

EFECTO DEL FRACCIONAMIENTO DEL APICE CAULINAR PARA EL MEJORAMIENTO BIOTECNOLOGICO DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA EN PANICUM MAXIMUM CV. LIKONI

G. Lajouchere y A. R. Mesa

Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba

Con el objetivo de estudiar el efecto del fraccionamiento del ápice caulinar en la embriogénesis somática (ES) de *Panicum maximum* cv. Likoni en cultivo de tejidos "in vitro", se condujo un experimento en el que se emplearon explantes sin dividir y divididos en dos y en cuatro partes, en un medio nutritivo MS, suplementado con 2,5 mg de 2,4-D/L y 5 % de agua de coco. A partir del tercer día de cultivo se realizaron nueve evaluaciones semanales donde se midieron diferentes indicadores como los porcentajes de contaminación, necrosis, explantes latentes, ápices germinados, callos no embriogénicos y callos embriogénicos, además del diámetro promedio de los callos. Los resultados demostraron que el fraccionamiento en dos partes mejoró la ES en un 7,5 % del total de explantes cultivados con respecto al testigo, debido a que en la dinámica de los cultivos durante las 8 semanas de evaluación la formación de callos fue más numerosa y estos tuvieron mayor vigor; además, la ES comenzó una semana antes que en el resto de los tratamientos aplicados y disminuyeron los porcentajes de necrosis y explantes latentes, así como se incrementó el diámetro promedio de los callos en la octava semana de cultivo, el cual difirió significativamente ($P<0,05$) del tratamiento donde se fraccionó en cuatro partes. Se comprobó que el fraccionamiento del ápice disminuyó el porcentaje de germinación, pero aumentó el porcentaje de contaminación al favorecer el crecimiento de la microflora endófitas.

Palabras clave: *Cultivo de tejidos, Panicum maximum cv. Likoni*

An experiment employing whole, two-parted and four-parted explants in an MS nutritive medium, supplemented with 2,5 mg of 2,4 D/L and 5 % of coconut-milk, was carried out in order to study the caulinary apex fractionalization effect upon the somatic embryogenesis of *Panicum maximum* cv. Likoni in tissue culture "in vitro". Contamination percentages, necrosis, dormant explants, germinated apexes, embryogenic and non-embryogenic calli and average calli diameter were all measured in nine weekly evaluations made starting on the third day of culture. Two-part fractionalization lead to the somatic embryogenesis improvement of 7,5 % of the total explants cultivated, as compared to the control, since the number and strength of the calli was higher during the eight weeks of evaluations in the culture dynamics. Moreover, the somatic embryogenesis started a week before the other treatments applied reducing the necrosis percentages and explants dormancy, while increasing the average diameter of the calli in the eight week of culture, which differed significantly ($P<0,05$) from the treatment with four-part fractionalization. It was confirmed that the germination percentage was reduced with the apex fractionalization, but the contamination percentage was increased cause by the favoured growth of the endophyte microflora.

Additional index words: *Tissue cultures, Panicum maximum cv. Likoni*

La totipotencia de los tejidos vegetales en el cultivo de tejidos "in vitro" puede lograrse a través de la embriogénesis somática (ES). Esta última ofrece múltiples ventajas, por lo que en dependencia de la estabilidad genética de las nuevas plantas obtenidas se puede utilizar en la

variación somaclonal o la micropropagación acelerada.

Este proceso no ocurre espontáneamente, sino en presencia de algunos factores que actúan favorablemente. Tisserat (1985) los agrupó en tres fundamentales, que son el explante, los

nutrimentos empleados en el medio y las condiciones microambientales en el cultivo. Dentro del primer factor se encuentra todo lo que se refiere al explante, como el tipo de tejido, la edad, el estado fisiológico, el tamaño y el genotipo, pero aun cuando se establezcan adecuadamente, el éxito puede ser mayor al manipular los explantes mediante operaciones sencillas.

En trabajos anteriores Lajonchere, Mesa, Prieto y Toral (1993) recomendaron utilizar ápices caulinares cultivados en un medio MS suplementado con 2,5 mg de 2,4-D/L, 5 % de agua de coco, 30 g de sacarosa/L y 0,8 g de agar/L, los cuales produjeron un 1,5 % de callos embriogénicos de los explantes que se desdiferenciaron.

En un trabajo realizado por Lu y Vasil (1981) con guinea se informó que el por ciento de callos embriogénicos formados de hojas inmaduras estuvo determinado por el genotipo y varió desde 0 hasta 16 %.

Estas diferencias pueden observarse también en otras especies de gramíneas pratenses, provocadas por factores tales como la concentración hormonal (Lu, Chandler y Vasil, 1984; Artunduaga, Taliaferro y Johnson, 1988; Zhong, Srinivasan y Sticklen, 1991) y el tamaño de la inflorescencia utilizada como explante (George, Eapen y Rao, 1989).

Es por ello que con el objetivo de mejorar la eficiencia de inducción de la ES, se probó el efecto del fraccionamiento de los explantes como manipulación de presembrado.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron como explantes ápices caulinares de *Panicum maximum* cv. Likoni, los cuales fueron obtenidos y desinfectados según la metodología utilizada por Lajonchere et al. (1993). Se empleó un diseño totalmente al azar con cuarenta réplicas. Los tratamientos consistieron en dividir los ápices caulinares en dos partes mediante un corte perpendicular desde la cima hasta la base (A), en cuatro partes por dos cortes perpendiculares de igual manera que en el anterior (B) y un tercer tratamiento como testigo en el que se mantuvo íntegro el explante (C). A continuación se implantaron en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2,5 mg de diclorofenoxiacético/L (2,4-D), 5 % de agua de coco (AC), 30 g de sacarosa/L y 0,8 g de agar/L. Se tuvo el cuidado de que todas las partes cortadas quedaran en contacto íntimo con la superficie del medio. Estas siembras se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ en la oscuridad.

A partir del tercer día se realizaron evaluaciones semanales hasta la octava, con vistas a estudiar la dinámica del cultivo. Se midieron los por cientos de contaminación, necrosis (incluye tanto explantes como callos), explantes latentes, ápices germinados, callos no embriogénicos y callos embriogénicos, además del diámetro promedio de estos dos últimos en la novena evaluación.

Se aplicó un ANOVA simple para el análisis estadístico del diámetro promedio de los callos y cuando existieron diferencias significativas se empleó a la dódima de Duncan (1955).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestra el marcado efecto de los tratamientos aplicados sobre los indicadores evaluados en la octava semana de cultivo. La formación de callos embriogénicos fue notablemente superior al dividir el ápice caular en dos partes con respecto a los otros tratamientos.

Tabla 1. Efecto de los tratamientos en la octava semana de cultivo de ápices caulinares de *P. maximum* cv. Likoni.

Indicador (%)	Tratamientos		
	A	B	C
Callos no embriogénicos	50,0	35,0	52,5
Callos embriogénicos	10,0	2,5	2,5
Apices germinados	-	-	5,0

El fraccionamiento de los ápices en los dos primeros tratamientos indujo finalmente que todos los explantes que sobrevivieron, logran desdiferenciar en callos, no así en el tratamiento testigo donde un 5 % germinaron. Zhong, Srinivasan y Sticklen (1991) notaron igual tendencia en las semillas de *Agrostis palustris* Huds implantadas en un medio con bajas dosis de 2,4-D; sin embargo, con altas dosis se formaron callos directamente. Este tratamiento de presembrado permite eliminar el efecto negativo para la callogénesis cuando se requieren bajas concentraciones hormonales para la ES, como en este caso.

El diámetro promedio de los callos resultó significativamente superior en el tratamiento A (tabla 2), en el que hubo una mayor multiplicación celular de los tejidos, debido al adecuado tamaño de la pieza implantada y al contacto íntimo de esta con el medio de cultivo.

Tabla 2. Diámetro promedio de los callos de *P. maximum* cv. Likoni, en la octava semana de cultivo.

	Tratamientos		
	A	B	C
Diámetro promedio (cm)	0,84 ^a	0,59 ^b	0,75 ^{ab}
ES \pm	0,318	0,234	0,236

a,b Superíndices no comunes difieren significativamente a $P < 0,05$ (Duncan, 1955)

A continuación se presentan los resultados del estudio de la dinámica de los cultivos.

Contaminación. En la figura 1 se puede observar los por cientos de contaminación de los cultivos, los cuales surgieron desde la primera evaluación y alcanzaron su máximo valor en la primera semana en los tres tratamientos. Estos altos valores fueron informados también por Lajonchere et al. (1993) y se debieron a la presencia de una microflora endófito del material vegetal seleccionado en el campo (facilitada por los cortes en los explantes de los tratamientos A y B), la cual se puso en contacto con el medio de cultivo más fácilmente que en el C, donde las periferias de los ápices quedaron totalmente desinfectadas.

Estos contaminadores internos son difíciles de eliminar y se requiere la inclusión de antibióticos en los medios de cultivo (Roca y Mröginski, 1991).

Necrosis. El tratamiento que logró los menores por cientos de necrosis fue el A (fig. 2) y su diferencia tan marcada con el resto pudo deberse a dos causas: 1) El aumento en el fraccionamiento de los ápices provocó la deshidratación de las pequeñas piezas cortadas, impidiéndoles resistir el estrés de manipulación de la siembra (tratamiento B); en tal sentido, es posible que se haya sobrepasado el límite mínimo del tamaño del explante por debajo del cual no se obtiene proliferación callosa u otra respuesta deseable (Mroginski y Roca, 1991). 2) La fuerte desinfección (necesaria en ese material proveniente del campo) necrosó las capas de células de la periferia, lo que dificultó el contacto directo de las células vivas con el medio de cultivo (tratamiento C).

Latencia. Los resultados de este indicador tuvieron un comportamiento inverso al número de cortes de los ápices caulinares (fig. 3). Ello se debió a que el contacto más íntimo de las células no dañadas (por la desinfección) con el medio permitió al tejido responder más rápido, independientemente que facilitó la aparición de la contaminación.

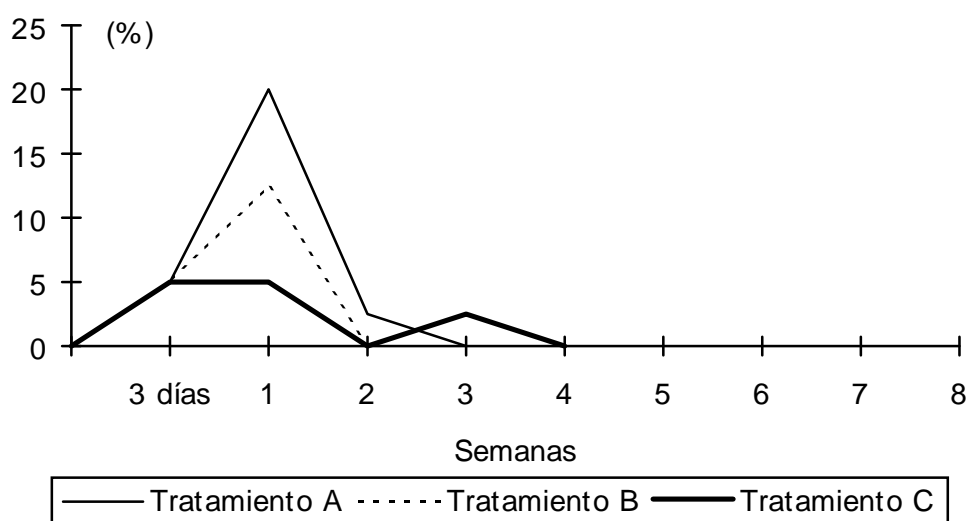


Fig. 1. Por ciento de contaminación de los explantes y callos de *P. maximum* cv. Likoni.

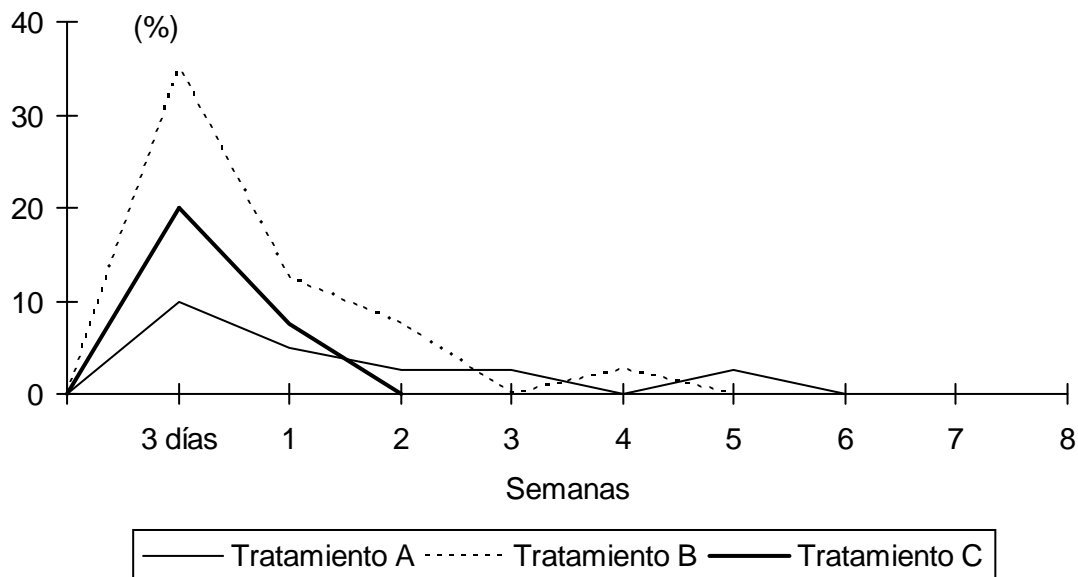


Fig. 2. Por ciento de necrosis de los explantes y callos de *P. maximum* cv. Likoni.

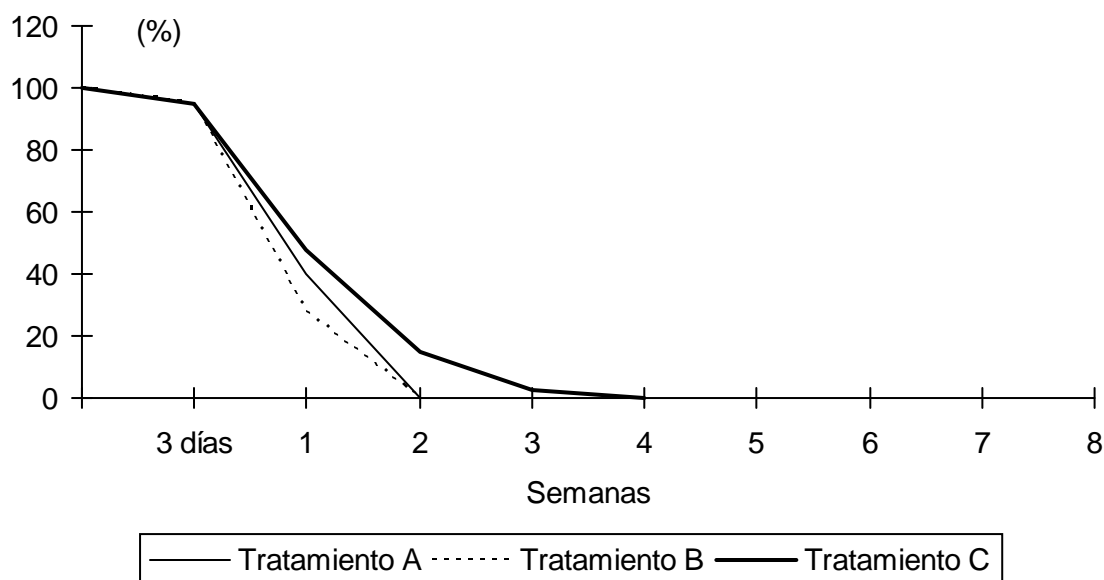


Fig. 3. Por ciento de ápices latentes de *P. maximum* cv. Likoni.

Germinación de ápices caulinares. Este indicador manifestó igual tendencia que el anterior (fig. 4) y se caracterizó por la formación de nuevas hojas, que con frecuencia se malformaron por el efecto de la concentración hormonal y en muchos casos se cubrieron de masas callosas que crecieron hasta formar callos completos. También aparecieron en ocasiones raicillas que engrosaron y desdiferenciaron en callos.

En el caso de los cultivos procedentes del tratamiento C no todos lograron detener su crecimiento diferenciado y formaron nuevas plantas completas. Esto se debió a que, a diferencia de los dos primeros tratamientos, no

se perdió la integridad del explante y continuó formando hojas y raíces.

Callos embriogénicos y no embriogénicos.

La formación de callos no embriogénicos comenzó a partir de la primera semana y alcanzó su máximo valor entre la tercera y la quinta (fig. 5); el tratamiento A fue el mejor en las 6 primeras semanas.

La causa fundamental del descenso de las curvas descritas por los tratamientos fue la aparición de la ES y estos callos pasaron a la categoría de embriogénicos (fig. 6).

La ES fue notablemente superior en el tratamiento en que se fraccionaron los ápices caulinares en dos partes, además de que

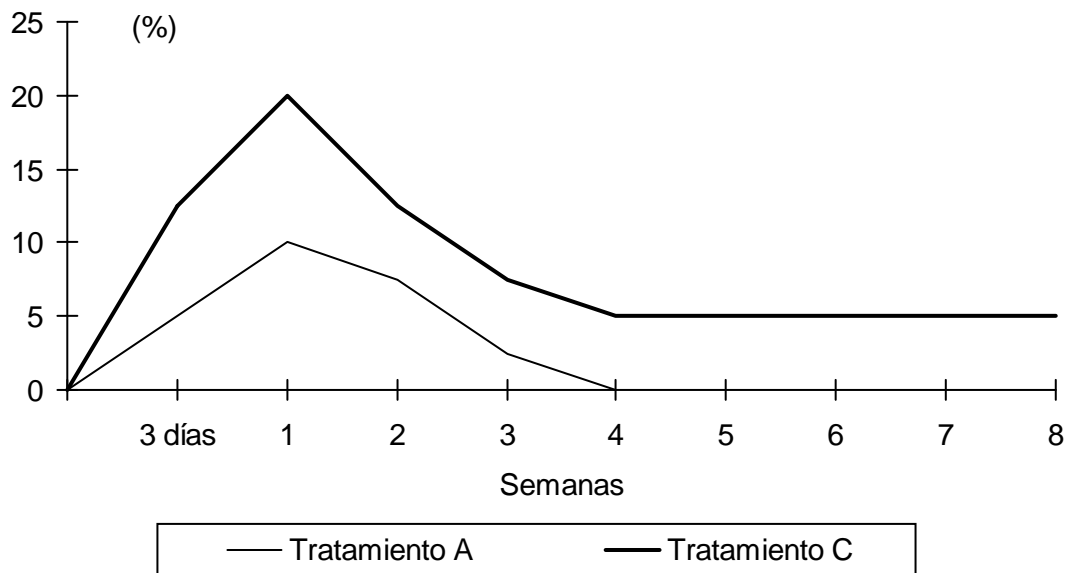


Fig. 4. Por ciento de ápices germinados de *P. maximum* cv. Likoni.

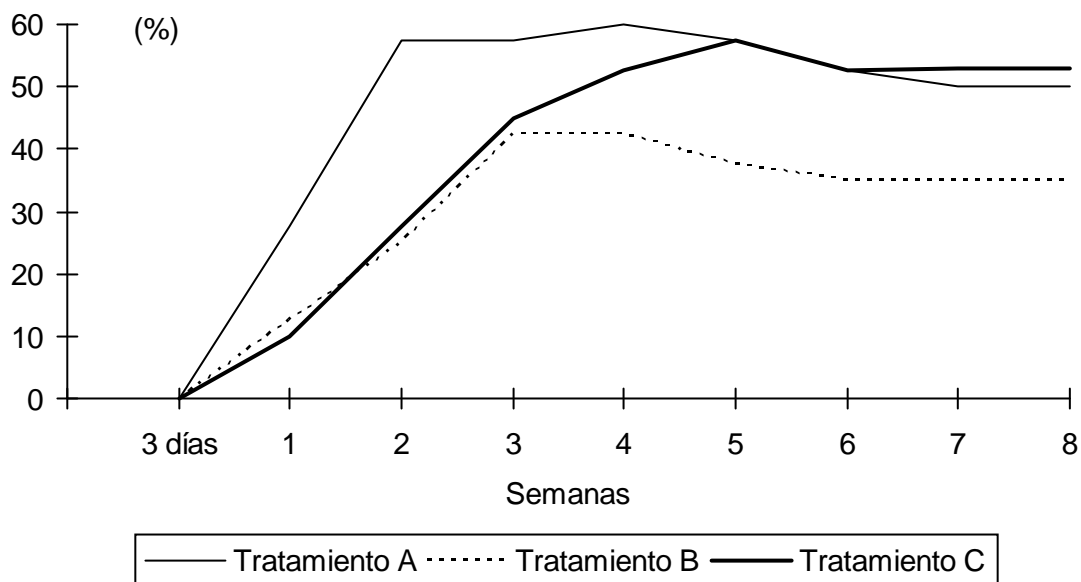


Fig. 5. Por ciento de callos no embriogénicos de *P. maximum* cv. Likoni.

apareció una semana antes que en los otros dos. Ello fue producto de las ventajas que presentó este desde las primeras semanas, ya que permitió una rápida desdiferenciación del tejido y un adecuado desarrollo de los callos no embriogénicos.

Es conocido que para lograr éxitos en el cultivo de tejidos la acción de las sustancias reguladoras del crecimiento desempeñan un papel fundamental (Krikorian, 1991), pero en muchos casos la introducción de pequeñas variaciones en los componentes del medio de cultivo y en el manejo del explante contribuye a alcanzar mejores resultados. En tal sentido, al implantar la cariópsis desnuda de *Paspalum notatum* con la parte del escutelum hacia el medio de cultivo, Bovo y Mroginski (1995),

obtuvieron un alto por ciento de callos embriogénicos. Watt, Mycock y Cresswell (1989) mejoraron la formación de callos embriogénicos en *Digitaria eriantha* en un 50 % cuando adicionaron 50 g más de sacarosa por litro en el medio de cultivo.

Se comprobó que el fraccionamiento en dos partes mejoró la ES en un 7,5 % del total de explantes cultivados con respecto a los otros dos tratamientos, debido a que en el estudio de la dinámica de los cultivos durante las 8 semanas de evaluación la formación de callos fue más numerosa y estos tuvieron mayor vigor; además, la ES comenzó una semana antes que en el resto de los tratamientos y disminuyeron otros indicadores como los por cientos de necrosis y explantes latentes, así como se incrementó el

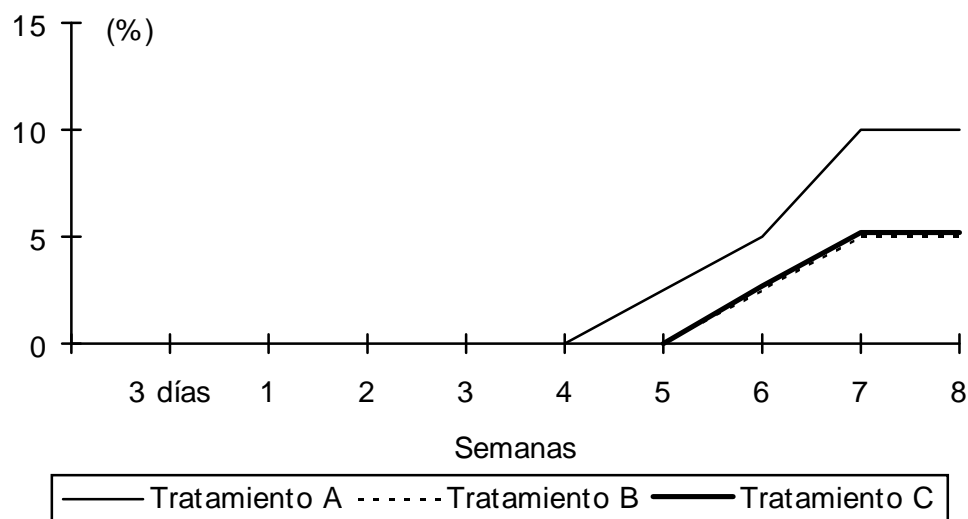


Fig. 6. Por ciento de callos embriogénicos de P. maximum cv. Likoni.

diámetro promedio de los callos y el por ciento de contaminación, al favorecer este último el crecimiento de la microflora endófitas.

REFERENCIAS

- ARTUNDUAGA, I.R.; TALIAFERRO, C.M. & JOHNSON, B.L. 1988. Effects of auxin concentration on induction and growth of embryogenic callus from young inflorescence explants of old world bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermuda (*Cynodon* spp.) grasses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 12:13
- BOVO, O.A. & MROGINSKI, L.A. 1995. Cultivo in vitro de tejidos de pastos tropicales. Notas de conferencia impartida en el Taller Internacional Biotec'95. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba
- GEORGE, LEELA; EAPEN, SUSAN & RAO, P.S. 1989. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescence cultures of two Indian cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)**. 99:405
- KRIKORIAN, A.D. 1991. Medios de cultivos: Generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Eds. Roca, W.M. & Mroginski, L.A.). CIAT. Cali, Colombia. p. 41
- LAJONCHERE, G.; MESA, A.R.; PRIETO, MARLENIS & TORAL, ODALYS. 1993. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de ápices caulinares de *Panicum maximum* Jacq. cv. Likoni. **Pastos y Forrajes**. 16:201
- LU, C.; CHANDLER, S.F. & VASIL, I.K. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature embryos of Rye (*Secale cereale* L.). **J. Plant Physiol.** 115:237
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. **Theor. Appl. Genet.** 59:275
- MROGINSKI, L.A. & ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Eds. Roca, W.M. & Mroginski, L.A.). CIAT. Cali, Colombia. p. 19
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15:473
- ROCA, W.M. & MROGINSKI, L.A. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Eds. Roca, W.M. & Mroginski, L.A.). CIAT. Cali, Colombia. p. 1
- TISSERAT, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Plant cell culture, a practical approach. (Ed. Dixon, R.A.). IRL Press. Oxford, Washington. p. 79
- WATT, PAULA M.; MYCOCK, D.T. & CRESSWELL, C.F. 1989. Plant regeneration by somatic embryogenesis from leaf explants of *Digitaria eriantha* (Stend).

Subsp. Eriantha. Proc. XVI Int. Grassl.
Cong. Nice, France. p. 421
ZHONG, HENG; SRINIVASAN, C. & STICKLEN,
MIRIAM B. 1991. Plant regeneration via

somatic embryogenesis in creeping
bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). ***Plant
Cell Reports***. 10:453

Recibido el 22 de marzo de 1996