

# EVALUACION DE LA VARIABILIDAD FENOTIPICA DE PLANTAS DE *Stylosanthes guianensis* REGENERADAS A PARTIR DE CULTIVO DE TEJIDOS

Omaira Pineda R. \*  
William M. Roca \*\*

## COMPENDIO

La variabilidad fenotípica en plantas de *Stylosanthes guianensis* CIAT 2243 tipo "tardío" fue evaluada en plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos. 100 clones provenientes de hojas fueron regenerados y se llevaron al campo en un diseño de bloques completamente al azar. De 11 características evaluadas, se encontró variación en número cromosómico, vigor, número de tallos, tipo de crecimiento, área foliar, reacción al ataque de antracnosis y porcentaje de materia seca. No se presentó variación en longitud de entrenudos, crecimiento lateral, producción de semilla y peso de semilla. La mayor variación generada, estuvo asociada con duplicaciones del número cromosómico.

## ABSTRACT

Phenotypic variability in *Stylosanthes guianensis* CIAT 2243 was evaluated in plants regenerated from tissue culture. 100 leaf derived clones were regenerated and were taken to the field under a randomized block distribution. Out of eleven parameters of evaluation, regenerated clones displayed significant variation in: chromosome number, plant vigor, number of stems, leaf area, growth habit, reaction to antracnose and dry matter content. The other parameters internode length, lateral expansion, seed production and seed size showed no significant variation among clones. The greater variability produced was associated with chromosome number increase.

---

\* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

\*\* Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. A.A. 6713, Cali.

## 1. INTRODUCCION

***Stylosanthes guianensis*** es una leguminosa de América Tropical distribuída actualmente en muchos países del mundo (McIlroy, 9). El género ***Stylosanthes*** contiene algunas especies de importancia económica como forraje, para mejorar la producción ganadera del trópico por sus buenas características agronómicas, pero su producción se vé limitada por el ataque de la “antracnosis” enfermedad causada por el hongo ***Colletotrichum gloeosporioides*** (Grof, 5; Lenné *et al*, 8) y ampliamente difundida en las regiones tropicales de Centro y Sur América (CIAT, 1).

Mediante la selección y el mejoramiento genético de las especies forrajeras puede lograrse mayor adaptación a clima, suelo y tolerancia a plagas y enfermedades. La eficiencia en los procesos de mejoramiento depende en gran parte de la disponibilidad de variación genética (Jaramillo, 6).

La variación somaclonal generada durante el cultivo de tejidos, puede utilizarse en los programas de mejoramiento para aumentar su eficiencia (Larkin y Scowcroft, 7). Se ha registrado variación de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas de avena, trigo, caña de azúcar, maíz, tomate, alfalfa y tabaco regeneradas por cultivo de tejidos (Roca, 11). La variación que se recupera en las plantas regeneradas, resulta tanto de las diferencias genéticas que preexisten en las células somáticas, así como de la inducción por los componentes del medio de cultivo (Roca, 12).

La variación de las plantas puede resultar en variación temporal (epigenética) y variación genética; la variación epigenética generalmente se induce por los componentes del medio de cultivo y no es útil para el mejoramiento de las plantas, puesto que no se expresa en la progenie de las plantas regeneradas. Para determinar el valor y la base genética de los somaclones individuales es necesario examinar la progenie sexual (Roca, 12). Por las consideraciones anteriores los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la variabilidad presentada en plantas de ***Stylosanthes guianensis*** regeneradas a partir de cultivo de tejidos y el efecto de dos subcultivos de callo en la ocurrencia de variación en las plantas regeneradas.

## 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El trabajo se llevó a cabo en el Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT con la variedad de ***Stylosanthes guianensis*** CIAT 2243, originaria del Brasil, en donde se conoce con el nombre de cultivar “Bandeirante,” y caracterizada por tener floración “tardía” (CIAT, 2).

Como explantes se utilizaron segmentos de hojas de 4 mm<sup>2</sup> de una planta cultivada en el invernadero y se sembraron en el medio de inducción de callo, el cual constaba de sales de Murashige & Skoog, suplementado con piridoxina (1.0 mg/l), ácido nicotínico (1.0 mg/l), ANA (2.0 mg/l) y BAP (8.0 mg/l). Los cultivos in vitro se incubaron a 27 ± 1°C, 2000 lux y fotoperiodo de 12 horas.

Aproximadamente a los 45 días después de la siembra de los explantes, la mitad de cada uno de los callos obtenidos se transfirieron a medio de regeneración para inducir la rediferenciación de las plantas. La otra parte de los callos se subcultivó en el mismo medio de inducción inicial, para que continuara el crecimiento de los callos durante otros 45 días y poder observar si existe algún efecto de la permanencia durante mayor tiempo de los callos en estado indiferenciado, sobre la estabilidad fenotípica de las plantas regeneradas. Luego se transfirieron al medio M S suplementado con ANA (0.02 mg/l), BAP(0.05 mg/l) y GA (0.05 mg/l); este medio fue desarrollado para el cultivo de meristemas de yuca (Roca, 10) y se ha utilizado para la regeneración de callos de *Stylosanthes* (CIAT, 3).

Después de tres a cuatro meses se obtuvieron plantas bien desarrolladas de aproximadamente ocho cm de altura. Se tomó una planta proveniente de cada uno de los callos, se consideró como un somaclon y se micropropagó vegetativamente por medio de cultivo de nudos con yemas axilares hasta obtener nueve plantas, las cuales se trasplantaron a potes una vez alcanzaron una altura aproximada de 8 centímetros.

Se siguió la metodología desarrollada en el CIAT para la yuca (Roca, 10). Se sembraron en un sustrato compuesto de tres partes de arena por una de suelo, se colocaron en cámaras con alta humedad relativa durante los primeros quince días; posteriormente se dejaron en las condiciones normales del invernadero y aproximadamente a los dos meses se llevaron a campo en un diseño de bloques completamente al azar con nueve repeticiones por clon. El número total de clones fueron 49 regenerados directamente del callo inicial y 49 regenerados de callo subcultivado; los testigos fueron plantas propagadas vegetativamente de la planta donante de explantes.

Las características evaluadas fueron: número cromosómico en puntas de raíz, vigor, crecimiento lateral, número de tallos, longitud de entrenudos, tipo de crecimiento, reacción al ataque de antracnosis, área foliar, porcentaje de materia seca, producción de semilla y peso promedio de 100 semillas.

Las variables vigor, número de tallos, longitud de entrenudos y tipo de crecimiento, se analizaron mediante tablas de frecuencia. Las demás variables se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y para la

comparación de medias significativas se utilizó la prueba Duncan.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Número de cromosomas.

De 19 plantas con número cromosómico  $4n = 40$ , 11 (22 o/o) correspondieron a las regeneradas directamente del callo inicial y 8 (16 o/o) a las regeneradas de callo subcultivado. Las otras plantas regeneradas tuvieron un número cromosómico normal,  $2n = 20$ . Los resultados fueron similares a los del CIAT, que encontró 21 o/o de las plantas tetraploides (3 y 4).

Con base en ésta variable se clasificaron las plantas en cinco grupos: tetraploides 1 (regeneradas directamente del callo inicial) y 2 (regeneradas de callo subcultivado); testigo y diploides 1 (regeneradas directamente del callo inicial) y 2 (regeneradas del callo subcultivado).

#### 3.2. Vigor.

En los tetraploides 1 y 2 el vigor incrementó con una frecuencia total de 55.1 y 41.0 o/o en los rangos 4 y 5 de la escala, con relación a los testigos (33 o/o). En las plantas diploides 1 y 2 también se obtuvieron incrementos del vigor, con frecuencias de 52 y 41 o/o para cada grupo (Figura 1). En las plantas regeneradas directamente del callo inicial se incrementó el vigor tanto en diploides como en tetraploides, con la mayor frecuencia de plantas en el rango 4 de la escala.

En las plantas regeneradas de callo subcultivado el comportamiento de los clones fue similar al de los testigos, con la mayor frecuencia de plantas en el grado 3 de la escala.

Aunque generalmente se considera como más vigorosas a las plantas tetraploides gran número de diploides superaron a algunas de ellas y otras tetraploides tuvieron valores de vigor muy bajos.

#### 3.3. Número de tallos.

Las plantas regeneradas presentaron diferencias con relación al control en el número de tallos. En general, las plantas testigos presentaron entre 1 y 3 ramas basales, comparadas con el rango entre 1 y 6 en tetraploides 1 y 2 y diploides 1 y 2; sin embargo, la mayor frecuencia de clones se situó entre 1 y 3 ramas (Figura 2). Los incrementos registrados fueron de 13 y 10 o/o para tetraploides y diploides respectivamente. Los incrementos en el número de tallos pueden ser favorables ya que podrían manifestarse en un aumen-

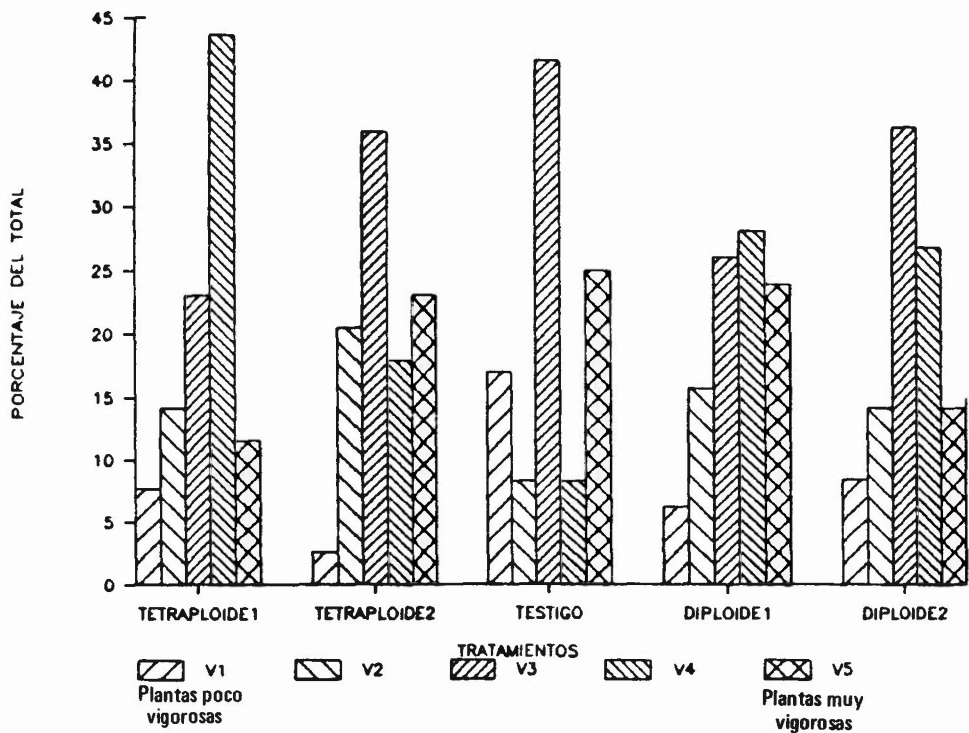


Fig. 1. Frecuencias observadas para vigor.

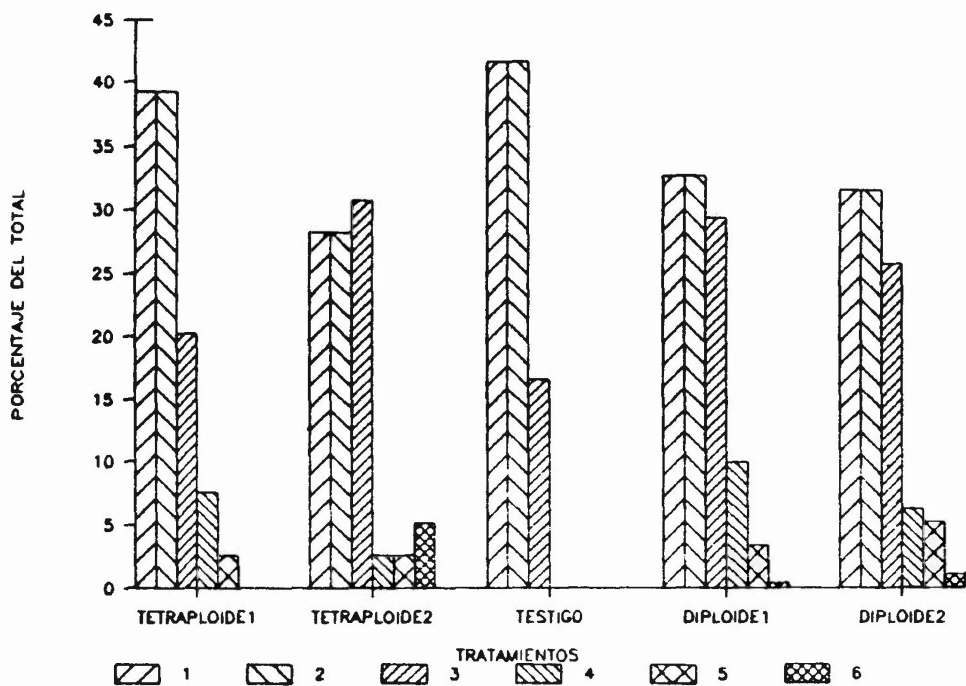


Fig. 2. Frecuencias para el número de tallos.

to en la producción de forraje para ésta leguminosa.

### **3.4. Longitud de entrenudos.**

Para el análisis de la longitud de los entrenudos se formaron cinco grupos: 10-12 cm ( $E_1$ ), 12-14 ( $E_2$ ), 14-16 ( $E_3$ ), 16-18 ( $E_4$ ) y mayor de 18 cm ( $E_5$ ). En general, todos los clones regenerados presentaron las mismas tendencias que los controles en todos los grupos (Figura 3). La mayor frecuencia de plantas presentaron entrenudos en el grupo  $E_3$  y la menor frecuencia en  $E_1$ .

La disminución en la longitud de los entrenudos podría manifestarse en un aumento en la producción de forraje, ya que a mayor número de entrenudos, mayor número de hojas; por otra parte a entrenudos más largos probablemente las plantas pueden ser más quebradizas y por ende tener menor resistencia al pisoteo por parte del ganado.

### **3.5. Tipo de crecimiento.**

El crecimiento de las plantas testigos fue semierecto (Tipo 2). En los grupos tetraploide 1 y diploide 2 las plantas presentaron los tres tipos de crecimiento, situándose la mayor frecuencia en el tipo 2. Las plantas tetraploides 2 presentaron los tipos de crecimiento 2 (semierecto) y 3 (erecto) y el grupo diploide 1 los tipos 1 (postrado) y 2 (semierecto).

El tipo de crecimiento erecto se presentó con mayor frecuencia en los tetraploides, especialmente en el grupo 1 (Figura 4). Hecho que se atribuye al mayor grosor y consistencia de tallos y ramas de las plantas tetraploides, lo cual les daría mayor resistencia al viento que las diploides.

### **3.6. Area foliar.**

La prueba de Duncan no evidenció diferencias significativas entre los testigos y los grupos diploides 1 y 2; sin embargo se observaron diferencias altamente significativas entre tetraploides 1 y 2 y también con relación a los testigos y a las plantas diploides (Cuadro 1).

Esta puede ser una característica importante ya que las plantas con mayor área foliar pueden verse beneficiadas con una mayor eficiencia fotosintética.

### **3.7. Crecimiento lateral.**

Las plantas diploides 2 alcanzaron el mayor crecimiento lateral promedio,

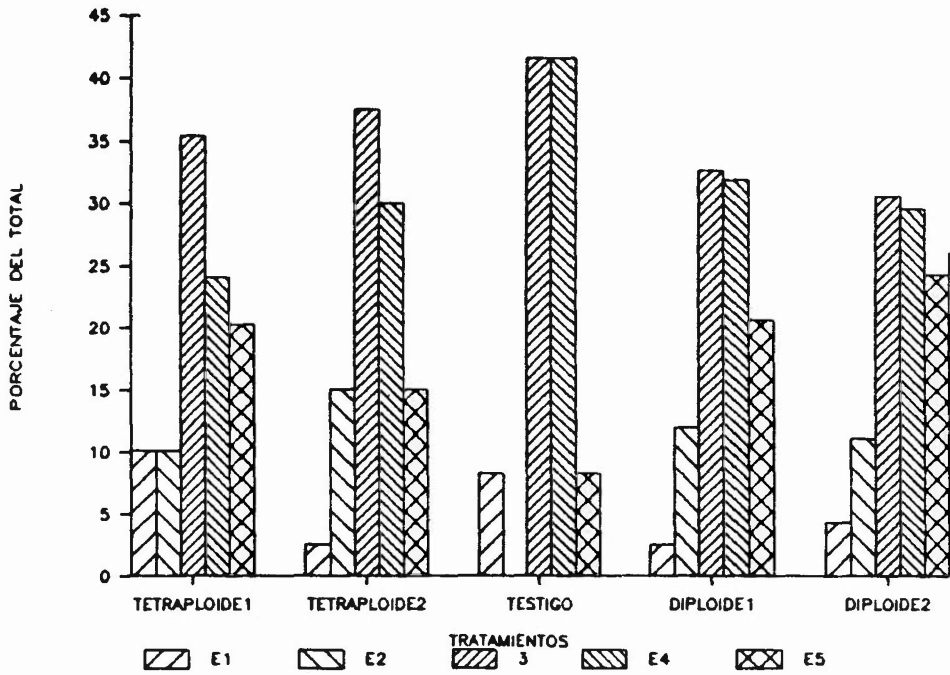


Fig. 3. Frecuencias para longitud de entrenudos.

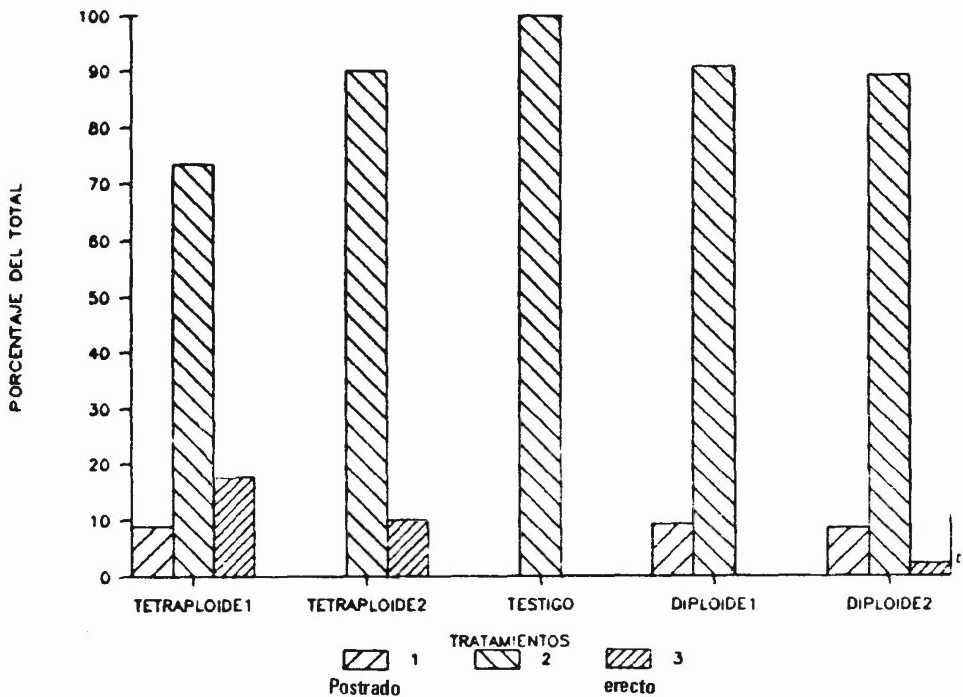


Fig. 4. Frecuencias para tipo de crecimiento.

seguidos por los grupos diploide 1 y tetraploide 1 y 2, las plantas con menor promedio fueron las testigo; sin embargo, de acuerdo con la prueba de Duncan, éstos promedios no fueron significativamente diferentes (Cuadro 2).

Analizando el comportamiento individual de los clones, se observaron diferencias altamente significativas entre ellos, con valores extremos de 67 (clon 54) y de 152 cm (clon 84).

### **3.8. Reacción al ataque de antracnosis.**

En general, las plantas regeneradas, tanto diploides como tetraploides, tuvieron mayor tolerancia a la enfermedad que las testigos, con un mejor comportamiento de las plantas tetraploides.

La prueba de Duncan mostró diferencias significativas entre los testigos y las plantas diploides y de éstos con las plantas tetraploides (Cuadro 3).

Las plantas con mayor tolerancia fueron las tetraploides 1, seguidas por las tetraploides 2, diploides 1 y 2 y el último lugar para las plantas testigo.

La mayor frecuencia de plantas se encontró en el grado 1 de la escala, seguidos de los rangos 0 (sanas), 2, 3, 4, 5 (muertas).

Es importante resaltar que aunque las plantas con mayor tolerancia fueron las tetraploides, se encontraron cuatro clones diploides con valor 0 de infestación.

### **3.9. Porcentaje de materia seca.**

Los mayores promedios para porcentaje de materia seca fueron obtenidos por las plantas tetraploides 2 (50.2 o/o) y 1 (48.5 o/o), seguidas de las diploides 1 (47.5 o/o) y 2 (46.4 o/o); las testigo ocuparon el último lugar (44.2 o/o). Sólo se encontraron diferencias significativas entre tetraploides 1 y 2 con relación a los testigos (Cuadro 4).

Los resultados hacen suponer que las plantas tetraploides sean ligeramente más fibrosas que las diploides y testigos, lo cual podría tener algún efecto negativo en la palatabilidad por parte del ganado.

Analizando los clones individualmente se observaron diferencias altamente significativas entre ellos, obteniendo el clon 60 el mayor promedio (58 o/o) y el clon 24 el menor (21.6 o/o).



Cuadro 1

Prueba de Duncan para la variable área foliar

Tratamiento	No. de datos	Promedio	Grupo
Tetraploide 1	79	1.255	A
Tetraploide 2	40	1.177	B
Testigo	12	0.729	C
Diploide 2	185	0.715	C
Diploide 1	241	0.692	C

N. S. = 0.05

Promedio con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 2

Prueba de Duncan para la variable crecimiento lateral de las plantas

Tratamiento	No. de datos	Promedio (cm)	Grupo
Diploide 2	189	112.630	A
Diploide 1	241	111.490	A
Tetraploide 1	79	104.848	A
Tetraploide 2	39	101.795	A
Testigo	12	101.667	A

N. S. = 0.05

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 3

Prueba de Duncan para la variable reacción al ataque de antracnosis

Tratamiento	No. de datos	Promedio	Grupo
Testigo	12	3.080	A
Diploide 2	188	1.196	B
Diploide 1	241	1.153	B
Tetraploide 2	40	0.512	C
Tetraploide 1	79	0.398	C

N. S. = 0.05

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 4

Prueba de Duncan para la variable porcentaje de materia seca

Tratamiento	No. de datos	Promedio (o/o)	Grupo
Tetraploide 2	40	50.244	A
Tetraploide 1	79	48.521	A
Diploide 2	188	47.503	AB
Diploide 1	241	46.429	AB
Testigo	12	44.252	B

N. S. = 0.05

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes

### 3.10. Producción de semilla.

Las plantas tetraploides de los grupos 1 y 2 tuvieron la menor producción de semilla, con promedios de 0.28 y 0.27 gramos. La mayor producción de semilla se obtuvo en las plantas diploides 1, seguidos muy de cerca por los controles y las plantas diploides 2 (Cuadro 5).

En general, aunque se obtuvieron pequeñas diferencias en la producción de semilla, éstas no fueron estadísticamente significativas. Sólo se encontraron diferencias altamente significativas entre clones individuales, obteniendo la mayor producción el clon 43 (1.13 g) y siendo el más inproductivo el clon 60 (0.009 g).

### 3.11. Peso promedio de 100 semillas.

Las plantas regeneradas directamente del callo inicial, tanto diploides como tetraploides, presentaron el mayor peso para el promedio de 100 semillas comparadas con los testigos; las plantas regeneradas de callo subcultivado presentaron los menores promedios (Cuadro 6).

Los clones que presentaron semillas más pequeñas fueron el 52, 56, 81, 85 y 97 todos provenientes de callo subcultivado. El mayor peso de semilla se obtuvo en los clones 13, 58 y 60.

## 4. CONCLUSIONES

- 4.1. Se presentó variación en las plantas de *Stylosanthes guianensis* CIAT 2243 tipo “tardío” regeneradas a partir de cultivo de tejidos.
- 4.2. Cuando se analizaron los clones en los cinco grupos clasificados, las características que variaron fueron número cromosómico, vigor, número de tallos, tipo de crecimiento, área foliar, reacción al ataque de antracnosis y porcentaje de materia seca.
- 4.3. Analizando los clones individualmente, se presentó variación en todas las características evaluadas.
- 4.4. La mayor variación generada estuvo relacionada con duplicaciones en el número cromosómico.
- 4.5. Analizando la variación generada con edad del callo, se encontraron diferencias en número cromosómico, vigor, tipo de crecimiento y peso promedio de 100 semillas.

Cuadro 5

Prueba de Duncan para la variable producción de semilla

<u>Tratamiento</u>	<u>No. de datos</u>	<u>Promedio (g)</u>	<u>Grupo</u>
Diploide 1	241	0.343	A
Testigo	12	0.313	A
Diploide 2	185	0.302	A
Tetraploide 1	79	0.280	A
Tetraploide 2	40	0.272	A

N. S. = 0.05

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 6

Prueba de Duncan para la variable peso promedio de 100 semillas

<u>Tratamiento</u>	<u>No. de datos</u>	<u>Promedio (g)</u>	<u>Grupo</u>
Diploide 1	241	0.216	A
Tetraploide 1	79	0.215	A
Testigo	12	0.214	A
Tetraploide 2	40	0.213	A
Diploide 2	185	0.211	A

N. S. = 0.05

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Informe anual, 1978.
2. \_\_\_\_\_ . Informe Anual, 1982.
3. \_\_\_\_\_ . Informe Anual. Unidad de Biotecnología, 1985.
4. \_\_\_\_\_ . Informe Anual. Unidad de Biotecnología, 1986.
5. GROF, B. Preliminary studies on the performance of accessions of tropical fine stem stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw) in the eastern plains of Colombia. Trop. Grassl. v.17, n. 4. p. 164-170. 1983.
6. JARAMILLO, S. Estudio sobre la inducción de callo y la regeneración de plantas de *Stylosanthes* spp. in vitro. Bogotá, Universidad Nacional - ICA, 1982. (Tesis M. Sc.).
7. LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation; a novel source of variability from cell culture for plant improvment. Theor. Appl. Genet. v. 60, p. 197 - 214. 1981.
8. LENNE, J; VARGAS, A; TORRES, C. Descripción de las enfermedades de las principales leguminosas forrajeras tropicales. Guía de estudio. Cali, CIAT, 1983. (Serie 045 P-03-03).
9. MCLLROY, R. J. Introducción al cultivo de los pastos tropicales. México, Limusa, 1973. 168 p.
10. ROCA, W. M. El cultivo de meristemas de yuca. Guía de estudio. Cali, CIAT, 1980. (Serie 045 C-02.02).
11. \_\_\_\_\_ . Biotecnología: oportunidades para la investigación agrícola en América Latina. En: CIMMYT. Fortalecimiento de la investigación agrícola en América Latina. Memorias, 1985.
12. \_\_\_\_\_ . Biotecnología de plantas: nuevas oportunidades para la agroindustria . En: Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle. Agro-industria 2000. Cali, 1986.