

CULTIVO IN VITRO

De Anteras y Fragmentos de hoja de *Stylosanthes* spp

Sonia Jaramillo Villegas*

1. INTRODUCCION

Al género *Stylosanthes* pertenecen plantas leguminosas forrajeras de amplia distribución geográfica y gran potencial de utilización en suelos ácidos e infértiles (oxisoles y ultisoles), como los de los Llanos Colombo-Venezolanos y los del Cerrado de Brasil. Mediante la selección y mejoramiento genético de las especies forrajeras, puede lograrse una mejor adaptación al clima, suelo y tolerancia a plagas, lo que trae como consecuencia un aumento en la productividad de tan extensas llanuras.

La eficiencia del mejoramiento depende de la disponibilidad de variabilidad genética, de la selección, fijación genética y rápida propagación de los materiales sobresalientes. Los métodos de cultivo de tejidos pueden integrarse a los programas de mejoramiento para ayudar a aumentar la eficiencia de algunos de los procesos mencionados. El cultivo de tejidos, así como el de células y callos, promueve el desarrollo de variabilidad citogenética, la que a veces continúa en la progenie. La aplicación de toxinas de hongos y bacterias, de herbicidas, sales minerales, análogos bioquímicos, temperaturas altas o bajas, que normalmente son deletéreas pueden inducir variabilidad en forma de resistencia o tolerancia a estos factores.

La fijación de caracteres deseados, puede lograrse rápidamente con el cultivo de anteras de plantas F1 o F2 de cruces convencionales, pues se producen plantas haploides o diploides homocigotas, sin posterior segregación, ni pérdida de vigor, sobre todo en las especies autógamias. Además, los caracteres controlados por genes recesivos, se manifiestan al eliminarse la dominancia en los haploides doblados.

El objetivo general del presente trabajo es establecer la metodología para la regeneración *in vitro* de plantas a partir de anteras y segmentos de hojas de *Stylosanthes* spp., con miras a su posterior utilización como una ayuda para el mejoramiento genético.

* Profesora asistente. Resumen del trabajo de tesis presentado a la Escuela para graduados en Ciencias Agrarias Universidad Nacional - ICA, 1982.

Incluye la evaluación del efecto de diferentes factores en el cultivo *in vitro*, tales como; genotipos, medios de cultivo, reguladores de crecimiento, estado de desarrollo de la microspora y bajas temperaturas.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Historia

En 1902 Haberlandt publicó su infructuoso intento de cultivar células de hojas de varias angiospermas, sugiriendo la totipotencialidad de las células vegetales. Sólo a partir de 1930 empezó a progresar el cultivo de tejidos de plantas, gracias a los esfuerzos de investigadores pioneros como White, quien en 1934 mantuvo puntas de raíz de tomate por períodos prolongados en un medio líquido que contenía sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa. Por ese entonces Gautheret cultivó tejido cambial de *Salix caprea* y otros maderables en el medio de White con tres vitaminas y la auxina AIA (Acido indol acético) recientemente descubierta por Went y Thimann. (14, 19, 30).

El posterior descubrimiento de las citoquininas y su inclusión en el medio de cultivo, hizo posible la formación de estructuras organizadas a partir de callos aislados en un número considerable de plantas. Skoog y Miller (26) fueron capaces de controlar la formación de raíces y tallos a partir de callos de tabaco.

Los primeros cultivos en suspensión con alta proporción de células aisladas, fueron realizados por Bergman en 1960, citado por Thomas y Davey (30). Los cultivos en suspensión pueden facilitar el aislamiento de mutantes que podrían ser útiles para la producción de sustancias del metabolismo secundario como; gomas, resinas, enzimas, alcaloides, flavonoides. Por lo tanto, las técnicas de cultivo de tejidos no sólo son útiles para la agricultura, sino también en estudios básicos de la morfología, patología, farmacología, etc. (19).

Tuleke en 1950-1953, demostró que granos de polen maduro de ciertas gimnospermas como *Ginkgo biloba* podían proliferar en un medio de cultivo, originando callos haploides. No todos los granos de polen respondieron de la misma manera, muchos siguieron el crecimiento normal, formando tubos polínicos y gametos; fenómeno similar ocurría siempre en angiospermas (22). Guha y Maheshwari (6) reportaron por primera vez el desarrollo directo de embriones de *Datura innoxia*, por medio del cultivo de anteras, lo que condujo a la formación de plantas haploides.

En 1967, Borgen y Nitsch obtuvieron plantas haploides completas de *Nicotiana tabacum*, y en 1968, Niizeki y Oono tuvieron éxito con anteras de arroz (19, 22, 29). Hasta el momento se ha logrado regenerar plantas haploides por medio del cultivo de anteras en aproximadamente 20 especies (34).



2.2 Factores que influyen en el cultivo de tejidos

2.2.1 Factores internos

2.2.1.1 La planta donante del explante

Según Nitsch (18) la planta debe estar en estado fisiológico y sanitario óptimos. Se deberá evitar el uso de pesticidas 3 a 4 semanas antes del cultivo *in vitro*.

En cuanto a la edad de la planta no se puede hacer una generalización. Así, en *Pisum sativum* (12) sólo se obtuvo regeneración con folíolos de tres días, mientras que en *Stylosanthes guianensis* (9, 13) lograron regeneración de yemas a partir de folíolos maduros e inmaduros.

Para el cultivo de anteras o polen, Nitsch (16) opina que el estado en el cual la microspora es capaz de cambiar de la evolución normal de la gametogénesis a la androgénesis, varía de una especie a otra y entre variedades de una misma especie. En numerosas especies se ha logrado inducir androgénesis cuando la microspora se encuentra alrededor de la primera mitosis, como es el caso de *Datura innoxia* (27), arroz (3), maíz y *Pennisetum* (17), *Arachis* spp. (1, 10, 11).

La viabilidad del grado de polen inmaduro puede ser favorecida por factores que estimulan la *androgénesis* como la temperatura, o reducida por el efecto de sustancias tóxicas producidas por heridas en las células. Este efecto se puede contrarrestar por adición de carbón activado, flotando las anteras o polen en medio líquido (16).

2.2.1.2 Genotipo

La frecuencia de inducción de callos y diferenciación de plantas varía con el genotipo. Es así como en arroz se recomienda utilizar variedades que responden en un medio de cultivo definido para incrementar la respuesta (19, 35). Los genes letales interfieren con el crecimiento de plantas haploides al doblar sus cromosomas, en cuyo caso hay que modificar el genomio antes de producir los haploides (18).

2.2.1.3 Edad del callo para la regeneración de órganos y plantas

Según Oono (19) la totipotencia de los callos va decreciendo después del cultivo, posiblemente por variación fisiológica o genotípica del callo. Algunas especies pierden su capacidad organogénica con el tiempo, como *Nicotiana tabacum*, *Brassica oleracea*, *Dacus*, *Allium cepa*, *Linaria vulgaris*, *Saccharum* sp y *Pisum sativum* (28).

En *Lilium longiflorum* y alfalfa se ha logrado mantener callos organogénicos por varios años (28).

En *Pisum sativum*, callos haploides se volvieron mixoploides, predominando células tetraploides, luego de tres años de cultivo (7).

2.2.2 Factores Externos

2.2.2.1 Medio del cultivo

Los elementos mayores más comunmente usados son los del medio Murashige y Skoog (14), el cual ha sido modificado para algunas especies, más que todo en la relación MH_4^+ : NO_3^- . Así Chu *et al* (3) desarrollaron el medio N_6 para anteras de arroz.

En alfalfa, Walker y Sato (33) lograron la máxima embriogénesis con las más altas concentraciones de amonio, el cual interactúa con los reguladores de crecimiento.

El hierro promueve la diferenciación de embriones globulares a acorazonados y posteriormente a plantas completas (18).

El cultivo de anteras generalmente no requiere de hormonas para iniciar embriogénesis como sucede con *Datura* y tabaco (17). En caso de organogénesis es más determinante el uso de hormonas (17, 19).

La selección adecuada de los reguladores de crecimiento y/o de las condiciones de cultivo, es fundamental para contrarrestar las dificultades en la inducción de callos a partir de anteras de ciertos materiales (35).

Parece que las auxinas y la citoquininas en el medio de cultivo son fundamentales para la formación de callos y/o diferenciación. Así, alta relación auxina/citoquinina, promueve la formación de callos y raíces y baja relación estimula las yemas y callos. (13, 24, 33).

Según Nitsch (17) el azúcar debe ser estudiado con más detalle para las diferentes familias, pues el éxito puede depender de la concentración de sacarosa. Así, con anteras de arroz, Narváez (15) determinó como óptimo el 5% y en maní, Martín y Rabéchault (8) Mroginski y Fernández (10, 11) establecieron una concentración del 2%. Stavarek, *et al* (28) sugieren que la sacarosa puede actuar en la regeneración de callos como fuente de carbono o como osmoregulador.

Narváez (15) observó que la leche de coco y caseína hidrolizada, estimulaban la síntesis de clorofila y rediferenciación de plántulas, a partir de callos procedentes de anteras de arroz.

2.2.2.2 Temperatura

La androgenénesis puede resultar, entre otros factores, de someter la antera o microspora a condiciones adversas. La formación de embriones se incrementa a menudo por pretratamiento de la inflorescencia con calor o frío. Así: maíz y millo a 14°C, *Datura*, *Nicotiana* y trigo a 35°C (17); maní por 48 horas a 6°C (8). Dependiendo de la especie se debe mantener la temperatura entre 20-30°C durante el día 18-23°C en la noche (1, 11).

2.2.2.3 Luz

La intensidad, el fotoperíodo y calidad de la luz influyen sobre el crecimiento de las células inducidas. Longitudes de ondas azules y rojas tienen un marcado efecto sobre *Nicotina glauca* (17).

Maíz y mijo (13), *Arachis* sp (11), *Pisum sativum* (7, 12), *Stylosanthes guianensis* (13) y *Medicago sativa* (32), responden muy bien a un fotoperíodo de 18 horas de luz. En diferentes cultivos se han usado intensidades bajas o altas como 1000, 3000 y 9000 lux (maíz, *Stylosanthes* y arroz respectivamente).

3. MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, de la Unidad de Recursos Genéticos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) situado en Palmira, Colombia.

Para el cultivo de anteras se utilizaron los siguientes ecotipos: CIAT 1020, CAT 1633, CIAT 2160 y los híbridos F1 de los cruces 1021 x 2160, 1020 x 1633 y 1020 x 1875 de *Stylosanthes guianensis* y los ecotipos CIAT 2452 y CIAT 2945 de *Stylosanthes capitata*.

Para el cultivo de fragmentos de hoja se utilizó el híbrido F1 del cruce 1021 x 1633 de *S. guianensis* y se tomaron explantes de 5 x 5 mm² del folíolo medio. Se explantaron anteras que contenían microsporas en diferentes estados de desarrollo (tetradas hasta binucleado), para lo cual se hizo un estudio previo tendiente a correlacionar los parámetros macroscópicos del botón floral, con el estado de desarrollo del grano de polen.

El material se desinfectó por inmersión en etanol al 70% por 30 segundos y luego en hipoclorito de calcio al 1% por 1 y 5 minutos para botones y hojas respectivamente, se realizaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Como medios básicos de cultivo se emplearon el de Chu *et al* (3) para la inducción de callos de antera y el de Murashige y Skoog (14) para la inducción de callos de hojas y organogénesis de callos procedentes de anteras y hojas, suplementados con prolina (100 mg/l) y caseína hidrolizada (500 mg/l) el primero y tiamina (1 mg/l) y m-inositol (100 mg/l) el segundo.

Las condiciones del cultivo fueron:

Temperatura 27 ± 3°C, iluminación 4000 a 8000 lux y fotoperíodo de 12 horas; adicionalmente se ensayó el efecto de bajas temperaturas en el cultivo de anteras, sometiendo los botones desinfectados y las anteras cultivadas *in vitro* a temperaturas de 10°C por un tiempo de 2-5 días.

Una vez enraizadas las plantas se acondicionaron para su trasplante al invernadero, para lo cual se utilizó una mayor intensidad de luz (8000 lux) por un período de 3-5 días al cabo de los cuales se sembraron en potes jiffy, cuyo sustrato estaba constituido por tres partes de arena lavada y una de suelo esterilizado y se colocaron en cámaras con alta humedad relativa por 15 días y luego se dejaron bajo condiciones normales del invernadero.

Para el conteo de cromosomas se tomaron puntas de raíces jóvenes en horas de la mañana y se colocaron en viales con agua destilada por 24 horas a 10°C, luego se hidrolizaron con HCl 1N por 10 minutos a 60°C, para ser colocadas en orceína lactopropiónica por 30 minutos y ser observadas en el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las anteras que contenían polen en diferentes estados de desarrollo (tetra-da-binucleado) sembradas en N₆ más sacarosa al 6% sin y con hormonas (2-4-D y ANA, 2-0 mg/l de cada una) no respondieron en ninguno de los dos medios. Con el primer medio se pretendía observar la capacidad embriogénica de las microsporas, pues Nitsch (17) opina que éstas pueden responder al cultivo *in vitro*, sin necesidad de hormonas exógenas. Se esperaba que las auxinas del segundo medio estimularan la inducción de callo, como paso previo a la diferenciación, lo cual sucede en muchas plantas, fenómeno observado por Narváez (15) en arroz.

En ensayos posteriores se encontró que sólo es posible inducir callos a partir de anteras cuando el medio con auxina es suplementado con citoquinina (Tabla 1, fig. 1A).

En general se asume que el mayor potencial androgénico lo presentan las microsporas alrededor del estado uninucleado (1.3.10.11.17) siempre y cuando las condiciones del cultivo promuevan la multiplicación de éstas y no del tejido somático de las anteras. Por esta razón se seleccionaron anteras cuyos granos de polen estaban entre el estado uninucleado temprano y binucleado temprano. Aunque la inducción de callo a partir de estas anteras fue alta, es difícil definir el origen del callo, puesto que podría ser el resultado de la proliferación de células somáticas por acción de las citoquininas y auxinas.

No hubo formación de callo, ni embrioides cuando las anteras o botones se trataron con temperaturas de 10°C. La falta de respuesta, podría atribuirse a que el medio de cultivo utilizado no contenía citoquininas, las cuales fueron indispensables, según se observó en otro ensayo, o al efecto detrimental de la baja temperatura en la viabilidad de la microspora.

En la Tabla 1, se observa que el mejor tratamiento para la inducción de callos a partir de anteras, contenía 1.0 mg/l de 2-4 D y 0.1 mg/l de BAP. En *S. guianensis* y *S. hamata* Mroginski y Kartha (13) y Scowcroft y Adamson (24) mostraron que las combinaciones de citoquininas y auxinas, utilizadas fueron suficientes para la inducción de callos y posterior diferenciación a partir de fragmentos de hoja, radícula y cotiledones. Igual respuesta fue observada por Meijer y Broughton (9) en *S. guianensis*.

A pesar de que la inducción de callos en el cultivo de anteras no es suficiente, lo cual si es en el cultivo de tejidos somáticos, pues es necesario que el callo se origine en las células haploides de la antera, se puede decir que el uso adecuado de reguladores de crecimiento, es un aspecto de importancia, para contrarrestar las dificultades en la inducción de callos de numerosos materiales.

TABLA 1

Efecto de auxinas y citoquininas sobre la inducción de callos a partir de anteras de *S. guianensis* (F1 1021 x 2160).

Medios de Cultivo (mg/l)*				Relación Auxinas Citoquininas	Inducción de Callo (%)**
ANA	2,4-D	BAP	Kinetina		
0	0	0	0		0
2.0	2.0	0	0		5.0
1.0	0	0.5	0	2 : 1	60.0
1.0	0	1.0	0	1 : 1	25.0
1.0	0	0	1.0	1 : 1	47.0
0	0.5	0	2.0	1 : 4	66.0
0	1.0	0.1	0	10 : 1	75.0

* Medio básico: N₆ + 6% sacarosa; 0.6% agar.

** Número de anteras por tratamiento = 150.

Evaluación a los 20 días.

Parece que es más importante la presencia de auxinas y citoquininas que la relación cuantitativa entre ellas, como puede observarse en las tablas 1 y 2 para anteras y explantes de hoja respectivamente.

TABLA 2

Efecto de auxinas y citoquininas sobre la inducción de callo y la organogénesis a partir de fragmentos de hoja de *S. guianensis* (F1 1021 x 1633).

Medios de Inducción*				Inducción de Callo (%)*	Organogénesis (%)**			
ANA mg/l	2,4-D mg/l	BAP mg/l	Kinetina mg/l		Medio A		Medio B	
					raíces	vástagos	raíces	vástagos
1.0	0	1.0	0	100	10	0	10	0
1.0	0	2.0	0	100	20	0	0	0
1.0	0	3.0	0	100	10	30	20	30
0	1.0	0.1	0	100	10	0	0	0
0	1.0	1.0	0	100	20	40	0	10
0	1.0	2.0	0	100	10	10	10	10
0	1.0	0	2.0	100	70	0	50	0
0	1.0	0	4.0	100	40	0	10	0

* Porcentaje en base a 12 callos por tratamiento.

** Porcentaje de callos con raíces y/o vástagos diferenciados en base a 10 callos por tratamiento.

Medio básico de inducción y organogénesis: MS + sacarosa 2% + agar 0.8%

Medio A: Medio básico sin hormonas.

Medio B: Medio básico + 0.1 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BAP

Se observó que la diferenciación de zonas meristemáticas sobre los callos ocurrió en un medio de composición diferente al de inducción de callos. Observaciones similares hicieron Walker *et al* para *Medicago sativa* y Mroginski y Kartha (13) para *Stylosanthes guianensis*.

En la Tabla 3, se puede observar que la mayor organogénesis se presentó en el medio con la más baja concentración de hormonas.

TABLA 3

Efecto de auxinas y citoquininas sobre la organogénesis en callos obtenidos de anteras de *S. guianensis* F1 1021 x 2160).

Medio básico*	Hormonas (mg/1)				No. de Callos	Organogénesis (%)	
	ANA	2,4-D	BAP	Kinetina		Raíz	Vástagos
MS	1.0	0	2.0	0	113	2.6	4.4
MS	1.0	0	1.0	1.0	114	0	0
MS	0	0.1	0.1	0	114	5.3	42.9
N ₆	0.1	0	1.0	0	70	0	0

* Suplementados con sacarosa al 2% y con agar al 0.8%.

La regeneración de plantas a partir de anteras y fragmentos de hojas ocurrió en tres etapas: Callo-vástago-raíz, cada una regulada por una relación hormonal característica. Igual observación hicieron Mroginski y Kartha (13) y Scowcroft y Adamson (24) para *Stylosanthes guianensis*. y *S. hamata*.

Los niveles relativamente altos de auxinas y citoquininas (entre 1.0 y 2.0 mg/1) tuvieron poco efecto en la diferenciación de vástagos, esta respuesta puede observarse en las tablas 1 y 2, para callos de anteras y hojas respectivamente.

Se incrementó el porcentaje de organogénesis a medida que se disminuyó la concentración de las hormonas a niveles iguales o menores de 0.1 mg/1 (Tablas 2, 3 y 5). Resultados similares obtuvieron Timir y Satyesh (31) en *Vigna sp.*, con dosis hasta 100 veces menores que las de inducción de callos. Sin embargo, Meijer y Broughton (9) utilizaron dosis más altas (2.0 y 1.0 mg/1 de BAP y ANA respectivamente) con altos porcentajes de inducción de callos y raíces, pero que disminuyeron notablemente con concentraciones mayores que éstas.

El genotipo influyó tanto en la diferenciación de callos (Tabla 4) como en la diferenciación de órganos (Tablas 4 y 5). Este no es un efecto extraño, puesto que ya ha sido observado en otras especies (15, 19, 31, 35).

El híbrido F₁ 1633 x 1020, presentó un porcentaje ligeramente superior al padre y marcadamente mayor a la madre, en la inducción de callos a partir de anteras (Tabla 4, Fig. 1B), vigor que fue observado por Rush *et al* (23) en arroz. Es de esperarse también que las progenies procedentes de estas plantas obtenidas *in vitro*, incrementen la respuesta en cultivos asépticos, a consecuencia de un acondicionamiento gradual.

Se observó que callos derivados de anteras de *S. guianensis* 1633 y los F₁ 1021 x 2160, formaron órganos y plantas en todos los medios de cultivo, en este caso no sería tan crítica la definición del medio. Igual situación se presentó con *S. capitata* 2945. Sin embargo, los ecotipos 1020, 2160 y los cruces F₁ 1020 x 1633 y F₁ 1020 x 1875 de *S. guianensis* y el ecotipo 2452 de *S. capitata*, fueron más exigentes en la composición del medio de cultivo, hasta el punto de que en el cruce F₁ 1020 x 1875 de *S. guianensis*, no se observó organogénesis a pesar de la alta inducción de callos a partir de las an-

TABLA 4

Efecto del genotipo sobre la inducción de callos y la organogénesis a partir de anteras de *Stylosanthes* spp.

Genotipo	Anteras con Callo (%)*	Organogénesis (%)**
<i>S. guianensis</i> CIAT 1633	29.0	60
<i>S. guianensis</i> CIAT 1020	49.0	0
<i>S. guianensis</i> CIAT 1633 x 1020	63.0	88
<i>S. guianensis</i> CIAT 1020 x 1875	61.0	0
<i>S. guianensis</i> CIAT 2160	61.0	40
<i>S. guianensis</i> CIAT 1021 x 2160	61.0	84
<i>S. capitata</i> CIAT 2945	17.0	60
<i>S. capitata</i> CIAT 2452	61.0	40

Medio inducción de callo: N_6 + 6% sacarosa + 1.0 mg/l ANA + 0.5 mg/l BAP + 0.6% agar.

Medio organogénesis: MS + 2% sacarosa + 0.02 mg/l ANA + 0.05 mg/l BAP + 0.6% agar.

* Porcentajes en base a 150 anteras.

** Porcentajes de callos diferenciando vástagos en base a 25 callos.

teras (Tabla 4). Siguiendo en orden de exigencia se encontraron los genotipos 1020 y 2160 de *S. guianensis*. Estos podrían tener una causa genética según los resultados de la Tabla 5. En cuanto a *S. capitata*, se observó mayor inducción de vástagos en el ecotipo 2945, en el cual, la producción de callos fue ampliamente superada por el ecotipo 2452 (Tabla 4). Igual situación observaron Bajay, *et al* (1), Mroginski y Fernández (11) en *Arachis* spp. Pero a pesar de este aspecto se logró un mayor número de plantas completas normales de 2452 que de 2945 ya que este último presentó mucha fasciación.

Es posible lograr una mayor respuesta de genotipos con difícil potencial organogénico, mediante modificaciones del medio de cultivo (32). De otra parte, Gresshoff (5) opina que algunos cultivares responden a ciertas condiciones de cultivo, lo que podría reflejar una influencia genética sobre la fisiología de la planta, en cuanto a la utilización de nutrientes y la respuesta a fitohormonas.

Fue necesario realizar 2 a 3 subcultivos en el medio de organogénesis, para lograr regenerar algunas plantas de los ecotipos más difíciles como *S. guianensis* 2160 y 1020. Este resultado sugiere la necesidad de acondicionamiento del tejido al medio. Sería conveniente evaluar otras relaciones hormonales para el híbrido F_1 1020 x 1875 de *S. guianensis*, pues no se logró diferenciación en los medios evaluados. Quizás sea posible establecer un medio más universal para la mayoría de los ecotipos. De la tabla 5, se puede deducir que la relación hormonal para la organogénesis que cobijó el mayor número de ecotipos fue 0.02 y 0.05 mg/l de ANA y BAP, respectivamente, seguida de 0.01 y 0.1 mg/l de AIA y BAP, relación 100 veces menor, con respecto a la concentración utilizada en los medios de inducción de callos. Una relación similar fue requerida para plantas de *Vigna* spp. (31).

Sin embargo, Mroginski y Kartha (13) emplearon una relación ANA/BA de 3:1, para la inducción de callos y omitieron auxinas o emplearon una alta relación de citoquininas respecto a las auxinas, para la diferenciación.

TABLA 5

Efecto del genotipo sobre la organogénesis en callos obtenidos de anteras y su interacción con el medio de cultivo.

Medio de Organogénesis (mg/l)					Organogénesis (%)**							
					<i>S. guianensis</i>				<i>S. capitata</i>			
ANA	2,4-D	IAA	BAP	GA	1633		1020		1021		2452	2945
					1633	1020	x	x	2160	2160		
0	0	0	0	0***	12	0	20	0	40	0	40	
.02	0	0	.05	.05	88	0	10	0	96	88	92	
0	.01	0	.1	0	48	0	0	12	68	76	48	
0	0	.01	.1	0	48	40	12	0	92	88	76	
.02	0	0	.05	0	60	0	84	40	88	40	60	
0	.01	0	.05	0	68	0	20	12	80	0	48	

* Medio básico: MS + 2% sacarosa + 0.6% agar.

** Porcentaje de callos a vástagos, en base a 25 callos por tratamiento.

*** Medio básico: MS/2 + 2% sacarosa + 0.6% agar.

1020 x 1875 no diferenció en ninguno de los 6 medios evaluados.

Una relación adecuada de la clase y concentración de auxinas y citoquininas, estimula la producción de tallos múltiples. En callos de hojas se observa el efecto positivo de la kinetina sobre la diferenciación de raíces (Tabla 2), pero que a la vez podría interferir con el desarrollo de vástagos, según lo observado por Meijer y Broughton (9) en *S. guianensis*. En *Medicago sativa*, Walker y Sato (33) observaron que con dosis altas de Kinetina y bajas de 2,4-D estimulaban la formación de raíces. Sin embargo, en esta investigación, el enraizamiento se indujo en un medio con 0.01 mg/l de ANA y AG respectivamente y en otro sin auxinas con las sales MS diluídas en un tercio (1/3) y con sacarosa al 2% .

En algunos casos no fue necesario transplantar el vástago a un medio de enraizamiento. Esto debido posiblemente a que se agotó el exceso de hormonas del medio, las cuales podrían inhibir el enraizamiento, o a que la concentración endógena de éstas, fue lo suficiente como para inducir la formación de raíces, debido a la síntesis de auxinas en los folíolos nuevos.

En general, se observó que a medida que se efectuaban, subcultivos, se aumentaba la proliferación de yemas y tallos múltiples (Fig. 1D), lo que indica un alto potencial de regeneración ya que una masa de callo procedente de anteras o fragmentos de hoja, puede ser subdividida varias veces y cada una de estas porciones dar origen a otras tantas puntas meristemáticas y así sucesivamente, para producir en un ciclo completo de más o menos tres meses, alrededor de 1800 plantas.

Se observó una disminución en la inducción de callos, así como en la diferenciación y crecimiento de órganos cuando la intensidad de luz fue menos de 4000 lux. Sin embargo este no fue un factor limitante para la formación de plantas. Igual observación hicieron Meijer y Broughton (9).

La luz estimuló la pigmentación verde del callo, especialmente en la superficie. Luego se diferenciaron zonas meristemáticas y finalmente órganos. Martín y Rabechault (8) encontraron que cultivos que crecían bajo luz, fueron ligeramente más organogénicos que los que crecían en oscuridad. Sin embargo Narváez (15) no encontró relación entre el verdeamiento de los callos y la organogénesis.

Los callos cultivados en medio líquido presentaron alta fenolización, con porciones pequeñas de color verde. Al pasar estos tejidos al medio semisólido de diferenciación, formaron yemas en una semana. Esto indica que mantuvieron la capacidad organogénica en estado latente. Phillips y Collins (21) Scowcroft y Adamson (24) también observaron que cultivos celulares en suspensión, diferenciaron yemas en medios semisólidos de composición similar a la utilizada para embriogénesis somática.

D'amato (4) y Skirvin (25) han observado variaciones en los niveles de ploidía de células diferenciadas de varias especies, como ocurrencia natural o inducida por el cultivo *in vitro* de tejidos somáticos y haploides segregados, especialmente cuando ocurre la formación de callo como un paso intermedio a la diferenciación.

Al contar cromosomas en puntas de raíz de plantas procedentes de hojas y anteras, se observó gran variación en el número de cromosomas. (Tabla 6, Figs. 1G y 1H).

En *Sylosanthes guianensis*, $2n = 20$ cromosomas. Se puede pensar que la causa inmediata de la variación fue el cultivo *in vitro* y que el efecto de la clase de tejido utilizado (hojas y anteras) fue muy pequeño. Sólo sería posible especular, que durante la inducción de callos y la organogénesis, células somáticas y algunas gaméticas han sufrido pérdida de cromosomas como consecuencia de procesos de fusión nuclear o doblaje seguido de eliminación de cromosomas. Otra posibilidad es que la aneuploidía presente en el material donante haya sido promovida por efecto del cultivo *in vitro*. Mroginski y Fernández (10) y Bajay *et al* (1) en *Archis* spp, observaron que el núcleo se

TABLA 6

Variación del número de cromosomas en plantas regeneradas de callos, obtenidas de anteras y hojas de *Stylosanthes guianensis*.

Procedencia	No. plantas observadas	No. total de células observadas*	Rango de número cromosómico (%)**			
			10-17	20 ± 2	22-30	31-40
Semillas (control)	5	26	—	100	—	—
Anteras	15	253	37	51	7	5
Hojas	7	139	42	58	—	—

* Contaje de cromosomas en puntas de raíces.

** Porcentajes sobre la base del número total de células.

dividía repetidamente pasando por varios estados embriogénicos hasta formar callos, los cuales se fusionaron con los callos procedentes de tejido somático de las anteras, siendo imposible su separación.

Se observó también variación en la forma y tamaño de los cromosomas, del material regenerado de anteras y hojas. Al respecto Cameron (2) sugiere que durante la evolución del género *Stylosanthes* ha habido cambios en el número y tamaño de los cromosomas, impidiendo el apareamiento de cruces entre diploides con cromosomas de diferente tamaño.

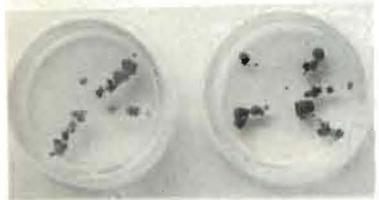
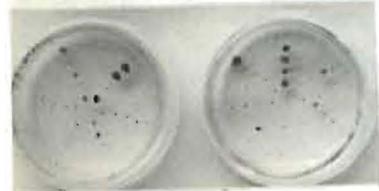
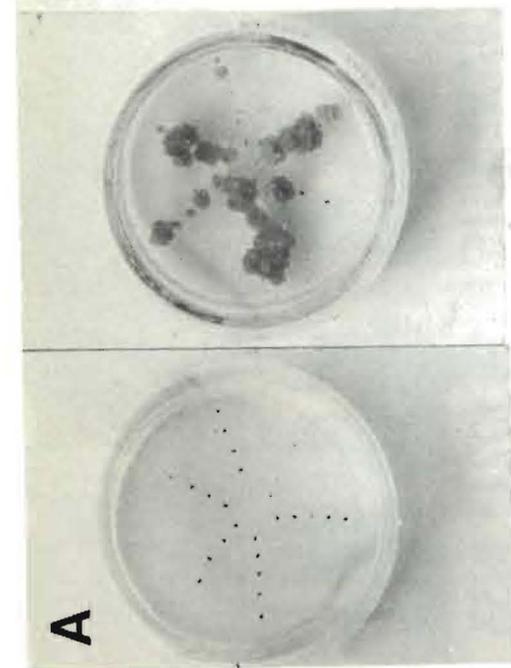
Por las razones anteriores, sería conveniente cultivar directamente microsporas, dado el gran potencial organogénico de las células de *Stylosanthes* spp. demostrado en esta investigación, por lo tanto la posibilidad de androgénesis directa de cultivo de microsporas podría ser alta.

El estudio de la segregación de caracteres morfológicos de las plantas regeneradas, daría mayor información sobre el origen de las plantas. Sin embargo, se observó variabilidad morfológica en las plantas regeneradas de anteras (Fig. 1E) y no así en aquellas regeneradas de hojas (Fig. 1F). Dicha variación se manifiesta en altura de la planta, tamaño de hojas y ramificación, dos meses después de crecimiento en el invernadero.

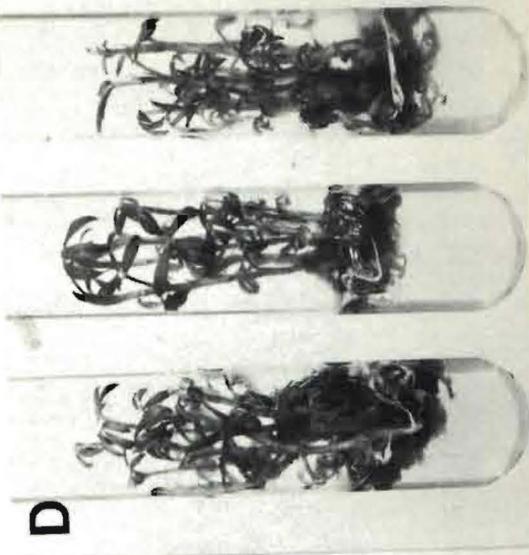
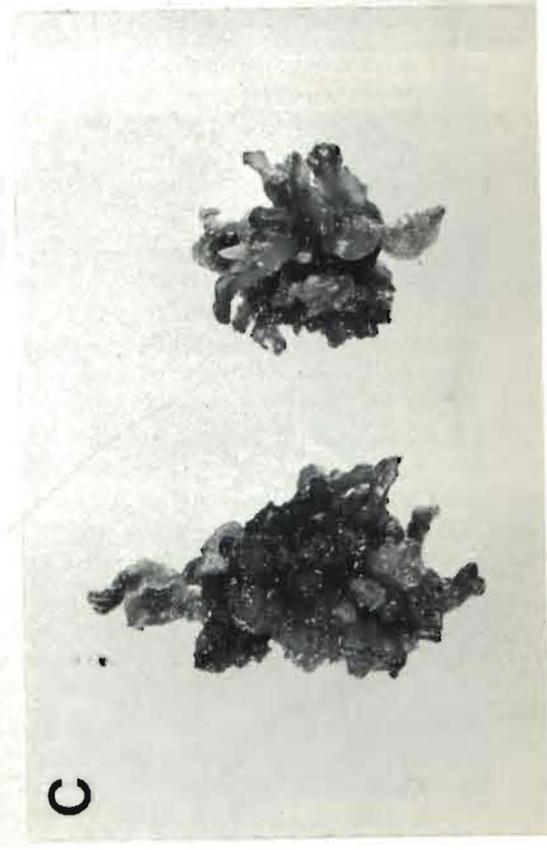
Sería conveniente que además de observar el comportamiento de las plantas en el campo, se conduzcan estudios sobre la estabilidad genética del material, los cuales serían útiles para la planeación de proyectos de mejoramiento de las especies de *Stylosanthes*, aprovechando adecuadamente la variabilidad natural o inducida por el cultivo *in vitro*.

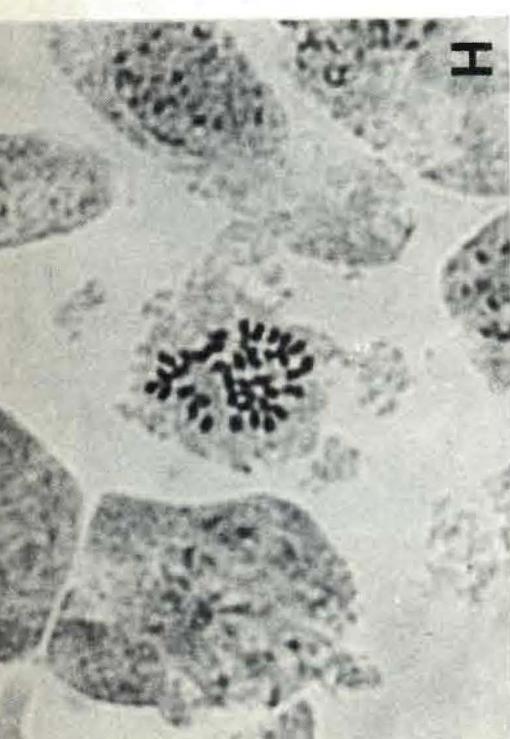
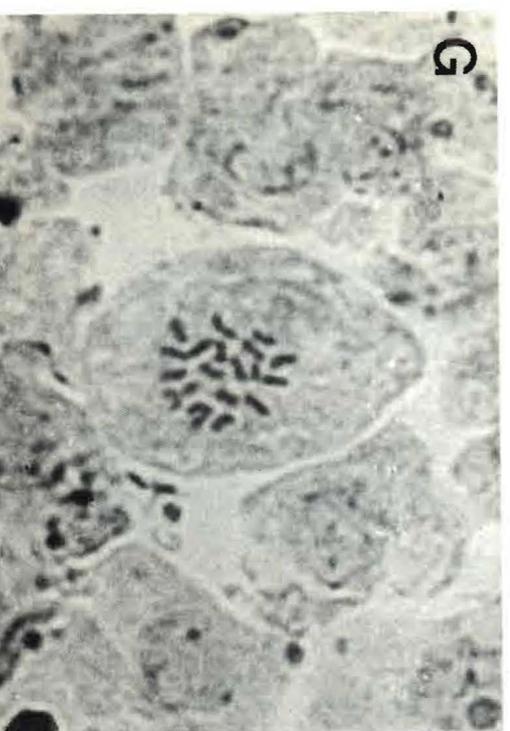
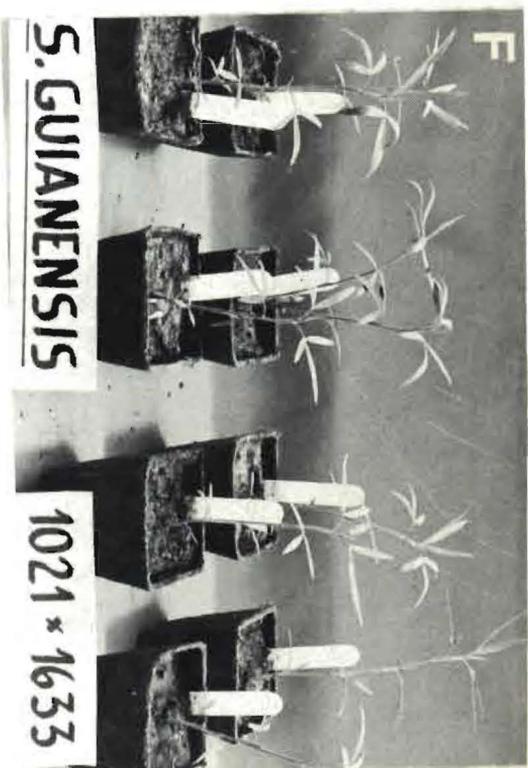
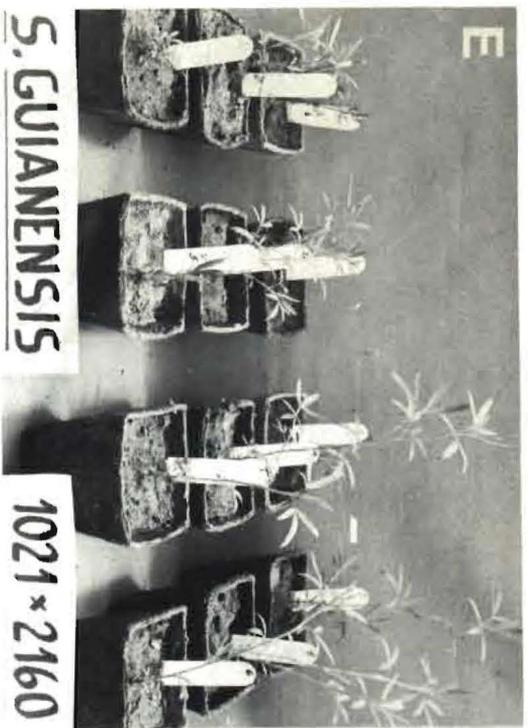
FIGURA 1: Inducción de callos y regeneración de plantas a partir de cultivos *in vitro* de anteras y hojas de *Stylosanthes* spp.

- A. Efecto de citoquininas sobre la inducción de callos a partir de anteras. Izq: Medio básico suplementado con auxinas (2mg/1 de 2,4-D y ANA). Der: Medio básico suplementado con auxinas y citoquininas (1.0 mg/1 ANA y 0.1 mg/1 BAP).
- B. Influencia del genotipo y de la heterosis en la inducción de callo a partir de anteras de *S. guianensis*: a. Ecotipo CIAT 1020; b. Ecotipo CIAT 1633 y c. Híbrido F1: 1020 x 1633.
- C. Organogénesis en callos obtenidos a partir de anteras (Izq.) y segmentos de hojas (Der.).
- D. Proliferación de plantas a partir de callos organogénicos como en C.
- E. Población de plantas regeneradas de callos obtenidos de anteras. Nótese las diferencias en crecimiento entre individuos.
- F. Población de plantas regeneradas de callos obtenidos de segmentos de hojas. Nótese la homogeneidad entre individuos.
- G. y H. Variación en el número de cromosomas en una misma raíz de plantas regeneradas a partir de anteras (*S. guianensis* F1: 1021 x 2160: G:18 y H:30 cromosomas).



a x **b** = **F1**
B





REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BAJAJ, Y. P.; RAM, A. K., LABANA, K. S.; SINGH, H. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogea* and *Arachis villosa*. Plant Science Letters (Holanda) v. 23 no. 1, p. 35-39. 1981.
2. CAMERON, D.F. Studies of the ecology and genetics of townsville lucerne *Stylosanthes humilis* H. B. K. Queensland, University of Queensland, 1968. 136 p. (Tesis Ph. D.).
3. CHU, C. C.; Wang, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; Yin K. C.; CHU, C. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Scientia Sinica (China) v. 18 no. 8, p. 659-668. 1975.
4. D'AMATO, F. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. Caryologia (Italia) v. 17 no. 1, p. 41-51, 1964.
5. GRESSHOFF, P. M. *In vitro* culture of White clover callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. Botanical Gazette (Estados Unidos) v. 141 no. 2, p. 157-164 1980.
6. GUHA, S.; MAHESHWARY, S. C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature (Inglaterra) v. 204, p. 497. 1964.
7. GUPTA, S. Morphogenetic response of haploid callus of *Pisum sativum* (var B22). Indian Agriculture (India) v. 19 no. 4, p. 11-21. 1975.
8. MARTIN, J. P.; RABECHAU, H. Culture *in vitro* d'etamines d'arachide (*Arachis hypogea* L.) organogenese. Oleagineux (Francia) v. 31 no. 1, p. 19-25. 1976.
9. MEIJER, E. G.; BROUGHTON, W. J. Regeneration of Whole plants from hypocotyl-root, and leaf derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. Physiologia Plantarum (Dinamarca) v. 52 no. 2, p. 280-284. 1981.
10. MROGINSKI, L. A.; FERNANDEZ, A. Cultivo *in vitro* de anteras de especies de *Arachis* (leguminosae). Oleagineux (Francia) v. 34 no. 5, p. 243-248. 1979.
11. ———; ———. Obtención de plántulas por cultivo *in vitro* de anteras de especies silvestres de *Arachis* (Leguminosae). Oleagineux (Francia) v. 35 no. 2, p. 89-92. 1980.
12. ———; ———; KARTHA, K. K. Regeneration of pea (*Pisum Sativum* L. cv century) Plants by *in vitro* culture of immature leaflets. Plant Cell Reports (Alemania) v. 1 no. 1 p. 64-66. 1981.
13. ———; ———. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. Plant Science Letters (Holanda) v. 23 no. 3, p. 245-251. 1981.
14. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays With tabaco tissue cultures. Physiología Plantarum (Dinamarca) v. 15, p. 473-497. 1962.
15. NARVAEZ, V. J. Cultivo de tejidos del arroz *Oryza sativa* L. Inducción de callo y regeneración de plantas. Palmira, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1981 95 p. (Tesis Ing. Agr.).
16. NITSCH, C. Progress in anther and pollen culture techniques. International training course of plant tissue culture methods and applications in agriculture. Los Baños, University of the Philippines. October 24-November 7, 1981. 10 p. (mimeografiado).

17. NUTSCH, C.; ANDERSEN, S.; GOARD, M.; NAUFER, M. G.; SHERIDAN, W. F. Production of haploids plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. International training course on plant tissue culture methods and applications in agriculture, Los Baños, University of Philippines. October 25 - November 7, 1981, 15 p. (mimeografiado).
18. — — — — —. Production of isogenic lines: basical technical aspects of androgenesis. En: Thorpe, T.A. plant tissue culture. New York, Academic Press, 1981. p. 241-282.
19. OONO, K. Anther culture application in crop improvement research and development. s.n.t. 1978. 23 p. (mimeografiado).
20. PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G. B. *in vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Science (Estados Unidos) v. 19 no. 1, p. 59-62. 1979.
21. — — — — —; — — — — —. Inducción and development of somatic embryos from cell suspension cultures of soybean. Plant Cell Tissue Organ Culture (Netherlands) v. 1 no. 2, p. 123-129. 1981.
22. REINERT, J.; BAJAJ, Y.P. S. Anther culture: haploid production and its significance in plant cell, tissue and organ culture. En: Reinert, J.; Bajaj, Y.P.S. Berlín, Springer-Verlag, 1977. p. 251-267.
23. RUSH, M. C.; SHAO, O. O.; CRILL, J. P. Protoplast, cell and rice tissue culture: prospects for the future. Los Baños, Laguna, Philippines. 1980. 33 p. (A paper presented at Special planing).
24. SCOWCROFT, W.; ADAMSON, J.A. Organogenesis from callus cultures of the legume, *Stylosanthes hamata*. Plant Science Letters (Holanda) v. 7 no. 1, p. 39-42. 1976.
25. SKIRVIN, R.M. Natural and induced variation in tissue culture. Euphytica (Holanda) v. 27 no. 1, p. 241-266. 1978.
26. SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulatin of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. En: the society for Experimental Biology Simposio, London, 1977. p. 118-131.
27. SOPORKY, S.K.; MAHESHWARI, S.C. Development of pollen embryoide in anther cultures of *Datura innoxia*. I. General observations and effects of physiological factors. Journal of Experimental Botany (Inglaterra) v. 27 no. 96, p. 49-57. 1976.
28. STAVAREK, S.J.; CROUGHAN, T.P.; RAINS, D.W. Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells. Plant Science Letters (Holanda) v. 19 no. 3, p. 253-261. 1980.
29. SUNDERLAND, N. Pollen and anther culture. En: Street, H.E. Plant tissue and cell culture. Berkely, University of California, 1971. p. 205-239.
30. THOMAS, E.; DAVEY, M.R. From single cells to plants. London, Wykeham Publications, 1975. 171 p.
31. TIMIR.; B.J.; SATYESH, CH.R. Effects of different hormones on *Vigna* tissue culture and its chromosomal behaviour. Plant Science Letters (Holanda) v. 24 no. 2, p. 219-224. 1982.
32. WALKER, K.A.; YU, P.C.; JAWORSKI, E.G. The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa*. L. cultured *in vitro*. American Journal of Botany (Estados Unidos) v. 65 no. 6, p. 654-659. 1978.

33. WALKER, K. A.; SATO, S. J. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* (Netherlands) v. 1 no. 2, p. 109-121. 1981.
34. WENZEL, G. Recent progress in microspore culture of crop plants. *En: Proceedings of the fourth John Innes Symposium*. p. 185-196. 1979 (reprint).
35. ZHANG-ZHEN, H. Application of anther culture technique to rice breeding. *En: International Rice Research*. Los Baños, Philippines. Innovative approaches to rice breeding. Los Baños. IRRI, 1980. 15 p. (Selected paper from 1970 International Rice Research Conference).