

# Preservación de genotipos selectos de *Lolium multiflorum* cvar. RvP, mediante cultivo 'in vitro' de meristemos apicales

A. POL SALOM y H. MEDRANO GIL

Laboratorio de Fisiología Vegetal. Universitat de les Illes Balears.  
07071 PALMA DE MALLORCA

## RESUMEN:

*Las técnicas de cultivo 'in vitro' de meristemos, pueden prestar una valiosa ayuda para preservar a largo plazo, genotipos de interés, en especies, como las gramíneas forrajeras, habitualmente alógamas. En este trabajo se describen los métodos aplicados y los primeros resultados obtenidos en la preservación, mediante cultivo 'in vitro' de meristemos, de genotipos de Lolium multiflorum (cvar. RvP) seleccionados por eficacia fotosintética.*

## PALABRAS CLAVE:

**LOLIUM MULTIFLORUM, CULTIVAR RvP, PRESERVACION 'IN VITRO', CULTIVO DE TEJIDOS.**

## INTRODUCCION:

*Un problema elemental de los programas de mejora genética vegetal, es asegurar el mantenimiento de los genotipos que se ha conseguido seleccionar.*

*En gramíneas forrajeras, este problema se agudiza debido a sus características reproductoras, que favorecen la alogamia y reducen drásticamente las posibilidades de autofecundación. Esta característica, dificulta el mantenimiento prolongado de los genotipos obtenidos por selección.*

*Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales 'in vitro', pueden prestar*

---

Este trabajo es parte del proyecto n 1936/82 C financiado por la C.A.I.C.Y.T.

una valiosa ayuda para la resolución de este problema (MEDRANO y POL, 1985).

Se han descrito las condiciones y medio de cultivo adecuados para el mantenimiento y regeneración de plantas completas, a partir de meristemas apicales en *Lolium multiflorum* (DALE, 1975); aplicándose con éxito estas mismas técnicas, a distintas especies de gramíneas forrajeras, y obteniéndose los mayores porcentajes de regeneración, precisamente en *Lolium multiflorum* (DALE, 1977).

Posteriores trabajos han demostrado una buena regeneración, en medio con Kinetina como única hormona exógena (DALE, 1980), estableciendo las condiciones ambientales adecuadas para la obtención de plántulas a partir de meristemas, y su posterior preservación a largo plazo. Dicha preservación se consigue mediante cultivo a bajas temperaturas, durante 10 a 11 meses, y subcultivo posterior, para en su caso, reinicializar el ciclo (DALE y col. 1980). Se comprobó además, que los genotipos preservados, se mantienen genéticamente estables tras varios subcultivos (DALE y col. 1982).

El desarrollo de un programa de mejora genética de gramíneas forrajeras, mediante selección por supervivencia en cámara de bajo contenido en CO<sub>2</sub>, ha permitido la obtención de los primeros genotipos supervivientes (POL y MEDRANO, 1987), que interesa preservar para posteriores estudios y posibles cruzamientos. En esta línea, el objetivo del presente trabajo, ha sido poner a punto y utilizar las técnicas de cultivo 'in vitro' de meristemas apicales, para preservar dichos genotipos.

## MATERIAL Y METODOS

### *Material:*

Como material vegetal de partida se utilizan tallitos individuales o "tillers" de *Lolium multiflorum* cvar. RvP. Las plantas de las que procede este material, han sufrido un proceso de selección en una cámara con atmósfera de baja concentración de CO<sub>2</sub>. Estos "tillers" se cortan de modo que, el tallo tenga una longitud de 5 cm y las raíces 0,5 cm (DALE y col. 1980).

### *Métodos:*

*lavado y desinfección:* Previamente a la disección del material vegetal, es necesario someterlo a un proceso que permita evitar cualquier tipo de contaminación microbiana, tanto del tejido como del medio nutritivo, durante su cultivo "in vitro". Para ello, en primer lugar, se lavan los "tillers" a fondo, manteniéndolos bajo un chorro de agua, eliminando cualquier resto de suelo o de tejido seco de la propia planta. A continuación, se procede a una desinfección de las muestras, la cual debe ser superficial

para que no llegue a dañar el tejido meristemático. Este proceso comienza con una inmersión en etanol de 96°, durante 30 segundos. Seguidamente, se someten a inmersión en hipoclorito sódico al 50% (lo cual supone de 5 a 7% p/v de cloro activo) conjuntamente con 4 gotas de agente mojante "Tween-20" por cada 100 ml de solución; se mantiene en estas condiciones durante 15 minutos, agitando frecuentemente. Posteriormente, se lavan los "tillers" desinfectados, 6 veces con agua esterilizada, para eliminar los restos de desinfectante. Todas estas operaciones, así como las que se describen a continuación, se realizan trabajando en condiciones estériles en una "cabina de flujo laminar".

*Disección y siembra:* Los "tillers" se secan y se sujetan bajo una lupa binocular (10x). Se practica un corte longitudinal con bisturí, sobre el extremo inferior del tallo, a unos pocos milímetros de la raíz. Se separan las sucesivas capas de vaina, manipulando con aguja, hasta visualizar los primordios foliares internos. Se extrae el tejido meristemático, juntamente con el par de primordios foliares más jóvenes, de modo que el conjunto mida entre 0,3 y 0,9 mm de longitud (DALE, 1980). Se siembra el tejido extraído en tubo de cultivo con medio nutritivo.

*Medio de cultivo:* El medio nutritivo para el cultivo "in vitro" de meristemas contiene las sales MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962), 30 g/l de sacarosa, 0,2 mg/l de Kinetina; se ajusta el pH a 5,6 y se añaden 5 g/l de "Difco Bacto Agar". El agar se disuelve en autoclave a 121°C durante 5 minutos. Se dosifican 20 ml de medio en tubos de cultivo, esterilizándose en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

*Incubación:* Los tubos sembrados se incuban a 25°C, con una intensidad luminosa de 6000 lux con luz blanca en iluminación continua (de 1 a 2 meses). Una vez regeneradas las plántulas, se inicia el período de preservación, manteniéndolas a temperaturas de 2 a 4°C y 8 horas de fotoperíodo.

En este primer ensayo, se han utilizado 10 genotipos, sembrándose en total 122 meristemas.

## RESULTADOS Y DISCUSION:

La aplicación de las técnicas anteriormente descritas se ha llevado a cabo con éxito en todos los genotipos ensayados, excepto en el S-94. La tabla 1, muestra la eficiencia conseguida en los distintos genotipos, detallando el número de explantes utilizados y el de plantas regeneradas, así como los estadios en que se mantienen los explantes que no llegan a desarrollar plántula en tubo, y que van desde la ausencia de desarrollo, pasando por tejido verde indiferenciado, a la aparición de tejido foliar pero sin desarrollar plántula.

La eficiencia media en % de plántulas regeneradas (24,6%) es sensiblemente inferior a la referida por otros autores (76%), para el mismo tamaño de explante utilizado y en esta especie (DALE, 1980). Aunque exis-

ten notables efectos de cultivar en la respuesta al cultivo 'in vitro', se hace necesario optimizar las condiciones de cultivo y manipulación, para en próximos trabajos alcanzar eficiencias similares a las referidas.

La falta de desarrollo del explante, la formación de tejido indiferenciado y la contaminación, son, por este orden, los tres factores de mayor incidencia entre los meristemos no regenerados a plántula, en el tiempo previsto (dos meses). La dificultad de extracción, hace que el tamaño real del explante utilizado resulte bastante variable. En explantes de tamaño reducido (0,1 -0,3 mm), la viabilidad es muy inferior, y existe un riego mucho más alto de desecación durante la manipulación y en el tubo, con la consiguiente falta de desarrollo. La proliferación de tejido indiferenciado, podría asociarse también a tamaños de explante por debajo del adecuado. Por otra parte, la posibilidad de contaminación, por el propio tejido del explante, aumenta con el tamaño.

No obstante, la aplicación por primera vez de estas técnicas, ha permitido la preservación con éxito de prácticamente todos los genotipos utilizados. Queda por observar la respuesta al subcultivo y en el trasplante a maceta de estas plántulas, para evaluar con mayor base la eficiencia y utilidad del presente método.

TABLA 1. EFICIENCIA EN LA REGENERACION DE PLANTULAS A PARTIR DE MERISTEMOS EN LOS GENOTIPOS ENSAYADOS.

GENOTIPOS	Nº de meristemos sembrados	Nº de plántulas regenerados	%	A	B	C	D	Nº de tubos contaminados
S-6	14	5	35,7	2	2	2	1	2
S-13	7	2	28,6	-	-	-	-	5
S-14	20	4	20	1	6	1	2	6
S-19	18	1	5,6	-	6	2	3	6
S-74	16	8	50	1	3	1	2	1
S-76	5	2	40	1	-	-	2	-
S-77	18	5	27,8	2	2	3	6	-
S-81	10	1	10	-	-	3	6	-
S-83	4	2	50	-	1	-	1	-
S-94	10	-	-	-	1	-	9	-
TOTAL	122	30	24,6	7	21	12	32	20

A: Tubos en que el explante muestra sólo una hoja diferenciada.

B: Crecimiento de tejido indiferenciado (2-5 mm).

C: Crecimiento de tejido indiferenciado (0-1 mm).

D: Explante sin modificación aparente. No desarrollado.

DALE, PJ. 1975. Meristem tip culture in *Lolium, multiflorum*. J. of Experimental Botany 26: 731-736.

DALE, PJ. 1977. Meristem tip culture in *Lolium Festuca, Phleum* and *Dactylis*. Plant Science Letters 9: 333-338.

DALE, PJ. 1980. A method for 'in vitro' storage of *Lolium multiflorum* Lam. Ann. of Bot. 45: 497-502.

DALE, PJ, VA CHEYNE y SJ DALTON. 1980. Pathogen elimination and 'in vitro' plant storage in forage grasses and legumes. En: Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Ed. DS INGRAM and JP HELGESON. p. 119-124.

DALE, PJ VA CHEYNE, SJ DALTON, MF FAY, ML JONES y CS PIKE. 1982. Tissue culture for the conservation and creation of genetic variability in forage grass and legumes. Meeting of the Fodder Crops Section of EUCARPIA. Aberystwyth. p. 124-132.

DALTON, SJ y PJ DALE. 1981. Induced tillering of *Lolium multiflorum* 'in vitro'. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 1: 57-64.

MEDRANO, H y A POL. 1975. Cultivo de tejidos y mejora genética en gramíneas forrajeras. Actas XXV Reunión Científica de la S.E.E.P. Valladolid.

MURASHIGE, T y F SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

POL, A y H MEDRANO. 1987. Crecimiento y producción de genotipos de *Lolium multiflorum* cvar. RvP, seleccionados en cámara de baja concentración de CO<sub>2</sub>. Actas XXVII Reunión Científica de la S.E.E.P. Mahón/Palma.

#### STORAGE OF *LOLIUM MULTIFLORUM* CVAR. RvP SELECTED GENOTYPES, BY SHOOT TIP 'IN VITRO' CULTURE

#### SUMMARY

Shoot-tip 'in vitro' culture techniques may be of great interest to long term storage of certain genotypes, in outbreeding species like forage grasses. In the present work, has been described, the applied methods and first results obtained in the preservation of *Lolium multiflorum* (cvar. RvP) selected genotypes, by 'in vitro' meristem culture.

*Key words:* *Lolium multiflorum*, cvar. RvP, 'in vitro' storage, tissue culture.