

EL CULTIVO *IN VITRO* EN EL MEJORAMIENTO DE PASTOS Y FORRAJES. I. VARIACIÓN SOMACLONAL

A.R. Mesa, G. Lajonchere y Odalys Toral

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

La ganadería tradicional cubana se basó en el empleo de los pastos, constituidos principalmente por especies de gramíneas endémicas y naturalizadas, generalmente de poco valor nutritivo y productividad, explotadas a través de un sistema de manejo extensivo.

Al triunfo de la Revolución la producción de carne y leche constituyó la piedra angular para el necesario desarrollo de la base alimentaria de la población, por lo que fue necesario el incremento cuantitativo y cualitativo de la masa ganadera disponible, para la cual los pastos constituyen el alimento fundamental en un sistema de bajos insumos. Por ello, resulta necesario la búsqueda de nuevas variedades de pastos más productivos a través del mejoramiento genético y de la biotecnología.

El mejoramiento genético persigue reestructurar en un individuo todos los caracteres de interés para el productor. En los pastos y forrajes es de gran importancia mejorar cada vez más los indicadores de producción de materia seca, porcentaje de proteína bruta, fibra bruta y de hojas, así como la producción de semillas de calidad y la resistencia a plagas y enfermedades. Con estos objetivos el mejorador va en busca, finalmente, de un alimento de buena calidad, con repercusión en la producción de leche y carne.

Uno de los grandes problemas que han presentado los programas de mejoramiento en la mayoría de los pastos, consiste en el modo de reproducción asexual, fundamentalmente la apomixis, como ocurre en *Cynodon*, *Panicum*, *Cenchrus* y otras. Los trabajos de Combes y

Pernés (1972) y Chaume y Savidán (1977), entre otros, han abierto nuevos horizontes al mejoramiento genético en estas especies.

En sentido general, cualquier programa convencional de mejoramiento se caracteriza por ser relativamente demorado en lograr su objetivo final. Es por ello, y por otros inconvenientes, que resulta necesario la búsqueda de nuevas vías más rápidas y seguras.

Con la explosión del desarrollo de la ciencia y la técnica, surge un nuevo mundo, la Biotecnología, que va invadiendo todas las disciplinas y campos que domina el hombre hasta estos momentos.

Los avances en la biología molecular y en el metabolismo genético y bacterial han contribuido al desarrollo de la biotecnología (Sasson, 1989), la cual, como en otros muchos casos, puede ser aplicada para mejorar genéticamente los pastos en Cuba.

En este artículo se analizará el papel de la variación somaclonal en el mejoramiento genético, así como los factores que la afectan,

Importancia del cultivo in vitro

La biotecnología, según Sasson (1989), es "la aplicación de principios científicos e ingenieriles para el procesamiento de materiales por agentes biológicos y así obtener beneficios y servicios". Estos agentes biológicos a que se refiere el autor son los microorganismos, animales, plantas, enzimas y células y la definición abarca desde el cultivo de tejido hasta la ingeniería genética.

En el mundo actual, las aplicaciones de la biotecnología abordan todas las ramas de los métodos convencionales de mejora y producción de semillas. Las fundamentales son: mejoramiento genético, propagación masiva, conservación de germoplasma y producción de metabolitos secundarios.

En el mejoramiento genético se pueden considerar tres campos de aplicación:

Técnicas auxiliares del mejoramiento genético. Tienen como objetivo hacer más eficientes los métodos convencionales de cruzamiento, como son: el rescate de embriones (Torrey, 1973; Pérez-Padrón y González-Rivero, 1991), el cultivo de anteras (Bajaj, 1983), los mapas genéticos y los marcadores moleculares para la selección. Estas técnicas no han sido aplicadas en pastos tropicales.

Mejoras por mutación somaclonal o inducidas. En este campo, la variabilidad genética para cualquier programa de mejora vegetal que se produce *in vitro* es muy importante y se han obtenido resultados relevantes en varios cultivos forrajeros, tales como *Panicum maximum* (Bajaj, Sidhu y Dubey, 1981; Lu, Vasil y Vasil, 1981; Karlsson y Vasil, 1986), *Stylosanthes guianensis* (Mroginski y Kartha, 1981; Szabados y Roca, 1986) y *Digitaria eriantha* (Watt, Mycock y Cresswell, 1989).

Transformaciones genéticas de las plantas. En este caso, según Pérez-Ponce y Jiménez (1992), la variabilidad genética es creada por los genes aislados o semiutilizados por la biología molecular e incorporada a las plantas por ingeniería genética, aunque las técnicas biotecnológicas sustentan el manejo del material biológico *in vitro* y la posterior regeneración de las plantas.

Por todo lo anteriormente expuesto, reviste gran importancia el conocimiento y la utilización de dichas técnicas en el mejoramiento genético de cualquier especie vegetal. No obstante, por su extensión

solamente se expondrá lo relacionado con la variación somaclonal.

Por otra parte, a nivel internacional son muy pocos los estudios biotecnológicos en los pastos tropicales con relación a otros cultivos de interés agrícola; estos se concentran en las siguientes especies: *Digitaria decumbens* (Cheng, 1985); *Pennisetum purpureum* (Wang y Vasil, 1983; Chandler y Vasil, 1984), *Sorghum bicolor* (Brettell, Wernicke y Thomas, 1980); *Leucaena leucocephala* (Nagmani y Venketeswaram, 1983) y *Cynodon dactylon* (Ahn, Huang y King, 1985; Artunduaga, Taliaferro y Johnson, 1988). Por ello, estos estudios son altamente importantes, máxime cuando la variabilidad genética esté muy restringida o cuando sean limitadas las prospecciones en los centros de origen de las especies forrajeras

Variación somaclonal

En la técnica de micropropagación, comúnmente usada por los biotecnólogos, se observaron en ocasiones cambios fonológicos del material vegetal multiplicado. En un principio se desconocieron sus causas, pero ello constituyó una limitante para cumplir los objetivos de la micropropagación. Larkin y Scowcroft (1981) desarrollaron un minucioso estudio de esta variabilidad y la definieron por primera vez. Posteriormente dichos autores profundizaron en esta nueva opción para el mejoramiento genético (Scowcroft y Larkin, 1982) y algunos años después Larkin (1987) generalizó su definición.

Según Vasil (1986), la variabilidad obtenida por cultivo *in vitro*, se debe a los cambios que ocurren durante el período de crecimiento del callo, los cuales pueden ser genéticos o no genéticos. El autor argumenta que algunos de estos cambios son derivados de las células aberrantes que pre-existían en el explante o de los disturbios fisiológicos causados por el ambiente de cultivo. Tales variaciones son

motivadas por disturbios en los niveles de expresión de los genes, más que por cambios inducidos durante el cultivo en las plantas regeneradas.

Se puede plantear, por tanto, que la variabilidad por cultivo *in vitro* está controlada genéticamente y se denomina variación somaclonal.

Se plantea que las plantas regeneradas de tejidos meristemáticos organizados, tales como ápices vegetativos o yemas axilares, son visualmente estables en tipo y uniformidad y ocasionalmente producen variantes epigénicas o mutantes somáticas. Sin embargo, la fase de callo que precede a la diferenciación a veces ocasiona variación genética entre las plantas regeneradas. Esta variación somaclonal es reconocida ahora como un fenómeno general que ocurre en los tejidos de los callos desdiferenciados y no organizados, y los cambios genéticos pueden ocurrir más fácilmente en la fase de callo (Anon, 1986a). Se ha demostrado en múltiples cultivos que dichos cambios persisten a través de la diferenciación y regeneración de las plantas.

La variabilidad por la vía de la ortogénesis puede ser inducida por el tipo de explante utilizado, por la acción mutagénica del medio de cultivo empleado para la formación del callo o por la combinación de ambas.

En caña de azúcar, Liu (1981) encontró variabilidad para caracteres morfológicos; resultados similares han sido obtenidos en Cuba por otros investigadores. González (1988a), en un estudio realizado con la variedad Ja 64-19, obtuvo gran variabilidad en la mayoría de los componentes del rendimiento para la población somaclonal; González (1988b) comprobó que la población de plantines fue más fina, menos alta y de menor rendimiento que la población de la variedad donadora; también la variabilidad de los componentes del rendimiento no fue incrementada significativamente en su población somaclonal, pero sus individuos

presentaron un mayor rango de variación, lo que posibilitó la selección de genotipos con rendimientos superiores a los del donante. Se ha informado además, mediante esta técnica, genotipos resistentes a estrés de suelo (Pérez, Milanés, Cabrera y Morales, 1984) y otros con supresión en la floración (Pérez-Ponce, 1988), por lo que se puede plantear, de acuerdo con estos resultados analizados, que la variación que se produce por cultivo de tejidos es suficiente para la selección.

Por otra parte, Meijer (1984) describió anomalías en plantas regeneradas en *Stylosanthes guianensis* por cultivo *in vitro* en cuanto al tamaño y la forma de las hojas, el grosor del tallo, la longitud de los internodos y la ausencia de dominancia apical, y aunque la variabilidad persistió en las plantas propagadas clonalmente, la naturaleza genética de estos cambios morfológicos aun no ha sido confirmada.

También en el CIAT Tabares, Pineda, López, Szabados y Roca (1986) determinaron la extensión de la variabilidad en plantas de esta especie regeneradas *in vitro*. En 96 plantas obtenidas por callos, derivadas de hojas e hipocótilos, encontraron caracteres muy similares a los señalados anteriormente y el 20% de estas plantas fueron tetraploides ($2n = 40$).

En Cuba Saura, Martínez, Prieto y Santana (1987) regeneraron plantar de *P. maximum* Jacq. a partir de tejido meristemático apical en el medio Murashige y Skoog suplementado con 3 mg/l de 2,4-D +10% de harina de coco; cuando se subcultivaron estos callos con 0,3 mg/l de Kinetina, obtuvieron plantas que mostraron una marcada variabilidad genética. Ello fue comprobado por Pereira, Prieto y Ávila (1990) al utilizar un método electroforético con dos sistemas enzimáticos (esterasas y peroxidasas), quienes observaron diferencias entre los calloclones.

Crougham y Hebert (1988) utilizaron el método de cultivo *in vitro* para la ampliación

del germoplasma de *Cynodon dactylon* y demostraron que las plantas regeneradas tuvieron una variación útil, ya que hubo somaclones con una mayor tasa de crecimiento y resistencia a *Spodoptera frugiperda*, así como a la mancha foliar.

Tipos y origen de la variación somaclonal

El origen de las mutaciones que ocurren en el cultivo *in vitro* ha sido poco estudiado, más aún en los pastos tropicales. Schuze *et al.* (citados por Pérez-Ponce, 1992) analizaron los resultados de 20 investigaciones, de las cuales en 12 las mutaciones se produjeron a nivel nuclear, 5 en citoplasma y en 3 no fue posible determinar dónde ocurrieron, lo que indica que la herencia citoplasmática tiene un gran peso en la variación somaclonal.

Dentro de las mutaciones que ocurren en el núcleo, según Vázquez, Ana (comunicación personal), se ha informado la cromosómica, o sea, cambios estructurales y numéricos de los cromosomas, cambios génicos (monogénica y poligénica) y otros referidos a las transposiciones y mediaciones del DNA. Brown y Lörz (1986), en una reseña sobre este tema, han enfatizado la importancia de los cambios que ocurren en el DNA de las mitocondrias y de los cloroplastos durante el cultivo *in vitro*.

En el caso de las mutaciones, la mayoría de los investigadores han encontrado como causa fundamental la poliploidía, la aneuploidía y las mutaciones genómicas. Según Ahloowalia (1983), dentro de estas últimas se han informado todas las formas posibles de la genética mutacional clásicas: translocaciones, inversiones, deleciones y otras.

La poliploidía y la aneuploidía son las mutaciones más frecuentes *in vitro*, y puede detectarse desde el inicio del cultivo la inestabilidad cromosómica. En *Pennisetum americanum* Swedlung y Vasil (1985) informaron que el explante inicial tenía un 96% de células diploides, 25% tetraploides y 1,2%

aneuploides. Al mes de cultivo el 92% fue diploide, aumentaron a 4% las tetraploides y a 47% las aneuploides. Con los subsiguientes subcultivos, a los varios meses de edad, hubo un 76% de diploides, 10% de tetraploides y 14% de aneuploides. Esto sugiere que las pocas células no diploides presentes en el explante inicial debieron tener una ligera ventaja selectiva durante la proliferación del callo, por lo que se incrementó su población.

En *Medicago sativa*, el cultivo *in vitro* permitió la obtención de 9 octaploides de 200 plantas regeneradas a partir de un clon tetraploide (cv Saranac) (Saunders y Bingham, 1972). Posteriormente, Saunders y Bingham (1975) detectaron 50 octaploides por doblaje espontáneo de los tetraploides Wang y Vasil (1983) plantaron segmentos de inflorescencias jóvenes de un genotipo enano de Napier (*Pennisetum americanum* x híbrido de *Pennisetum purpureum*) y observaron que no hubo una marcada variabilidad, ya que retuvieron su número triploide de cromosomas ($3x = 21$), excepto una de las variantes que fue hexaploide ($6x = 42$).

Son muy pocos los trabajos que abordan las mutaciones citoplasmáticas en los cultivos vegetales *in vitro*, situación que se acentúa más en los pastos tropicales. No obstante, en algunas gramíneas tales como el arroz y el trigo, se ha evidenciado por Palmer y Thompson (1982) que las variaciones obtenidas *in vitro* se deben a la presencia de dos grandes secuencias de DNA en los cloroplastos. También Day y Ellis (1984) encontraron selecciones del DNA cloroplástico y grandes segmentos invertidos y repetidos en plantas regeneradas de trigo.

En cuanto a los cambios del DNA mitocondrial, Gengenbach, Green y Donovan (1977) y Brettell, Goddard e Ingram (1979) regeneraron plantas de maíz resistentes a la toxina del hongo *Drechslera maydis*, cuyo donante era una línea altamente susceptible a la enfermedad (Texas Male Sterile cytoplasm).

Cuando la presión de selección fue aplicada por subcultivo de callos en presencia de la toxina, algunos regenerantes fueron no solamente resistentes a la enfermedad, sino también fértiles. Los análisis de restricción del DNA mitocondrial de los regenerantes mostraron diferentes secuencias, donde hubo una gran alteración estequiométrica de los fragmentos.

Con respecto al DNA nuclear, se ha observado también que es afectado por el estrés de cultivo *in vitro*, con un gran incremento y una proporción aumentada de secuencias repetidas (De-Paepe, Prat y Huguet, 1982). Algunas investigaciones han concluido la existencia de procesos de síntesis de DNA, y tal amplificación, por lo tanto, puede ser solamente un paso primario de una cascada de eventos que permiten cambios en el desarrollo.

Los otros tipos de variación somaclonal son menos estudiados y requieren, en sentido general, de una gran atención por parte de los investigadores.

No obstante, como una nueva causa de variabilidad se informan los elementos genéticos móviles, las transposomas. Producto de esta variabilidad novel aparecen mutantes que no existen o que son muy raros en la naturaleza, tales como: panículas múltiples en trigo, panículas triples en cebada, incremento en la altura y el vigor en el maíz y también mutantes resistentes a las fitohormonas, herbicidas, antibióticos, sales y metales (Ahloowalia, 1983).

Existen claras evidencias de que las mutaciones que ocurren *in vitro* son las mismas que ocurren *in vivo* por los métodos clásicos de la genética mutacional. A través del cultivo de tejidos se pueden obtener mutantes noveles, como es el caso donde se producen somaclones sexuales por aporte del citoplasma. Además se ha informado como otra causa de variabilidad el "crossing over mitótico".

Según Vázquez, Ana (comunicación personal), dentro de la variación somaclonal se pueden encontrar algunas rarezas que se observan en las plantas regeneradas. Entre ellas se mencionan: alta frecuencia de mutación para algunas especies, más de una mutación por planta, mutaciones dominantes, homocigosis, inestabilidad del mutante y segregaciones anormales.

Factores que afectan la variación somaclonal

De forma muy general, la variación somaclonal se origina de las mutaciones pre-existentes en los tejidos que se emplean para los cultivos *in vitro* y de las que se producen debido al cultivo *in vitro* por sí mismo. Los factores que originan las mutaciones son: el genotipo, el explante, la edad de los cultivos y los medios de cultivo.

Genotipo

Anon (1986b) indicó determinadas evidencias en el sentido de que ciertos géneros, especies o genotipos con diferentes condiciones de ploidía son más propensos para la ocurrencia de variación espontánea que otros. Este aspecto ha sido bien determinado en muchos cultivos, no así en el caso de los pastos y forrajes en que los informes de la literatura son muy escasos.

No obstante, en caña de azúcar se ha confirmado la influencia que tiene el genotipo sobre la variación somaclonal, aunque es más importante para el mejoramiento genético el comportamiento particular del carácter que se quiere mejorar. En la variedad de caña B-4362, con un alto por ciento de variabilidad somaclonal, en una población de 50 000 regenerantes no se encontró ninguno resistente a la roya; por el contrario, en la variedad My-5450 con una baja variabilidad, se pudieron aislar mutantes resistentes al carbón

(Liu, 1981). Por otra parte, la regeneración de plantas influye sobre la variabilidad somaclonal; a medida que esta sea de tejido más diferenciado, la variabilidad será menor, ocurriendo lo contrario cuando se regeneran tejidos menos diferenciados como el de los callos, al igual que los procedimientos físicos o químicos a que se someten los tejidos para la obtención de agregados o células simples. Esto se evidenció en dos formas de regeneración de plantas en *P. maximum* cv. Likoni, ya que Saura *et al.* (1987) obtuvieron una alta variabilidad por organogénesis y Lajonchere, Mesa, Prieto y Toral (1994) demostraron la alta estabilidad genética de las plantas obtenidas por embriogénesis.

La influencia del genotipo sobre la variabilidad somaclonal puede estar dada por dos causas: una es que sea más inestable y que tenga un mayor número de mutaciones en el tejido y la otra es que los genotipos, al igual que en el caso de la regeneración, tengan variada respuesta a la variabilidad que se produce por cultivo *in vitro* "per se".

Jaramillo (1984) realizó estudios con diferentes genotipos, incluyendo algunos híbridos de *S. guianensis* en cultivo de anteras y organogénesis a partir de hojas, y observó que el genotipo influyó grandemente, tanto en la diferenciación de callos como de órganos.

También Godwin, Gordon y Cameron (1987) regeneraron plantas de 5 genotipos de *S. guianensis* a partir de callos derivados de hojas y notaron grandes diferencias genotípicas en cuanto al potencial morfogenético, que variaron desde 95 a 100% en los callos formadores de brotes del cv. Graham y a menos de 1% en el cv. Oxley. En sentido general, variaron caracteres como el albinismo, menor fertilidad, enanismo y morfología foliar.

En otras leguminosas se ha encontrado una gran variación genotípica para la regeneración de plantas, tales como *Medicago sativa* (Brown y Atanassov, 1985), *Trifolium pratense* (Phillips

y Collins, 1979) y otras especies (Keyes, Collins y Taylor, 1980).

La variación genotípica en *T. pratense* para la embriogénesis somática fue atribuida a la varianza genética aditiva (Keyes *et al.*, 1980); mientras que Reisch y Bingham (1981) informaron que la capacidad para la embriogénesis somática en genotipos diploides de alfalfa fue controlada por dos genes dominantes.

Explante

Para el inicio del cultivo *in vitro* se puede partir de cualquier tejido: somático o sexual. Si es somático, a la variabilidad que se obtenga se le denomina variación somática o somaclonal y si es sexual variación gametoclinal.

Como se ha planteado, la causa de la variación genética son las mutaciones pre-existentes en el tejido, por lo que el tipo de explante debe jugar un papel preponderante.

Miles, Roca y Tabares (1989) estudiaron la variación somaclonal de *S. guianensis* CIAT-2243, en un medio con las sales orgánicas e inorgánicas del MS y suplementado con las vitaminas del B₅ más 4 a 8 mg/l de 6-BAP y 0,5 mg/l de ANA, con dos tipos de explantes: hojas maduras e hipocótilos. En total tuvieron 26 y 23% de tetraploides para cada tipo de explante respectivamente y el resto diploide. Estos investigadores notaron que el índice de tetraploidía no se vio afectado ni por el explante ni por el número de subcultivos y observaron además, en general, que la media de las líneas diploides fue diferente a la media de las líneas tetraploides y estas entre sí presentaron diferencias. Dichos autores concluyeron que la variación somaclonal será de utilidad en las actividades de mejoramiento genético, si la generación de esta variación puede combinarse con procedimientos de selección eficaces.

En *Cajanus cajan* L. (Milsp), Sarangi y Gleba (1991) utilizaron para la regeneración

múltiple directa diferentes porciones de los embriones cigóticos: embriones enteros y embriones cortados en piezas de 0,5-1 mm; ellos observaron que las partes cotiledonales no adyacentes al eje embrionario no retuvieron el poder organogénico y, en sentido general, fue evidente la variabilidad genética obtenida.

Vázquez y Ruíz (1986) citan a algunos autores que han utilizado diferentes tipos de explantes: Scheunert utilizó secciones de raíces seminales de *Hordeum vulgare* y obtuvo un 80% de células diploides; Canoir-Reynaerts y Jacobs obtuvieron callos derivados de embriones donde el 60% de las células fueron tetraploides y algunas con más de 100 cromosomas; Wilson observó células con diferentes niveles de ploidía en callos derivados de microsporas.

En sentido general, el uso de células meristemáticas o embriogénicas derivadas de ápices vegetativos e inflorescencias jóvenes pueden proveer una fuente genéticamente más estable que los tejidos diferenciados (Anon, 1986b).

Edad de los cultivos *in vitro*

Como se ha señalado anteriormente, las variaciones más comunes que ocurren en el

cultivo *in vitro* son la poliploidía, la aneuploidía y las aberraciones cromosómicas. En estudios citogenéticos ha quedado demostrado que estos cambios aumentan proporcionalmente con la edad de los cultivos *in vitro* (Pérez-Ponce, 1992), los que ocasionan la pérdida de la totipotencia de las células producto del elevado número de mutaciones que ocurren en ellas.

En *S. guianensis* (CIAT, 1986) se encontró que la capacidad regenerativa disminuyó de 46 a 16 y 3 para subcultivos sucesivos respectivamente, pero hubo una tendencia a aumentar la frecuencia de doblaje de los cromosomas; se observó además una relación entre el nivel de ploidía y los caracteres agronómicos

Vázquez y Ruíz (1986) notaron en *H. vulgare* que los callos obtenidos de embriones mostraron una alta frecuencia de células diploides después de 4 meses de cultivo; esta predominancia de células diploides fue mantenida sobre un período de 3 años. Sin embargo, al inicio se observó cierta inestabilidad de los cromosomas.

En la tabla 1 se muestra cómo influye el período de tiempo sobre el número de cromosomas en callos derivados de embriones en *H. vulgare*.

Tabla 1. Por ciento de células con diferentes números de cromosomas en *H. vulgare*.

Días de cultivo	Número de cromosomas					Total de células
	<14	14	>14<28	28	>28	
2	-	100	-	-	-	108
3	-	88,62	-	10,57	0,81	123
90	0,74	80,74	0,74	17,78	-	135
120	-	96,77	-	3,23	-	93

Como se puede notar, el comportamiento de la variabilidad y la edad de los cultivos *in vitro* es muy importante cuando se aplica esta técnica en el mejoramiento genético.

Medios de cultivo

Uno de los factores más importantes que gobiernan la morfogénesis en el cultivo de tejidos es la composición del medio.

En los medios de cultivo existen dos formas de provocar variabilidad genética: la primera es debido a la influencia de las diferentes hormonas vegetales sobre el material hereditario, y la segunda es que los medios de cultivo condicionan la forma de regeneración.

En cuanto a la primera causa, el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es la hormona más utilizada como agente mutagénico, ya que induce irregularidades en el proceso mitótico (Bayliss, citado por Vázquez y Ruíz, 1986).

Con el objetivo de incrementar de esta forma la variabilidad del germoplasma en *Bothriochloa* sp., Metzinger, Taliaferro, Johnson y Mitchell (1987) y Taliaferro, Dabo, Mitchell. Johnson y Metzinger (1989) condujeron un estudio donde originaron cambios genéticos en las plantas regeneradas con la concentración de 5 mg/l de 2,4-D. En las R₁ las plantas tendieron a ser más pequeñas que las progenitoras y hubo un decrecimiento correspondiente en la longitud de las inflorescencias y racimos más bajos. El número de cromosomas se incrementó en dichas plantas. También en *Cynodon* sp. las concentraciones de 1 mg/l de 2,4-D provocaron callos embriogénicos que regeneraron posteriormente en medio libre de hormonas, mostrando una alta variabilidad entre los individuos. Este método de cultivo fue recomendado para el mejoramiento genético de las bermudas (Ahn, Huang y King, 1987; Arhmduaga *et al.*, 1988). Sin embargo, en *Medicago sativa* la aplicación de 11 mg/l de 2,4-D produce una marcada embriogénesis sin perturbar la información hereditaria, por lo que esta técnica es utilizada para la producción de sencilla artificial (Brown y Atanassov, 1985). En *Panicum* sp. también se produce embriogénesis con el uso de esta hormona, pero en concentraciones menores sin cambios en el genoma.

En caña de azúcar se ha demostrado el efecto mutagénico que ejerce la Kinetina (N-(2-furamilmetil)-IH-purina-6-amina), ya que con la

misma forma de regeneración (en este caso organogénesis a partir de callos) se obtuvieron valores de variabilidad distintos en dependencia del tipo y concentración de las hormonas empleadas.

Debemos señalar que el efecto del medio de cultivo está muy estrechamente unido a la edad de los cultivos *in vitro*, por lo que resulta muy difícil separar el efecto de ambos.

CONCLUSIONES

Con el desarrollo surge la Biotecnología, la cual va invadiendo todas las disciplinas y campos biológicos que hasta hoy domina el hombre; a ello han contribuido los avances en la biología molecular y puede ser aplicada para mejorar genéticamente los pastos en nuestro país.

Las aplicaciones de la biotecnología en el mundo actual abarcan todas las ramas y los métodos convencionales de mejora y producción de semillas. Las fundamentales son: mejoramiento genético, propagación masiva, conservación de germoplasma y producción de metabolitos secundarios.

En cuanto al mejoramiento genético, esta nueva disciplina tiene como objetivo tres aspectos fundamentales: técnicas auxiliares, mejora por mutación somaclonal y transformación génica de las plantas.

La variación somaclonal es debida a los cambios que ocurren durante el período de crecimiento del callo. Estos cambios son derivados de las células aberrantes que pre-existían en el explante o de disturbios fisiológicos causados por el ambiente de cultivo.

Los cambios genéticos que se pueden producir por el cultivo *in vitro* pueden ser a nivel nuclear y en el citoplasma, por lo que la herencia citoplasmática juega un papel importante en la variación somaclonal. Se ha informado que en el núcleo celular son los cromosómicos, cambios génicos, transposi-

ciones y metilaciones del DNA los cambios más frecuentes, aunque el material genético de los cloroplastos y mitocondrias sufren también cambios estructurales.

Las causas fundamentales de la variación somaclonal son la poliploidía, la aneuploidía y las mutaciones genómicas, y dentro de estas últimas las translocaciones, inversiones y deleciones.

Existen varios factores que afectan la variación somaclonal, entre ellos el genotipo, el explante, la edad de los cultivos *in vitro* y los medios de cultivo, entre otros.

Se ha podido demostrar que la variación somaclonal es de gran utilidad en el mejoramiento genético, siempre y cuando la generación de esta variación pueda combinarse con procedimientos de selección eficaces.

CONCLUSIONS

The biotechnology arises with the development; it invade all disciplines and biologic field that the man dominate today; the advance in molecular biology has contributed in their science and it can be applied to grass genetic improvement in our country.

The applications of the biotechnology in the actual world include all branches and conventional methods of improve and seed production. The mains are: genetic improvement, mass propagation, germplasm conservation and secondary metabolites production.

With respect to genetic improvement, this new discipline has three main aspects as objective: auxiliary techniques, improvement by somaclonal variation and genic plant transformation.

The somaclonal variation is due to the chances that occur during the growth period of the callus. The changes are derived of the aberrant cells that pre-exist in the explant or physiological disturbance caused by cell environment

The genetics changes produce by the *in vitro* culture can be at nuclear level and in the cytoplasm, for that reason cytoplasmic inheritance play an important role in the somaclonal variation. It was informed that in the cell nucleus the changes more frequent are chromosomal, genic changes, transpositions and DNA methylations, although the genetic material of the chloroplasts and mitochondrias also suffer structural changes.

The principal causes of somaclonal variation are the polyploidy, the aneuploidy and the genomic mutations and within these, last the translocations, inversions and deletions.

There are various factors that affect the somaclonal variation, as well as, genotype, explant, age of *in vitro* culture and the nutritive culture medium.

The somaclonal variation is very important in the genetic improvement but it is necessary to combine this variation with efficient selection procedures.

REFERENCIAS

- AHLOOWALIA, B.S. 1983 Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass. **Crop Sci.** 23:1141
- AHN, B.J.; HUANG, F.H. & KING, J.W. 1985. Plant regeneration through somatic embryogenic in common bermuda grass tissue culture. **Crop Sci.** 25:1107
- AHN, B.J.; HUANG, F.H. & KING, J.W. 1987. Regeneration of bermudagrass cultivars and evidence of somatic embryogenesis. **Crop Sci.** 27:594
- ANON. 1986a. Report of the 1st Research Coordination Meeting. In: *In vitro* technology for mutation breeding. International Atomic Agency. Vienna. p. 9
- ANON. 1986b. Report of the 2nd Research Coordination Meeting. In: *In vitro* technology for mutation breeding. International Atomic Agency. Vienna. p. 25
- ARTUNDUAGA, J.R.; TALIAFERRO, Ch.M. & JOHNSON, B.B. 1988. Effects of auxin

- concentration on induction and growth of embryogenic callus from young inflorescence explants of old world bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermuda (*Cynodon* spp.) grasses. ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***. 12:13
- BAJAJ, Y.P.S. 1983. *In vitro* production of haploids In: Handbook of plant cell culture. (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada, Eds.) MacMillan, N.Y. Vol. 1. p. 228
- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, B.G. & DUBEY, V.K. 1981. Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass. *Panicum* sp. ***Euphytica***. 30:135
- BRETTELL, R.I.S.; GODDARD, B.V.D. & INGRAM, D.S. 1979. Selection of Tms-cytoplasm maize tissue cultures resistant to *Drechslera maydis* T-toxin. ***Maydica***. 24:203
- BRETTELL, R.I.S.; WERNICKE, W. & THOMAS, E. 1980. Embryogenesis from cultured immature inflorescence *Sorghum bicolor*. ***Protoplasma***. 104:141
- BROWN, D.C.W. & ATANASSOV, A. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. ***Plant Cell Tissue and Organ Culture***. 4:11
- BROWN, P.T.H. & LÖRZ, H. 1986. Molecular changes and possible origins of somaclonal variation. In: Somaclonal variations and crop improvement. (Ed. Jean Semal). Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht/Boston/Lancaster. p. 148
- CIAT. 1986. Informe anual. Pastos tropicales. Documento de trabajo No. 24 CIAT, Colombia, p. 22-1
- COMBES, D. & PERNES, J. 1972. Polimorphisme et mode de reproduction dans la section maximae du genre *Panicum* (Gramineae) en Afrique. Résumé des Thèse de Doctorat. France
- CROUGHAM, S.S. & HEBERT, K.M. 1988. Improvement of bermuda grass varieties through tissue culture. Forage and Grassland Conference, Lexington, N.Y. p. 131
- CHANDLER, S.F. & VASIL, I.K. 1984. Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier grass). ***J. Plant Physiol.*** 117:147
- CHAUME, R. & SAVIDAN, Y. 1977. *Panicum maximum*, module de manipulation génétique d'une graminée fourragère apomictique. Communication au 1er. Colloque Internatl. en zone tropicale humide. Bouake Cote d'Ivoire. p. 18
- CHENG, Y.K. 1985. Callus induction and plant regeneration from inflorescence segments of pangola grass. Proc. XV Int. Grassld. Cong, Kyoto, Japan. p. 313
- DAY, A. & ELLIS, T.H.N. 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for material inheritance of chloroplast. ***Cell***. 39:359
- DE-PAEPE, R.; PRAT, D. & HUGUET, T. 1982. Heritable nuclear DNA changes in doubled haploid plants obtained from pollen culture of *Nicotiana sylvestris*. ***Plant Sci. Lett.*** 28:11
- GENGENBACH, B.C.; GREEN, C.E. & DONOVAN, C.D. 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures. ***Proc. Nat. Acad. Sci.*** 74:5113
- GODWIN, L.D.; OORDON, G. & CAMERON, D.F. 1987. Callus culture derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Plant Breeding. ***Zeitschrift für Pflanzenzuchtung***. 98:220
- GONZÁLEZ, A.A. 1988a. Estudio y selección de somaclones de la variedad JA 64-19 en condiciones de secano. Memorias Conf Cient X Aniv. del ISACA. Ciego de Ávila, Cuba. Vol. 1, p. 42
- GONZÁLEZ, A.A. 1988b. Estudio y selección de somaclones de la variedad JA 8751 (*Saccharum* spp. híbrido) en condiciones de secano. Memorias. Conf. Cient. X Aniv. del ISACA Ciego de Ávila, Cuba. Vol. 1, p. 72
- JARAMILLO, S. 1984. Cultivo *in vitro* de anteras y fragmentos de hojas de *Stylosanthes* spp. ***Rev. Facultad Nacional de Agronomía***. 37:43

- KARLSON, SILVIA B. & VASIL, I.K. 1986. Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* (guinea grass) and *Pennisetum purpureum* (Napier grass). **Am. J. of Bot.** 73:894
- KEYES, G.J.; COLLINS, G.B. & TAYLOR, N.L.D. 1980 Genetic variation in tissue cultures of red clover **Theor. Appl. Genet.** 58:265
- LAJONCHERE, G.; MESA, A.R.; PRIETO, MARLENIS & TORAL, ODALYS. 1994. Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de ápices caulinares en *Panicum maximum* Jacq. cv. Likoni. **Pastos y Forrajes.** 16:201
- LARKIN, P.J. 1987. Somaclonal variation: history, method and meaning. **Iowa State J. Res.** 61:392
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for improvement. **Theor. Appl. Genet.** 60:1
- LIU, M.C. 1981. *In vitro* methods applied to sugar cane improvements. In: Plant Tissue Culture: Method and applications in agriculture. (Ed. Thorpe, T.A.). Academic Press, N.Y. p. 299
- LU, C.; VASIL, V. & VASIL, I.K. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jacq (Guinea grass): somatic embryogenesis and plantlet formation. **J. Pflanzenphysiol.** 104:311
- MEIJER, E.G.M. 1984. Some aspects of long-term tissue culture of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Leguminosae). **J. Plant Physiol.** 117:131
- METZINGER, B.D.; TALIAFERRO, C.M.; JOHNSON, B.B. & MTTCHHELL, E.D. 1987. *In vitro* regeneration of apomictic bluestem grasses. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 10:31
- MILES, J.W.; ROCA, W. & TARARES, E. 1989. Assessment of somaclonal variation in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. 2nd International Symp. on Genetic Manipulation in Crops (Meijeeb-Kazi, A. & Sitch, L.A. , Eds.). México, D.F. p. 249
- MROGINSKI, L.A & KARTHA, K.K. 1981 Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. **Plant Sci. Lett.** 23:245
- NAGMANI, R. & VENKETESWARAM, S. 1983. *In vitro* culture of hypocotyl and cotyledon segments of leucaena. **Leucaena Res. Rep.** 1:88
- PALMER, J.D. & THOMPSON. W.F. 1982. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost. **Cell.** 29:537
- PEREIRA, MADELINE; PRIETO, MARLENIS & AVILA, VIVIAN. 1990 Caracterización isoenzimática de somaclones de *Panicum maximum*. **Pastos y Forrajes.** 13:237
- PÉREZ, G.; MILANES, N.; CABRERA, L. & MORALES, F. 1984 Principales variedades de la caña de azúcar en producción y extensión en Cuba. INICA. La Habana, Cuba. p. 12
- PEREZ-PADRON, A.V. & GONZÁLEZ-RIVERO, A 1991. Hibridación inter-específica y rescate de embriones en el género *Oryza* en Cuba. Resúmenes 2do. Coloquio de Biotecnología de las Plantas y IV Symp. Internat. de Sanidad Vegetal en la Agricultura Tropical. Santa Clara, Cuba. p. 25
- PÉREZ-PONCE, J. 1988 Caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). UCLV, Cuba. (Mimeo)
- PÉREZ-PONCE, J. 1992. Variación somaclonal. En: Conferencias. Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central de Las Villas, Cuba
- PEREZ-PONCE, J. & JIMÉNEZ, E; 1992. Introducción al cultivo *in vitro*. En: Conferencias. Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central de Las Villas, Cuba

- PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. **Crop Sci.** 19:64
- REISCH, B. & BINGHAM, E.T. 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue cultures: variation in growth and morphological characteristics. **Crop Sci.** 21:783
- SARANGI, K.B. & GLEBA, Y.Y. 1991. Direct multiple regeneration in *Cajanus cajan* L. (Millsp.). **Acta Hort.** 289:149
- SASSON, A. 1989. Biotechnologies and developing countries: present and future to: Plant biotechnologies for developing countries. (Eds. A. Sasson and V. Costarini). Proc. of an Internat. Symp. organized by CTA and FAO, Luxemburgo. p. 23
- SAUNDER, J.W. & BINGHAM, E.T. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. **Crop Sci.** 12:804
- SAUNDER, J.W. & BINGHAM, E.T. 1975. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. **Am. J. Bot.** 62:850
- SAURA, CARMEN; MARTÍNEZ, M.; PRIETO, MARLENIS & SANTANA, I. 1987. Regeneración de plantas a partir de cultivo de tejido en hierba guinea (*Panicum maximum* Jacq.). **Pastos y Forrajes.** 10:199
- SCOWCROFT, W.R. & LARKIN, P.J. 1982. Somaclonal variation: a new option for plant improvement. In: Plant improvement and somatic cell genetics (Eds. I.K. Vasil, W.R. Scowcroft & K.J. Frey). Academic Press, NY. p. 159
- SWEDLUNG, B. & VASIL, I.K. 1985. Citogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L) K. Schum. **Theor. Appl. Genet.** 69:575
- SZABADOS, L. & ROCA, W.M. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. **Plant Cell Reports.** 3:174
- TABARES, E.; PINEDA, O.; LÓPEZ, P.; SZABADOS, L. & ROCA, W. 1986. Búsqueda de variación somaclonal en *Stylosanthes guianensis* usando cultivo de tejidos En: IV Congreso Latinoamericano de Botánica, Medellín, Colombia
- TALIAFERRO, C.M.; DABO, S.M.; MITCHELL, E.D.; JOHNSON, B.B. & METZINGER, B.D. 1989. Morphological, citogenic and enzymatic variation in tissue culture regenerated plants of apomictic old-world bluestem grasses (*Bothriochloa* sp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 10:31
- TORREY, J.C. 1973. Plant embryo. In: Tissue culture, methods and applications. (P.F. Kouse & M.K. Jr Patterson, Eds.). Academic Press, N.Y. p. 166
- VASIL, I.K. 1986. Relative genetic stability of embryogenic cultures of the gramineae and uniformity of regenerated plants. In: Somaclonal variation and crop improvement. (Ed. Jean Semal). Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht/Boston/Lancaster. p. 108
- VÁZQUEZ, ANA & RUIZ, M.L. 1986. Barley: Induction of genetic variability through callus cultures. In: Biotechnology in agriculture and forestry. (Ed. Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag, Berlin. Vol. 2, p. 204
- WANG, D.Y. & VASIL, I.K. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum. **Plant Sci. Lett.** 25:147
- WATT, PAULA M.; MYCOCK, D.J. & CRESSWELL, C.F. 1989. Plant regeneration by somatic embryogenesis from leaf explants of *Digitaria eriantha* (Stend.) Subsp. *Eriantha*. Proc XVI Int. Grassld. Cong. Nice. France p. 421

Recibido el 30 de junio de 1993