

## EMBRIOGENESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE ÁPICES CAULINARES DE *Panicum maximum* JACQ. CV. LIKONI

**G. Lajonchere, A.R. Mesa, Marlenis Prieto y Odalys Toral**

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"  
Matanzas. Cuba**

Con el objetivo de producir callos embriogénicos a partir de ápices caulinares de *Panicum maximum* Jacq. cv. Likoni, se probó un medio nutritivo Murashige y Skoog (MS), con ocho niveles de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y cuatro niveles, de agua de coco (CM). Se cuantificaron un los por cientos de necrosis, contaminación y explantes vivos, con sus observaciones cualitativas. Se subcultivaron los callos en loa medios frescos hasta la tercera generación, para observar el comportamiento de los embriogénicos y algunos no embriogénicos. Los primeros fueron subcultivados en un medio de regeneración. Se observó que en todas las combinaciones de 2,4-D y CM se produjeron callos no embriogénicos, pero los embriogénicos surgieron entre los nivelen desde 2 hasta 7 mg/l de 2,4-D y 5 y 10% de CM. Estos últimos fueron muy estables en los subcultivos. Se comprobó que en los subcultivos de callos no embriogénicos, se produjeron nuevos callos embriogénicos La regeneración de plantas completas surgió con facilidad a partir de los embriones maduros implantados en medio MS con 0,3 mg/l de Kinetina (Kin). De acuerdo con los resultados, se recomienda utilizar los niveles desde 2 hasta 3 mg/l de 2,4-D y 5% de CM, para producir callos embriogénicos de buena calidad, y para la regeneración de estos, emplear el medio basal MS suplementado con 0,3 mg/l de Kin.

**Palabras claves:** *Cultivo de tejidos, embriogénesis, regeneración de plantas, P. maximum Jacq. cv. Likoni*

In order to produce embryogenic callus from apical meristems of *Panicum maximum* Jacq. cv. Likoni, was tested a Murashige and Skoog (MS) nutritive medium, with eight levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and four levels of coconut milk (CM). The necrosis, contamination and live explants percentages were quantified, with itself qualitative observation. The callus were subcultured on fresh medium for three generation in order to observe the behaviour of the embryogenic and some one no embryogenic callus The first were subculture on a regeneration medium. In all combinations of 2,4-D and CM was observed the proliferation of callus no embryogenic, but the embryogenic rise between 2 to 7 mg/l of 2,4-D and 10% of CM. The last were very stable on the subcultives. New embryogenic callus were formed in the subcultives of no embryogenic callus. Mature embryo gave rise to plants on MS medium with 0,3 mg/l kinetine (Kin). According to the results it is recommended to use levels from 2 to 3 mg/l of 2,4-D and 5% of CM to produce good quality embryogenesis callus, and for regeneration use MS basal medium supplemented with 0,3 mg/l of Kin.

**Additional index words:** *Tissue culture, embryogenesis, plant regeneration, Panicum maximum Jacq. cv. Likoni*

El mejoramiento genético de la especie *Panicum maximum* comenzó en nuestro país en 1973, aunque los primeros resultados fueron informados por Sidak y Seguí (1974). Actualmente han sido aprobados 4 cultivares como nuevas variedades comerciales registradas en Cuba y se cuenta con otras variedades que se han ido destacando en el proceso de selección y que proceden de cruzamientos, cultivo de tejidos y nuevas introducciones.

Las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen una poderosa herramienta para acelerar los resultados del mejoramiento genético. Dentro de estas, la regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática, permite realizar una serie de trabajos posteriores con diversos fines, como son: micropropagación acelerada incluyendo la producción de semilla artificial, conservación *in vitro* y obtención de germoplasma mejorado (Crougham y Herbert, 1981).

Internacionalmente, la embriogénesis somática en el género *Panicum* ha sido poco difundida y estudiada, concentrándose los mayores esfuerzos en la Universidad de la Florida, de los Estados Unidos.

El nivel hormonal como factor principal puede conducir finalmente a la formación de embriones. Sin embargo, el explante es también de gran importancia, por lo que su origen y naturaleza deben ser considerados, por los biotecnólogos.

Varios han sido los explantes utilizados en la especie *P. maximum*, como segmentos de hojas en proliferación, semillas maduras, mesocotiledones, segmentos de tallos (Heyser y Nabors, 1982), escutelum de embriones inmaduros, inflorescencias inmaduras (Lu, Vasil y Vasil, 1981), meristemos (Bajaj, Sidhu y Dubey, 1981) y embriones maduros e inmaduros (Lu y Vasil, 1982), con los que se ha obtenido embriogénesis. Sin embargo, en la literatura consultada no se señala el uso de ápices caulinares con este fin.

El ápice caulinar está compuesto por el tejido inmaduro y a la vez contiene estructuras básicas muy diversas. Su ubicación dentro de la planta garantiza un aislamiento adecuado entre este y el ambiente contaminante que la rodea, asegurando la asepsia del material vegetal. Como otra ventaja, su estructura y tamaño facilitan la manipulación en las labores de siembra, al compararlas con las de otros explantes utilizados.

Este trabajo se propuso como objetivo probar la potencialidad del ápice caulinar para producir embriogénesis somática en medio sólido.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizó como explante el ápice caulinar de guinea cv. Likoni, procedente de retoños basales de macollas establecidas en campo. El explante se obtuvo defoliando levemente el retoño y cortando cerca de los extremos de la yema. Se sumergió 20 minutos en sulfato de cobre al 8%, 1 minuto en etanol al 95% y 20 minutos en hipoclorito de sodio al 1%, se enjuagó con agua destilada estéril entre cada paso de la desinfección y seguidamente se extrajeron las yemas.

Los explantes fueron implantados en un medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962)

con una combinación de hormonas de 1; 2; 2,5; 3; 4; 5; 7 y 10 mg/l de 2,4-D y 0; 5; 10 y 15% de CM, en 32 tratamientos. La siembra se incubó a 27°C  $\pm$  2 y oscuridad.

Se efectuaron evaluaciones semanales hasta que se detectó estabilidad en el crecimiento y desarrollo del tejido, sin que se observaran síntomas de senectud.

Una vez alcanzando el máximo desarrollo de la callogénesis, se subcultivaron los callos embriogénicos y las mejores variantes que produjeron callos no embriogénicos, con el objetivo de observar su comportamiento.

Para regenerar las plantas completas a partir de los embriones maduros, se pasaron estos a medio de regeneración formulado por Saura, Martínez, Prieto y Santana (1987), con un fotoperíodo de 16 horas luz, 7 500 lux y 27°C. Las plantas con buen fortalecimiento radical se adaptaron a tierra, las más débiles se fortalecieron antes en medio enraizamiento con 0,1 mg/l de ácido 3-indolacético (AIA).

Las medidas tomadas fueron por ciento de contaminación, necrosis, explantes vivos sanos, talla y procesos organogénicos. De los explantes vivos sanos, se detallaron los latentes y los que desdiferenciaron en callos embriogénicos y no embriogénicos. Se tomaron tres escalas, especificando tamaño pequeño (<0,3 cm), mediano (0,3-0,7 cm) y grande (>0,7 cm de diámetro). Finalmente se describieron las características cualitativas de las masas callosas.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los por cientos de contaminación y necrosis alcanzaron valores promedio de 30,3 y 8,4% respectivamente, aunque se esperaba que estos fueran menores. La casi totalidad de las contaminaciones aparecieron a partir del décimo día de sembrados los explantes, lo que indica, según Torres (1989), la presencia de un contaminante interno y no la incorrecta manipulación de los explantes. Se supone que los microorganismos contaminantes viven en los intersticios más íntimos o dentro del tejido al que no llegó la acción de los desinfectantes previos a la implantación. Ello sugiere estudiar los microorganismos presentes y aplicar el antibiótico específico en dosis adecuadas en el medio de cultivo. Lajonchere, G. (datos no publicados) ha logrado hasta un 100% de

efectividad en explantes de esta especie vegetal, sin contaminaciones ni necrosis.

Estos comportamientos diferentes pueden estar influenciados por las condiciones climáticas que interactúan sobre la planta y su microflora epifítica; no obstante, es muy común que esto ocurra. Beauchesne (1974) asegura que la contaminación ha sido la causa de numerosos fracasos en siembras de meristemos de hortensias, que en un principio era del 99% y después se redujo al 55%.

Las necrosis se distribuyeron aleatoriamente en todos los tratamientos, lo que pudo estar causado por la manipulación práctica de los

explante y, debido a las inapropiadas condiciones de trabajo.

Del total de explantes que lograron sobrevivir en la fase inicial de implantación, un grupo no tuvo respuestas a las hormonas y permanecieron latentes por un largo período de tiempo hasta su desecho. En un análisis efectuado al reagrupar los mismos por los niveles hormonales utilizados (fig. 1), se observó la influencia que ejerció el 2,4-D, que determinó una parábola invertida; mientras que el por ciento de CM no pareció influir en esta medida.

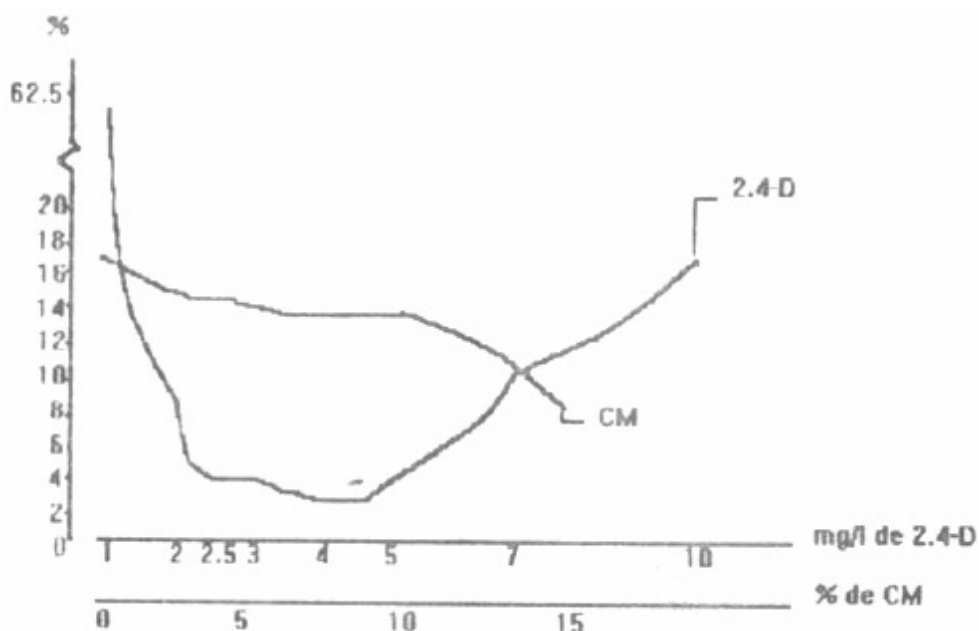


Fig. 1. Distribución de los por cientos de explantes latentes con respecto a los explantes vivos sanos, según los niveles de 2,4-D y CM empleados.

La formación de callos se observó a partir de las 2 semanas de sembrados los explantes y en todas las variantes empleadas. Se reconocieron macroscópicamente dos tipos de callos: los primeros se describieron, en lo fundamental, como callos de color crema, translúcidos, blandos y friables, en concordancia con lo informado por Lu y Vasil (1982) para esta misma especie. Con frecuencia se observaron agrupaciones de células de tonalidades más blanquecinas y menos translúcidas, que finalmente originaron raíces de diferente grosor y pilosidad. Estos callos clasificados como no embriogénicos, fueron los primeros en aparecer cuando comenzó la desdiferenciación.

Las figuras 2 y 3 representan las curvas que toman las agrupaciones de callos pequeños, medianos y grandes, con respecto a los niveles de 2,4-D y CM respectivamente. El objetivo fue obtener los mayores por cientos de callos grandes y medianos y el mínimo de callos pequeños, lo cual se logró con los niveles de 2; 2,5 y 3 mg/l de 2,4-D (fig. 2) y con 5 y 10% de CM (fig. 3). Aunque es evidente que con 10% de CM se formaron los mayores por cientos de callos grandes, estos se vieron afectados por el menor por ciento de callos embriogénicos (fig. 4).

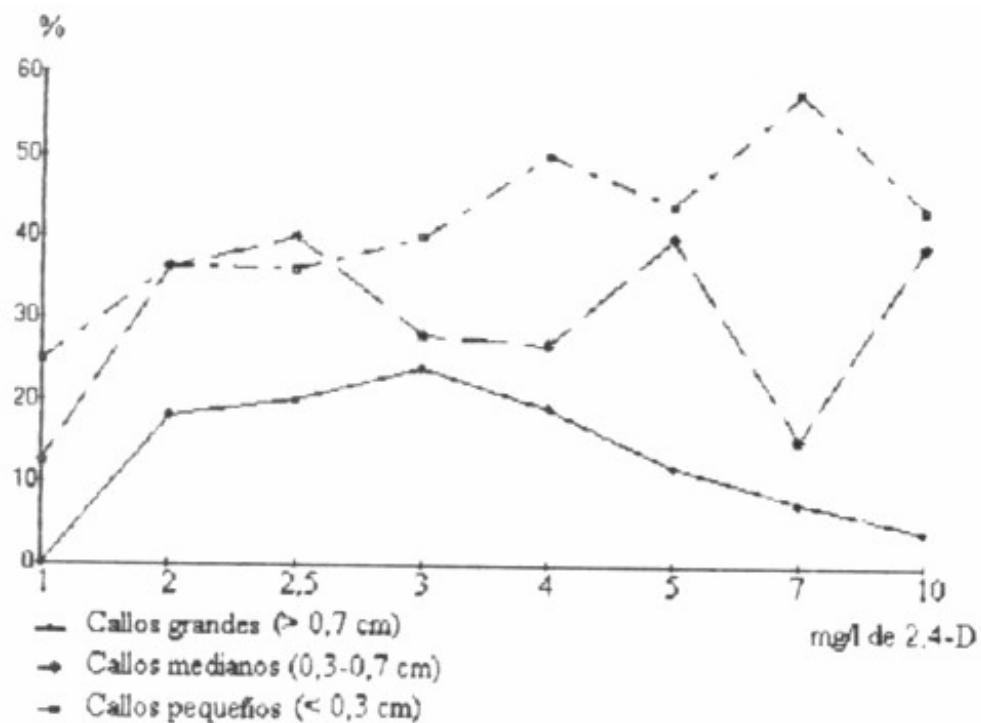


Fig. 2. Distribución de los por cientos de callos pequeños, medianos y grandes con respecto al total de callos producidos, acorde con los niveles de 2,4-D.

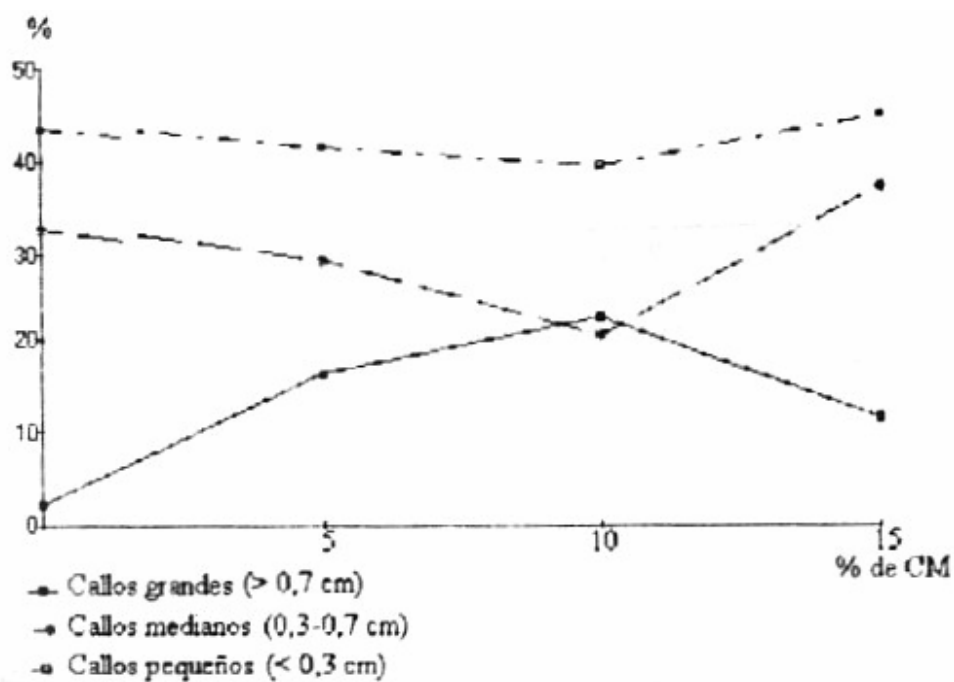


Fig. 3. Distribución de los por cientos de callos pequeños, medianos y grandes con respecto al total de callos producidos, acorde con los niveles de CM empleados.

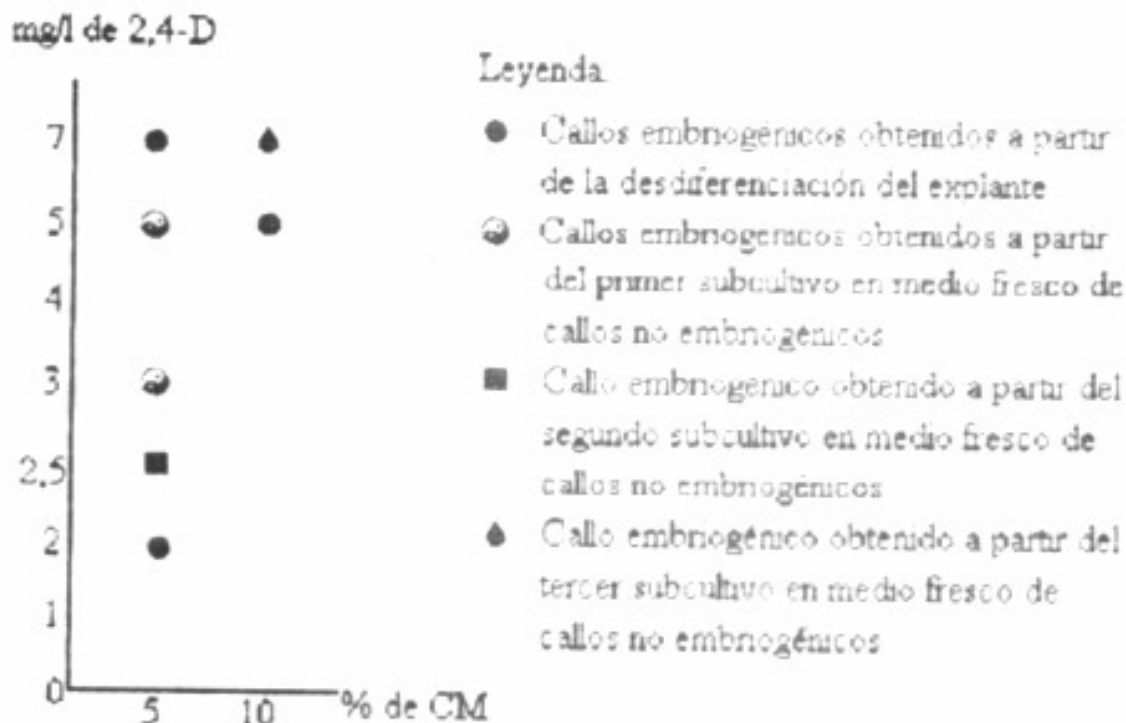


Fig. 4. Localización de callos embriogénicos formados en la desdiferenciación de los explantes y en los tres subcultivos de callos no embriogénicos.

Como producto del análisis de estos resultados, se subcultivaron los mejores callos no embriogénicos en sus medios frescos y se observó que con la misma frecuencia de las siembras iniciales de explantes, aparecieron nuevos callos embriogénicos.

El otro tipo de callo se reconoció por su coloración bien blanca, además de ser opaco y de apariencia compacta, en coincidencia con la descripción hecha por Lu y Vasil (1982) para esta especie. Bajo el estereoscopio se observaron diminutas agrupaciones de células mucho más pequeñas que las primeras; estas se organizaron y dieron origen a embriones inmaduros que no tardaron en madurar posteriormente. Los callos embriogénicos surgieron a partir de las 6 semanas de sembrados los explantes, en zonas bien determinadas, cerca del tejido del explante y a partir de un punto de crecimiento inicial. A diferencia de los no embriogénicos, estos fenolizaron el medio de cultivo inmediatamente después que aparecieron, facilitando su determinación por simple observación. Dicha distinción no ha sido informada en otros trabajos consultados sobre embriogénesis.

Los callos no embriogénicos se formaron en todas las variantes empleadas; mientras que

los embriogénicos aparecieron en los callos cultivados desde 2 hasta 7 mg/l de 2,4-D con 5 y 10% de CM.

En la figura 4 se puede observar la distribución de callos embriogénicos formados hasta el tercer subcultivo de los no embriogénicos. El mayor número de embriogénesis se observó con la suplementación al medio de 5% de CM. En una comparación con los resultados de Lu y Vasil (1981), estos encontraron formaciones de callos embriogénicos en las variantes desde 2,5 hasta 10 mg/l de 2,4-D, debido quizás a que usaron diferentes cultivares y explantes, lo que pudo influir en las exigencias hormonales de los mismos.

En la literatura internacional se exponen los medios, combinaciones hormonales y explantes usados en especies del género *Panicum*, así como la formación de callos embriogénicos sin aclarar con qué grado aparecen. En el presente trabajo, se logró el 1,5% de callos embriogénicos de los explantes que lograron desdiferenciar, mientras que en las especies pratenses, Cruz, R. (comunicación personal) solo encontró en pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) el 0,0001% de aparición de los mismos.

Los callos embriogénicos mostraron una alta estabilidad en la proliferación embriogénica cuando fueron subcultivados. Esto se pudo comprobar hasta el tercer subcultivo, donde se pasaron a medio de regeneración formulado por Saura, Martínez, Prieto y Santana (1987). Los embriones maduros regeneraron en plantas completas con relativa facilidad. Las plantas con un buen fortalecimiento radical soportaron el estrés de adaptación a tierra y las más débiles se fortalecieron con un medio de enraizamiento y después pasaron a la fase de adaptación a tierra.

Estas plantas serán posteriormente investigadas genotípica y fenotípicamente para conocer la estabilidad genética que brinda esta biotécnica, a través de pruebas agrobotánicas y bioquímicas.

La facilidad de obtener plantas por esta vía podría satisfacer futuros objetivos de trabajo, como la micropropagación acelerada de variedades élites o de poca disposición de semillas en un momento determinado, la obtención de material biológico para la producción de semilla artificial y finalmente el mejoramiento genético a través de inducción de mutaciones.

De acuerdo con los resultados, se puede concluir que los niveles desde 2 hasta 3 mg/l de 2,4-D y 5% de CM fueron los más adecuados para obtener un mayor número de callos de buena calidad, con la posibilidad de formar callos embriogénicos. No obstante, se hace necesario emprender estudios con el

objetivo de mejorar la embriogénesis en esta especie vegetal.

## REFERENCIAS

- BAJAB, Y.P.S.; SIDHU, B.S. & DUBEY, V.K. 1981. *Euphytica*. 30:135
- BEAUCHESNE, G. 1974. Culture d'hortensias *in vitro* a partir de prélèvements de méristemes. *Pépiniéristes, horticulteurs maraichers*. 144:29
- CROUGHAM, S.S. & HERBERT, K.M. 1981. Improvement of bermuda grass varieties through tissue culture. In: Forage and Grassland Conference, Lexington, N.Y. p. 131
- HEYSER, J.W. & NABORS, M.W. 1982. *Crop. Sci.* 22:1070
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981. *Theor. Appl. Genet.* 59:275
- LU, C. & VASIL, I.K. 1982. *Amer. J. Bot.* 69:77
- LU, C.; VASIL, V. & VASIL, I.K. 1981. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:311
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. *Physiol. Plant.* 4:473
- SAURA, CARMEN; MARTÍNEZ, M.; PRIETO, MARLENIS & SANTANA, I. 1987. *Pastos y Forrajes*. 10:199
- SIDAK, V. & SEGUÍ, ESPERANZA. 1974. Factores componentes de la productividad de las semillas en guinea (*Panicum maximum* Jacq.) y métodos para su regulación. Resúmenes Primer Seminario Interno Científico-Técnico. EEPF "Indio Hatuey". Serie Técnico-Científica A-5. p. 47
- TORRES, K.C. 1989. Stages of micropropagation. In: Tissue culture technique for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold. New York. p. 54

Recibido el 5 de abril de 1993