

## ORGANOGENESIS EN *Stylosanthes guianensis* CV. CIAT 184

**A.R. Mesa, G. Lajonchere, Marlenis Prieto y Odalys Toral**

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

Se condujo este experimento con el objetivo de conocer las combinaciones hormonales adecuadas para regenerar plantas a partir de callos en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. Se tomaron como explantes secciones de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas maduras de 5 mm<sup>2</sup> de los folíolos, los cuales fueron incubados en un medio con las sales de MS y las vitaminas del B<sub>5</sub>, suplementado con varias concentraciones de ANA, 2,4-D y 6-BAP. En general se lograron mejores resultados en la callogénesis en las hojas cotiledonales. La mejor respuesta a la regeneración se obtuvo cuando se subcultivó con 0,05 mg/l de 6-BAP en los callos formados con ANA; mientras que los callos obtenidos con 2,4-D regeneraron con 3 mg/l de 6-BAP más 0,01 mg/l de ANA. La organogénesis en este cultivar se obtuvo cuando la relación auxina/citoquinina fue menor que uno, tanto para la dediferenciación como para la diferenciación.

**Palabras claves:** *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184, organogénesis, cultivo in vitro, hormonas

An experiment was carried out in order to know the adequated hormonal combinations to regenerate plants from callus in *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. The explants were sections of hypocotyls, cotyledons and mature leaflets of 5 mm<sup>2</sup>, which were cultured on MS salts containing vitamins as in B<sub>5</sub> medium, supplemented by various concentrations of ANA, 2,4-D and 6-BAP. In general the best results in the callogenesis were obtained in the cotyledon explants. The best response in the regeneration was obtained subculturing with 0,05 mg/l of 6-BAP from the callus induced with ANA; while the callus formed with 2,4-D regenerated with 3 mg/l of 6-BAP plus 0,01 mg/l of ANA. The organogenesis in this cultivar was obtained when the auxin/cytokinin ratio was less than one even for the dedifferentiation than for differentiation.

**Additional index words:** *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184, organogenesis, tissue culture, hormones

La biotecnología vegetal posibilita la obtención de somaclones con disímiles características genéticas, que les permite a los mejoradores de pastos seleccionar genotipos con características deseables tales como resistencia a enfermedades y a estrés de suelo, mayor tasa de crecimiento, entre otras.

La obtención de plantas por esta vía a partir de callos, ha sido observada en varios cultivares y variedades de *Stylosanthes guianensis* por Mroginski y Kartha (1981), Meijer y Boughton (1981), Meijer (1984) y Szabados y Roca (1986), cuyos datos indican que hay diferencias sustanciales en cuanto a la capacidad regenerativa de los diferentes cultivares, en dependencia de las concentraciones externas de fitohormonas.

Esta especie ha resultado una leguminosa de gran interés como forrajera en el área tropical (Thomas, Lascano y Vera, 1987) y en

nuestro país los resultados de evaluación así lo confirman (Machado y Chao, 1980). Sin embargo, como pasto ha estado limitada principalmente por la enfermedad conocida como Antracnosis, cuyos agentes etiológicos son los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y Sacc. y *C. dematium* sp. truncata (Schw.) V Arx. (Lenné y Sonoda, 1978).

Dicha enfermedad ha sido informada en América Central, América del Sur, África y Australia (Fernández, Fernández y Grof, 1992). Otro aspecto negativo que presenta es el lento crecimiento en la fase de establecimiento, aunque no es muy acentuado en el CIAT 184.

El objetivo del presente trabajo consistió en buscar un balance hormonal adecuado, así como el mejor tipo de explante, para la regeneración de plantas en *S. guianensis* cv. CIAT 184, por ser promisorio para nuestra ganadería.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *S. guianensis* cv. CIAT 184 fueron suministradas por el germoplasma de la EEPF "Indio Hatuey", las cuales se escarificaron con agua caliente a 80°C durante 3 minutos.

**Tratamientos.** Para la proliferación de callos, se utilizaron combinaciones hormonales (mg/l) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), ácido naftalacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (6-BAP), según se apreciar en la tabla 1.

Para la regeneración de plantines se emplearon varias concentraciones de 6 BAP en el caso de los callos que provenían del ANA + 6-BAP; mientras que los callos formados con 2,4-D + 6-BAP se regeneraron con varias combinaciones de ANA + 6-BAP, de acuerdo con lo que se observa en la tabla 2.

**Procedimiento.** Las superficies de las semillas se esterilizaron por inmersión secuencial en etanol al 70% por 3 minutos, bicloruro de mercurio al 0,1 % por 2 minutos e hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos, seguidas por varios enjuagues con agua destilada y estéril.

Las semillas se pusieron a germinar sobre un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con 0,9% de agar libre de hormonas de crecimiento, en la oscuridad a 27°C durante 7 días y posteriormente pasaron a la luz durante otra semana.

Con posterioridad, a los 15 días de la germinación las plántulas fueron seccionadas en fragmentos de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas maduras de 5 mm<sup>2</sup>, las que fueron cultivadas en un medio con las sales de MS y las vitaminas del B<sub>5</sub> (Gamborg, Miller y Ojima, 1968) a 27°C, 1 500 lux de intensidad luminosa y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Con el objetivo de regenerar plantas, se subcultivaron dos veces cada 6 semanas, según se puede apreciar en la tabla 2.

Para el enraizamiento se utilizó el mismo medio basal suplementado con 0,5 mg/l de ácido 3-indol acético (A1A).

**Mediciones.** A las 6 semanas de incubados los explantes en diferentes medios, se determinó el peso fresco de los callos y su apariencia externa. Posteriormente, a las 6

semanas después del primer subcultivo, se contó el número de yemas bajo el estereoscopio óptico y a las 6 semanas siguientes el número de plantines.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para que la organogénesis ocurra a partir de un callo, se deben producir cambios que conduzcan a la organización celular. Este proceso involucra diferenciación e interacción celular y reacción a señales específicas (Torpe, 1980), por lo que se deben señalar las características del callo.

En la tabla 1 se observa el peso seco (mg) de los callos al cabo de las 6 semanas de proliferación en los tres tipos de explantes. En general, las hojas cotiledonales dieron los mejores resultados, en coincidencia con lo obtenido por Tabares, Pachón y Roca (1991) para la var. pauciflora cv. CIAT 2243 de esta misma especie.

Todos los callos presentaron un color verde. Se observaron callos de textura friable, excepto aquellos que se indujeron bajo la acción del 2,4-D, que fueron compactos. Estos mostraron además una corona blanca en su superficie, de textura gelatinosa.

En la mayoría de los casos, el aumento en 2 mg/l de 6-BAP incrementó la masa celular, por lo que fue notable el efecto beneficioso de esta fitohormona sobre la callogénesis en el cv. CIAT 184, sobre todo cuando la relación auxina/citoquinina fue menor que uno en el medio de cultivo.

Se pudo observar que el proceso de la desdiferenciación comenzó a partir de las 2 semanas de implantados los explantes en el medio de cultivo, además, al cabo de las 5 semanas hubo una respuesta organogénica muy evidente, que fue mayor en los tratamientos con el ácido naftalacético en todos los explantes, por lo que se puso de manifiesto que este cultivar permite la utilización de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas, ello coincide con lo obtenido por Mroginski y Roca (1991) para otros cultivares de la misma especie.

Para los subcultivos en medio de regeneración, se seleccionaron los callos que provenían de 0,5 y 2,0 mg/l de ANA + 4 mg/l de 6-BAP y 1,0 y 2,0 mg/l de 2,4-D + 2,0 y 4,0

Tabla 1. Media del peso seco de los callos (mg).

Tratamientos	HIP	HC	HM
0,5 ANA + 2 6-BAP	25,4	45,2	33,9
0,5 ANA + 4 6-BAP	45,4	79,3	14,4
1,0 ANA + 2 6-BAP	10,9	19,3	6,6
1,0 ANA + 4 6-BAP	40,5	97,5	8,0
2,0 ANA + 2 6-BAP	15,3	52,4	9,1
2,0 ANA + 4 6-BAP	20,2	93,2	12,8
1,0 2,4-D + 2 6-BAP	43,2	50,3	119,0
1,0 2,4-D + 4 6-BAP	55,8	66,7	60,3
2,0 2,4-D + 2 6-BAP	26,4	52,3	48,5
2,0 2,4-D + 4 6-BAP	84,4	101,5	81,2
HIP Hipocótilos	HC Hojas cotiledonales	HM Hojas maduras	

Tabla 2. Número de yemas promedio en el segundo subcultivo y plantines en el tercer subcultivo.

Variantes	2do. Subcultivo			3er. Subcultivo		
	HIP	HC	HM	HIP	HC	HM
0,5 ANA + 4 6-BAP	11,0	8,1	-	1,0	5,0	-
0,05 6-BAP	7,8	36,0	-	10,5	46,5	-
0,01 6-BAP	6,6	1,5	-	10,1	13,0	-
0,1 6-BAP	3,3	25,2	-	5,0	42,7	-
2,0 ANA + 4 6-BAP	5,1	-	-	5,3	-	-
0,05 6-BAP	14,2	-	-	25,0	-	-
0,01 6-BAP	10,1	-	-	20,6	-	-
0,1 6-BAP	5,0	-	-	18,7	-	-
1,0 2,4-D + 2 6-BAP	0,0	-	3,0	0,0	-	8,3
0,01 ANA + 1 6-BAP	1,1	-	0,0	7,0	-	0,0
0,01 ANA + 3 6-BAP	20,6	-	3,8	31,8	-	11,0
0,01 ANA + 6 6-BAP	7,0	-	4,4	15,6	-	8,7
0,1 ANA + 1 6-BAP	0,0	-	4,3	1,2	-	8,0
0,1 ANA + 3 6-BAP	4,0	-	8,0	27,2	-	26,5
0,1 ANA + 6 6-BAP	8,3	-	4,8	66,0	-	2,3
2,0 2,4-D + 4 6-BAP	0,1	0,0	-	0,0	0,3	-
0,01 ANA + 1 6-BAP	1,6	8,3	-	7,8	9,8	-
0,01 ANA + 3 6-BAP	2,8	12,9	-	31,8	21,7	-
0,01 ANA + 6 6-BAP	7,4	5,3	-	15,6	11,0	-
0,1 ANA + 1 6-BAP	1,9	1,3	-	1,2	5,3	-
0,1 ANA + 3 6-BAP	5,8	9,1	-	27,0	8,3	-
0,1 ANA + 6 6-BAP	2,5	4,7	-	66,0	13,3	-
HIP Hipocótilos	HC Hojas cotiledonales	HM Hojas maduras				

mg/l de 6 BAP. El conteo del número de yemas en el segundo subcultivo y el número de plantines en el tercero (tabla 2), reflejaron que cuando los subcultivos en medio fresco fueron tratados con ANA, resultaron capaces de

producir un número limitado de plantines; mientras que en los callos proliferados con 2,4-D casi no tuvo efecto. Esto confirma lo referido por Mroginski y Kartha (1981) acerca de que para obtener un número máximo de plantas, se

hace necesario cambiar las concentraciones y tipos de hormonas en cada paso de la regeneración de plantas.

Al igual que en otras especies vegetales, este proceso depende además de las relaciones exógenas de auxinas/citoquininas (Street, 1979) y en el cultivar objeto de estudio fue esencial suministrar al medio 6-BAP solo o en combinación con bajas dosis de ANA para lograr la regeneración de plantas.

La alta relación de citoquinina/auxina sugerida por Thorpe (1980) y Litz y Jarret (1991) para la diferenciación de las yemas se puso en evidencia en este trabajo, ya que cualquiera de los tratamientos con ANA + 6-BAP incrementó el número de yemas y de plantines, según se puede apreciar en la tabla 2. También la ausencia de la amina para regenerar callos que fueron formados con ANA + 6-BAP, incrementó sustancialmente el número de plantillos en forma general.

Es importante resaltar que los callos compactos, sin tener indicios de morfogénesis, regeneraron plantas cuando fueron subcultivados en un medio con 6-BAP y ANA, el cual pudiera ser un medio adecuado para estudios posteriores de variación somaclonal, debido a que se ha sugerido que el 2,4-D es un agente mutagénico, por lo que la variabilidad genética que se obtenga debe ser mayor en los somaclones.

En sentido general, se observó (tabla 2) que a medida que aumentó el número de subcultivos cada 6 semanas, se incrementó la potencialidad de regeneración. Esto es importante para obtener una mayor variabilidad genética, debido a la influencia que ejercen los reguladores de crecimiento exógenos, para tiempos prolongados, sobre el material genético en el cultivo *in vitro* (Sutter y Langhans, 1981).

Por todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que la mejor respuesta a la regeneración se obtuvo cuando se subcultivó con 0,05 mg/l de 6-BAP y cuando los callos fueron formados con ANA; mientras que los callos obtenidos con 2,4-D regeneraron con 3 mg/l de 6-BAP + 0,01 mg/l de ANA. La organogénesis en este cultivar se obtuvo cuando la relación auxina/citoquinina fue menor que uno, tanto para la desdiferenciación como para la diferenciación.

## REFERENCIAS

- FERNÁNDEZ, A.T.F.; FERNÁNDEZ, C.D. & GROF, B. 1992. *Pasturas Tropicales*. 14:22
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. 1968. *Exp. Cell Res.* 50:151
- LENNE, J.H. & SONODA, R.M. 1978. *Plant Dis. Rep.* 62:813
- LITZ, R.E. & JARRET, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones (Eds. W.M. Roca & L.A. Mroginski). Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. p. 143
- MACHADO, HILDA & CHAO, LAURA. 1980. *Pastos y Forrajes*. 3:321
- MEUER, E.G.M. 1984. *J. Plant Physiol.* 117:131
- MEUER, E.G.M. & BOUGHTON, W.J. 1981. *Physiol. g Plant.* 52 280
- MROGINSKI, L.A. & KARTHA, K.K. 1981. *Plant Sci. Lett.* 23:245
- MROGINSKI, L.A. & ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones (Eds. W.M. Roca & L.A. Mroginski). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 19
- MURASHIGE, T & SKOOG, F. 1962. *Physiol. Plant.* 15:473
- STREET, H.E. 1979. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. In: Plant cell and tissue culture. Principles and application (Eds. W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.E. Paddock & V. Raghavan). Ohio State Univ. Press. Columbia, USA. P. 123
- SUTTER, E. & LANGHANS, W. 1981. *Ann. Bot.* 48:559
- SZABADOS, L. & ROCA, W.M. 1986. *Plant Cell Rep.* 3:174
- TABARES, E.; PACHÓN, J. & ROCA, W.M. 1991. Variación somaclonal y su aplicación en el mejoramiento de cultivos. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Eds. W.M. Roca & L.A. Mroginski). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 339
- THOMAS, D.; LASCANO, C.E. & VERA, R.R. 1987. *Span.* 30:59
- THORPE, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*. Structural, physiological and biochemical aspects. In: Perspectives in plant cell and tissue cultura. (Ed. I.K. Vasil). Academic Press, N.Y. p. 71

Recibido el 5 de abril de 1993