

### Cinco especies de *Paspalum* (Gramineae) por obtención de plantas por cultivo *in vitro* de ovarios.

**Summary.** Excised ovaries of five *Paspalum* species 24, 76, and 100 hours after pollinization, were incubated on a Murashige and Skoog medium with 0.5 to 5% of sucrose. The cultures were kept at  $27 \pm 5^\circ\text{C}$ . for a 16 h photoperiod. The best results were obtained with ovaries 100 hours after pollinization. The addition of high levels (5%) of sucrose resulted in an increase of the growth of the plants with good shoots and roots. No response of the ovaries was observed with the addition of ANA, K, and  $\text{AG}_3$  to the medium. Ovaries from *P. ionanthum* x *P. cromoerhizon* were cultured, some of them producing regenerated plants.

Una de las causas de la baja efectividad de los cruzamientos interespecíficos es el aborto de los embriones después de la polinización. La aplicación de la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos, y en particular la de ovarios o de embriones, posibilitó el éxito de algunos cruzamientos (4, 5, 6). En algunos casos, como en el género *Paspalum*, la extracción de los embriones debe realizarse en un lapso corto después de la polinización. Este hecho hace que se deba cultivar embriones muy pequeños, cuya manipulación es dificultosa, por lo que se hace necesario optar por un explanto de mayor tamaño, como son los ovarios fecundados.

Los cruzamientos interespecíficos en *Paspalum* son de utilidad en el mejoramiento de algunas especies de este género de gramíneas y además facilitan estudiar las relaciones filogenéticas. Se obtuvo algunos híbridos interespecíficos de *Paspalum* mediante el uso de las técnicas convencionales (1, 2). Sin embargo, algunas combinaciones interesantes no pudieron ser logradas (2); el aborto de los embriones pocos días después de la polinización fue una de las causas (Quarin, comunicación personal).

Este trabajo informa acerca de una técnica para regenerar plantas de cinco especies de *Paspalum*, a partir del cultivo *in vitro* de ovarios fecundados.

#### Materiales y métodos

Se trabajó con *Paspalum notatum* var. *saurae* Parodi ( $2n = 2x = 20$ ), *P. notatum* Flüggé ( $2n = 4x = 40$ ), *P. ionanthum* Chase ( $2n = 4x = 40$ ), *P. cromoerhizon* Trin. ( $2n = 2x = 20$ ) y *P. dilatatum* spp. *flavescens* Poir. ( $2n = 4x = 40$ ). Todo este material se encuentra herborizado en el herbario Corrientes. Salvo *P. notatum* ( $2n = 4x = 40$ ) que es apomictica y *P. dilatatum* spp. *flavescens* que es autocompatible, las demás especies se reproducen sexualmente y son alógamas por ser autoincompatibles. Los ovarios fueron extraídos 24, 76 y 100 horas después de la polinización, variando su tamaño desde 1.4 a tres milímetros

En las especies autoincompatibles, siempre se polinizó con polen de otros individuos de la misma especie.

Se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (3), variando la concentración de sacarosa. El pH fue ajustado a 5.8 con KOH y HCl antes del agregado del agar (0.8%). Los medios de cultivo fueron preparados en tubos de ensayos de 150 mm de longitud por 15 mm de diámetro y esterilizados durante 20 minutos a una atmósfera de presión. En una experiencia, el medio basal fue suplementado con diferentes combinaciones y concentraciones de ANA (ácido naftalenacético), K (cinetina) y  $\text{AG}_3$  (ácido giberélico).

Las inflorescencias fueron desinfectadas con etanol de  $70^\circ\text{C}$  durante un minuto, luego con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 0.8% durante 10 minutos y por último varios enjuagues con agua destilada estéril.

Se cultivó un explanto por tubo y fueron incubados en condiciones de laboratorio ( $27 \pm 5^\circ\text{C}$ ), en luz (16 horas de fotoperíodo), suministrada por un tubo fluorescente de 40 W, ubicado a 40 cm de los cultivos.

Las plantas obtenidas fueron repicadas cuando tenían de cuatro a seis centímetros de altura, sobre el mismo medio basal diluido a la mitad, suplementado con 7.5 g/l de sacarosa. Las plantas permanecieron en esas condiciones aproximadamente 10 días, para luego ser puestas en pequeñas macetas, conteniendo tierra y turba (1/1).

#### Resultados y discusión

Fueron cultivados ovarios de *P. notatum* ( $2n = 4x = 40$ ), provenientes de 24, 76 y 100 horas después de la polinización. Los resultados obtenidos muestran que solamente se logró plantas cuando fueron extraídos a las 76 y 100 horas de la polinización, obteniéndose mejores resultados con el lapso más largo.

Considerando que los ovarios abortan 150 horas después de la polinización (Quarin, comunicación personal), para las demás especies se trabajó con ovarios provenientes de 100 horas después de la polinización.

Como se observa en el Cuadro 1, se obtuvo plantas en casi todos los medios de cultivo ensayados. A los cinco días de incubación comenzaron a alargarse los ovarios y aproximadamente a los 10 días aparecieron las primeras hojas, que fueron de color verde. Cuando éstas alcanzaron una longitud de dos centímetros, aparecieron las raíces (Fig. 1). En algunos ovarios se

Cuadro 1. Obtención de plantas de cuatro especies de *Paspalum* por cultivo *in vitro* de ovarios.

Especie	Sacarosa (por ciento)	Ovarios cultivados	Plantas obtenidas	
			Número	Por ciento
<i>P. corymborrhizon</i>	0	23	0	0
	0.5	21	5	23
	1	24	6	25
	2	21	3	14
	3	25	5	21
	4	24	5	20
<i>P. ionanthum</i>	5	20	6	30
	0	21	0	0
	0.5	18	8	44
	1	16	9	56
	2	17	15	88
	3	15	8	53
<i>P. dilatatum</i>	4	22	11	50
	5	21	17	80
	0	12	0	0
	0.5	12	8	66
	1	12	10	83
	2	12	9	75
<i>P. notatum</i> (2n = 20)	3	12	9	75
	4	12	6	50
	5	12	9	75
	1	50	29	58
	2	50	22	44
	4	50	8	16
5	50	14	28	

Cuadro 2. Pasaje a tierra de plantas de tres especies de *Paspalum*, obtenidas por el cultivo *in vitro* de ovarios, incubados sobre Murashige y Skoog + 40 g/l de sacarosa. Resultados a los tres meses de cultivo.

Especie	No. de ovarios cultivados (1)	No. de plantas <i>in vitro</i> (2)	No. de plantas puestas en tierra (3)	No. de plantas sobrevivientes	Porcentaje		
					1	2	3
<i>P. corymborrhizon</i>	156	30	22	20	13	66	91
<i>P. ionanthum</i>	130	68	45	38	29	55	84
<i>P. dilatatum</i>	84	51	51	38	45	74	74

observó la formación de callos, que tuvieron poco crecimiento. En los callos no se notó la presencia de vástagos pero sí de raíces.

En general, la respuesta de los ovarios de todas las especies a las distintas concentraciones de sacarosa

fueron similares en cuanto al número de plantas. Sin embargo, las concentraciones más altas de sacarosa posibilitaron la obtención de vástagos y raíces de mayor vigor. El comportamiento de los ovarios de *P. notatum* (2n = 2x = 20) fue diferente, dado que las concentraciones más bajas de sacarosa facilitaron la obtención de mejores resultados.

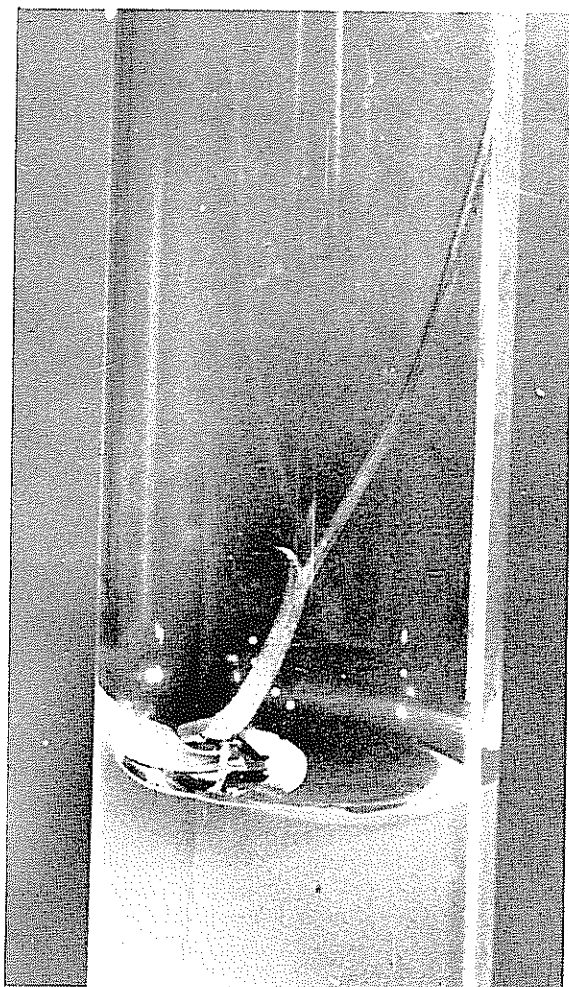


Fig 1 Obtención de una planta por cultivo *in vitro* del ovario de *Paspalum ionanthum*, incubado sobre por extenso + 4% de sacarosa 25 días de cultivo

Con la intención de mejorar estos medios de cultivo fueron suplementados con distintos reguladores del crecimiento en diferentes combinaciones y concentraciones, tales como ANA, K, y  $AG_3$ . Los resultados obtenidos no superaron a los medios desprovistos de estos reguladores

Las plantas obtenidas fueron transferidas a tierra, con un porcentaje de sobrevivencia superior al 70%. El número de plantas obtenidas luego de tres meses de inicio de los cultivos se presenta en el Cuadro 2, donde puede apreciarse que, según las especies, entre el 12 y el 45% de los ovarios fecundados cultivados brindó plantas enteras.

Los medios de cultivo descritos anteriormente fueron ensayados para cultivar ovarios provenientes de cruzamientos interespecíficos, lográndose obtener un híbrido a partir del cruzamiento entre *P. ionanthum* x *P. cromyorrhizon* (Bovo y Quarín, no publicado).

## Resumen

Ovarios provenientes de cinco especies de *Paspalum* con 24, 76 y 100 horas después de la polinización, fueron cultivados en el medio de Murashige y Skoog, variando la concentración de sacarosa entre 0.5 y cinco por ciento. Los ovarios fueron incubados en condiciones de laboratorio ( $27 \pm 5^\circ C$ ), con 16 horas de fotoperíodo. Los mejores resultados se obtuvieron con ovarios de 100 horas después de la polinización. Los niveles más altos de sacarosa posibilitaron la obtención de mejores plantas. La suplementación con ANA, K y  $AG_3$  al medio de cultivo no produjo una mejor respuesta. Algunos ovarios provenientes del híbrido *P. ionanthum* x *P. cromyorrhizon* fueron exitosamente cultivados.

23 de noviembre de 1984

O. A. BOVO\*

\* Becario del CONICET. Instituto de Botánica del Nordeste, Casilla de Correo 209, 3400-Corrientes, Argentina

## Literatura citada

1. BURSON, B.L. 1973. Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four *Paspalum* species. *Crop Science* 13:739-743.
2. BURSON, B.L. 1979. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum* hybrids. *Crop Science* 19:534-538.
3. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
4. RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P.S. 1982. Embryo culture. In *Experimental embryology of vascular plants*. Ed. by B.M. Johri. Berlin, Springer-Verlag p. 195-222.
5. RANGAN, T.S. 1982. Ovary, ovule, and nucellus culture. In *Experimental embryology of vascular plants*. Ed. by B.M. Johri. Berlin, Springer-Verlag p. 105-125.
6. WILLIAMS, E.G.; VERRY, I.M.; WILLIAMS, W.M. 1982. Use of embryo culture in interspecific hybridization. In *Plant improvement and somatic cell genetics*. Ed. by I.K. Vasil; W.R. Scowcroft; K.J. Frey. New York, Academic Press. p. 119-129.