

# Utilización de la técnica de embriogénesis somática para la micropropagación de líneas androestériles de *Pennisetum americanum* (L.) Leeke.

Niurka Morffi González\*, Marta Arteaga Amador\* y Ramón O. Martínez Zubiaur\*\*

\*Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

\*\*Instituto de Ciencia Animal (ICA)

## RESUMEN

Se estudiaron diferentes aspectos relacionados con la formación y propagación del callo embriogénico, así como la regeneración de plantas, a partir de inflorescencias jóvenes de tres líneas androestériles de *Pennisetum americanum*: 67A<sub>3</sub>, 23A y 239A<sub>2</sub>D<sub>2</sub>. Se evaluó la efectividad de diez combinaciones de reguladores del crecimiento sobre el medio basal de Murashige y Skoog (1962). La combinación de 2,4-D (2,0 mg/L) + BA (0,4 mg/L) reportó resultados satisfactorios (66,7% de efectividad) en la inducción del callo embriogénico para la variedad 23A. Se observó que la propagación del callo embriogénico ocurre por formación de embriones adventicios a bajas concentraciones de 2,4-D (0,5 mg/L) + agua de coco (15%). La regeneración de plantas y su maduración fue efectiva en medio con 2,4-D + (0,1 mg/L) + agua de coco (15%) seguido del trasplante a los 30 días a medio libre de hormonas. Se discuten los resultados.

**Palabras clave:** micropropagación, embriogénesis somática, *Pennisetum americanum*, biotecnología, líneas androestériles

## ABSTRACT

Different aspects related with the formation and propagation of embryogenic callus and the regeneration of plants were studied, from young inflorescences of three androsteril lines of *Pennisetum americanum*: 67A<sub>3</sub>, 23A and 239A<sub>2</sub>D<sub>2</sub>. The effectiveness of ten combinations of growth regulators was evaluated on Murashige and Skoog's basal medium (1962). The combination of 2,4-D (2,0 mg/L) + BA (0,4 mg/L) reported satisfactory results (66,7%) in the induction of embryogenic callus for the variety 23A. The propagation of the embryogenic callus by formation of adventitious embryos were observed in low concentrations of 2,4-D (0,5 mg/L) + coconut water (15%). The plants regeneration and their development was effective with 2,4-D (0,1 mg/L) + coconut water (15%) followed by the transplant after 30 days to free of hormones medium. Results are discussed.

**Key words:** micropropagation, somatic embryogenesis, *Pennisetum americanum*, biotechnology, androsteril lines

## INTRODUCCIÓN

En Cuba la producción de forrajes está basada fundamentalmente en el King grass, especie clasificada como *Pennisetum purpureum* K. Schum que fue introducida en nuestro país en el año 1975. Normalmente se siembra por propagación vegetativa para garantizar el alimento destinado al consumo animal en la época de sequía.

Dada la necesidad de contar con otras variantes de plantas forrajeras que puedan adaptarse a las condiciones climáticas de cada región, así como a los diferentes propósitos productivos que se persigan, Martínez *et al.* (1996) utilizaron el cultivo *in vitro* para la obtención de mutantes de *Pennisetum purpureum* como variantes útiles de pastos tropicales.

Otra de las posibilidades inmediatas de obtener nuevas variedades y que en la actualidad continua siendo objeto de estudio, es el cruzamiento entre especies de *Pennisetum* y su posterior evaluación (Yadav *et al.*, 1995 ; Noitsakis *et al.*, 1996); en nuestro país se han desarrollado cruces de *Pennisetum purpureum* con *Pennisetum americanum* manipulando líneas androestériles, lo cual

resulta complejo si no se cuenta con el mantenedor y el regenerador de cada androestéril.

Por otra parte, la micropropagación vía embriogénesis somática resulta una buena opción para la propagación acelerada de estas líneas de interés. Shenoy y Vasil (1992) avalaron la utilización de este método y sus resultados confirman reportes anteriores acerca de la uniformidad genética de las plantas derivadas de embriones somáticos; así mismo, contar con un sistema repetible de propagación de callos embriogénicos permite el desarrollo de técnicas mutagénicas (Herrera *et al.*, 1996), que incluyen sistemas de selección de líneas resistentes a condiciones de estrés, tanto en medio sólido como en suspensiones celulares desde los estadios más tempranos del desarrollo de las plantas (Herrera *et al.*, 1989; Rai y Kumar, 1994; Ashraf *et al.*, 1995 ; Tepe y Harms, 1995).

El objetivo del presente trabajo es obtener por embriogénesis somática, un esquema de micropropagación de líneas androestériles de *Pennisetum americanum*, a partir de inflorescencias jóvenes.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**Inducción del callo embriogénico**

Se utilizaron como explantos fragmentos de un centímetro de inflorescencias jóvenes de tres líneas androestériles de *Pennisetum americanum*: 67A<sub>3</sub>, 23A y 239A<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, cultivadas en condiciones de campo sobre suelo ferralítico rojo. Se probaron tres variantes de medios de cultivo (IC328, IC322 e IC23) constituidos por el MS (medio basal de Murashige y Skoog, 1962) y suplementados con reguladores del crecimiento según se describe en la tabla I. Se utilizó agar (OXOID No.3) al 0,65% y el pH se ajustó a 5,7.

Se colectaron fragmentos terminales de aproximadamente 12 cm de plantas en prefloración y se trasladaron al laboratorio sumergidos en solución diluida al 0,5% de cloro comercial (Kinsol al 2,5% IA). Posteriormente se les aplicó tres lavados con agua destilada y se pasaron al flujo laminar donde se desinfectaron con alcohol al 70% durante un minuto y 10% de cloro comercial por 10 minutos. Las inflorescencias jóvenes fueron extraídas intactas de su envoltura de hojas y los explantos obtenidos se inocularon en tubos de ensayo conteniendo 10 mL de medio para la iniciación del callo. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad total y a temperatura de (26±2)°C durante cinco semanas.

**Micropropagación del callo embriogénico**

Los callos inducidos se fragmentaron, siguiendo el mismo procedimiento en todas las variedades, descartando las porciones friables y necróticas y seleccionando las

embriogénicas, éstas últimas se trasplantaron a tres medios de cultivo, dos de ellos utilizados en la fase de inducción (IC322 y IC23) y el RC123 con una disminución en la concentración de auxina (Tabla I). Se realizaron dos subcultivos cada cuatro semanas, para evaluar la potencialidad de la propagación en 25 fragmentos de callos por medio de cultivo. Se mantuvieron las mismas condiciones de incubación.

**Regeneración de plantas**

Para esta fase los callos embriogénicos propagados se subdividieron en secciones de aproximadamente 1 cm y se trasplantaron a diferentes variantes del MS: RP86, RP300A, RP300, RP170, RP325 y RP1 (Tabla I); se sembraron 25 callos por variante y se incubaron en luz artificial (3000-4000 lux) con fotoperíodos de 16 hr/luz y temperatura de (26±2)°C. A las cuatro semanas se trasplantaron todos los callos al medio MS sin adición de hormonas y sin variar las condiciones de incubación.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Solamente el 68% de los explantos iniciados *in vitro* resultaron viables, lo que puede estar relacionado con las características del material, específicamente su grado de inmadurez; sin embargo, la factibilidad del empleo de inflorescencias jóvenes (no mayores de 3.0 cm) para obtener callos embriogénicos está avalada por Da Yuan y Vasil (1982). Cheng (1992) y Botti y Vasil (1983) determinaron que la respuesta de este tipo de explanto se vincula con el estado de primordio floral, en híbridos de *Pennisetum americanum* x *P purpureum* y en *Pennisetum purpureum* respectivamente.

**TABLA I**

Variantes de combinaciones de reguladores del crecimiento adicionadas al MS utilizadas para la inducción del callo (IC), reproducción del callo embriogénico (RC) y regeneración de plantas (RP).

Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg/L)						
	2,4-D	BAP	Agua de coco(%)	IAA	KINETINA	Malato de amonio	Acido absísico
IC238	2,0	0,4	5,0	-	-	-	-
IC322	2,5	-	5,0	-	-	-	-
IC23	2,0	0,4	-	-	-	-	-
RC123	0,5	-	15,0	-	-	-	-
RP86	0,1	-	15,0	-	-	-	-
RP300A	0,2	-	-	0,2	1,0	-	-
RP300	-	-	-	0,2	1,0	-	-
RP170	-	1,0	15,0	1,0	-	-	-
RP325	-	-	-	-	-	400,0	0,01
RP1	-	-	-	-	-	-	-

BAP: 6-bencilaminopurina; IAA: ácido indolacético; 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; Kinetina: furfurilaminopurina.

La proliferación del callo fue evidente a los 21 días de realizada la siembra, definiéndose claramente tres variantes de textura: friable, semifriable y embriogénico (Fig.1). Los callos embriogénicos y la porción embriogénica de los semifriables se caracterizaron por un color blanco opaco, de consistencia endurecida y estructuras globulares no definidas; a las cinco semanas su talla permitió el trasplante a los medios utilizados para su multiplicación.

El medio IC23 reportó resultados satisfactorios para el 66,7% de los cultivos en la inducción del callo embriogénico para la variedad 23A, las otras dos variedades respondieron discretamente con la combinación del IC322 (Tabla II); la composición hormonal de ambos medios se encuentra en el rango de estimulación efectiva sugerido por Vasil y Vasil (1981) y Bajaj y Dhanju (1981), para *Pennisetum americanum* y *Pennisetum purpureum* respectivamente.

**TABLA II**

Porcentajes de inducción del callo embriogénico por variedad y medio de cultivo utilizado.

L.A./MC	IC328	IC322	IC23
67A <sub>3</sub>	13,3	39,0	16,0
23A	46,1	42,0	66,7
239A <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	0	36,0	5,0

L.A: líneas androestériles; MC: medio de cultivo.

La propagación de los callos embriogénicos resultó altamente efectiva con las condiciones de incubación establecidas, para los dos subcultivos realizados y las tres combinaciones de medio de cultivo utilizadas (Tabla III). Se destacó el RC123 con un 80% de callos con nuevo crecimiento, lo cual puede sugerir que la combinación hormonal estimulativa para la multiplicación del callo embriogénico de líneas androestériles de

*Pennisetum americanum*, debe ser cercana a la que incluye el medio de regeneración propuesto para otras especies de este género (Passos y Katterman, 1994). Los embriones somáticos de *Pennisetum*, al igual que embriones cigóticos, son pequeños y pasan de un estado a otro en cortos períodos. En nuestro trabajo se pudo observar además, que la propagación ocurre por formación de embriones adventicios a partir de los embriones primarios en estado globular.

La conversión de embriones en plantas fue visible a los 30 días de realizado el trasplante a los medios de cultivo en estudio. El RP170 promovió el mayor porcentaje de conversión por fragmento del callo. Resultados similares obtuvo Martínez *et al.*, (1996) en *Pennisetum purpureum*; no obstante, los porcentajes de conversión obtenidos en el RP86 (por encima del 50%) deben ser tomados en cuenta como potencialmente factibles (Fig.2); estos resultados coinciden con lo sugerido por diversos autores en relación a que la disminución paulatina de la concentración de auxinas (2,4-D) hasta su eliminación total, contribuye a la maduración de los embriones somáticos y su futura conversión en plantas, mientras que elevadas concentraciones de auxinas inhiben la embriogénesis y provocan el desarrollo precoz de los embriones (Cheng, 1992). EL RP-325 no resultó tan efectivo como propusieron Vasil y Vasil (1981) para híbridos de *Pennisetum* (Fig.3). Las variantes del medio RP300, RP300A, e inclusive, la RP1 aportaron resultados discretos pero no despreciables.

El trasplante de los callos a RP1 (medio basal MS), permitió el proceso de conversión de los embriones en estados inferiores de desarrollo, disminuyendo así las pérdidas por asincronía, además de contribuir a la maduración de las vitroplantas.

**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Dr. Gleen Burton de la Coastal Plain Station de Georgia la donación del material genético utilizado y a Alberto Acosta, del Instituto de Ciencia Animal, por el trabajo fotográfico.

**TABLA III**

Respuesta del callo embriogénico a las combinaciones hormonales utilizadas para su propagación y la regeneración de plantas.

RE/MC	RC123	IC23	IC322	RP86	RP300	RP300A	RP170	RP325	RP1
PE	83	72	60	-	-	-	-	-	-
PC	-	-	-	56	52	44	64	16	48

RE: respuesta embriogénica; MC: medio de cultivo; PE: porcentaje de callos embriogénicos con nuevo crecimiento; PC: porcentaje de conversión.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ashraf M, Zafar ZU and Cheema ZA. 1995. Effect of low potassium regimes on some salt and drought tolerant lines of pearl millet. *Phyton*. Horn. 34 (2): 219-227.
- Bajaj YPS and Dhanju BS. 1981. Regeneration of plants from callus culture of Napier grass (*Pennisetum purpureum*). *PL. Sci. Let.* 20: 343-345.
- Botti C and Vasil IK. 1983. Ontogeny of somatic embryos of *P.purpureum*. II. In cultured immature inflorescences. *Am. J. Bot.* 62: 1629-1635.
- Cheng YK. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Pennisetum purpureum* and *P.americanum* x *P. purpureum* hybrids. *Journal of Taiwan Livestock Research* 25(2): 107-116.
- Da Yuan W and Vasil IK. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* K. Schum (Napier or Elephant grass). *PL. Sci. Let.* 25: 147-154.
- Herrera RS, Lauzan J, Cruz R y Martínez RO. 1996. Estudio de mutantes de King grass:( *Pennisetum purpureum* ssp.), obtenidos mediante técnicas nucleares y mutágenos químicos. *V. Pigmentos. RCCA.* 30(2): 214-216.
- Herrera RS, Lauzan J, Martínez RO, Monzote MM and Cruz R. 1989. Evaluation of King grass clones (*Pennisetum purpureum*) obtained by tissue culture. III. Quality of the mutants. *Proceeding of the XVI International Grassland Congress. Versailles, France.* pp. 873-874.
- Martínez RO, Herrera RS y Torres V. 1996. Cultivo de tejidos y fitotecnia de las mutaciones en pastos tropicales. *Pennisetum purpureum: otro ejemplo para la obtención de nuevos clones. RCCA.* 30(1): 1-11.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Noitsakis B, Nastis A, Koukoura Z, Zervas NP and Hatziminaoglou J. 1996. Proceeding of an international symposium: The optimal exploitation of marginal areas by extensive ruminant production systems. Thessaloniki, Greece. pp. 217-220.
- Passos LP and Katterman F. 1994. Production of embryogenic callus of elephant grass on response to different culture methods, types of explants and growth regulator. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 23(5): 743-753.
- Rai KN and Kumar KA. 1994. Pearl millet improvement at ICRISAT an update. *International Surghum and Millets Newsletter* 35: 1-29.
- Shenoy VB and Vasil IK. 1992. Biochemical and molecular analysis of plant derived from embryogenic tissue culture of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). *Theor. Appl. Genet.* 83(8): 947-955.
- Tepe M and Harms H. 1995. Influence of abiotic stress on the GSH/GSSG system of plant cell culture. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 158(1): 75-78.
- Vasil V and Vasil IK. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Pennisetum americanum* and *Pennisetum americanum* x *Pennisetum purpureum* (hybrid). *Am. J. Bot.* 68: 864-872.
- Yadav YP, Phogat DS, Virender K, Yadav HD and Kumar V. 1996. Relative performance of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) hybrids and varieties under two moisture regimes. *Crop. Research. Hisar.* 12(2): 146-149.

**Recibido:** 3 de febrero de 1999.

**Direcc. de los autores :** \*Jardín Botánico Nacional, Carretera "El Rocío" km 3 ½, Calabazar, Boyeros. CP. 19230, Ciudad de La Habana, Cuba. \*\*Instituto de Ciencia Animal (ICA), Tulipán # 1011 e/ 47 y Loma, Nuevo Vedado, Plaza. CP. 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

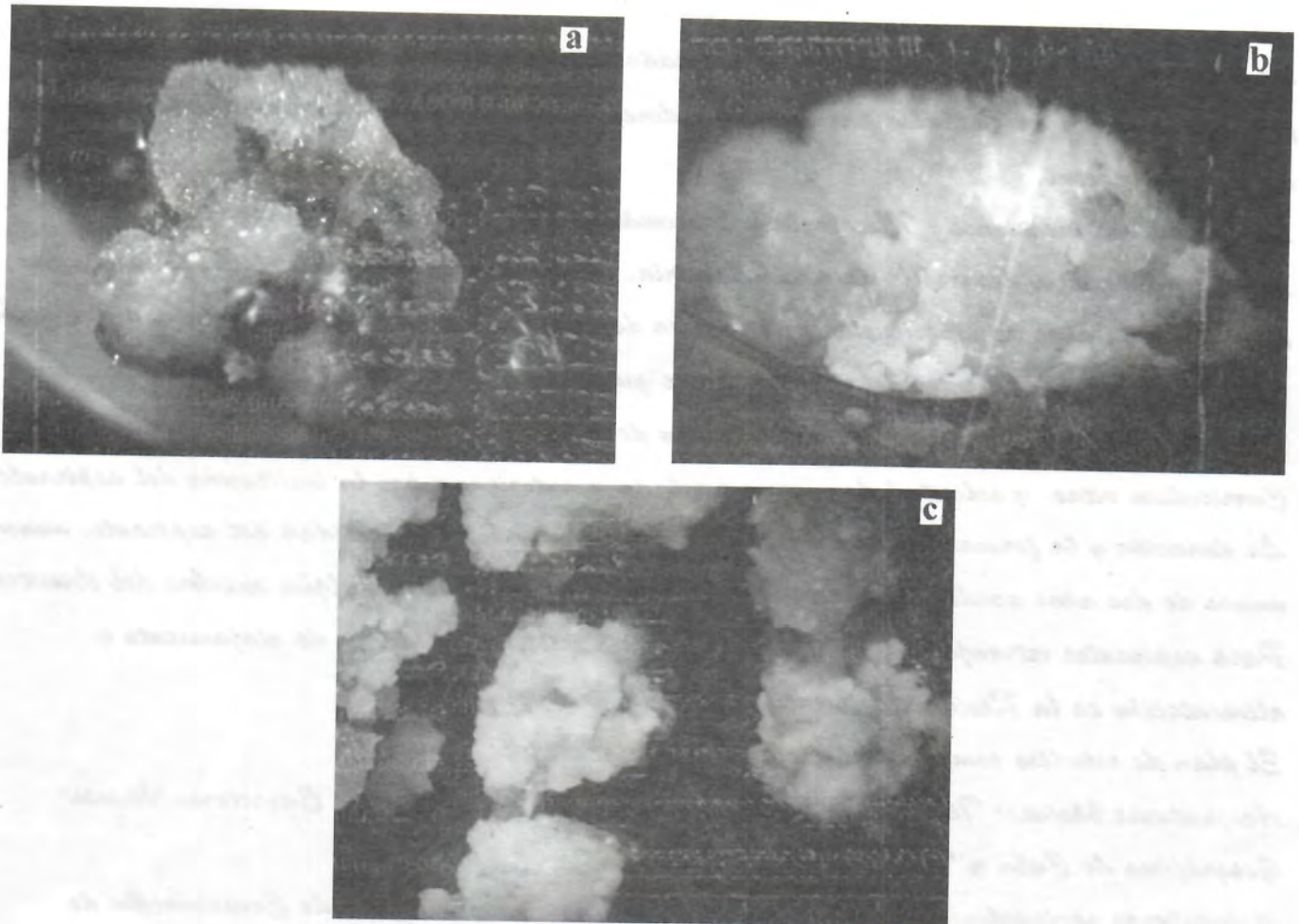


Fig. 1. Variantes de textura características de los callos de líneas androestériles de *Pennisetum americanum* en los medios de cultivo utilizados. a) friable, b) semifriable y c) embriogénico.

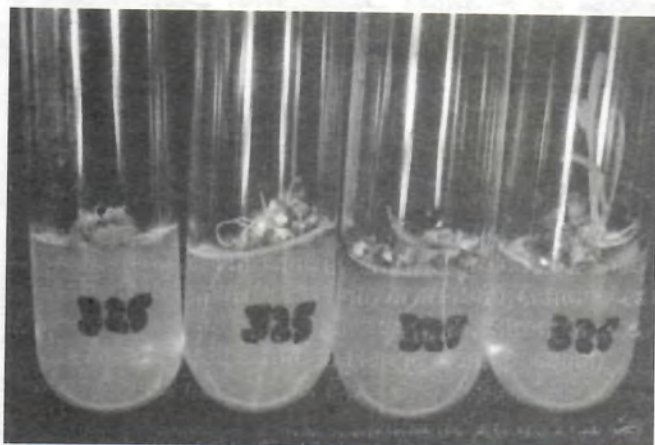


Fig. 2. Proceso de conversión de embriones somáticos a partir de su trasplante a embriones medio MS + 0,1mg/L de 2,4-D + 15 % de agua de coco ( RP86 ).

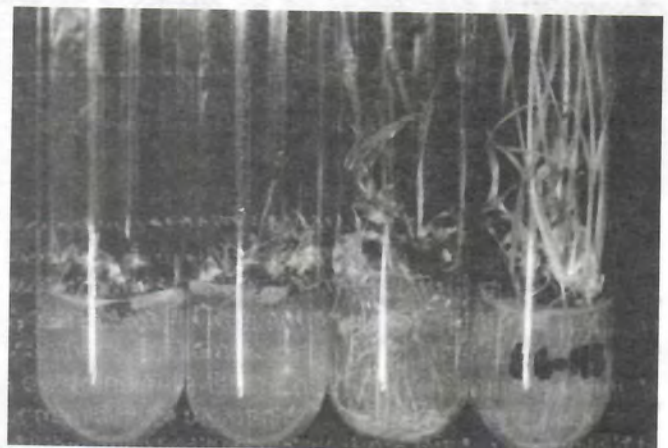


Fig. 3. Baja efectividad en la conversión de la combinación de Malato de amonio + Acido absícico.