

REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE CULTIVO DE TEJIDO EN HIERBA DE GUINEA (*Panicum maximum* Jacq.)

Carmen Saura, M. Martínez, Marlenis Prieto e I. Santana

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

Se llevó a cabo un trabajo de regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos en hierba de guinea. Para ello se utilizaron callos provenientes de tejido meristemático apical del cv. Likoni. Estos se obtuvieron en un medio nutritivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con 3 mg de ácido 2,4 diclorofenoxiacético por litro y agua de coco al 10%. Con posterioridad estos callos fueron transferidos a medio MS con Kinetina a diferentes concentraciones (0,1-0,4 mg/l) y a medio MS suplementado con Acido Indol Acético, de 0,1-0,3 mg/l. Las plántulas solo se regeneraron en el medio con 0,3 y 0,4 mg de Kinetina por litro, pero en esta última en menor proporción. Teniendo en cuenta los resultados se recomienda utilizar 0,3 mg de Kinetina por litro para la regeneración de plantas a partir de callos de este cultivar. Además, se sugiere investigar la morfogénesis a partir de otros tejidos del vegetal en las condiciones de nuestro laboratorio.

Palabras clave: *Regeneración de plantas, cultivo de tejido, Panicum maximum*

A plant regeneration work has been carried out from tissues culture in guinea grass. Callus from apical meristematic tissues in cv. Likoni were used. These callus were obtained in a nutritive Murashige and Skoog medium which was supplemented with 3 mg of 2,4 diclorophenoxiacetic acid per liter and coconut water at 10%. The callus were moved to a MS medium with Kinetine having different concentrations (0,1-0,4 mg/l) and to a MS medium supplemented with Indol Acetic Acid (0,1-0,3 mg/l). Seedlings were only regenerated in the medium containing 0,3 and 0,4 mg of Kinetine per liter, but in this last with less proportion. The use of 0,3 mg of Kinetine per liter for plants regeneration from tissues in this cultivar, is recommended. Investigations of morphogenesis from other vegetable tissues under our conditions are suggested.

Additional index words: *Plant regeneration, tissue culture, Panicum maximum*

La hierba guinea es una especie bien adaptada a las condiciones tropicales y resulta de considerable importancia económica para nuestras empresas ganade-

ras. Esta especie comenzó a estudiarse con fines de mejoramiento a partir del año 1973 por Sidak y Seguí, quienes perseguían como objetivo principal obte-

ner cultivares con alta producción de materia seca; a partir de 1980 se estableció un programa de cruzamientos.

Sin embargo, el avance alcanzado en las técnicas de cultivo *in vitro* en el mundo, ha permitido que las mismas se empleen en el mejoramiento genético, por lo que en nuestra Estación se ha comenzado su introducción como complemento tanto de este programa como de otros que se inician en la actualidad con otras especies. Ello está avalado por los éxitos alcanzados en un grupo de gramíneas pratenses por algunos investigadores que lograron regenerar plantas partiendo de diferentes partes, como embriones inmaduros, segmentos de inflorescencia inmadura, segmentos de hojas inmaduras, tanto en cultivo de callo como por suspensión celular (Lu y Vasil, 1981 a 1982; Hanna, Lu y Vasil, 1984).

No obstante la gran cantidad de literatura que se ha acumulado en los últimos años, donde se recomiendan diferentes medios para la regeneración de plantas (incluyendo *Panicum maximum*), la extrapolación de los resultados para predecir las condiciones para la regeneración de una planta dada es prácticamente imposible (Minocha, 1984).

El objetivo de este trabajo fue la regeneración de plantas, utilizando diferentes medios, a partir de callos provenientes de tejido meristemático apical de *P. maximum* cv. Likoni.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar este trabajo se emplearon como donantes plantas jóvenes del cultivar Likoni desarrolladas en invernadero. Como explante se empleó el meristemo apical de estas plantas (2 a 3 mm de diámetro), el cual fue esterilizado en etanol 70% durante un minuto, seguido por hipoclorito de sodio al 8% durante 10 minutos y enjuagado (5 veces) con agua destilada estéril.

El callo, a partir de dicho explante, fue obtenido en un medio Murashige y Skoog (MS) (1962), el cual contenía 3% de sacarosa y 0,8% de agar, suplementado con 3 mg del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 - D) por litro y agua de coco al 10%. El pH del medio osciló entre 5,6 y 5,8 y la temperatura entre 26 y 28°C en completa oscuridad (Lu y Vasil, 1981b).

Algunos de estos callos fueron transferidos a medio MS con diferentes concentraciones de Kinetina (0,1; 0,2; 0,3; 0,4) y otros a medio MS con diferentes concentraciones (0,1; 0,2; 0,3) de Acido Indol Acético (AIA); también se realizó un ensayo en medio MS sin hormonas. El pH del medio se ajustó entre 5,6 y 5,8 antes de someterlos a la autoclave. Todos los cultivos fueron incubados de 26 a 28°C, con 48 horas de luz y 8 de oscuridad; la intensidad luminosa osciló entre 5 000 y 7 500 lux.

Las plántulas obtenidas con pobre desarrollo del sistema radicular, fueron pasadas para medio MS sin vitaminas, ni

hormonas y con 8% de azúcar, con vistas a lograr un mayor enraizamiento.

Finalmente estas plántulas regeneradas fueron trasplantadas a bolsas con tierra estéril, luego a macetas (en invernadero), y posteriormente fueron pasadas a fase de campo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Transcurrida una semana del trasplante de los callos a medio de regeneración, se observaron algunas zonas verdes en la superficie de este, las cuales, al cabo de 7 días, se convirtieron en brotes o yemas, donde comenzaron a despuntar las primeras hojas de coloración verde morada. En el período subsiguiente (3 a 4 semanas), se observaron, finalmente, las plántulas obtenidas. Esto ocurrió en las variantes donde se empleó 0,3 y 0,4 mg de Kinetina por litro, no así en el resto don-

donde no hubo regeneración alguna. Con 0,3 mg de esta hormona por litro se obtuvo un mayor número de plantas que con 0,4, tal como se muestra en la tabla 1.

El por ciento de plantas resultó bajo, aun en el mejor medio, debido posiblemente a que un número considerable de callos resultaron friables, los cuales no regeneran plantas (Vasil, 1984). Además, para la regeneración de plantas tiene importancia la totipotencia inicial del tejido que se toma como explante, la cual depende de la especie, del órgano y de la parte del órgano utilizado. Por ejemplo, Lu y Vasil (1981b) notaron que la división celular estuvo localizada casi exclusivamente en la mitad inferior del mesófilo y en la epidermis inferior; las células del mesófilo superior se dividieron muy raramente y las de la epidermis superior no se dividieron cuando fueron colocadas en un medio para formar callos.

Tabla 1. Efectos de la Kinetina y el AIA en la regeneración de plántulas a partir de callos en guinea likoni.

Hormona	Concentración (mg/l)	Número de muestras	No. de plántulas obtenidas	%
Kinetina	0,1	13	0	-
	0,2	13	0	-
	0,3	13	3	23,0
	0,4	13	1	7,6
	0	13	0	-
AIA	0,1	13	0	-
	0,2	13	0	-
	0,3	13	0	-

Por otro lado, Chlyah (1984) estudió en una población celular la síntesis del DNA y cuáles células producían morfogénesis en las células epidérmicas (por un procedimiento de marcaje radiactivo) y observó dos poblaciones de células; (a) una población que no sintetizó DNA, ni se dividió ni participó en la morfogénesis y representó el 80% de todas las células, y (b) una segunda población constituida por el 20% de las células restantes formadas por dos subpoblaciones: células que sintetizaron DNA entre 0 y 20 horas de cultivo, pero que no se dividieron, y células que sintetizaron DNA entre 20 y 48 horas, se dividieron y generalmente participaron en la formación de brotes.

Ello sugiere que del total de células que conforman el callo, solo una pequeña porción es capaz de regenerar plántulas.

Nuestros resultados parecen confirmar que el nivel endógeno celular de una fitohormona al cambiar de medio el callo tiene influencia en la diferenciación de plantas (Thomas y Street, 1970 y Walker y col., citados por Minocha, 1984), ya que al suplementar el medio solo con una citoquinina este fue capaz de regenerar plántulas; aunque Bajaj y Dhanju (1981) emplearon solo una auxina en el medio y lograron plántulas de esta misma especie, a pesar de la afirmación hecha por la literatura técnica acerca de que es necesario que existan en el medio combinaciones de auxina y citoquinina para diferenciar plántulas.

Ello viene a confirmar la necesidad de realizar estudios bioquímicos en las células del callo que determinen los posibles niveles endógenos de las fitohormonas que han sido empleadas en los medios precedentes.

Se sugiere investigar la morfogénesis a partir de otros tejidos del organismo vegetal en las condiciones de nuestro laboratorio y se recomienda la utilización de 0,3 mg de Kinetina por litro.

REFERENCIAS

- BAJAJ, Y.P.S. & DHANJU, M.S. 1981. Regeneration of plants from callus cultures of Napier grass (*Pennisetum purpureum*). Tissue Culture Laboratory, Punjab Agricultural University, Ludhiana (India)
- CHLYAH, H. 1984. Correlations in organogenesis. Proceedings of the International Symposium Olomouc. Czechoslovakia. p. 57
- HANNA, W.W.; LU, C. & VASIL, I.K. 1984. *Theoretical and Applied Genetics*. 67:155
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981a. *Annals of Botany*. 48:543
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981b. *Theoretical and Applied Genetics*. 59:275
- LU, C. & VASIL, I.K. 1982. *Amer. J. Bot.* 69:77
- MINOCHA, S.C. 1984. Regulation of organogenesis and embryogenesis in cell cultures. Proceedings of the International Symposium Olomouc. Czechoslovakia. p. 33
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. *Physiology Plantarum*. 15:473
- VASIL, I.K. 1984. Developing biotechnology for the improvement of cereal and grass crops - The consequences of somatic embryogenesis. Proceedings of the International Symposium Olomouc. Czechoslovakia. p. 67