



DESARROLLO DE UN SISTEMA EFICIENTE DE REGENERACIÓN VEGETAL *in vitro* PARA CINCO VARIEDADES ÉLITE DE *Lolium multiflorum* Lam[†]

[DEVELOPMENT OF A RELIABLE *in vitro* PLANT REGENERATION SYSTEM FOR FIVE ELITE CULTIVARS OF *Lolium multiflorum* Lam]

Luisa M. Gómez-Torres¹, Blanca Moreno-Gómez²,
Mario Enrique Velásquez-Lozano³ and Gerardo A. Aguado-Santacruz^{4*}

¹ *Sistemas y Recursos Ambientales Sostenibles SYRAS. Vicerrectoría de Investigaciones. Universidad Manuela Beltrán. Av. Circunvalar no. 60-00. Bogotá, Colombia. Tel 57(1) 5460600 Ext. 1187.*

² *Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende CP 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel y Fax 01 (461) 6115323.*

³ *Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Avenida Carrera 30 No. 45-03. Bogotá, Colombia. Tel 57 (1) 3165000 Ext. 14306.*

⁴ *Tecnológico Nacional de México/I.T. Roque, Carretera Celaya-Juventino Rosas Km. 8 CP 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel 01 (461) 6115903.*

Email: gaguados@gmail.com

**Corresponding author*

RESUMEN

Se desarrolló un sistema de regeneración eficiente y reproducible para variedades comerciales de *Lolium multiflorum* Lam, denominadas ‘Magnum’, ‘Bargala’, ‘Tetragold’, ‘Hercules’ y ‘Maximus’. Se estudió la eficiencia de formación de callo morfogénico y su capacidad de regeneración usando como explantes ápices de vástago cultivados en seis formulaciones basadas en el medio Murashige y Skoog suplementado con hidrolizado de caseína y diferentes concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D; 1 o 2 mg L⁻¹), benzilaminopurina (BA; 2 o 4 mg L⁻¹) y adenina (40 u 80 mg L⁻¹). Se observaron dos tipos morfológicos de callos; uno friable y con capacidad de regeneración y otro acuoso sin capacidad de formación de plantas. El mayor porcentaje de formación de callos morfogénicos (37 % en ‘Tetragold’ y ‘Hércules’ vs. 58 % y 65 % en ‘Maximus’ y ‘Magnum’, respectivamente) se logró en el medio 2D4B80A (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA y 80 mg L⁻¹ adenina). El mayor número de plántulas regeneradas g⁻¹ peso fresco (PF) de callo morfogénico fue de 48.71 para los ápices de vástago de la variedad ‘Magnum’ cultivados en el medio 2D4B40A (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA y 40 mg L⁻¹ adenina). Las plantas regeneradas crecieron en suelo bajo condiciones de invernadero alcanzaron la madurez y produjeron semillas. Los resultados confirman la ventaja de usar ápices de vástago como explantes iniciales al cultivar en las formulaciones de medios desarrolladas en este estudio.

Palabras clave: *Lolium multiflorum*; cultivo *in vitro*; embriogénesis; regeneración.

SUMMARY

The response to *in vitro* tissue culture of five commercial annual ryegrass cultivars, namely ‘Magnum’, ‘Bargala’, ‘Tetragold’, ‘Hercules’ and ‘Maximus’, was evaluated. Morphogenic callus induction and plant regeneration capacity were assessed in shoot apices cultured on six media formulations that included Murashige and Skoog medium supplemented with casein hydrolyzate and different concentrations of 2,4 phenoxyacetic acid (2,4-D; 1 or 2 mg L⁻¹), benzylaminopurine (BA; 2 or 4 mg L⁻¹) and adenine (40 or 80 mg L⁻¹). Two morphological kind of calli were observed: one of them friable and regenerable and the other watery without regeneration capacity. The highest morphogenic callus formation (37 % in ‘Tetragold’ and ‘Hercules’ varieties vs. 58 % and 65 % in ‘Maximus’ and ‘Magnum’, respectively) was achieved using 2D4B80A medium (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA and 80 mg L⁻¹ adenine). On the other hand, the highest number of regenerated plants per g⁻¹ fresh weight (FW) of morphogenic callus was 48.71 for ‘Magnum’ shoot apices cultured on 2D4B40A medium (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA and 40 mg L⁻¹ adenine). Regenerated plants grew in soil under greenhouse conditions reached maturity and subsequently produced seeds. The results obtained in this study confirm the suitability of using the shoot tips of *Lolium multiflorum* as starting material when cultured on the formulation media developed in this study.

Keywords: *Lolium multiflorum*; culture *in vitro*; embryogenesis; regeneration.

[†] Submitted November 23, 2017 – Accepted September 13, 2018. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License

INTRODUCCIÓN

El “ryegrass” italiano o “ryegrass” anual (*Lolium multiflorum* Lam) es uno de los pastos más importantes en los climas templados y es ampliamente usado como forraje debido a sus características deseables como alta producción, rápido establecimiento y crecimiento, precocidad extraordinaria y alto valor nutricional. El mejoramiento genético de *Lolium multiflorum* Lam tiene un alto potencial a través del empleo de las actuales herramientas biotecnológicas, tales como el cultivo de tejidos y la transformación genética, por el interés en desarrollar nuevas variedades con resistencia a enfermedades, tolerancia a sequía y bajas temperaturas, incremento de la digestibilidad, mayor producción de biomasa y mejor contenido de nutrientes (Humphreys et al., 2010; Ran et al., 2007). Se prevé que estas plantas mejoradas puedan ser empleadas por los productores de ganado de México y otros países para mejorar la alimentación animal.

Se sabe que los pastos, entre ellos *Lolium multiflorum* Lam, están entre las especies más recalcitrantes al cultivo de tejidos *in vitro* y por lo tanto a la aplicación de los diferentes métodos de transformación genética (Giri y Praveena, 2015; Regalado et al., 2017). Consecuentemente, existen solo unos pocos reportes de variedades comerciales de *Lolium multiflorum* con capacidad de regeneración *in vitro* consistentes y eficientes, y han sido desarrollados especialmente para variedades japonesas, surcoreanas y europeas. Los reportes de variedades comerciales de *Lolium multiflorum* están basados principalmente en cultivos *in vitro* organogénicos o embriogénicos (Ran et al., 2007). Los callos embriogénicos para *Lolium multiflorum* han sido inducidos a partir de cultivos meristemáticos obtenidos a partir de semillas maduras (Chenna-Reddy et al., 2005; Lee et al., 2009), ápices de vástago (Takahashi et al., 2004), óvulos (Kumlehn y Nitzsche, 1996) y embriones inmaduros (Dale, 1980). Por otro lado, suspensiones celulares (Pavlova y Kordyum, 1996) y protoplastos (Dalton, 1988) también han sido usados como sistemas de regeneración.

Los principales problemas de los cultivos de tejidos vegetales en pastos, han sido la baja regeneración, la pérdida de capacidad de regeneración con el tiempo y la obtención de plantas albinas. Estos factores restringen mucho la aplicación del cultivo *in vitro* en *Lolium multiflorum*. Además, la existencia de una amplia diversidad genética presente en esta especie que resulta en una gran variedad de respuestas al cultivo de tejidos, dificulta aún más el establecimiento de protocolos eficientes y reproducibles para el cultivo *in vitro* de esta especie.

El desarrollo de protocolos eficientes y reproducibles en cultivo de tejidos *in vitro* es un prerrequisito para aplicar herramientas biotecnológicas modernas tendientes a la producción de nuevas variedades y el mejoramiento genético de cultivos, tales como la recuperación de variantes somaclonales, producción de plantas transgénicas, obtención de plantas libres de patógenos y la multiplicación de germoplasma deseable, entre otros (Aguado-Santacruz et al., 2011). Se han obtenido plantas transgénicas de *Lolium multiflorum* mediante el bombardeo con microproyectiles (Dalton, 1988; Ye et al., 1997) y el empleo de *Agrobacterium* (Bettany et al., 2003; Lee et al., 2010). Sin embargo, la optimización de condiciones de cultivo que requiere cada genotipo de esta especie en cuanto a tipo de explante, medio de cultivo y suplementos nutricionales es necesaria para lograr una transformación genética exitosa de *Lolium multiflorum*. El objetivo de este estudio fue probar diferentes formulaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de respuestas morfogénicas en explantes de ápices de vástago de cinco genotipos de *Lolium multiflorum* y desarrollar un sistema de cultivo de tejidos regenerable y de largo plazo para facilitar su manejo biotecnológico en laboratorio. Hasta donde se sabe, ninguna de las variedades utilizadas en este estudio ha sido previamente considerada para el análisis de la capacidad de regeneración *in vitro* de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El germoplasma de cinco variedades élite de *Lolium multiflorum* Lam, denominadas ‘Magnun’, ‘Bargala’, ‘Tetragegold’, ‘Hercules’ y ‘Maximus’, fue utilizado para los experimentos de cultivo de tejidos. Se utilizaron ápices de vástago como material de inicio para evaluar la respuesta morfogénica de estas cinco variedades al cultivo *in vitro*. Las semillas de las cinco variedades de *Lolium multiflorum* fueron tratadas con 50 % (v/v) de ácido sulfúrico por 30 minutos para remover la lema y posteriormente fueron cuidadosamente enjuagadas con agua destilada. Subsecuentemente, las semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (5.6 % v/v) por 20 minutos y enjuagadas cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas *in vitro* colocándolas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con 2.5 g L⁻¹ de Gelrite. Posteriormente, los ápices de vástago fueron aislados a partir de las plántulas de 3 a 5 días de desarrollo. Para aislar estos explantes, las semillas fueron germinadas en la oscuridad para promover la elongación del internodo subcoleoptilar y entonces se disectaron usando un estereoscopio.

Medios probados para la inducción de respuestas morfológicas en *Lolium multiflorum*

Con el objetivo de inducir callos a partir de segmentos de 1 cm de largo que incluían el nodo coleoptilar, estos fueron sembrados en cajas de Petri que contenían 30 mL de los diferentes medios de inducción. Se usaron cinco cajas de Petri (réplicas) con 10 ápices de vástago en cada una para cada variedad de *Lolium multiflorum* y condición de luz. Las seis formulaciones de medio contenían las vitaminas y las sales basales del medio MS, 1 o 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina, 2 o 4 mg L⁻¹ de BA, 500 mg L⁻¹ de hidrolizado de caseína, 3 % de sacarosa; todos los medios formulados fueron solidificados con 2.5 g L⁻¹ de Gelrite (Tabla 1).

Las concentraciones de reguladores de crecimiento escogidas para el experimento fueron sugeridas por un experto en el tema de cultivo de tejidos vegetales en gramíneas (Aguado-Santacruz et al., 2007; Aguado-Santacruz et al., 2011). La combinación de auxinas y citocininas utilizadas en estos experimentos, fueron similares a las que se usaron para desarrollar la única línea celular clorofílica en Poaceae reportada hasta la fecha, la cual corresponde al pasto *Bouteloua gracilis* (Aguado-Santacruz et al., 2001). Los explantes fueron cultivados bajo dos condiciones de luminosidad distintas: oscuridad completa e iluminación fluorescente continua (40 μmol de fotón m⁻² s⁻¹, a 25 ± 1 °C) para evaluar el efecto de la luz en la inducción de callos morfológicos. El medio fue ajustado a un pH de 5.8 y entonces esterilizado a 121°C por 15 minutos.

La eficiencia de inducción de callo primario fue medida como porcentaje de ápices de vástago que produjeron callo. Los porcentajes de inducción de callo fueron cuantificados 30 días después de sembrar los explantes en los diferentes medios. El medio MS, la sacarosa y el hidrolizado de caseína fueron comprados a la empresa Phytotechnology (Shawnee Mission, KS). Los reguladores de crecimiento y el Gelrite fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Tabla 1. Medios utilizados para inducción de respuestas morfológicas a partir de ápices de vástago de cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Medio	Sales Basales	2,4-D mg L ⁻¹	BA mg L ⁻¹	Adenina mg L ⁻¹
MPC	MS	1	2	40
MPC80	MS	1	2	80
D3B40A	MS	1	3	40
D4B80A	MS	1	4	80
2D4B40A	MS	2	4	40
2D4B80A	MS	2	4	80

MS: Medio Murashige y Skoog; 2,4-D: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BA: Benzilaminopurina

Propagación y mantenimiento de callos y regeneración de plantas

Líneas clonales individuales de callos se propagaron disectando y subcultivando las masas iniciales de callos formados sobre el mismo medio de inducción durante tres subcultivos (a intervalos de 30 días para cada uno) en la oscuridad o en presencia de luz (40 μmol fotón m⁻² s⁻¹) a una temperatura de 25 °C ± 1 °C y humedad relativa de 13 %. Se cuantificó la formación de callo morfológico y la presencia de necrosis en los callos formados en cada formulación. La eficiencia de formación de callo morfológico fue medida como el porcentaje de ápices de vástago que produjeron callo morfológico. Los porcentajes de inducción de callos morfológicos fueron cuantificados 90 días después de sembrar los callos primarios en los diferentes medios.

Para determinar la capacidad de las líneas celulares individuales para regenerar plantas completas, parte de los callos multiplicados fueron transferidos a cajas de Petri que contenían MS o 1/2 MS y entonces fueron colocadas en un cuarto de crecimiento a 25 °C ± 1 °C, humedad relativa de 13 % y un fotoperiodo de 8 horas (40 μmol fotón m⁻² s⁻¹). Posteriormente, los brotes de 1 a 2 cm de altura fueron transferidos a cajas Magenta GA7 de 400 mL de capacidad, que contenían 50 mL de medio 1/2 MS suplementado con 0.5 a 1.0 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) y mantenidos en las condiciones ambientales ya mencionadas hasta que las plántulas alcanzaron alturas de 7 a 9 cm y desarrollaron de tres a cinco raíces con longitudes entre 2 y 4 cm.

Aclimatación y adaptación de las plantas regeneradas

Después que las plántulas regeneradas *in vitro* alcanzaron el estado de desarrollo proyectado, fueron removidas de las cajas de Magenta, y las raíces formadas se enjuagaron con agua corriente para eliminar el medio residual. Subsecuentemente, las plántulas fueron transferidas a macetas de medio litro que contenían una mezcla estéril de suelo arcilloso y arena (50:50), cubiertas con bolsas de polietileno transparentes y entonces fueron colocadas en un cuarto de crecimiento a 25 °C ± 1 °C, 13 % de humedad relativa y 40 μmol fotón m⁻² s⁻¹. Después de 15 a 20 días de aclimatación en el cuarto de crecimiento y cuando las plántulas tenían 20 a 25 cm fueron transferidas a campo donde se les aplicaron dos dosis de 10 g cada una de fertilizante NPK (17-17-17) cada 20 días.

Análisis estadístico

Se evaluaron las diferencias estadísticas entre los porcentajes de inducción de callo primario y de formación de callos morfológicos obtenidos para los distintos medios y para las distintas variedades de

Lolium multiflorum Lam evaluadas utilizando un análisis ANOVA factorial (abc/y). Las medias fueron analizadas usando la prueba de Fisher LSD. El software usado para los análisis estadísticos fue Statgraphics centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuestas *in vitro* de los ápices de vástago

Una semana después del cultivo en los diferentes medios, en condiciones de oscuridad o luz fluorescente continua ($40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, los ápices de vástago continuaron su desarrollo, aparecieron nuevas hojas y se formaron los callos (Figura 1-a). Por lo tanto, los ápices de vástago tuvieron que ser re-disectados para eliminar esas nuevas hojas y colocados en el mismo medio de inducción. Un mes después, el callo empezó a formarse en la mayoría de los ápices de vástago. La eficiencia de inducción de callo primario osciló entre 40 y 94 % después de 4 semanas de cultivo (Tabla 2). El callo primario fue separado y transferido al mismo medio para su subcultivo. Callos de tipo morfológico fueron obtenidos después de tres subcultivos (Figura 1-b y 1-c).

Al realizarse el análisis estadístico ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.01$) en términos de eficiencia de inducción de callo primario, en condiciones de luz u oscuridad, variedades y medio de cultivo usado. Sin embargo, se observó que los porcentajes de inducción de callo primario son altos para todas las variedades y

concentraciones de reguladores de crecimiento probadas en los medios.

Competencia regenerativa de los callos inducidos

Después de obtener el callo primario probando diferentes genotipos, condiciones de luz y oscuridad y formulaciones de medio se estudió la eficiencia de formación de callo morfológico (Tabla 3). Durante los experimentos de formación de callo, se obtuvieron diferentes morfologías de callos (Figura 1-d). Algunos de estos callos formaron estructuras duras, compactas, nodulares y amarillentas, mientras que otros desarrollaron masas suaves, acuosas, sueltas, friables y de color crema a translúcidas. Cuando se transfirió a la luz, el callo morfológico se tornó verde, exhibiendo un mejor crecimiento y al realizar el subcultivo en el mismo medio cada 30 d, en algunos callos se inició el proceso de regeneración. Aunque la mayoría de los ápices de vástago fueron capaces de producir callo primario, una gran parte de este material no fue estable, generó raíces y no mostró una competencia para la regeneración de plantas completas; la apariencia de este callo no morfológico fue predominantemente suave y esponjosa.

No hubo diferencias significativas en la inducción de callo morfológico a partir de las condiciones de luz u oscuridad. Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre las variedades probadas y entre los medios utilizados (Tabla 3).

Tabla 2. Eficiencia de inducción de callo primario (%) a partir de ápices de vástago de cinco variedades de ryegrass en condiciones de luz y oscuridad

Condición Luz		Variedad				
Medio	'Magnum'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'	
MPC	56 ± 2.8	88 ± 13.0	80 ± 12.2	58 ± 13.0	76 ± 8.9	
MPC80	54 ± 5.5	60 ± 3.8	58 ± 2.7	52 ± 8.4	88 ± 13.0	
D3B40A	64 ± 3.6	72 ± 5.9	62 ± 13.0	60 ± 8.7	88 ± 10.9	
D4B80A	56 ± 5.5	88 ± 17.9	72 ± 14.8	66 ± 13.4	78 ± 2.7	
2D4B40A	70 ± 7.1	52 ± 16.4	46 ± 5.5	60 ± 12.2	94 ± 8.9	
2D4B80A	66 ± 15.2	70 ± 2.4	80 ± 2.0	68 ± 13.0	88 ± 8.4	
Condición Oscuridad		Variedad				
Medio	'Magnum'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximums'	
MPC	70±2.1	82±10.9	66±11.4	82±14.8	54±9.5	
MPC80	56±2.7	74±11.4	74±8.9	78±13.0	40±14.1	
D3B40A	74±8.2	82±8.4	76±16.7	78±4.5	46±18.2	
D4B80A	58±10.9	70±2.2	68±8.4	74±11.4	64±8.9	
2D4B40A	68±16.4	86±5.5	76±8.9	68±10.9	62±10.9	
2D4B80A	76±5.5	64±31.3	78±8.4	68±17.9	62±10.4	

Tabla 3 Eficiencia de formación de callo morfogénico (%) a partir de ápices de vástago para cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Medio	Variedad				
	'Magnum'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'
MPC	28 ± 10.33 ^a	22 ± 11.35 ^b	29 ± 8.76 ^a	11 ± 13.70 ^a	26 ± 13.50 ^{ab}
MPC80	41 ± 8.70 ^{bc}	6 ± 6.99 ^a	34 ± 8.43 ^a	10 ± 11.55 ^a	28 ± 17.51 ^{ab}
D3B40A	32 ± 13.17 ^{ab}	30 ± 12.47 ^b	36 ± 17.76 ^a	35 ± 12.69 ^b	20 ± 18.26 ^a
D4B80A	32 ± 4.22 ^{ab}	19 ± 11.01 ^{ab}	34 ± 5.16 ^a	38 ± 6.32 ^b	37 ± 12.52 ^b
2D4B40A	49 ± 7.38 ^c	6 ± 12.65 ^a	33 ± 13.37 ^a	35 ± 12.69 ^b	55 ± 13.54 ^c
2D4B80A	65 ± 15.09 ^d	7 ± 12.65 ^a	37 ± 10.59 ^a	37 ± 4.83 ^b	58 ± 19.89 ^c

Nota: Las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.01$) entre formulaciones de medio. Los experimentos fueron llevados a cabo cinco veces.

La variedad 'Hercules' tuvo una media de formación de callo morfogénico de 27.7 %, sin diferencias significativas con la variedad 'Tetragold' que presentó una media de 33.8 %. Las variedades que presentaron los mayores valores en esta variable fueron Tetragold' (33.83 %), 'Maximus' (37.3 %) y 'Magnum' (41.2 %), las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas en cuanto al porcentaje de formación de callo morfogénico. Por su parte, la variedad que tuvo el menor porcentaje de formación de callo morfogénico fue la variedad 'Bargala' (15.0 %).

Para la variedad 'Magnum' se observa que hay efectos significativos al cambiar la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹; esto se puede observar al comparar el porcentaje de formación de callos morfogénicos entre los medios MPC y MPC80 y los medios 2D4B40A y 2D4B80A. Cuando se varía la concentración de BA de 2 a 3 mg L⁻¹ y de 2 a 4 mg L⁻¹ no se observan diferencias significativas, por lo que a estas concentraciones de BA no hay mejora en la formación de callos morfogénicos, siempre y cuando que los demás reguladores de crecimiento no varíen (Tabla 3). Al aumentar 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ si se encuentran diferencias significativas en la formación de callos morfogénicos en 'Magnum'. Para esta misma variedad los mayores porcentajes de formación de callo morfogénico se obtuvieron en los medios 2D4B40A (49 %) y 2D4B80A (65 %) con diferencias significativas entre ellos ($p < 0.01$), indicando que las concentraciones de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de BA y el aumento de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹ potenció la generación de callo morfogénico.

En términos generales, la variedad 'Bargala' tuvo los menores porcentajes de formación de callos morfogénicos entre las 5 variedades analizadas con una media de 15 %, y encontrándose diferencias estadísticamente significativas con las demás variedades ($p \leq 0.01$). Para este genotipo, los menores valores de formación de callo morfogénico fueron para los medios de inducción MPC80, 2D4B40A y 2D4B80A, con valores de 6, 6 y 7 %, respectivamente,

mientras que los mayores porcentajes, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.01$), se observaron en los medios MPC y D3B40A, 22 y 30 %, respectivamente; por lo tanto el mejor porcentaje de formación de callo morfogénico se obtiene con concentraciones de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 mg L⁻¹ de adenina y una concentración de BA entre 2 y 3 mg L⁻¹. Al comparar los medios MPC y MPC 80 se observa una disminución en la eficiencia de generación de callo morfogénico de 22 a 6 %. El aumento de la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹ no mejora la eficiencia de formación de callo morfogénico para esta variedad, lo mismo sucede cuando se aumenta la concentración de 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ (Tabla 4).

La respuesta de formación de callos morfogénicos en la variedad 'Tetragold' no presenta diferencias significativas entre los medios utilizados; el porcentaje de inducción de callos morfogénicos se encuentra en el intervalo de 29 a 37 %. Estos valores de formación de callo morfogénico son relativamente buenos y las concentraciones de reguladores de crecimiento probadas, 2,4-D (1 a 2 mg L⁻¹), BA (1 a 4 mg L⁻¹) y adenina (40 a 80 mg L⁻¹) son adecuadas para la obtención de callo morfogénico en esta variedad.

En cuanto a la variedad 'Hercules' se observa que los menores valores de porcentaje de formación de callo morfogénico se presentaron en los medios MPC y MPC80 con 10 y 11 %, respectivamente, mientras que los mayores valores sin diferencias significativas ($p > 0.01$) se encontraron en los medios D3B40A, D4B80A, 2D4B40A, 2D4B80A con porcentajes entre 35 y 38 %. Esto demuestra que para este genotipo, la capacidad regenerativa aumenta principalmente cuando se incrementa el valor de BA en el medio de cultivo de 1 a 3 mg L⁻¹ y de 2 a 4 mg L⁻¹, y se mantienen constantes las concentraciones de 2,4-D y adenina. Los aumentos en las concentraciones de 2,4-D entre 1 y 2 mg L⁻¹, y de adenina entre 40 y 80 mg L⁻¹, no afectaron significativamente la formación de callo morfogénico para este genotipo.

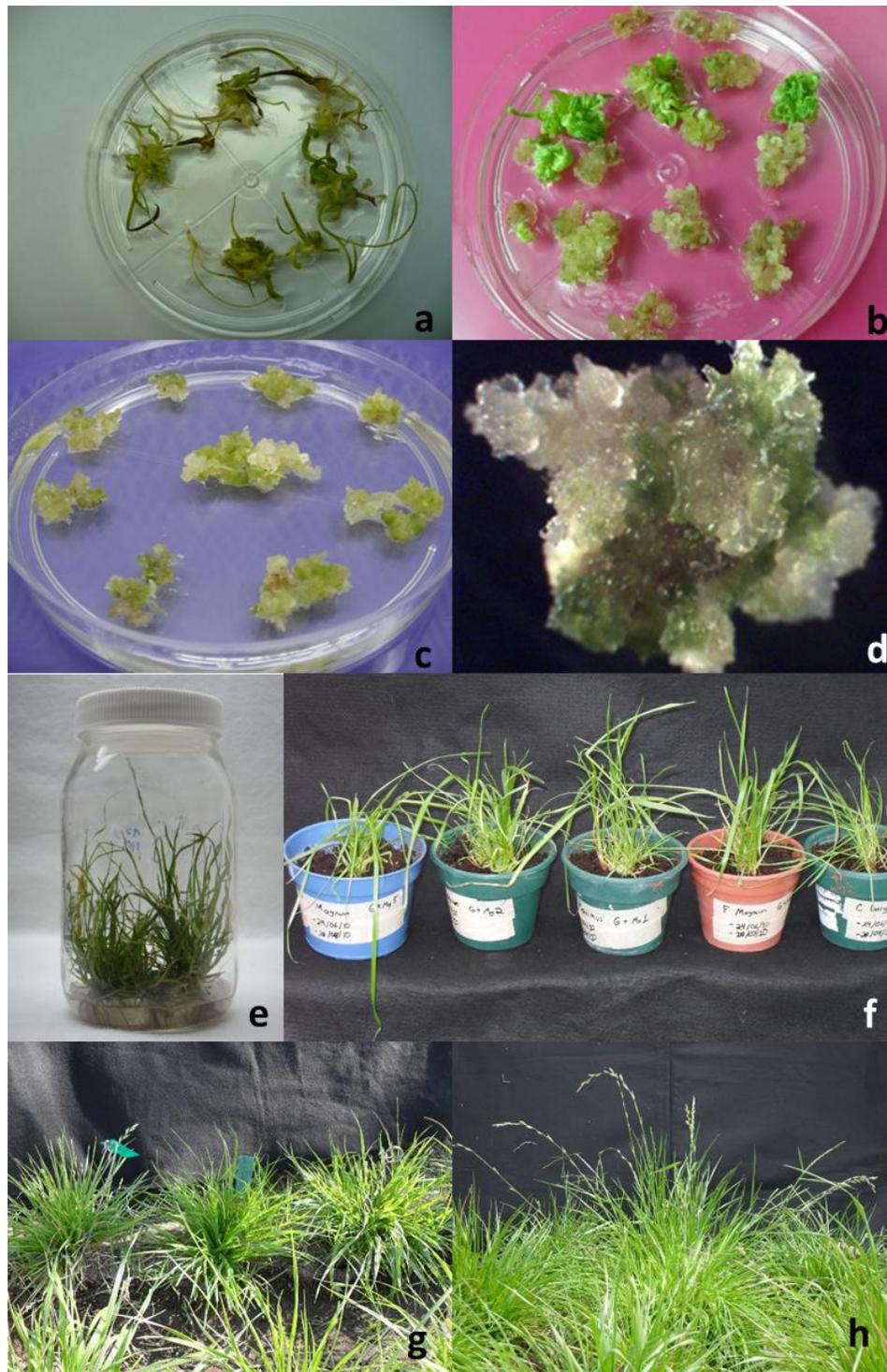


Figura 1. Inducción de callo morfogénico y regeneración de plantas a partir de *Lolium multiflorum* Lam. a) formación primaria de callo a partir de ápices de vástago de la variedad 'Magnum' después de un mes de cultivo en el medio 2D4B80A. b) callos formados a partir de la variedad 'Magnum' en el medio 2D4B80A. c) Subcultivo de callos de la variedad 'Magnum' en el medio 2D4B80A. d) callos de tipo morfogénico formados en los diferentes medios evaluados. e) Plántulas de la variedad 'Magnum' con fuerte enraizamiento en medio MS suplementado con 0.5 mg l^{-1} de AIA. f) Plantas regeneradas a partir de las diferentes variedades creciendo en macetas. g) Crecimiento en invernadero de plantas regeneradas a partir de la variedad 'Magnum'. h) formación de espigas en plantas regeneradas del cultivo *in vitro* de ápices de vástago.

En cuanto a la variedad 'Maximus' se puede observar que con los medios 2D4B40A (55 %) y 2D4B80A (58 %) se obtuvieron los mejores porcentajes de formación de callo morfogénico, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.01$). Entre los medios MPC y MPC80 no hubo diferencias significativas en la formación de callo morfogénico al aumentar la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹, lo mismo sucedió al incrementar la concentración de este regulador de crecimiento en los medios 2D4B40A y 2D4B80A. Solo se observaron diferencias significativas entre los medios D4B80A y 2D4B80A al aumentar la concentración de 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ y manteniendo las concentraciones de BA y adenina constantes en 4 mg L⁻¹ y 80 mg L⁻¹, respectivamente.

Después de transferir las líneas germinales a medio que contiene MS o MS a la mitad y cultivarlas en condiciones de luz, el callo morfogénico regenerable se tornó verde, germinó y formó múltiples embriones (Figura 1-d). Subsecuentemente, los embriones somáticos desarrollaron brotes y formaron raíces. Aunque los brotes espontáneamente formaron raíces después de su transferencia a medio MS y medio MS a la mitad, la incorporación de AIA al medio fortaleció el desarrollo de las raíces (Figura 1-e).

Además, como paso final dentro de la evaluación de la capacidad de los medios probados, para inducir respuestas morfogénicas en las variedades de *Lolium multiflorum*, el potencial de regeneración del callo morfogénico fue medido para algunas variedades y medios, en términos de plantas regeneradas g⁻¹ de peso fresco (PF) de callo (Tabla 4).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las variedades probadas y entre los medios utilizados en cuanto a la regeneración de plantas. Este análisis mostró que el número de plantas recuperadas por gramo de callo fresco varió entre 0 y 48.71. Para la variedad 'Magnum' el mayor número de plantas obtenido fue en el medio 2D4B40A (48.71), el cual contenía MS, 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 4 mg L⁻¹ de BA y 40 mg L⁻¹ de adenina. Para la variedad 'Bargala' el mayor número de plantas regeneradas se alcanzó en el medio MPC (17.42) y para la variedad 'Tetragold' el mayor valor se obtuvo en el medio 2D4B40A (5.80).

Después de un periodo de aclimatación de 15 días en el cuarto de crecimiento, las plantas fueron transferidas a un invernadero donde terminaron de consolidar su proceso de adaptación (Figura 1-f). Subsecuentemente, las plantas de *Lolium multiflorum* de 20 a 25 cm en altura fueron removidas de las macetas, plantadas en campo y fertilizadas químicamente dos veces cada 20 días. Todas las plantas transferidas a campo fueron establecidas exitosamente, se desarrollaron hasta su madurez y dieron semillas (Figura 1-g y 1-h).

Tabla 4 Regeneración de plantas *in vitro* (plantas g⁻¹ de PF de callo) a partir de callo inducido sobre diferentes formulaciones de medio.

Medio	'Magnum'	'Bargala'	'Tetragold'
MPC	20.07±4.03 _b	17.42±1.07 _c	DNR
D3B40A	0.00±0.00 ^a	9.68±0.30 ^b	DNR
2D4B40A	48.71±2.99 _c	0.00±0.00 ^a	5.80±2.33

Nota: Las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$) entre formulaciones de medio. Los experimentos fueron llevados a cabo al menos cinco veces.

Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callos

El empleo de la auxina 2,4-D y su combinación con citocininas, como BA, para la inducción de embriogénesis somática es común en pastos y cereales. Las concentraciones óptimas de estos reguladores de crecimiento varían entre diferentes pastos y especies estudiadas (Ahloowalia, 1984; Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992). Zhang et al. (2012) encontraron tasas de inducción de callo embriogénico de 82 % a partir de epicótilos de *Miscanthus sinensis* cultivados en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.5 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de tiamina; bajo esas condiciones también se alcanzó la mayor capacidad de regeneración (Zhang et al., 2012). Thomas y Yoichiro (2011) reportaron un protocolo estandarizado de regeneración para el pasto *Brachypodium distachyon* mediante el uso de ápices de vástago y se obtuvieron respuestas de inducción de callo hasta de 100 % con medio MS suplementado con 4 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de cinetina. Barampuram et al. (2009) encontraron que una concentración de 0.48 mg L⁻¹ de 2,4-D fue efectiva para la inducción de callo y la formación de embriones somáticos, usando como explantes bases de brotes jóvenes de *Eremochloa ophiuroides*. De forma similar, Liu et al. (2006) hallaron que los explantes de brotes jóvenes de *Lolium perenne* respondieron mejor en términos de inducción de callo usando medio MS con 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de BA. En los reportes más recientes de sistemas de regeneración de *Lolium multiflorum*, Lee et al. (2009) encontraron que la mayor tasa de inducción de callo embriogénico fue de 39.1% a partir de semillas cultivadas en MS adicionado con 5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de BA. Takahashi et al. (2004) estudiaron la inducción de callo embriogénico y potencial de regeneración a partir de ápices de vástago que crecieron en medio MS con concentraciones entre 0 y 7 mg L⁻¹ 2,4-D y de 0 a 0.2 mg L⁻¹ de BA, obteniendo porcentajes de hasta 100 % de callos

embriogénicos y porcentajes de regeneración similares.

Se ha sugerido en varios estudios que la concentración de auxinas en combinación con bajos niveles de citocininas es adecuada para la generación de plantas vía formación de callo (Lee et al., 2009; Liu et al., 2008). En el presente estudio, los ápices de vástago cultivados en todos los medios probados formaron rápidamente callos primarios y estructuras morfogénicas, con una media de inducción de callo primario de 69.13 % en oscuridad y 70.40 % cuando los explantes fueron crecidos en luz fluorescente (40 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En cuanto a la formación de callo morfogénico se presentaron diferencias significativas y se encontraron resultados similares a los reportados en la literatura, mostrando que la combinación de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 4 mg L⁻¹ de BA y 80 mg L⁻¹ de adenina fue benéfica para la inducción de callo morfogénico para la variedad 'Magnun' (65 %) con alta capacidad de regeneración. Además, la adición de adenina, en la variedad 'Magnun', complementó el efecto de 2,4-D y BA en la inducción y formación de callo organogénico y embriogénico debido a sus diversas funciones bioquímicas y baja actividad como citocinina. Por otro lado, es un metabolito central requerido para la síntesis de aminoácidos (Aguado-Santacruz et al., 2011; Su y Zhang, 2014).

Aguado-Santacruz et al. (2001) encontraron una rápida inducción de respuestas morfogénicas en *Bouteloua gracilis* en tratamientos que contenían 2 mg L⁻¹ BA más 1 mg L⁻¹ de 2,4-D con adición de 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina. Ellos obtuvieron de 9 a 37.2 plántulas por 500 mg PF de callo cuando usaron diferentes combinaciones de 2,4 (1 a 2 mg L⁻¹), BA (0.25 a 2 mg L⁻¹) y adenina (0 a 80 mg L⁻¹). En el presente estudio, también se encontraron resultados similares al usar 2,4-D en combinación con BA y adenina; sin embargo, su efecto fue dependiente del genotipo.

También, se ha reportado en la literatura que concentraciones mayores de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D resultan en una baja frecuencia de inducción de callo embriogénico y regeneración de *Lolium multiflorum* (Lee et al., 2009; Takahashi et al., 2004) y pueden generar una alta probabilidad de mutación de las plantas (Liu et al., 2006).

Morfología de los callos obtenidos

La naturaleza morfogénica de los callos no fue exclusiva porque algunas veces los callos embriogénicos mostraron pequeños sectores de tejido organogénico. Muchos de los tejidos embriogénicos desarrollaron sectores con brotes vía organogénesis. Adicionalmente, como la mitad de los callos embriogénicos fueron mantenidos en condiciones de

luz continua, en algunos casos la germinación fue espontánea.

Takahashi et al. (2004) describieron tres tipos de callos a partir de semillas maduras, ápices de vástago y ápices de raíz de la especie *Lolium multiflorum*. Los tres tipos de callo fueron friables, acuosos y compactos con finas raíces en su superficie. Ellos encontraron que esta diferencia era principalmente debida al tipo de explante utilizado, mientras que Jackson y Dale (1988) reportaron que las diferencias que ellos mismos encontraron en su estudio se debían principalmente al genotipo. En este estudio no se encontraron diferencias morfológicas marcadas debido al genotipo, ya que se obtuvieron callos principalmente friables y acuosos en todas las variedades estudiadas. A partir de los callos friables fue posible la generación de brotes, mientras que a partir del callo acuoso esto no fue posible. Estos resultados están de acuerdo con los de Takahashi et al. (2004) que explican que los callos friables y acuosos se formaron a partir de ápices de vástago utilizados como explantes y que las diferencias morfológicas entre los callos fueron importantes para su potencial de regeneración, ya que cuando el callo friable se transfirió a medio de regeneración se formaron brotes verdes.

El callo morfogénico formado a partir de los ápices de vástago, usados como explantes en este estudio, fue de color verde claro a blanco, granular y friable, y pudo ser obtenido después de 90 d de cultivo. Después de tres subcultivos el callo obtenido se hizo más friable y se pudieron observar más fácilmente los embriones somáticos. No se realizaron pruebas de sus características de desarrollo o diferentes estadios morfológicos embrionarios, por lo que se asume que el callo obtenido es una combinación de callo organogénico y embriogénico.

Efectos de la variación del genotipo sobre la inducción de callo y regeneración de plantas

De la misma forma que en estudios anteriores realizados con cereales y pastos (Aguado-Santacruz et al., 2011; Barampuram et al., 2009; Takahashi et al., 2004), los resultados obtenidos también revelaron que la inducción de callo morfogénico y la frecuencia de regeneración dependió fuertemente de la variación del genotipo entre las cinco variedades probadas. La variación de la eficiencia de formación de callo morfogénico entre los cultivos probados fue significativa ($p \leq 0.01$) de acuerdo al análisis estadístico ANOVA. El porcentaje de formación de callo embriogénico varió de 6 a 65 % entre genotipos (Tabla 3) y los mayores porcentajes de inducción de callo morfogénico se presentaron en la variedad 'Magnun' para todos los medios probados con una media de 41.2 %, mientras que en el medio 2D4B80A se observó el mayor porcentaje de formación de callo

morfogénico (65 %). Con la variedad 'Magnun' también se obtuvo la mayor regeneración de plantas (48.71 plántulas g⁻¹ PF callo), en el medio 2D4B40A. En contraste, la variedad 'Bargala' mostró los menores porcentajes de formación de callo morfogénico con una media de 15 % para todos los medios estudiados; particularmente, el medio 2D4B80A resultó en uno de los porcentajes más bajos de formación de callo morfogénico (7 %). La regeneración *in vitro* para esta variedad resultó en 9.68 y 17.42 plántulas g⁻¹ PF de callo para los medios D3B40A y MPC, respectivamente.

En este estudio no se regeneraron plantas albinas en ninguna de las variedades evaluadas, 'Magnun', 'Bargala', 'Tetragold', 'Hercules' y 'Maximus'. La formación de plantas albinas se ha reportado ampliamente en la literatura y ocurre frecuentemente en cultivo de tejidos de pastos que incluyen *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne* (Creemers-Molenaar y Beerepoot 1992). Se han encontrado muchos factores que afectan el grado de albinismo, tales como el genotipo y el estado fisiológico de las plantas donantes, el envejecimiento de los cultivos, condiciones ambientales y composición del medio (Creemers-Molenaar y Beerepoot 1992; Liu et al., 2002). Una característica molecular de las plantas albinas, es la presencia de grandes deleciones en el ADN del cloroplasto, sin embargo no se ha elucidado la causa del albinismo y la posible participación de los genomas nucleares y citoplasmáticos en la inhabilidad de los proplástidos de transformarse en cloroplastos (Makowska y Oleszczuk 2014).

Cultivos con potencial de regeneración a largo plazo

Algunas de las líneas de callos morfogénicos generadas en la presente investigación para las variedades 'Magnun', 'Bargala' y 'Tetragold' han sido mantenidas por más de tres años sin pérdida de su naturaleza morfogénica, capacidad regenerativa o potencial para producir plantas fértiles y normales de *Lolium multiflorum*. El principal problema en los cultivos de cereales y pastos es mantener el potencial de regeneración a largo plazo y prevenir la formación de plantas anormales (Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992). Consecuentemente, hay pocos reportes en los cuales el potencial morfogénico y regenerativo de los cultivos de *Lolium multiflorum* sean mantenidos por más de un año (Creemers-Molenaar y Beerepoot, 1992; Takahashi et al., 2004).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en cuanto a eficiencia de formación de callo morfogénico y habilidad de regeneración entre las cinco variedades probadas indicaron que las diferencias en las respuestas fueron

debidas a la influencia de los genotipos y a las distintas combinaciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. No hubo diferencias en la eficiencia de formación de callo morfogénico entre las condiciones de luz y oscuridad.

En este estudio 'Magnun' (65 %) y 'Maximus' (58 %) mostraron los más altos porcentajes de eficiencia de generación de callos morfogénicos. 'Tetragold' (34 %) y 'Hércules' (35 %) tuvieron una respuesta similar y la variedad que presentó la menor eficiencia de generación de callos fue 'Bargala' (6 %).

Se encontró que la combinación de diferentes concentraciones de 2,4-D, BA y adenina fue adecuada para la inducción de callo morfogénico en todos los genotipos de *Lolium multiflorum* Lam. Las formulaciones que contenían 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 4 mg L⁻¹ de BA y 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina parecieron ser adecuadas para la formación de callos organogénicos y embriogénicos en las variedades 'Magnun' y 'Maximus' y fueron también convenientes para las otras variedades probadas, exceptuando la variedad 'Bargala', donde estos medios mostraron las respuestas más bajas de formación de callos morfogénicos. Para la variedad 'Tetragold' con cualquiera de las combinaciones de reguladores de crecimiento se obtuvieron resultados satisfactorios y finalmente, para la variedad 'Hércules' se encontró que adicionalmente a la combinación mencionada, los medios con 1 a 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 3 a 4 mg L⁻¹ de BA y 40 a 80 mg L⁻¹ de adenina dieron como resultado callos morfogénicos con eficiencias estadísticamente similares.

En cuanto a la habilidad de regeneración de plantas, la variedad 'Magnun' y el medio que contenía 2 mg L⁻¹ de 2,4-D más 4 mg L⁻¹ de BA y 40 mg L⁻¹ de adenina resultaron en el mayor número de plantas regeneradas g⁻¹ de callo de fresco (48.71). Con la variedad 'Tetragold' y esta misma concentración de reguladores de crecimiento se obtuvieron 5.80 plantas por g de callo fresco. En contraste la variedad 'Bargala' cultivada en este medio no regeneró ninguna planta, teniendo en cuenta que con esta combinación de reguladores de crecimiento se había obtenido una de las más bajas eficiencias de generación de callo morfogénico.

Se demostró, que los ápices de vástago de plantas germinadas *in vitro* son útiles para cultivo de tejidos de *Lolium multiflorum* Lam, ya que se alcanzaron altas eficiencias de formación de callo embriogénico y regeneración de plantas.

Se espera que el uso de los medios 2D4B40A y 2D4B80A con genotipos adecuados de *Lolium multiflorum*, como la variedad 'Magnun' y 'Maximus' puedan cumplir con algunos de los requerimientos para

la aplicación exitosa de las diferentes herramientas biotecnológicas, tales como la producción de plantas libres de patógenos y la propagación de germoplasma deseable o transformación genética, considerando que los callos fueron de rápido crecimiento; después de 3 subcultivos luego de la inducción de callo primario fue posible iniciar el proceso de regeneración de plantas. Adicionalmente los callos obtenidos fueron altamente morfogénicos (combinación de callo embriogénico y organogénico) y capaces de retener su potencial regenerativo y de producción de plantas normales y fértiles por más de 3 años.

Aunque 2,4-D ha sido la auxina más utilizada en cultivo de tejidos de cereales y pastos, y en este trabajo dio buenos resultados en combinación con citocininas, es conveniente evaluar otras auxinas como por ejemplo Picloram y Dicamba las cuales, según la literatura, pueden ser más efectivas para la inducción de respuestas morfogénicas en algunos pastos.

Finalmente consideramos importante para estudios posteriores el comprobar el carácter embriogénico de los callos obtenidos mediante análisis histológico con microscopio óptico y también mediante microscopía electrónica de barrido

Agradecimientos.

A la División de Investigación Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por su financiación dentro de la convocatoria Apoyo a Tesis de Programas de Posgrado, Proyecto Código 10944.

REFERENCIAS

- Aguado-Santacruz, G. A., Cabrera-Ponce, J. L., Ramírez-Chávez, E., León-Ramírez, C. G., Rascón-Cruz, Q., Herrera-Estrella, L., Olalde-Portugal, V. 2001. Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud. *Plant Cell Reports*. 20: 131–136. DOI: 10.1007/s002990000293
- Aguado-Santacruz, G. A., García-Moya, E., Aguilar-Acuña, J. L., Moreno-Gómez, B., Solís-Moya, E., Preciado-Ortiz, E. R., Rascón-Cruz, Q. 2007. In vitro plant regeneration from quality protein maize (QPM). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(3): 215-224. DOI: 10.1007/s11627-007-9042-9
- Aguado-Santacruz, G. A., Velázquez-Ordinola, Á., Moreno-Gómez, B., Gómez-Torres, L. M., Díaz-Espino, L. F., Gámez-Vázquez, F. P. 2011. Development of long-term and reliable in vitro plant regeneration systems for elite malting barley varieties: Optimizing media formulation and explant selection. *African Journal of Biotechnology*. 10: 19522–19533. DOI: 10.5897/AJB11.1736
- Ahloowalia, B. S. 1984. Forage grasses. In: Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato P. V. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. Macmillan Publishers, New York. pp. 91–125
- Barampuram, S., Chung, B. Y., Lee, S. S., An, B. C., Lee, E. M., Cho, J.-Y. 2009. Development of an embryogenic callus induction method for centipede grass (*Eremochloa ophiuroides* Munro) and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 45: 155–161. DOI: 10.1007/s11627-009-9199-5
- Bettany, A., Dalton, S., Timms, E., Manderyck, B., Dhanoa, M., Morris, P. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). *Plant Cell Reports*. 21: 437–444. DOI: 10.1007/s00299-002-0531-3
- Chenna-Reddy, S., Allyson, S., Jennifer, D., Goldman, S., Sairam, R. 2005. Efficient in vitro regeneration system from seed derived callus of perennial (*Lolium perenne*) and annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 41: 35A–35A.
- Creemers-Molenaar, J., Beerepoot, L. J. 1992. In vitro culture and micropropagation of ryegrass (*Lolium spp.*). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *High-Tech and Micropropagation III*. Springer Berlin Heidelberg, Germany. pp. 549–575. DOI: 10.1007/978-3-662-07770-2_33
- Dale, P. J. 1980. Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*. 100: 73–77. DOI: 10.1016/S0044-328X(80)80187-5
- Dalton, S. J. 1988. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass). *Journal of Plant Physiology*. 132: 170–175. DOI: 10.1016/S0176-1617(88)80156-1
- Giri, C. C., Praveena, M. 2015. In Vitro Regeneration, Somatic Hybridization and Genetic Transformation Studies: an Appraisal on Biotechnological Interventions in Grasses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 120: 843–860. DOI: 10.1007/s11240-014-0653-7
- Humphreys, M., Feuerstein, U., Vandewalle, M., Baert, J. 2010. Ryegrasses. In: Boller, B.,

- Posselt, U. K., Veronesi, F. (eds.). Fodder Crops and Amenity Grasses. Springer, New York. pp. 211–260. DOI: 10.1007/978-1-4419-0760-8_10
- Jackson, J. A., Dale, P. J. 1988. Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum* L. Journal of Plant Physiology. 132: 351–355. DOI: 10.1016/S0176-1617(88)80119-6
- Kumlehn, J. J., Nitzsche, W. 1996. Plant regeneration from ryegrass ovules cultivated on endosperm-derived feeder cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44: 235–241. DOI: 10.1007/BF00048529
- Lee, K. W., Choi, G. J., Kim, K. Y., Ji, H. C., Park, H. S., Yoon, S. H., Lee, S. H. 2009. High frequency plant regeneration from mature seed derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars. African Journal of Biotechnology. 8(24): 6828- 6833. DOI: 0.5897/AJB2009.000-9531
- Lee, K.-W., Choi, G. J., Kim, K. Y., Yoon, S. H., Ji, H. C., Park, H. S. Lee, S. H. 2010. Genotypic variation of *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian ryegrass. Electronic Journal of Biotechnology. 13: 8 – 9.
- Liu, M., Yang, J., Lu, S., Guo, Z., Lin, X., Wu, H. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration in centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.). In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 44: 100–104. DOI: 10.1007/s11627-008-9115-4
- Liu, P., Zhang, Z.-X., Yuan, J.-G., Xi, J.-B., Du, X.-L., Yang, Z.-Y. 2006. Callus induction and plant regeneration in eleven perennial ryegrass cultivars. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 20: 30–37. DOI: 10.1080/13102818.2006.10817377
- Liu, W., Zheng, M., Konzak, C. 2002. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports. 20: 821–824. DOI: 10.1007/s00299-001-0408-x
- Makowska, K., Oleszczuk, S. 2014. Albinism in barley androgenesis. Plant Cell Reports. 33: 385–392. DOI: 10.1007/s00299-013-1543-x
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pavlova, M., Kordyum, E. 1996. Somatic embryogenesis in *Lolium multiflorum* suspension culture. Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 65: 43–45. DOI: 10.5586/asbp.1996.007
- Ran, Y., Ramage, C., Felitti, S., Emmerling, M., Chalmers, J., Cummings, N. Spangenberg, G. 2007. Ryegrasses. In Pua, E.C., Davey, M. R. (eds.). Transgenic Crops VI. Springer, Berlin Heidelberg. pp. 373–395. DOI: 10.1007/978-3-540-71711-9_21
- Regalado, J. J., Vignale, M. V., Novas, M. V., Pitta-Alvarez, S. I., Iannone, L. J. 2017. *Epichloë occultans* enhances micropropagation efficiency in *Lolium multiflorum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 130(1): 37-46. DOI: 10.1007/s11240-017-1202-y
- Su, Y. H., Zhang, X. S. 2014. The hormonal control of regeneration in plants. In: Galliot, B. (ed). Mechanisms of Regeneration. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press, US. 108: 35–69. DOI: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00010-3
- Takahashi, W., Komatsu, T., Fujimori, M., Takamizo, T. 2004. Screening of regenerable genotypes of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Plant Production Science. 7: 55–61. DOI:10.1626/pp.7.55
- Thomas, T. D., Yoichiro, H. 2011. Optimizing embryo and shoot tip derived callus production and high frequency plant regeneration in the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology. 145: 924–930. DOI: 10.1080/11263504.2011.633110
- Ye, X., Wang, Z.Y., Wu, X., Potrykus, I., Spangenberg, G. 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Cell Reports. 16: 379–384. DOI: 10.1007/BF01146777
- Zhang, Q. X., Sun, Y., Hu, H. K., Chen, B., Hong, C. T., Guo, H. P., Zheng, B. S. 2012. Micropropagation and plant regeneration from embryogenic callus of *Miscanthus sinensis*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 48: 50–57. DOI: 10.1007/s11627-011-9387-y