

# Micropropagación, obtención de callos y regeneración de plántulas de *Miscanthus sinensis* Andersson (Poaceae).

Ana Julia Rodríguez Mansito

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT)

## RESUMEN

Se desarrolló un protocolo para la micropropagación, así como para la obtención de callos y regeneración de plántulas de *Miscanthus sinensis* Anders. La propagación *in vitro* fue desarrollada a partir del ápice meristemático en el medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) modificado con auxinas y citoquininas. La obtención de callos se logró al utilizar como explantes segmentos de hojas del verticilo apical. El cultivo fue realizado en el medio MS modificado, con la adición de la hormona ácido 2,4 diclorfenoxiacético (2,4 - D). Al eliminar la hormona del medio de cultivo se indujo la regeneración de plántulas. La tasa de multiplicación en la propagación alcanzó los 40 brotes por explante en 60 días. La adaptación a tierra en condiciones controladas y de campo de las plantas regeneradas por ambos métodos resultó altamente eficiente. No se observaron diferencias morfológicas con el donante.

**Palabras clave:** *Miscanthus sinensis*, micropropagación, callo, plántulas, 2,4-D.

## ABSTRACT

A procedure for micropropagation, callus production and plantlets regeneration from *Miscanthus sinensis* Anders. was developed. Apical meristem was used for *in vitro* propagation in Murashige and Skoog medium, 1962 (MS), modified with auxins and cytokinins. Callus production took place when leaf pieces from apical verticil were used as explants. The culture was carried out in the modified MS with the addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plantlets regeneration was induced when the hormone was removed from the culture medium. Multiplication rate in micropropagation reached 40 shoots for explant in sixty days. For both methods soil adaptation of regenerated plants in controlled conditions and field conditions was highly efficient. Morphological differences as compared with donor were not observed.

**Key words:** *Miscanthus sinensis*, micropropagation, callus, plantlets, 2,4-D.

## INTRODUCCIÓN

Existen diversas aplicaciones de la tecnología de cultivo de tejidos, siendo su uso más notable como instrumento para modificar genéticamente las plantas en función del mejoramiento (Bottino, 1975) y su aplicación en la propagación *in vitro* (Murashige, 1978 b). Esta última ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica, reportándose su empleo en diferentes especies (Murashige, 1978 a; Hughes, 1981; Thorpe, 1983; Gawel, 1990; Zorzoli *et al.*, 1996), etc.

En la actualidad resulta de interés el empleo de diferentes tipos de plantas como fuente de energía renovable, dentro de las cuales se encuentra el *Miscanthus sinensis* Anders., cultivo adaptable a climas tropicales y templados, del cual se puede obtener fibra para la industria energética sostenible, así como celulosa para la industria del papel, brindándonos una alternativa a la tala de los bosques.

Su propagación en nuestro país por la vía tradicional no sería factible, ya que no existe suficiente material y la obtención de un gran número de individuos requeriría mucho tiempo. Sin embargo, no existen programas biotecnológicos para su extensión.

El objetivo del presente trabajo es establecer un protocolo

para la propagación acelerada de esta especie, así como la obtención de plántulas vía callos como posible utilización en el mejoramiento genético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon verticilos apicales de plantas de alrededor de seis meses de *Miscanthus sinensis* Anders., los cuales se lavaron con detergente comercial y se enjuagaron con agua corriente varias veces. La esterilización se llevó a cabo con cloro comercial al 2 % durante 20 minutos y después de eliminar algunas hojas exteriores, se realizó una segunda esterilización con el mismo producto al 0,5 % durante cinco minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces en el flujo laminar.

Para la micropropagación se extrajeron los ápices meristemáticos y se colocaron en un medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) modificado, que contenía 6- furfuril amino purina (Kin) 23  $\mu\text{M}$ , ácido indol butírico (AIB) 0,005  $\mu\text{M}$  y ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) 0,28  $\mu\text{M}$  como reguladores del crecimiento, además agua de coco 10 %, 20 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar.

A los diez días se realizó un transplante a medio de ahijamiento MS, modificado con 23  $\mu\text{M}$  de Kin, 0,66  $\mu\text{M}$  de 6- bencil amino purina (BAP) y 3,7  $\mu\text{M}$  de ácido indol acético (AIA) con las mismas concentraciones de agua

de coco, sacarosa y agar, efectuando trasplantes sucesivos mensualmente hasta obtener el material deseado. También se realizaron pruebas en medio líquido para observar el ahijamiento.

Posteriormente se pasaron a un medio de enraizamiento líquido que contenía 7,4  $\mu\text{M}$  de AIA y 30 g/L de sacarosa.

En todos los casos el pH fue ajustado entre 5,6 y 5,7 antes de añadir el agar y los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 16 horas luz y temperatura de  $(28 \pm 2)$  °C.

Después que estuvo bien formado el sistema radical las plántulas se pasaron a bandejas con tierra y materia orgánica a partes iguales y se cubrieron con frascos de cristal transparente durante tres días. En las bandejas permanecieron dos meses para después ser llevadas a condiciones de campo.

Para la obtención de callos se utilizaron como explantes segmentos de hojas primordiales, de la zona cercana al meristemo apical, y se colocaron en el medio MS suplementado con 10 % de agua de coco y de ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4 -D) 13,5  $\mu\text{M}$ , solidificado con 7 g/L de agar y el pH ajustado a 6,5. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 16 horas luz así como en oscuridad permanente.

La diferenciación se logró al colocar los callos sin suministro de 2,4 -D ni agua de coco.

La adaptación a las condiciones ambientales fue igual que en las plantas micropropagadas.

Para evitar la oxidación se empleó ácido ascórbico 50 mg/L en los medios de establecimiento y ahijamiento.

La esterilización de los medios se llevó a cabo en una autoclave a 121 °C y 1,2 atm de presión durante 20 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó formación de tejido calloso a partir de las hojas primordiales, al transcurrir una semana de colocado el explante en el medio de cultivo. Al mes aproximadamente ya se pudo apreciar una gran masa de células de color cremoso y consistencia friable, que le da la característica de alto potencial morfogenético, similar al obtenido en algunas variedades de caña de azúcar (Rodríguez, 1982; Fernández *et al.*, 1984).

El desarrollo de los callos se produjo tanto en condiciones de fotoperíodo como en oscuridad continua, aunque en este último caso se apreció que la calidad de los mis-

mos fue superior, al haber menor afectación por los fenoles, lo que concuerda con lo planteado por Fernández *et al.* (1984), en estudios realizados en callos de caña de azúcar con iluminación y oscuridad continuas, donde el contenido de fenoles fue menor en esta última condición.

Se obtuvo la diferenciación de plántulas a partir de los callos al retirar del medio tanto la hormona como el agua de coco, observándose la aparición de los primeros brotes verdes a la semana de cultivo aproximadamente. A los 30 días ya se habían desarrollado plántulas con raíces, sin necesidad de añadir ninguna hormona para la diferenciación de las raíces. La obtención de plántulas a través de callos pudiera ser una posible vía de explotar la variación somaclonal para su uso con fines de mejoramiento, según lo planteado por Larkin y Scowcroft (1981).

Los ápices meristemáticos colocados en medio de establecimiento para la micropropagación desenrollaron las hojas en 10 días, tiempo suficiente para ser trasladados a medio de ahijamiento.

A los 45 días se obtuvieron de dos a tres brotes por ápice y al cabo de 60 días la cifra alcanzaba los 40.

Con respecto a los medios sólidos y líquidos empleados en la fase de ahijamiento de los brotes, ambos dieron resultados satisfactorios, pero hubo un mejor desarrollo cuando se alternaron (Figs. 1 y 2). Resultados similares obtuvieron Ken y Teo (1994) en papaya (*Carica papaya* L.) al obtener un mayor número de brotes cuando emplearon secuencias de medios sólidos y líquidos.

Las plántulas obtenidas desarrollaron un sistema radical adecuado en el medio de enraizamiento al mes aproximadamente, y después de ese tiempo se adaptaron perfectamente a bandejas y campo no presentándose mortalidad en esa etapa (Figs. 3 y 4).

Las diferencias morfológicas con el donante no fueron observadas, aunque sí hubo un ahijamiento mayor, aspecto que coincide con lo reportado por Murashige (1978 b).

## CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* y la adaptación de las plantas de *Miscanthus sinensis* Anders. a campo.

- No se apreciaron diferencias morfológicas con el donante.

- Se logró la obtención de callos y regeneración de plántulas a partir de los mismos, así como su adaptación a condiciones ambientales.



Fig.1. Propagación en medio sólido.



Fig.2. Propagación en medio líquido.



Fig.3. Adaptación a condiciones ambientales.



Fig.4. Plantas adaptadas al campo.

#### BIBLIOGRAFÍA

Bottino JP. 1975. The potential of genetic manipulation in plant cell cultures for plant breeding. *Radiat. Bot.*, 15, 1.

Fernández C, Rodríguez AJ, Pérez A y Martín DM. 1984. Contenido de fenoles y actividad peroxidasa en callos de dos variedades de caña de azúcar. *Revista Cien. Agr.*, 21: 119-122.

Gawel NJ, Robacker CD y Corby WL. 1990. In vitro propagation of *Miscanthus sinensis*. *Hort. Sci.*, 25 (10): 1291-1293.

Hughes K W. 1981. Ornamental species. En: Conger BV (ed). *Cloning agriculture plant via in vitro techniques*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EU.

Ken ChL y Teo CKH. 1994. Culture of papaya explant in solid-liquid media sequence as a rapid method for producing multiple shoots. *Tropical Agriculture Science*. 17(2): 103-106.

Larkin PJ y Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.

Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium of rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

Murashige T. The impact of plant tissue culture on agriculture. En: Thorpe TA *Frontiers of plant tissue culture.* (ed), University of Calgary, Calgary; Canadá. 1978 a: 15-26.

\_\_\_\_\_. Principles of rapid propagation. En: Hughes KW, Henke PR y Contantin MJ. *Propagation of Higher Plants through Tissue Culture.* (eds). Technical Information Center. U.S. Department of Energy, Springfield, Va. 1978 b: 14.

Rodríguez AJ. 1982. Adaptación a condiciones ambientales de plantas de caña de azúcar, obtenidas a partir de la

variedad CP 52-43, mediante cultivo de tejidos. *Revista Cien. Agr.*, 11: 117-118.

Thorpe T. 1983. Biotechnological application of tissue culture to forest tree improvement. *Biotechnological Advances.* 1: 263-278.

Zorzoli R, Nestares GM y Mroginski LA. 1996. Micropropagación de genotipos de girasol (*Helianthus annuus*) por cultivo *in vitro* y la evaluación de las fases de aclimatación. *Invest. Agr. : Prot. Veg.* 11 (3).

**Recibido:** 15 de noviembre de 1998.

**Direcc. del autor:** Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 1 esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros. CP. 17200, Ciudad de La Habana, Cuba.