

## Obtención de callos y plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros

Ortiz JPA y LA Mroginsky

Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Instituto de Botánica del Nordeste. CC 209, 3400 Corrientes, Argentina.

Recibido 5 de Julio de 1990; aceptado 18 de Septiembre de 1990

### RESUMEN

Se regeneraron plantas de 4 variedades argentinas de trigo ( $2n=6x=42$ ) a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros. Los explantos formaron callos en el medio de Murashige-Skoog (MS) solidificado con  $8\text{ g l}^{-1}$  de agar y suplementado con 1 y  $2\text{ mg l}^{-1}$  ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se ensayaron 3 medios de regeneración con base salina MS y distintos reguladores del crecimiento, obteniéndose múltiples vástagos en todos ellos. La formación de raíces ocurrió en el medio MS sin hormonas.

**Palabras claves:** *Triticum aestivum*, embriones inmaduros, regeneración, *in vitro*.

### Calli formation and plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) immature embryos cultured *in vitro*.

### SUMMARY

Plants of 4 argentine varieties of wheat ( $2n=6x=42$ ) were regenerated from immature embryos cultured *in vitro*. Explants formed calli on Murashige-Skoog medium (MS), solidified with agar  $8\text{ g l}^{-1}$  and supplemented with 1-2  $\text{mg l}^{-1}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Three regeneration media with MS salts and various growth regulators were tested and multiple shoots were achieved in all of them. Roots formation occurred on MS medium without hormones.

**Key words:** *Triticum aestivum*, immature embryos, regeneration *in vitro*.

### INTRODUCCION

La regeneración de plantas a partir de callos o células es un requisito esencial para que la Biotecnología pueda ser usada en el mejoramiento y manipulación genética de las especies (Vasil y Vasil, 1986). Mediante estas técnicas es posible seleccionar *in vitro* plantas resistentes a estrés como por ejemplo: frío (Chen y Gusta, 1982),

enfermedades (Chawla y Wenzel, 1987), salinidad (Nabors y Dykes, 1984), así como obtener variaciones en los individuos regenerados que puedan servir a los fitomejoradores (Ryan *et al.*, 1987; Larkin *et al.*, 1984).

Con el trigo, si bien ya se han obtenido plantas a partir del cultivo *in vitro* de anteras (Armstrong *et al.*, 1987; Lazar *et al.*, 1984; Chu y Hill, 1988; Zhou y Konzak, 1989), bases de hojas

(Zamora y Scott, 1983), inflorescencias (Ozias-Akins y Vasil, 1982) y embriones inmaduros (Sears y Deckard, 1982; Ozias-Akins y Vasil, 1982; Heyser *et al.*, 1985), hasta el presente estos últimos resultan ser los materiales más adecuados para establecer los cultivos (Magnusson y Borman, 1985). Por otra parte, se ha determinado que tanto la producción de callos como la posterior regeneración de plantas son altamente dependientes del genotipo (Sears y Deckard, 1982; Ou *et al.*, 1989) y que la composición del medio de cultivo, como las condiciones de incubación, son igualmente determinantes (Bjornstad *et al.*, 1989; Eapen y Rao, 1985; Huang, 1987). También la respuesta a la producción de callos y la posterior regeneración es, para muchas variedades, aún desconocida.

El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta de 4 variedades de trigo difundidas en la Argentina a las condiciones del cultivo *in vitro*, así como determinar las técnicas necesarias para iniciar, mantener y regenerar plantas a partir de callos obtenidos de embriones inmaduros.

## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 4 variedades argentinas de trigo hexaploide ( $2n=6x=42$ ): Marcos Juárez INTA, Pampa INTA, Klein Chamaco y Buck Ombú. Las espigas fueron cortadas de plantas que crecían en macetas entre los 14 y 21 días después de la anthesis. Los cariopsis fueron retirados de las mismas y desinfectados con hipoclorito de sodio (1,6%) durante 15 min y 2 lavados con agua destilada estéril. Los embriones inmaduros de aproximadamente 1 mm de longitud fueron extraídos con la ayuda de un microscopio estereoscópico en condiciones asépticas e inmediatamente transferidos al medio de inducción de callos compuesto por las sales, vitaminas y sacarosa propuestas por Murashige y Skoog, (1962) (MS), suplementado con 1 y 2 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Los cultivos se establecieron colocando en promedio 5 embriones por frasco de 45 x 75 x 20

mm conteniendo 20 ml de medio cada uno. La orientación de los embriones fue tal que el escutelo quedó en contacto con el medio de cultivo. La incubación se realizó en la oscuridad y a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C.

Los porcentajes de formación de callos se evaluaron a los 15 días de establecidos los embriones y se consideraron los que respondieron generando solamente callos y los que originaron, además, vástagos. Con el objetivo de inducir la regeneración de vástagos, luego de los 30 días de cultivo, los callos fueron seccionados y transferidos a los medios: I= MS + 2,4-D 0,1 mg/l; II= MS + ácido indolacético (AIA) 0,3 mg/l + cinetina (CIN) 1 mg/l; III= MS + ácido naftalenacético (ANA) 0,3 mg/l + bencilaminopurina (BAP) 1 mg/l, incubándolos con un fotoperíodo de 14 h ( $10 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ ) proveniente de lámparas fluorescentes. También se cultivaron callos en el medio MS + 2,4-D 2 mg/l, en la oscuridad. En ambos casos se usaron frascos de 45 x 95 x 20 mm y la temperatura fue de  $27 \pm 2$  °C.

Los medios fueron solidificados mediante el agregado de agar (8 g/l) y el pH fue ajustado a 5,8 antes de la esterilización en un autoclave a 120 °C durante 20 min.

Las plantas regeneradas fueron transferidas a MS sin hormonas para favorecer el crecimiento radicular antes del pasaje a tierra en macetas de 1,5 l. Los experimentos fueron repetidos como mínimo 3 veces.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los callos comenzaron a hacerse visibles a partir del 5º y 7º día de cultivo evidenciando un rápido crecimiento. En algunos casos además de callos se observaron vástagos y raíces provenientes del embrión sexual, los cuales fueron eliminados en el momento del paso a regeneración.

Los callos presentaron un color blanco-amarillento con partes compactas y friables coincidiendo con lo informado por Ozias-Akins y Vasil, (1982) y por Heyser *et al.*, (1985).

Aunque los porcentajes de embriones que

formaron callos fueron elevados en todas las variedades, la máxima respuesta se obtuvo en Klein Chamaco con 100% para ambos medios ensayados (Tabla 1). Todos los callos transferidos al medio de mantenimiento continuaron creciendo y mostraron un considerable aumento de tamaño. En algunos casos se observaron vástagos y raíces provenientes de distintas regiones del callo.

Los callos transferidos a los medios de regeneración y llevados a la luz evidenciaron rápidamente la aparición de áreas verdes sobre su superficie y posteriormente vástagos (4 a 6 por callo en promedio). Los porcentajes de callos que respondieron a la regeneración de vástagos en los 3 medios ensayados se muestran en la Tabla 2. Como puede observarse las variedades respondieron mejor a los medios II y III, salvo en el caso de Pampa INTA cuyos callos inducidos en E1 respondieron con mayor porcentaje de regeneración en el medio I. La variedad que produjo los mayores valores de regeneración fue Marcos Juárez INTA con 80% en el medio II, tanto para los callos inducidos en E1 como en E2.

De acuerdo a estos resultados se infiere que es posible regenerar plantas de las 4 variedades de trigo estudiadas a partir del cultivo in vitro de embriones inmaduros a través de las siguientes etapas: inducción de callos, crecimiento y diferenciación. Las dos primeras etapas pueden llevarse a cabo con el uso de 2,4-D 2 mg/l y oscuridad. Mientras que la diferenciación, por el contrario, necesita la disminución de dicho regulador y la transferencia a la luz. Por otra parte, las citocininas como la CIN y BAP aumentaron la capacidad de los callos para producir vástagos.

Aunque otros autores llegaron a resultados

diferentes (Green y Phillips, 1975; Heysør et al., 1985), la orientación de embrión con el escutelo en contacto con el medio de cultivo produjo buenos resultados en cuanto al porcentaje de inducción de callos y, si bien en algunos casos se observó la germinación del vástago sexual, esta nunca ocurrió directamente, sino junto a la producción de callo en la base del mismo.

En general, la mayoría de las áreas verdes y vástagos se originaron de las partes compactas del callo, que resultan fácilmente distinguibles del resto (friable). Esto hizo posible la selección de los callos de acuerdo a su consistencia antes del paso a regeneración.

Cuando los vástagos fueron transferidos al medio de enraizamiento pudo verse un buen desarrollo radicular y una rápida elongación del tallo con posterior producción de macollas.

Un total de 297 plantas fueron obtenidas y cultivadas en frascos de 60 x 120 x 25 mm hasta su paso a tierra. Aún se encuentran en estudio algunas de las plantas regeneradas con el fin de detectar alguna variación de importancia.

Restaría estudiar más detalladamente el efecto de las citocininas sobre la capacidad de regeneración de los callos, incluyéndolas tanto en la etapa de inducción como en la de regeneración.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Alfredo Calzolari, E.E.A. INTA Pergamino por la cesión del material con que se realizó este trabajo.

**Tabla 1:** Inducción de callos (%) a partir de embriones inmaduros de 4 variedades de trigo en los medios E1= MS + 2,4-D 1 mg/l y E2= MS + 2,4-D 2mg/l  
Calli induction (%) from immature embryos of 4 varieties of wheat on media E1= MS + 2,4-D 1 mg/l and E2= MS + 2,4-D 2 mg/l.

CULTIVAR	MEDIOS	Nº DE EMBRIONES CULTIVADOS	Nº CALLOS	CALLOS Y VASTAGOS	PORCENTAJE DE EMBRIONES CON CALLOS
Marcos Juárez INTA	E1	25	16	7	92
	E2	30	19	8	90
Pampa INTA	E1	46	30	15	98
	E2	70	56	13	99
Klein Chamaco	E1	55	37	18	100
	E2	43	34	9	100
Buck Ombú	E1	24	17	6	96
	E2	34	24	10	100

**Tabla 2:** Regeneración de vástagos (%) a partir de callos de embriones inmaduros de 4 variedades de trigo en los medios I= MS + 2,4-D 0,1 mg/l; II= MS + AIA 0,3 mg/l + CIN 1 mg/l y III= MS + ANA 0,3 mg/l + BAP 1 mg/l  
Shoot regeneration (%) from calli of immature embryos of 4 varieties of wheat on media I=MS + 2,4-D 0,2 mg/l; II= MS + AIA 0,3 mg/l + CIN 1 mg/l y III= MS +ANA 0,3 mg/l + BAP 1 mg/l

CULTIVAR	MEDIOS DE INDUCCION DE CALLOS	MEDIOS DE REGENERACION DE VASTAGOS		
Marcos Juárez INTA	E1	40	80	80
Pampa INTA		75	66	64
Klein Chamaco		56	50	60
Buck Ombú		30	40	30
Marcos Juárez INTA	E2	50	80	70
Pampa INTA		64	70	76
Klein Chamaco		10	70	60
Buck Ombú		30	60	30

## BIBLIOGRAFIA

- Armstrong TA Metz and PN Mascia (1987) Two regeneration system for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Sci* 51:231-237
- Bjornstad A HG Ospal-Fernstad and M Amaso (1989) Effects of donor plant environment and light during incubation on anther cultures of some spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17:27-37
- Chawla HS and G Wenzel (1987) In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. *Theor. Appl. Genet.* 74:841-845
- Chen PM and LV Gusta (1982) Cold acclimation of wheat and smooth brome-grass cell suspensions. *Can. J. Bot.* 60:1207-1211
- Chu CC and RD Hill (1988) An improved anther cultured method for obtaining higher frequency of pollen embryoids in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.* 55:175-181
- Eapen S and PS Rao (1985) Factors controlling callus initiation growth and plant regeneration in breadwheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc. Indian Sci. (Plant Sci.)* 94:33-40
- Green CE and RL Phillips (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop. Sci.* 15:417-421
- Heysor JW; MW Nabors; C Mac Kinnon; T A Dykes; K J Demot; D C Kautzman and A Mujeeb-Kazi (1985). Long-term, high-frequency plant regeneration the induction of somatic embryogenesis in callus culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Z. Pflanzenzuchtg* 94:218-223
- Huang B (1987) Effects of incubation temperature on microspore callus production and plant regeneration in wheat anther cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9:45-48
- Larkin PJ SA Ryan R S I Brettell and W R Scowcroft (1984) Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67:443-445
- Lazar MD GW Schaefer and P S Baenzinger (1984) Cultivar and cultivar x environment effects on the development of callus and polyploid plants from anther culture of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67:237-247
- Magnusson I and C H Borman (1985). Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immatures zygotic embryos of *Triticum aestivum* L. *Physiol. Plant.* 63:137-145
- Murashige T and F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:473-497
- Nabors MW and T A Dykes (1984) Obtaining cereal cultivars with increased tolerance to salt, drought and acid stressed soil through tissue culture. En: *Inter-Center Seminar on IARCs and Biotechnology*, pag. 2-29 (1984)
- Ozias-Atdins P and I K Vasil (1982) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: Evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma* 110:95-105
- Ou G WC Wang and HT Nguyen (1989) Inheritance of somatic embryogenesis and cultures of winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 78:137-142
- Ryan SA P J Larkin and FW Ellison (1987) Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 74:77-82
- Sears RG and E L Deckard (1982) Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *Crop Sci.* 22:546-550
- Vasil I K and V Vasil (1986) Regeneration in cereal and other grass species. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol 3 Academic Press, Inc. Pág 121-142
- Zamora AB and K J Scott (1983) Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. *Plant Sci. Lett.* 29:183-189
- Zhou H and CF Konzak (1989) Improvement of anther culture methods for haploid production in wheat. *Crop Sci.* 29:817-821