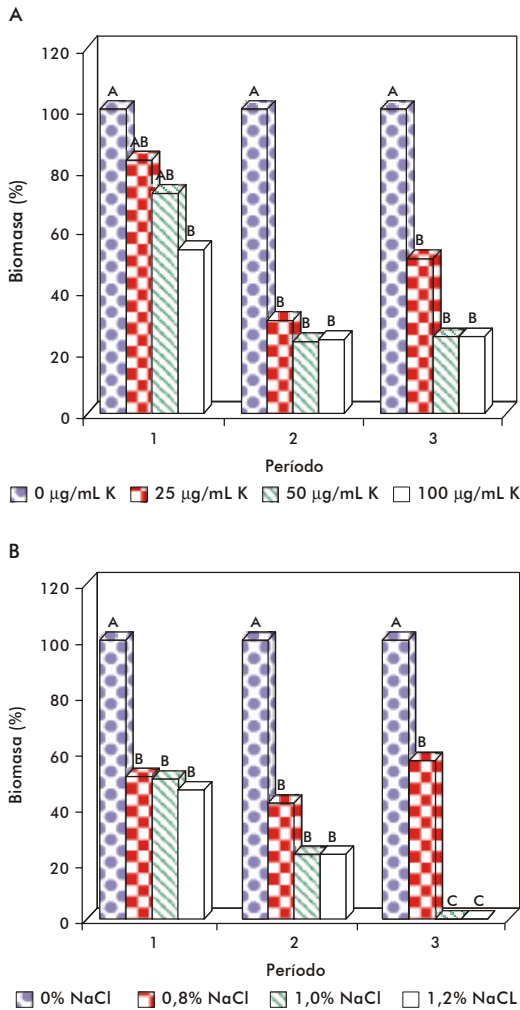


Figura 1. Efecto de la producción de biomasa en cultivos de *Saccharum* sp. variedad Z-Mex. 55-32 desarrollados en presencia de kanamicina (0 a 100 µg/mL) (A) y de NaCl (0 a 1,2% p/v) (B).

tuada al término de un período de 30 días de incubación. En el proceso de diferenciación de los callos de caña de azúcar, se encontró que a las concentraciones del antibiótico kanamicina probadas de manera específica se inhibía la diferenciación de la raíz de las plántulas regeneradas en estas condiciones (Tabla 1, Figura 2). Así mismo, la potencialidad de regeneración de plántulas en estos callos disminuyó hasta en 89% con respecto a la regeneración de plántulas con raíz obtenidas en el medio sin antibiótico que fue de 72%. Mediante una apreciación visual de estas plántulas, se encontró que el antibiótico indujo una apariencia clorótica de las mismas, que pudo resultar de una mayor degradación o una disminución en la síntesis de pigmentos (clorofilas). También interfirió con la capacidad de desarrollo de las plántulas regeneradas en estas condiciones. Estas plántulas solo alcanzaron en promedio 1 cm de longitud a los 30 días de incubación, mientras que en el medio sin antibiótico se obtuvieron como promedio plántulas de hasta 6 cm de longitud (Tabla 1).

El NaCl también afectó el patrón morfológico pero únicamente de los callos expuestos a la concentración más alta (1,2% de NaCl p/v). En esta condición se inhibió la regeneración de raíces en el 100% de las plántulas desarrolladas (Tabla 2). En la Figura 2 puede apreciarse como disminuye de manera gradual la “densidad de plántula” conforme aumenta la concentración de sal o kanamicina en el medio de cultivo.

Discusión

Es pertinente reconocer que ciertas plantas pueden diferenciarse del resto por tener mayor capacidad para desarrollarse en determinadas condiciones de deficiencia de algún elemento (nitrógeno, hierro, etc.) o en presencia de altas concentraciones de metales pesados y éstas no muestran los síntomas característicos correspondientes, por el contrario, manifiestan buen desarrollo. Plantas que además de tener la información genética específica pueden presentar mayor plasticidad de expresiones debido a la organización y funcionamiento de su información genética. Los autores desean demostrar cuan importante, desde el punto de vista biotecnológico, es identificar inicialmente fenotipos con alta potencialidad de desarrollo para utilizarlos como punto de partida en la micropropagación comercial de plantas así como en programas de mejoramiento genético en los que se aplica la biotecnología.

Producción de biomasa

La capacidad de producción de biomasa de los cultivos, en términos generales, esta en función de la capacidad intrínseca del desarrollo celular (división y crecimiento celular), de las condiciones nutrimentales del medio de cultivo así como de las condiciones de cultivo. En este caso particular y para explorar potencialidades de supervivencia de la célula, se han impuesto dos condiciones de estrés muy distintas pero que son restrictivas para el desarrollo: la presencia de sal o de un antibiótico en el medio. En relación a la capacidad intrínseca de la célula para tolerar la condición de estrés que causan estos compuestos depende

Tabla 1. Efectos de la presencia de kanamicina en la capacidad de rediferenciación de brotes en callos de *Saccharum* sp. Los cultivos fueron incubados en el medio MSO suplementado con antibiótico a 28 ± 2 °C durante 30 días, al cabo de los cuales las determinaciones fueron realizadas. Los datos con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey α = 0,05).

Kanamicina (µg/mL)	Tipo de desarrollo (%)			Plántulas	
	Callo	Plántulas sin raíz	Plántulas	Long. promedio (cm)	Color
0	28 ± 1,2 c	0 c	72 ± 1 a	6,0	Verde
25	89 ± 1,3 a	11 ± 1,2 b	0 b	1,0	Albinas
50	83 ± 1,6 b	17 ± 1,6 a	0 b	0,5	Albinas
100	89 ± 1,3 a	11 ± 1,0 b	0 b	0,5	Albinas

Tabla 2. Efectos de la presencia de NaCl en la capacidad de rediferenciación de brotes en callos de *Saccharum* sp. Los cultivos fueron incubados en el medio MSO suplementado con sal a 28 ± 2 °C durante 30 días, al cabo de los cuales las determinaciones se llevaron a cabo. Los datos con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey α = 0.05).

NaCl (%)	Tipo de desarrollo (%)			Plántulas	
	Callo	Plántulas sin raíz	Plántulas	Long. Promedio (cm)	Color
0	28 ± 1,2 c	0 b	72 ± 1 a	6,0	Verde
0,50	56 ± 2,6 b	0 b	44 ± 2,2 b	3,0	Verde
0,80	72 ± 1,6 a	0 b	28 ± 1,5 c	1,0	Verde
1,20	56 ± 2,8 b	44 ± 4 a	0 d	0,5	Amarillo

tanto de la información genética (el genotipo), la organización y el funcionamiento de genes específicos así como de las concentraciones de los compuestos causantes de estrés. El cultivo de la caña de azúcar es considerado por ciertos autores en la categoría de moderadamente sensible [18]. En relación a los antibióticos, el empleo de kanamicina es muy común como marcador genético en procesos de selección de células transformadas genéticamente ya que es ampliamente conocido que este antibiótico inhibe tanto el desarrollo celular como la diferenciación de plántulas [19, 20]. Por esta razón fue seleccionado este antibiótico para este estudio. Contrariamente, se ha demostrado que la carbenicilina, la cefatoxima y la ticarcilina promueven la capacidad de regeneración de *Dianthus carioophyllus* [19] y *Triticum durum* [21].

Las estrategias generales que la célula puede ejecutar para tolerar tanto la salinidad como la presencia de kanamicina pueden incluir: 1. impedimento a nivel de membrana de la penetración de éstos compuestos a la célula. 2. disgregación de los compuestos para eliminar su actividad. 3. reducción o pérdida de la afinidad de las proteínas blanco de los compuestos, que impide la interacción entre ambos y en consecuencia el efecto inhibitorio de la actividad enzimática específica. 4. sobreproducción de las enzimas blanco, proteínas y otros compuestos. De acuerdo a los resultados presentados no se puede puntualizar cual pudiera ser el mecanismo o mecanismos que los cultivos utilizan para sobreponerse a estas situaciones de estrés.

El resultado más interesante del presente trabajo ha sido la demostración de que los cultivos desdiferenciados de caña de azúcar han respondido de manera similar ante las dos condiciones de estrés impuestas por compuestos tan diferentes en su mecanismo de acción. En la búsqueda de explicaciones lógicas a los resultados obtenidos se postulan las siguientes: la célula de caña de azúcar es capaz de disgregar solutos en vacuolas [22]. En este trabajo; sin embargo, la respuesta observada en los cultivos expuestos a la concentración más baja de sal (0,8% p/v), en el primer estadio, se caracterizó por una fuerte inhibición de la producción de biomasa seguido de un estadio en el que se observó disminución de esta inhibición y posteriormente, en el tercer estadio los cultivos iniciaron el restablecimiento del desarrollo. Esta respuesta indicó que la recuperación de los cultivos depende de la concentración de estos compuestos. Si el mecanismo operado por la célula fuera mediante el impedimento para que el compuesto penetre a la misma, entonces, los cultivos se habrían desarrollado por igual en presencia de las diferentes concentraciones tanto de antibiótico como de NaCl, lo cual no ocurrió. Similar respuesta se habría presentado si las enzimas blanco de estos compuestos perdieran especificidad por estos compuestos. Por lo tanto, es posible presumir que la respuesta de recuperación de los callos observada en las dos condiciones de estrés fuera debido a la gradual sobreproducción de enzimas, proteínas blanco u otro tipo de compuestos. Szabó y colaboradores [23] demostraron que el contenido de ácido indolacético en callos de tabaco cultivados en ausencia de reguladores de crecimiento disminuía gradualmente hasta el subcultivo 4, a partir del cual gradualmente incrementó hasta el subcultivo 10 y presumen que los cultivos habituados aparecieron del

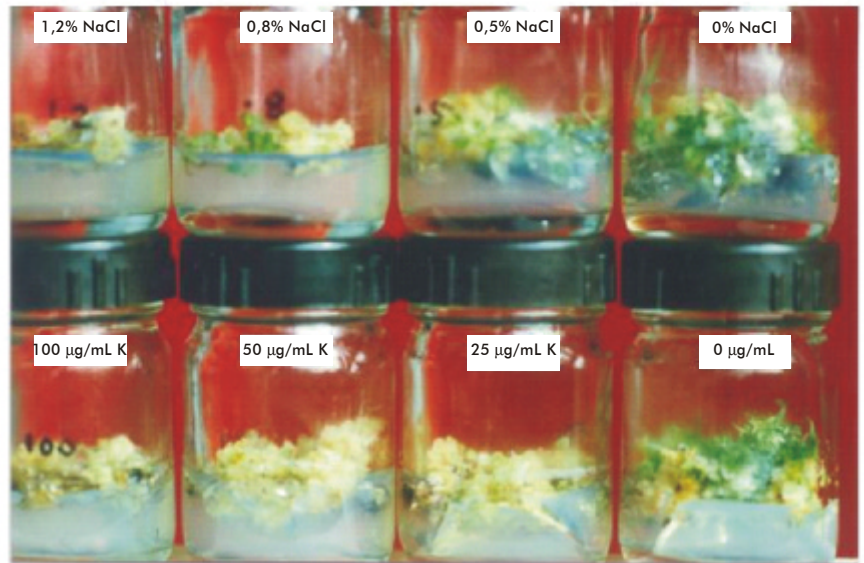


Figura 2. Aspecto de los cultivos de *Saccharum* sp. variedad Z-Mex. 55-32 en los que se muestra el desarrollo de brotes cuando los callos fueron sometidos a condiciones de estrés por NaCl (0 a 1,2% p/v) en la parte superior y kanamicina (0 a 100 µg/mL) en la parte inferior.

subcultivo 8 al 10. Como posible explicación al fenómeno de habituación en conexión con el metabolismo del ácido indolacético señalan que la habituación observada pudiera deberse a incrementos en la biosíntesis de la hormona vegetal o a la disminución de la actividad de la enzima indolacético oxidasa que inactiva dicha hormona. En otras palabras, dichos cultivos habituados pudieron desarrollarse debido a la producción continua y gradual de ácido indolacético. Meins y Binns [24] y Meins y Hansen [25] indicaron que el fenómeno de habituación, (pérdida del requerimiento de hormonas) no es un cambio rápido de "todo o nada" sino más bien un cambio continuo y gradual. Es posible que este mecanismo de respuesta sea debido a la forma de cómo ciertos genes pueden expresarse, formas de expresión que son inducidas en condiciones de estrés tanto en procariotes como en eucariotes [26, 27], o bien a una adaptación fisiológica al factor estresante. Mediante estos mecanismos se afecta la expresión de múltiples funciones como la sobreproducción de aminoácidos [28], de antibióticos [29], de proteínas [30], resistencia a antibióticos [30] o a herbicidas [31], en general, como respuesta a presiones selectivas ejercidas por ciertas drogas y compuestos que causan inhibición del desarrollo. El patrón de respuesta observado en este trabajo a lo largo de los tres subcultivos consecutivos de los callos expuestos a la mínima concentración de NaCl o del antibiótico fue muy similar. A pesar de que muchos estudios se han hecho para entender el fenómeno de tolerancia a la salinidad en plantas y de selección de cultivos tolerantes a sales, poco se ha incursionado en el campo de los genes involucrados en este caso. Holland y colaboradores [32, 33], lograron identificar un gen y la proteína codificada por éste, la cual es inducida por la presencia de sal. Demostraron, además, que la actividad de esta proteína también se incrementa al someter los cítricos a condiciones de sequía lo que indica que diferentes condiciones de estrés inducen una misma respuesta.

18. Ashraf M. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Rev Plant Sci* 1994;13:17-42.

19. Estopà M, Marfà V, Melé E, Messager J. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 2001;65:211-20.

20. Colby SM, Meredith CP. Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Rep* 1990;9:237-40.

21. Borrelli GM, DiFonzo N, Lupotto E. Effect of cefatoxime on callus culture and plant regeneration in durum wheat. *J Plant Physiol* 1992;140:372-4.

22. Welbaum GE, Meinzer FC. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiol* 1990;93:1147-53.

23. Szabó M, Köves E, Somogyi I. Development of auxin autotrophy in *Nicotiana tabacum* callus cultures. *Physiol Plant* 1994;90:348-52.

24. Meins F, Binns A. Epigenetic variation of cultured somatic cells: Evidence of gradual changes in the requirement for factors promoting cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2928-32.

25. Meins F, Hansen CE. Epigenetic and genetic factors regulating the cytokinin requirement of cultured cells. In: Bopp M, editor. *Plant growth substances*. Berlin: Springer-Verlag;1985. p. 333-41.

26. Stark GR. Gene amplification. *Annu Rev Biochem* 1984;53:447-91.

27. Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, Wahl GM. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell* 1989;57:901-8.

28. Nakamori S, Ishida M, Takagi H, Ito K, Miwa K, Sano K. Improved 1-threonine production by the amplification of the gene encoding homoserine dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric Biol Chem* 1987;51:87-91.

Totipotencia

La capacidad de rediferenciación de la célula desdiferenciada en condiciones adversas es otro indicador importante para determinar su superioridad relativa ya que debe poner en juego muchas expresiones diversas relacionadas a procesos morfogénicos o de embriogenesis somática. En el proceso de rediferenciación de los cultivos de callos de caña expuestas al antibiótico, a las concentraciones empleadas fue observado lo siguiente: 1. inhibición sistemática y selectiva del desarrollo del sistema radical. 2. disminución de prácticamente 89% del desarrollo de plántulas. 3. reducción dramática del crecimiento de las plántulas. 4. plántulas de coloración verde muy pálido. Es ampliamente conocido que en los organismos eucariotes, la kanamicina inhibe el mecanismo de síntesis de proteínas en mitocondria y cloroplasto, ya que al interaccionar con la subunidad 30s del ribosoma interfiere con la unión del fmet-tRNA^{fMet} del sitio P y también interfiere con el proceso de traducción a nivel del ribosoma. Esto a la vez afecta en la célula la producción de ATP e indirectamente repercute en procesos metabólicos que modifican la fisiología del organismo. La sal por su parte, únicamente a la concentración más alta: 1. Impidió el desarrollo del

sistema radical. 2. Causó reducción del número de plántulas regeneradas, aunque en menor grado que la kanamicina. 3. Interfirió con la acumulación de pigmentos verdes.

Estos resultados preliminares son importantes porque contribuyen a entender el proceso fisiológico del desarrollo de la célula o del organismo en ambientes adversos. Es importante considerar, porque ha sido demostrado, que en ciertos organismos sometidos a condiciones de estrés, además de incrementarse la expresión del gen directamente involucrado, pueden inducirse simultáneamente otras expresiones, por el grado de ligamiento de los genes, expresiones que le pueden conferir al individuo mayor o menor ventaja [34]. Es muy posible que los organismos que exhiben estas potencialidades tengan, en general, mayor plasticidad en la organización y la expresión de su información genética en relación con funciones importantes de desarrollo, por lo que deben identificarse y explotarse desde el punto de vista biotecnológico, independientemente del factor estresante utilizado para identificarlas. En el caso de los callos y plántulas regeneradas tolerantes a la sal es posible que pudieran expresar esta característica durante su desarrollo en el campo.

29. Altenbuchner J, Cullum J. Amplification of cloned genes in *Streptomyces* Bio/technology 1987;5:1328-9.

30. Jones DJ, Weller SC, Goldsbrough PB. Selection for kanamycin resistance in transformed petunia cells leads to the co-amplification of a linked gene. Plant Molec Biol 1994;24:505-14.

31. Wang Y, Jones JD, Weller SC, Goldsbrough PB. Expression and stability of amplified genes encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant tobacco cells. Plant Mol Biol 1991;17:1127-38.

32. Holland D, Faltin Z, Eshdat Y, Ben-Hayyim G. Molecular and functional characterization of a putative glutathione peroxidase gene from citrus. Plant Physiol 1993;102: (supplement 1) 19.

33. Holland D, Ben-Hayyim G, Faltin Z, Camoin L, Strosberg A.D, Eshdat Y. Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. Plant Mol Biol Int J Mol Biol Biochem Genet Eng 1993;21:923-7.

34. Le Dily F, Billard J-P, Huault C, Kevers C, Gaspar T. Fully habituated sugarbeet callus: under permanent stress. In Vitro Cell. Dev Biol Plant 1993 29P:149-154.

Recibido en agosto de 2001. Aprobado en septiembre de 2003.