

Desinfección de cariopses y regeneración de plantas de *Spartina argentinensis*

Mirian S. Bueno¹, Susana R. Feldman^{1,2} y Juan P. Ortiz³

¹Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, C.C. 14, s2125zaa Zavalla, Argentina. ²Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR). ³Cátedra de Química Biológica. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Abstract

M.S. Bueno, S.R. Feldman, and J.P. Ortiz. 2007. Cariopsis disinfection and plant regeneration of *Spartina argentinensis*. Cien. Inv. Agr. 34(3): 231-236. A protocol for disinfection and *in vitro* regeneration of *Spartina argentinensis* was developed. The lowest percentage of contamination was obtained after treating caryopses with 90° ethanol for 60 s and 20 min immersion in 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) plus 0.1% Tween 20. Murashige and Skoog (MS) media was used for callus induction, supplemented with 0.5 mg·L⁻¹ of 2, 4 dichlorophenoxy acetic (2,4-D) and 1 mg·L⁻¹ of indole-3-acetic acid (IAA). The highest proportion (20%) of shoot regeneration was achieved with MS media plus 0.25 mg·L⁻¹ of benzyl aminopurine (BAP), whereas 0.5 mg·L⁻¹ naphthalenacetic acid (NAA) was used for root induction. Plants were regenerated via organogenesis. To our knowledge, this is the first report of a protocol for *in vitro* plant regeneration of *S. argentinensis*, and it is the initial stage required for obtaining somaclonal variations.

Key words: *In vitro* regeneration, organogenesis, *Spartina*.

Introducción

El espartillo, *Spartina argentinensis* Parodi (*Poaceae: Chloridaeae*), es una de las especies dominantes de las comunidades halófilas de distintas áreas de Argentina. Forma matas de altura variable, de 0,5 - 1,4 m de altura. Aunque produce abundantes panojas durante el verano, se reproduce principalmente en forma agámica por rizomas (Feldman, 2003).

Los espartillares se utilizan para cría de ganado vacuno, a pesar del alto grado de lignificación de sus hojas, lo que reduce la digestibilidad. La obtención de líneas de espartillo caracterizadas por un menor contenido de lignina es una de las alternativas para mejorar la digestibilidad del forraje y al mismo tiempo mejorar la oferta forrajera en las áreas donde esta especie se encuentra presente.

Estudios previos (Larkin y Scowcroft, 1981) demostraron que durante las sucesivas mitosis que se producen en cultivo *in vitro* pueden ocurrir importantes modificaciones genéticas en las células. Algunas se manifiestan como mutaciones heredables, generando variaciones somaclonales. Por consiguiente, el cultivo de tejidos es una herramienta útil para el mejoramiento de especies vegetales y se ha utilizado en especies forrajeras nativas (Echenique *et al.*, 2001; Kothari *et al.*, 2005).

La elección del explante es fundamental para el establecimiento de un cultivo *in vitro* (Roca y Mroginsky, 1991). En gramíneas se ha regenerado plantas utilizando embriones inmaduros, inflorescencias inmaduras y cariopses maduros (Dutta Grupta *et al.*, 1999; Echenique *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos de estos explantes sólo se pueden obtener en determinadas épocas del año. En el género *Spartina*, se ha logrado regenerar plantas a partir de cultivo *in vitro* de cariopses maduros

(Li *et al.*, 1995, Li and Gallager, 1996; Wang *et al.*, 2003). Sin embargo, en *S. argentinensis*, la contaminación de sus cariopses por *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* y *Bipolaris sorokiniana* y otros hongos dificulta la utilización de los mismos para iniciar los cultivos. Algunos de estos hongos se han descrito como endógenos (Feldman *et al.*, 2004). Este trabajo tuvo como objetivo estudiar diferentes tratamientos de desinfección de cariopses de espartillo (*S. argentinensis*) y evaluar su potencial de regeneración *in vitro*.

Materiales y métodos

Se trabajó con cariopses maduros de *S. argentinensis*, sin pálea ni lemma, extraídos de panojas cosechadas en un espartillar ubicado en Pérez, provincia de Santa Fe, Argentina (32° 45' S; 60° 35' W). Se realizaron dos experimentos de desinfección de cariopses: 1. Inmersión durante 20 min en hipoclorito de sodio NaOCl al 1,5 y 2,5% (v/v) (Cloro Argentina S.A., 5,5 g·L⁻¹ de cloro) con o sin el agregado de Tween 20 (0,1%). 2. Inmersión en NaOCl 2,5% con Tween 20 (0,1%) durante 20 o 30 min a temperatura ambiente con o sin inmersión en etanol 90° por 60 s. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento, con 20 cariopses por repetición. Luego de cada tratamiento, los cariopses se lavaron con abundante agua estéril y se los sembró en placas de Petri con medio Murashigue Skoog (MS 1962), sin hormonas, suplementados con 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 7 g·L⁻¹ de agar, pH 5,8. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 23 ± 2°C durante 30 días.

La proporción de cariopses contaminados a los 7 días de la siembra *in vitro* se evaluó mediante análisis de varianza (ANDEVA) y los promedios se separaron según Duncan (Statística 5.0). Previo a los análisis, los valores porcentuales se transformaron en arcoseno \sqrt{x} .

Los cariopses libres de contaminación se transfirieron a tubos de ensayo de 20 ml con diferentes medios para la inducción de callos (Cuadro 1) y se mantuvieron en oscuridad a 25° C, durante 30 días. Los callos producidos se repicaron a medios para la inducción de vástagos con diferentes concentraciones de bencil amino purina (BAP) y se incubaron a

25° C, con un fotoperíodo de 16 h (Cuadro 1). Los vástagos obtenidos se separaron y la regeneración de raíces se obtuvo en medio con ácido naftalen acético (ANA) (Cuadro 1).

Las frecuencias de formación de callos y vástagos para los distintos medios ensayados, se compararon mediante prueba de homogeneidad con aplicación de Chi cuadrado (χ^2) (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

Se realizaron estudios histológicos para determinar la vía de regeneración de los explantes. Las muestras se fijaron en FAA (10% formol, 5% ácido acético, 50% etanol y 35% agua) y posteriormente se deshidrataron en concentraciones ascendente de etanol (1 h en cada una de las siguientes soluciones de etanol: 70°, 80°, 90°, 96° y 30 min en 100°). Previo a la inclusión en parafina, las muestras se clarificaron con xilol, realizando un paulatino desplazamiento del etanol 100° por el xilol. Se realizaron cortes con micrótopo tipo Minot (18-20 μ m de espesor) y se colorearon con safranina (30 min) y *fast-green* (60 s), que tiñe de color azul-verdoso las zonas celulósicas y de color fucsia a las zonas lignificadas (Johansen, 1940, Dizeo de Strittmater, 1979). Los preparados montados con bálsamo de Canadá, se observaron y se fotografiaron con microscopio óptico.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados para inducción de callos (M), inducción de vástagos (V) y enraizamiento (R) de *Spartina argentinensis*.

Table 1. Composition of the media used for callus induction (M), shoot (V) and root (R) regeneration of *Spartina argentinensis*.

Medios	Reguladores de crecimiento ¹ , mg·L ⁻¹			
	2,4-D	BAP	ANA	AIA
<i>Inducción de callos:</i>				
M1	0,5	0,05	1,00	
M2	0,5			1,00
M3	0,5	0,05		
<i>Inducción de vástagos:</i>				
V1		0,25		
V2		0,50		
<i>Enraizamiento:</i>				
R		0,50		

¹ BAP, 6-bencil amino purina; ANA, ácido naftalén acético; AIA, ácido indol acético; 2,4-D, ácido dicloro fenoxi acético.

Resultados y discusión

La desinfección de los explantes con NaOCl más 0.1% de Tween 20 como humectante disminuyó significativamente ($p = 0,001$) la contaminación a los 7 días de incubación. No hubo respuesta diferencial a las concentraciones de NaOCl, posiblemente debido al marcado efecto del humectante que permitió una eficiente desinfección aún con la menor concentración de NaOCl (Figura 1).

La contaminación disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en función del tiempo de inmersión en NaOCl y con el tratamiento con etanol, sin manifestarse interacción entre las variables analizadas (Figura 2). A diferencia de reportes previos, los mejores resultados se obtuvieron utilizando una mayor concentración de etanol 90° (Li y Gallagher, 1996). Posiblemente esto se debió a que los cariopses de *S. argentinensis* presentan mayor contaminación fúngica (Feldman *et al.*, 2004).

La presencia de callos se observó a los 7 días de incubación de los explantes en los medios de inducción. En la Figura 3 se observa la evolución porcentual de producción de callos durante los primeros cuarenta días de cultivo. La obtención de callos fue máxima a los 30 días de iniciado el cultivo, estabilizándose posteriormente. No se detectaron diferencias estadísticas significativas en las frecuencias de inducción de callos entre los medios M1 y M2 (68,8 y 62,5% respectivamente), respuesta coincidente con los resultados obtenidos previamente para *S. alterniflora* (Wang *et al.*, 2003). La inducción de callos sólo alcanzó a 37,5% en el medio 3, que incluyó 0,5 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 0,05 mg·L⁻¹ de BAP, debido a la ausencia de ANA o AIA.

Los estudios histológicos mostraron que la regeneración de vástagos ocurrió vía organogénesis, donde se observa la formación de dos vástagos dentro de la masa del callo, sin zonas embriogénicas ni proembriones (Figura 5).

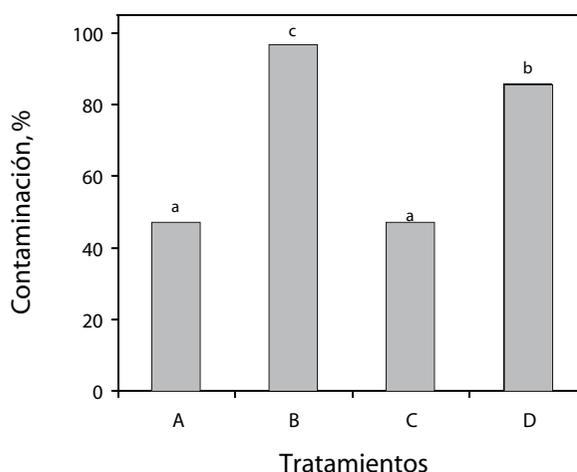


Figura 1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio y de Tween 20 empleado como tensoactivo en la desinfección superficial de cariopses de *Spartina argentinensis*. A. Hipoclorito de sodio 1,5% mas Tween 20. B. Hipoclorito de sodio 1,5% sin Tween 20. C. Hipoclorito de sodio 2,5% con Tween 20. D. Hipoclorito de sodio 2,5% sin Tween 20. (n=5). Promedios seguidos por igual letra no son estadísticamente diferentes entre si según Duncan ($p < 0,05$).

Figure 1. Effect of sodium hypochlorite concentrations and Tween 20 as humectant on superficial disinfection of caryopses of *Spartina argentinensis*. A. 1.5% sodium hypochlorite plus Tween 20. B. 1.5% sodium hypochlorite. C. 2.5% sodium hypochlorite plus Tween 20. D. 2.5% sodium hypochlorite. Means followed by the same letter are not statistically different according to Duncan ($p < 0.05$).

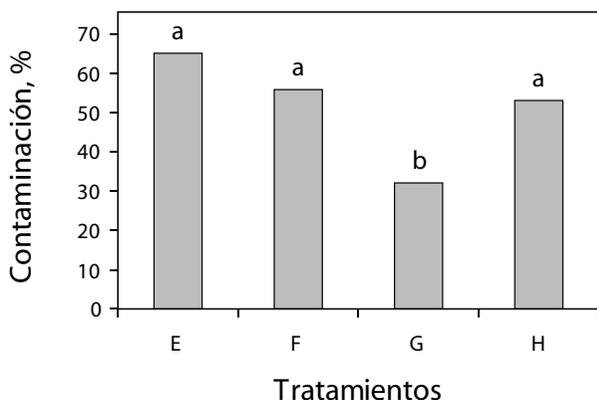


Figura 2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el porcentaje de contaminación de cariopses de *Spartina argentinensis*. E. 1 min en etanol 90° y 20 min de inmersión en hipoclorito de sodio 2,5% con Tween 20. F. Igual a E sin etanol. G. 1 min en etanol 90° y 30 min de inmersión en hipoclorito de sodio 2,5% con Tween 20. H. ídem G, sin etanol. Promedios seguidos por igual letra no son estadísticamente diferentes entre sí según Duncan ($p < 0,05$).

Figure 2. Effect of different treatments on surface contamination of caryopses of *Spartina argentinensis*. E. Ethanol 90° for 60 s and 20 min in 2.5% sodium hypochlorite plus Tween 20. F. Similar to E, but without ethanol. G. Ethanol 90° for 60 s and 30 min in 2.5% sodium hypochlorite plus Tween 20. H. Similar to G, but without ethanol. Means followed by the same letter are not statistically different according to Duncan ($p < 0.05$).

La misma vía de regeneración de vástagos fue previamente informada para *S. alterniflora*, *S. cynosuroides* y *S. patens* (Wang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1995, 1996). En otras especies, ej. *Eragrostis curvula*, y utilizando el mismo explante, la regeneración de vástagos ocurrió vía embriogénica (Echenique *et al.*, 2001) y en *Bouteloua gracilis*, la regeneración de vástagos se produjo tanto por vía organogénica como embriogénica (Agudo-Santacruz *et al.*, 2000).

De las concentraciones hormonales utilizadas para la regeneración de vástagos, el medio V2 con 0,5 mg·L⁻¹ de BAP favoreció la mayor respuesta de los explantes, puesto que 20% de los callos regeneraron vástagos. En el medio V1, con 0,25 mg·L⁻¹ de BAP, los porcentajes de respuestas fueron inferiores a 12%. Si bien el porcentaje de callos que regeneraron vástagos fue bajo, cada callo diferenció múltiples vástagos, aumentando la eficiencia de regeneración.

La regeneración de raíces se indujo favorablemente con 0,50 mg·L⁻¹ de ANA. Las plantas regeneradas se separaron y se transfirieron a una mezcla de suelo (30% vermiculita-70% tierra) en invernadero.

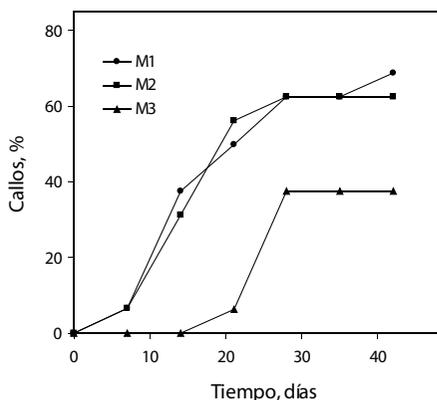


Figura 3. Efecto de distintos medios de cultivo sobre el porcentaje de producción de callos de *Spartina argentinensis*. M1 = 0,5 mg·L⁻¹ de 2,4-D; 0,05 mg·L⁻¹ de BAP y 1 mg·L⁻¹ de ANA. M2 = 0,5 mg·L⁻¹ de 2,4-D; 1 mg·L⁻¹ de AIA. M3 = 0,5 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 0,05 mg·L⁻¹ de BAP. BAP = 6-bencil amino purina; ANA = ácido naftalén acético; AIA = ácido indol acético; 2,4-D = ácido dicloro fenoxi acético.

Figure 3. Effect of different media on the percentage of callus production of *Spartina argentinensis*. M1 = 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D, 0.05 mg·L⁻¹ BA, and 1 mg·L⁻¹ NAA. M2 = 0.5 mg·L⁻¹ and 2,4-D, 1 mg·L⁻¹ IAA. M3 = 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D, 0.05 mg·L⁻¹ BA. BA = 6-benzyl-adenine; NAA = α -naphthaleneacetic acid; IAA = indole-3-acetic acid; 2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

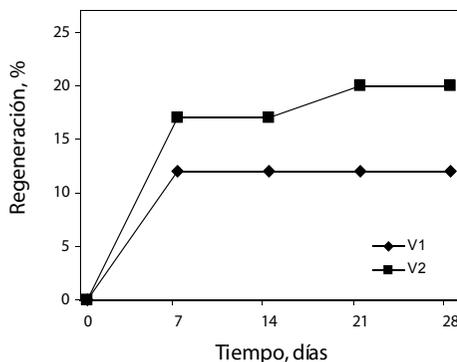


Figura 4. Variación del porcentaje de regeneración de vástagos de *Spartina argentinensis*. V1, 0,25 mg·L⁻¹ BAP (6-bencil amino purina) y V2, 0,5 mg·L⁻¹ BAP.

Figure 4. Percentage of *Spartina argentinensis* shoot regeneration using medium V, 0.25 mg·L⁻¹ BP (6-benzyl-adenine) and V2, 0.5 mg·L⁻¹ BP.

La metodología de desinfección de cariopses estudiada se podría extender a otras especies que presenten altos porcentajes de contaminación fúngica, debido a que permite utilizar el tratamiento combinado de NaOCl y etanol, que

presentan baja toxicidad, a diferencia de otros que utilizan cloruro de mercurio (Wang *et al.*, 2003).

Este trabajo es la primera mención de regeneración de plantas de *S. argentinensis* utilizando cultivo *in vitro* de cariopses maduros y constituye la etapa inicial para la obtención de variantes somaclonales. De esta forma se espera poder obtener líneas mejoradas en busca de cultivares con una mejor aptitud ganadera. Del mismo modo, estos protocolos de regeneración pueden aplicarse a otras especies de gramíneas, comunes en pastizales naturales.

Resumen

Se desarrolló un protocolo de desinfección y regeneración *in vitro* de *Spartina argentinensis*. El menor porcentaje de contaminación se obtuvo tratando los cariopses por 60 s en etanol 90° y 20 min de inmersión en hipoclorito de sodio al 2,5% con Tween 20. La inducción de callos se realizó en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0,5 mg·L⁻¹ de ácido diclorofenoxi acético (2,4-D) y 1 mg·L⁻¹ de

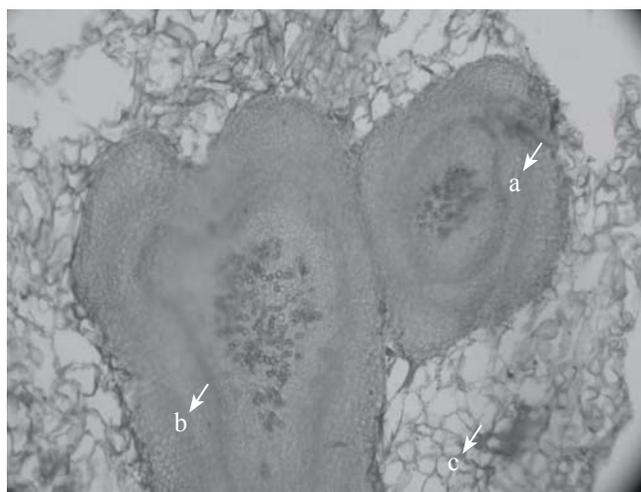


Figura 5. Corte de callo de *Spartina argentinensis* de 31 días obtenido de cariopses maduros en medio V1, 0,25 mg·L⁻¹ BAP. Las flechas señalan la formación de vástagos, rudimento de hoja (a), cordón precambial (b) y callo (c). Barra = 10 μ.

Figure 5. Cross section of a 31 day old callus of *Spartina argentinensis*, using caryopses as explant, on V1 0.25 mg·L⁻¹ BP (6-benzyl-adenine) as regeneration media. Arrows show shoot regeneration. a, leaf rudiment; b, precambial tissue, and c, callus. Bar = 10 μ.

ácido indol acético (AIA). La mayor (20%) regeneración de vástagos se logró con igual base salina y $0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de bencilamino purina (BAP). Se utilizó $0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido naftalen acético para la regeneración de raíces. Las plantas se regeneraron vía organogénesis. Este protocolo es la primera mención de regeneración de plantas de *S. argentinensis* utilizando cultivo *in vitro* y constituye la etapa inicial para obtener variantes somaclonales. La metodología de desinfección se puede hacer extensiva a otras especies.

Palabras clave: Organogenesis, regeneracion *in vitro*, *Spartina*.

Literatura citada

- Agudo-Santacruz, G., J.L. Cabrera-Ponce, V. Olalde-Portugal, M. Sánchez-González, Márquez-Guzmán, and L. Herrera-Estrella. 2001. Tissue culture and plant regeneration of blue Grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. Ex Steud. *Plant* 37:182-189.
- Dizeo de Strittmater, C. 1979. Modificación de una técnica de coloración safranina- fast green. *Bol. Soc. Arg. Botánica* 18:121-122.
- Dutta Gupta, S., and B. Conger. 1999. Somatic Embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of switchgrass. *Crop Science* 39:243-247.
- Echenique, V., M. Díaz, P. Polci, and L. Mroginsky. 2001. Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees. *Biocell* 25:131-138.
- Feldman, S. R. 2003. Ecología de *Spartina argentinensis* Parodi. Crecimiento y desarrollo de la planta y efecto del fuego sobre sus poblaciones y comunidades Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 182 pp.
- Feldman, S. R.; N. S. Pioli y J. P. Lewis. 2004. Caracterización de los propágulos de origen sexual de *Spartina argentinensis* Parodi. *Revista de Investigación, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (Argentina)* 4:69-73.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*, Mac Graw Hill. NY, USA. 523 pp.
- Kothari, S.L., K. Satish, R.K. Vishnoi, A. Kothari, and N.W. Kazuo. 2005. Applications of biotechnology for improvement of millet crops: Review of progress and future prospects. *Plant Biotechnology* 22:81-88.
- Larkin, P., and W. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60:197-214.
- Li, X., D.M., J.A. Seliskar, J. Moga, and J.L. Gallagher. 1995. Plant regeneration from callus cultures of salt marsh hay, *Spartina patens*, and its cellular-based salt tolerance. *Aquatic Botany* 51:103-113.
- Li, X., D.M., and J.L. Gallagher. 1996. Tissue culture and plant regeneration of big cordgrass, *Spartina cynosuroides*: implications for wetland restoration. *Wetlands* 16:410-415.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Mroginski, L.A. y W.M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Páginas 19-40. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Cali, Colombia.
- Wang, J., D.M. Seliskar, and J.L. Gallagher. 2003. Tissue culture and plant regeneration of *Spartina alterniflora*: implications for wetland restoration. *Wetlands* 23:386-393.