

MONOGRAFIA

Aplicación de técnicas biotecnológicas en *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw., leguminosa forrajera promisorio para suelos infértiles

**Autores: MSc. Leticia Fuentes Alfonso
Lic. Yunel Pérez Hernández.**

INTRODUCCION:

El género *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae) incluye aproximadamente 50 especies y subespecies, predominantemente herbáceas, de regiones tropicales y subtropicales tanto de Asia, África y las Américas, principalmente América del Sur (Quecini et al., 2002). A pesar de ser un género relativamente pequeño, es considerado una de las fuentes más importantes de pastos tropicales naturales, pues en él se ubican cerca de la tercera parte de todas las variedades comerciales de leguminosas pastables (Consoli et al., 1996). Se caracterizan por un vigoroso hábito de crecimiento, habilidad para enraizar profundamente y la persistencia en suelos pobres y poco fértiles en su mayoría, por lo que son ampliamente utilizadas en la agricultura tropical y subtropical como bancos de proteínas, abono verde, y fundamentalmente como cultivos forrajeros en asociaciones con gramíneas (Lovato y Martins, 1997). Algunas especies también pueden ser utilizadas como control biológico de la garrapata del ganado (Sutherst, Wilson, Reid y Kerr, 1998).

Entre los principales problemas ambientales que afectan a nuestro país, recogidos en el documento Estrategia Ambiental de la República de Cuba (CITMA, 1997), se encuentra el de la erosión y degradación de los suelos, el cual afecta a grandes extensiones de superficie agrícola, base principal de nuestra actividad económica. Entre las medidas propuestas para contribuir a mejorar la calidad de los mismos, se señala el uso de las leguminosas en la producción animal, las cuales enriquecen el suelo y contribuyen al desarrollo de una ganadería de bajos insumos.

Con el propósito de recuperar paulatinamente las 225 227, 20 ha de suelos afectados por acidez en la provincia de Matanzas (CITMA, 1997); un colectivo de investigadores de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" incluyó desde 1991 la evaluación del comportamiento agronómico de

un grupo de accesiones y cultivares pertenecientes al género *Stylosanthes* entre sus líneas de investigación; de los cuales *S. guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184 demostró ser una de las más promisorias (Mesa et al., 1993). Esta es una especie perenne y autógama que muestra una tolerancia variable a la antracnosis (enfermedad que mayores estragos ocasiona en el género) en un amplio rango de condiciones de suelos, clima y altura (Cameron et al., 1997).

La búsqueda de un germoplasma que permita un manejo sostenible del mismo en las condiciones de suelo y clima de nuestro país, ha impulsado el desarrollo de nuevas investigaciones encaminadas a la evaluación de las potencialidades de diferentes técnicas para inducir variabilidad genética, en una especie que según Meijer y Szabados (1990), manifiesta reacciones de incompatibilidad interespecífica con lo cual se dificultan los trabajos de mejora genética mediante alternativas convencionales.

Las técnicas de cultivo de tejidos y de manipulación genética han sido indicadas como complemento de algunos trabajos de mejora genética del género (Consoli et al., 1996). Entre los estudios realizados, se ha publicado la regeneración de plantas de *Stylosanthes* a partir de explantes obtenidos de hipocótilos, cotiledones y hojas (Meijer y Sábados, 1990), y también a partir de protoplastos (Szabados y Roca, 1986; Vieira et al., 1990). Este género está considerado entre las leguminosas, como un modelo de regeneración *In Vitro*. Sin embargo se han encontrado diferencias en la respuesta morfológica de los explantes dependiendo de la especie o cultivar de origen (Meijer, 1982), de la parte de la planta de donde fue obtenido (Dornelas et al., 1992); así como de las concentraciones y tipos de auxinas utilizadas. Es por ello que representa un ejemplo claro de cómo la manipulación de las condiciones físicas y químicas y los factores físicos, pueden influir en la reorganización de las células en cultivo.

Las técnicas de cultivo de tejidos constituyen un poderoso instrumento para generar variación somaclonal (van den Bulk et al., 1990), fundamentalmente, durante el cultivo de callos, células y protoplastos. Varios autores sugieren que los mecanismos involucrados en la generación de variabilidad genética están relacionados con diferentes causas como: aberraciones cromosómicas, activación de elementos transponibles, metilación de ADN y mutaciones puntuales (Peschke y Phillips, 1992). Estas últimas pueden estar ocasionadas por la ocurrencia de recombinaciones mitóticas, tanto por crossing-over intercromátidas o intercambios intracromátidas de repeticiones

invertidas, provocando pérdida o ganancia de información genética y por consiguiente, variabilidad en el número de secuencias repetidas en tándem (Phillips et al., 1994).

Ante tan disímiles eventos, muchos de los cuales no están completamente estudiados (Consoli et al., 1996), se hace necesaria la aplicación de otras técnicas que permitan caracterizar todo el proceso de obtención de los regenerantes obtenidos mediante el cultivo de tejidos vegetales. El estudio histológico del proceso de formación de los callos organogénicos, así como la caracterización genética mediante técnicas citogenéticas y moleculares pueden contribuir a seleccionar la metodología de trabajo adecuada al emplear la variación somaclonal como alternativa en un programa de mejora genética.

Las técnicas histológicas brindan información, que en muchos casos no son detectables a simple vista. Investigar el origen de estructuras específicas como brotes adventicios, raíces y embriones que se desarrollan en cultivo, ha sido uno de los principales objetivos de su uso por varios investigadores (Trigiano et al., 1999). Por otra parte el uso complementario de las técnicas citogenéticas y moleculares han permitido caracterizar genéticamente algunos de los procesos resultantes del cultivo de tejidos vegetales. Fue así como se descubrió la ruptura de cromosomas como principal evento citológico en cultivos de maíz y avena; así como el incremento de mutaciones puntuales por la activación de elementos transponibles.

Por otra parte, varios investigadores (Quecini et al., 2001, Quecini et al., 2002), encaminan sus esfuerzos hacia la consecución exitosa de la transformación genética de esta especie mediante una complementación de las técnicas de cultivo de células y tejidos con métodos transgénicos como la electroporación.

La introducción y explotación de especies promisorias como *Stylosanthes guianensis* en la agricultura cubana, debe ir acompañada de un amplio conocimiento de sus potencialidades y de los avances que se han obtenido en los diferentes programas de mejora que se desarrollan en regiones donde se utiliza con mucho éxito. Por ello, la presente monografía tiene como objetivo analizar los principales resultados que se han obtenido en la aplicación de las técnicas biotecnológicas en esta especie.

DESARROLLO

I. Género *Stylosanthes* Swartz.

1.1. Origen, distribución y localización

El género *Stylosanthes* (Leguminosae- Papilionoidae- Aeschynomeneae, Polhill y Raven, 1981), es endémico de América Central, América del Sur, África, antiguo Ceilán y Sureste de la India, con un centro de diversificación biológica en Brasil (Consoli et al., 1996). Se han estimado aproximadamente 40 especies tropicales y subtropicales, las cuales están ubicadas en dos secciones: *Stylosanthes* Sw. y *Styposanthes* J. Vogel (Kirkbridge y de Kirkbridge, 1985). Las opiniones sobre la taxonomía del género han sido muy diversas lo cual ha provocado diferentes criterios de clasificación; por lo que se informa un número variable de subespecies y variedades, en dependencia de una u otra posición taxonómica (William et al., 1984).

A pesar de que existen criterios divergentes, muchos autores coinciden en que la evolución de estos taxa tiene una base común, a partir de un grupo central sobre el que influyeron diferentes mecanismos en la distribución, con un rango relativamente restringido, pero siempre en asociación con *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.

La importancia económica que se le concede a esta género como una de las principales fuentes de leguminosas forrajeras en el mundo (Consoli et al., 1996), ha provocado que en la actualidad varios investigadores (Kazan et al., 1993^{1,2,3}; Liu y Musial, 1995 y Liu et al., 1996), estén utilizando técnicas moleculares como RAPDs (random amplified polymorphism DNA), RFLPs (restriction fragment length polymorphism), marcadores STS (sequence-tagged-sites), entre otras, para definir aspectos aún divergentes en cuanto a su taxonomía. Este género está estrechamente vinculado con otros como *Aeschynomene* L., *Arachis* L., *Cyclocarpa* Afzelius ex Urban, *Ormocarpum* P. Beauv., *Smithia* Aiton y *Zornia* J. Gmelin, conformando la tribu *Aeschynomeneae* (Benth.) Hutch. (Reynolds, 1990).

1.2. Descripción de la especie *S. guianensis* (Aubl.) Sw.:

Planta decumbente con raicillas en los primeros nodos, tallos esponjosos, pubescente con el envés de color más claro, estípulas soldadas formando un tubo con pelos glandulares, flores con 6 mm en

glomérulos apicales, que maduran de una en una, estandarte amarillo con rayitas rojo pardas en el interior, alas con apéndice de 1mm, estambres monadelfos y vainas de una sola semilla incluida en el cáliz. Una planta típica tiene una forma radial de crecimiento con ramas finas, flexibles y postradas que parten del eje central profundamente enraizado. De las ramas radiales con hojas más frondosas, crecen los brotes que se sostienen erectos hasta una altura de un metro cayendo luego sobre sí mismo debido al peso y formándose una maraña de tallos lignificados de la cual crecen nuevos tallos erectos. Las hojas trifoliadas con hojitas de 15 a 55 mm. de longitud y aunque la raíz principal hasta un metro en el suelo, alrededor del 80% de las raíces secundarias se mantienen a 20 cm. de profundidad. Aunque la forma típica de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. es erecta, existe mucha variación en su forma de crecimiento, variando desde esta forma hasta postrado y semitrepador (Machado y Chao, 1980).

Los factores del suelo más influyentes en el patrón de distribución son la profundidad y el pH; suelos poco profundos y moderadamente arenosos (18-56% de arena), y pH bajos se combinan en las regiones donde es más abundante, debido probablemente a su poca capacidad competitiva en suelos profundamente fértiles, donde otras especies se desarrollan más vigorosamente. Se adapta mejor a bajas altitudes. Pueden tolerar determinados períodos de inundaciones (Amezquita et al., 1991).

El rango de temperatura que permite alcanzar el mayor crecimiento y el mayor rendimiento en materia seca, se encuentra entre 23-29°C, y la temperatura óptima para una nodulación eficiente es 27°C (CIAT, 1993).

Los datos de 32 pruebas regionales de la Red Internacional de Evaluación de Pasturas Tropicales (RIEPT), conducidas en el trópico húmedo de América entre México y Bolivia demostraron la resistencia de este cultivar a la antracnosis en un amplio rango de condiciones de clima, suelo y altura (Amezquita et al., 1991); hecho también informado por He y Schultze-Kraft, (1988) en cuanto al comportamiento del cultivar en China, detectándosele un alto valor nutricional y rendimiento de materia seca, por lo que se recomienda como cultivo multiuso.

1.3. Importancia económica y su introducción en Cuba.

Existe un consenso generalizado sobre la necesidad de incluir leguminosas forrajeras en las explotaciones ganaderas como parte de la dieta de los animales, por el valor nutricional de las mismas y por la contribución a la mejora en la calidad de los suelos. El género *Stylosanthes*, a pesar de ser pequeño, es considerado una de las fuentes más importantes de pastos tropicales naturales, pues en él se ubican cerca de la tercera parte de todas las variedades comerciales de leguminosas pastables (Williams et al., 1984). *S. humilis* Kunth y *S. guianensis* fueron las primeras especies reconocidas, desde comienzos del siglo XX. En Australia, a partir de 1975, se mejoraron aproximadamente 1 millón de has de pastizales con diferentes cultivares de ellas. Con ello se alcanzaron incrementos en la producción animal en el orden de 50 a 80 kg. por ejemplar, superiores a la de los criados en pastizales naturales sin mejorar (Chakraborty et al., 1997).

La colección y búsqueda de especies de *Stylosanthes* ha permitido descubrir otras especies que posean características de importancia potencial para los mejoradores vegetales. Esto incluye a *S. scabra* J. Vog. un poliploide que es resistente al fuego y adaptado a suelos ácidos (Edye, 1984), *S. hamata* L. y *S. macrocephala* Sw., los cuales son tolerantes a la antracnosis (Sousa Costa y Ferreira, 1984), la enfermedad que más afecta al cultivo. Los daños causados por ella, han impulsado programas de mejora genética encaminados a lograr una mayor diversidad de genes de resistencia en cultivares de *S. scabra* en Australia y de *S. guianensis* en América del Sur.

En Cuba se han identificado tres especies: *Stylosanthes hamata* L., *Stylosanthes viscosa* Sw. y *Stylosanthes tuberculata* Kunth, las dos primeras muy extendidas por Jamaica y América del Sur y la última que crece en Camagüey y Cayo Romano (Machado y Chao, 1980).

En 1975 se liberó en Perú el cultivar Pucallpa (*S. guianensis* cv. CIAT-184), tolerante a la antracnosis en un amplio rango de condiciones de suelo, clima y altura (Amezquita et al., 1991). *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, liberado en 1975 como cultivar Pucallpa por el IVITA (Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura) y el INIPA (Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agropecuaria) en Perú (Amezquita et al., 1991), es oriundo de América del Sur, pero actualmente se encuentra distribuido en muchos países del mundo. A partir de la década del 80 fue

introducido en China, con resultados satisfactorios, adaptándose rápidamente como cultivar predominante la producción a gran escala en la zona meridional (He y Schultze-Kraft, 1988).

En la misma época, fue introducido en Cuba en la zona central de la provincia de Matanzas con resultados similares según refieren Mesa et al., (1993), por lo que se ha ido extendiendo su explotación hacia el Occidente del país como se refleja en las evaluaciones de Crespo y Curbelo (1990) y Crespo, Ruiz y Febles (1995).

En la actualidad, países en desarrollo como Mozambique (Maposse, Muir y Alage, 2003) y Laos (Keoboulapheth y Mikled, 2003) han introducido otros cultivares de esta especie, incluyendo a Stylo 184, ya sea para la ganadería bovina en zonas extremadamente áridas como sucede en muchas zonas de África, como para sustituir algún componente en la dieta de otros animales como el arroz para los cerdos en zonas rurales de Asia.

1.4. Mejoramiento genético de *Stylosanthes* sp.

Instituciones como el Centro de Investigaciones de Agricultura Tropical (CIAT) de Colombia, la Organización para la Investigación y los Recursos Científicos de la Mancomunidad Británica (CSIRO) en Australia, la Universidad de la Florida en Estados Unidos, entre otros en África y Asia, han desarrollado diferentes programas de mejora de las especies más promisorias del género, que según Cameron et al. (1997) son: *S. scabra* J. Vog. en la isla continente y *S. guianensis* (Aubl.) Sw. en Asia y América del Sur.

Los diferentes programas han estado encaminados a producir cultivares capaces de persistir y brindar una producción relativamente estable en pastizales permanentes (Cameron et al., 1989). Se han desarrollado diferentes estrategias en las cuales uno de los propósitos ha sido lograr diversidad en los genes de resistencia a la antracosis, reconocida como el mayor peligro para muchas especies del género, combinada con otros caracteres tales como una mayor persistencia, incrementos en la producción de materia seca y de semillas, tolerancia al estrés ambiental y acortar el tiempo de floración (Cameron et al., 1997).

El desarrollo de la estrategia ha comprendido el empleo de diferentes métodos de selección y cruzamiento (CIAT, 1993, Cameron et al., 1997), que ha encontrado sus limitaciones en algunas especies autógamias con muy bajos niveles de cruzamiento como *S. guianensis*, o por la producción de híbridos estériles (Stace y Edye, 1984). Por ello, varios autores han sugerido el empleo de técnicas de cultivo de tejidos y diferentes metodologías para la manipulación genética como complemento de los programas de mejora (Consoli et al., 1996; Dornellas, Vieira y Appezato-da- Gloria., 1992; Godwin et al., 1990).

II. Técnicas Biotecnológicas.

2.1. Generalidades del cultivo de células y tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten en el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998). Constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Kommamine et al., 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1955), la propagación masiva (Kitto, 1997), la conservación de germoplasma (Withers, 1985), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección *in vitro* (Pérez et al., 1998) y la ingeniería genética (Herrera, Estrella et al., 1983).

Los métodos de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas se han visto beneficiados también por el desarrollo del cultivo de tejidos como refieren en sus resultados Quecini et al., 2002, 2003).

La habilidad de los tejidos vegetales para formar varios órganos *de novo* es lo que se conoce como organogénesis (Schwarz y Beaty, 1999). Puede producirse de forma directa o pasando por una etapa de dediferenciación total de los fragmentos vegetales de partida (explantes) y luego una rediferenciación de ese tejido que se conoce como callo.

Los callos son estructuras que pueden manifestar variabilidad atendiendo a diferentes criterios de clasificación. Uno de los criterios que se tuvo en consideración para este trabajo fue el de Pierik (1990) quien refiere que las diferencias pueden estar dadas en cuanto a estructura y hábitos de crecimiento, pudiendo ser fijos o libres, blandos (acuosos) o duros; y en cuanto a la coloración, desde blancos hasta coloreados, dependiendo de la especie, tipo de explante, edad y otros factores.

Cuando se precisa un callo juvenil se pueden utilizar entre otros, fragmentos de plántulas y debe tenerse en cuenta que tanto la edad del material inicial, como la posición del explante sobre la planta (que refleja el nivel de hormonas endógenas) puede tener gran influencia en procesos como la división celular y la formación de órganos y embriones. Como señalara Devlin (1982) los niveles endógenos de reguladores del crecimiento pueden provocar efectos diferentes de acuerdo a la concentración usada. En otras palabras, las raíces son más sensibles a las auxinas que los tallos. Ello pudiera ser la causa de que esta fuera una respuesta en aquellas situaciones de bajos niveles auxínicos en el medio o incluso en ausencia de ellas.

Entre los reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los más utilizados en el cultivo de tejidos de plantas son las auxinas y las citoquininas, aunque en ocasiones también pueden ser utilizadas las giberelinas. Según Beyl (1999) las auxinas juegan su papel en muchos procesos del desarrollo, incluyendo la elongación y expansión del tejido, la dominancia apical, la formación de raíces adventicias y la embriogénesis somática. Generalmente cuando la concentración de auxinas es baja se favorece la formación de raíces, mientras que con el aumento de la concentración ocurre la formación de callos.

Las auxinas sintéticas más utilizadas son el ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido-4-amino-3, 5, 6-tricloro-2-piridincarboxílico (picloram). Como auxinas naturales se encuentran el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), el cual se clasificó como sintético durante mucho tiempo (Beyl, 1999), hasta que se demostró su síntesis natural en el olivo y el tabaco. Las concentraciones más utilizadas de las auxinas en general, oscilan entre 0.001 y 10 mg/L

Por su parte las citoquininas estimulan la división celular, así como el inicio y crecimiento de brotes. Las más comúnmente utilizadas son la zeatina, la hidroxizeatina, la kinetina, la benciladenina (BA), el tidiazuron y el 2 iP. Tanto la zeatina como la BA son citoquininas muy fuertes y pueden ser utilizadas a bajas concentraciones para permitir la acción enraizadora de las auxinas, o a mayores concentraciones (1 a 10 mg/L) para estimular la formación de brotes (Beyl, 1999).

Las exigencias de regulador exógeno (tipo de regulador, concentración, proporción auxina/citoquinina) dependen en gran medida del genotipo y su contenido en hormonas endógenas, por lo cual estas necesidades pueden dividirse en tres categorías (Pierik, 1990). Atendiendo a los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones realizadas en *Stylosanthes* sp., los miembros de este género se agrupan en la tercera, toda vez que son plantas que precisan tanto de auxinas como de citoquininas para la formación de callos, con una relación menor que uno en muchos casos.

Por su comportamiento este género está considerado entre las leguminosas como un modelo de regeneración *in vitro*. Se han publicado varios estudios sobre la regeneración de plantas de *Stylosanthes* a partir de diferentes explantes obtenidos de hojas, hipocótilos y cotiledones (Meijer y Szabados, 1990, Mesa et al., 1993, Valarini et al., 1997); y a partir de protoplastos (Meijer y Steinbiss, 1983; Szabados y Roca, 1986, Vieira et al., 1990). La regeneración de las plantas siempre ocurre por organogénesis mediante el desarrollo de brotes sobre la superficie de los callos.

La regeneración de plantas completas de *Stylosanthes guianensis* fue publicada inicialmente por Meijer y Broughton (1981), al establecer las condiciones para el establecimiento, crecimiento y rediferenciación de callos en el cultivar australiano 'Cook'. A partir de entonces varios autores, incluyéndolo a él, continuaron aplicando estas técnicas con diferentes objetivos.

Mroginski y Kartha (1981) obtuvieron callos organogénicos a partir de hojas maduras e inmaduras sobre un medio MS (Murashige y Skoog, 1956) suplementado con vitaminas del B5 y diferentes combinaciones de BA (Benciladenina) y ANA (Ácido naftalenacético), con un alto porcentaje de regeneración hasta los seis meses en subcultivo; al transferir porciones de estos a medio fresco con bajos niveles en la relación NAA/BA. En algunos callos los primordios aparecieron antes de ser transferidos a medio fresco, fundamentalmente en el medio suplementado con 1 mg/L ANA y 3 mg/L

BA, lo cual no es exclusivo a esta combinación pues en la experiencia reflejada por otros autores como Mesa et al. (1993) se obtuvieron respuestas similares en medios suplementados con 2,4-D, aunque en las combinaciones con ANA fue más notable. Sin embargo, todos estos autores sugirieron el cambio de las combinaciones hormonales empleadas en cada etapa (callo, brote y raíz); con niveles bajos de la relación ANA/BA (1:3 mg/L) para callo, con BA sólo o combinado con bajas concentraciones de ANA (0.01 mg/L) en la segunda fase y para el enraizamiento pueden suprimirse las hormonas.

Al continuar sus estudios, comparando el comportamiento de diferentes cultivares australianos, Meijer (1982), pudo determinar que la capacidad de regeneración *In Vitro* era una propiedad de la especie mucho más que una característica de una línea genética particular como sucede en otras leguminosas como *Medicago sativa* L. Sin embargo, según los resultados obtenidos por Godwin et al. (1987), el potencial morfogenético si puede manifestar variabilidad entre diferentes genotipos, como sucedió entre los cultivares australianos ‘Graham’ y ‘Oxley’, con un 95% de respuesta de los callos en el primero contra un 1% en el segundo.

La capacidad morfogenética también puede manifestar variabilidad en cultivos de callos envejecidos. Meijer (1984) observó diferencias en relación con la fuente de explante, ya que el 76 % de los callos formados a partir de hipocótilos obtenidos del cultivar ‘Cook’, cultivados durante dos años en medios suplementados con diferentes combinaciones de auxinas (2,4-D o ANA) y citoquininas (BA o kinetina); fueron capaces de regenerar plántulas en medio de regeneración suplementado con 1mg/L de BA, no ocurriendo así en alguno de los callos obtenidos de hojas los cuales dejaron de formar brotes luego del cuarto subcultivo.

Otra metodología desarrollada en estos años fue la regeneración de plantas a partir de protoplastos, con la intención de lograr una hibridación somática efectiva, ya que según los resultados obtenidos por Stace y Cameron, (1984) la hibridación interespecífica de *S. guianensis* con otras especies de *Stylosanthes* (*S. capitata* H. B. K., *S. macrocephala* Vog.) era impedida por reacciones de incompatibilidad.

Szabados y Roca (1985) obtuvieron regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de suspensiones celulares del mesófilo de las hojas en las accesiones CIAT-136 y CIAT-2243, especies

muy productoras de semillas pero susceptibles a la antracnosis. Además encontraron diferencias fenotípicas para las accesiones en las suspensiones celulares y en protoplastos, enfatizando la importancia de la selección de genotipos en experimentos de cultivo de células y tejidos.

A la par de estos estudios, continuaron los trabajos de propagación de estos cultivares con el objetivo de desarrollar la metodología más eficiente que permitiera incrementar significativamente la eficiencia de mejora de plantas o contribuyeran a resolver algunos problemas no resueltos mediante métodos convencionales (CIAT, 1985). Se incluyeron nuevos explantes y nuevos reguladores del crecimiento como las giberelinas (AG₃ al 0.05%), en combinaciones con ANA y 6-BAP, siempre en una relación menor que uno tanto para la callogénesis como para la organogénesis.

Por su parte en el CSIRO, en Australia, se incluyeron nuevas especies del género como *S. scabra* y *S. hamata* (Godwin et al., 1987; 1990). En todos los casos, fue corroborada la necesidad de utilizar combinaciones de la auxina con una citoquinina (preferentemente 6-BAP) en una relación similar a la ya mencionada. Según los autores, el tipo y la concentración de las de citoquinina en la etapa de inducción de callo, tenía determinada influencia sobre la capacidad regenerativa de los mismos. Los callos cultivados en medios con 2,4-D como único RCV eran de consistencia muy suave y no tenían una buena respuesta morfogénica. Nuevamente fueron detectadas diferencias en la capacidad morfogénica a largo plazo entre genotipos.

Una vez determinadas las condiciones de cultivo para estas especies, se diseñaron experimentos que permitieran evaluar el comportamiento en condiciones de campo de los regenerantes obtenidos. Algunos trabajos como el de Consoli et al., (1996), y Valarini et al., (1997) mantuvieron condiciones similares a las anteriormente descritas para obtener las vitroplántulas, con la diferencia de que no utilizaron giberelina en ninguna etapa.

2.2. Cultivo *In Vitro* de *S. guianensis* cv. CIAT-184.

A partir de los resultados obtenidos en las evaluaciones del comportamiento en campo del cultivar CIAT-184; la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, incluyó entre sus líneas de investigación un programa de mejora de la especie, con el objetivo de obtener un germoplasma

diversificado, bien adaptado a suelos ácidos. Como parte del mismo se realizaron estudios preliminares para evaluar el comportamiento *In Vitro* de diferentes explantes, inoculados en diferentes combinaciones de ANA (0,5; 1,0 y 2,0 mg/L) y 2,4-D (1 y 2 mg/L) con 6-BAP (2 y 4 mg/L).

Según lo reflejado en la publicación por estos autores, la respuesta *In Vitro* de este cultivar, tiene puntos comunes con lo ya abordado anteriormente. El incremento en 2 mg/L de citoquinina produjo un efecto beneficioso en la ganancia en masa fresca de los callos, sobre todo cuando la relación auxina/citoquinina era menor que uno. Fue posible obtener tejido callogénico en los tres explantes utilizados, con la particularidad que en hojas cotiledonales el tamaño fue superior al de las restantes. La organogénesis comenzó a manifestarse a las cinco semanas de incubados los fragmentos de plantas en medio de inducción, antes incluso del subcultivo a medio de regeneración, por lo que el proceso fue más evidente en las variantes que contenían ANA como auxina.

En cuanto a la regeneración de los callos, se detectaron diferencias en relación con los explantes y con las auxinas utilizadas en el medio de formación. De forma general los hipocótilos respondieron en todas las variantes de regeneración, no así en los otros dos casos, con respuestas heterogéneas. En aquellos callos que se formaron en medio con ANA (0,5; 1,0 y 2,0 mg/L) el mayor número de plántulas se lograron en variantes de regeneración carentes de auxina y bajas concentraciones de 6-BAP (0,05, y 0,01 mg/L), mientras en los provenientes de medios con 2,4-D (1,0 y 2,0 mg/L) fue en aquellos que contenían ANA a bajas concentraciones (0,01 mg/L) en combinación con 3 mg/L de 6-BAP. Según Mesa y colaboradores (1993) ello confirmaba lo señalado por otros autores como Tabares, Pachón y Roca, (1991) acerca de la necesidad de cambiar las concentraciones y tipos de hormonas en cada paso de la regeneración de plantas en este género. La posibilidad de obtener plántulas a partir de callos formados en presencia de 2,4-D, a pesar de la textura compacta de ellos, permitió sugerir la posibilidad de diseñar nuevos experimentos encaminados a producir variabilidad genética en los regenerantes del cv. CIAT-184.

En estudios realizados por Fuentes (2001) se corroboró la posibilidad de obtener regenerantes a partir de los tres explantes (Fig. 1) seleccionados, siempre que en la formulación del medio de cultivo aparecieran combinaciones de auxinas (2,4-D 1 y 2 mg.L⁻¹) y citoquininas (6-BAP 2 y 4 mg.L⁻¹).

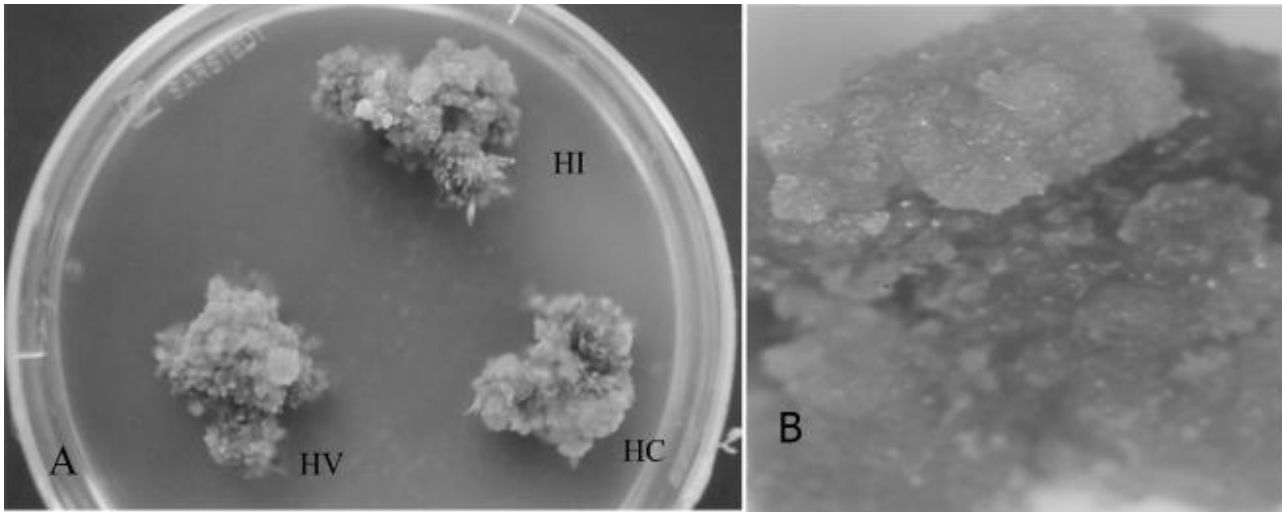


Fig.1. Callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 luego de 35 días en medio de inducción. A) Callos formados a partir de los tres explantes Hi: hipocótilos, HV: Hojas verdaderas, HC: Hojas cotiledonales. B) Foto ampliada del callo formado a partir de Hi, en Estereoscopio NIKON OPHITON (84X) (Fuentes, 2001, Fuentes et al., 2005).

Sin embargo, el proceso de dediferenciación mostró particularidades ya mencionadas por otros autores en otros cultivares, como las diferencias en la coloración, el grado de dediferenciación de los explantes y la textura de los callos finales (tabla 1).

Mientras los Hi se transformaban completamente en la mayoría de los tratamientos, las HV mantuvieron una zona alrededor de la nervadura central, incluyéndola a ella, que se dediferenció muy poco, a excepción de las muestras cultivadas en el tratamiento 6, formado por las mayores concentraciones utilizadas de 2,4-D (3 mg/L) y la de 6-BAP (4 mg/L). Por su parte las HC mostraron un comportamiento intermedio a los referidos anteriormente, pues en todos los tratamientos se encontraron callos de los dos tipos.

Tabla 1. Textura de los callos iniciales de *S. guianensis* cv. CIAT-184, luego de seis semanas en medio de inducción.

Tipo de textura	Explante	% de callos según variante de medio de cultivo						H.
		I	II	III	IV	V	VI	
Compacta	Hi	60 g	86,6 b	56.6 g	66.6 f	33.3 i	50 h	46.46***
	HC	83,3 c	83,3 c	60 g	76,6 e	36,6 i	66,6 f	
	HV	90 b	100 a	86,6 b	83.3 c	66,6 f	80 d	
Compacta y Friable	Hi	40 b	13.3 g	30 c	33.3 c	50 a	46,6 a	40.98***
	HC	16,6 f	16,6 f	30c	23.3 d	46,6 a	30 c	
	HV	10 g	--	13,3 g	13.3 g	30 c	30 c	
Friable	Hi	--	--	13,3 a	--	16,6 a	3,3 b	44.39***
	HC	--	--	10 a	--	16,6 a	3,3 b	
	HV	--	--	--	--	3,3 b	--	

Leyenda: H: Estadístico de Kruskal-Wallis
letras diferentes indican diferencias estadísticas para $p < 0.05$ (Prueba de Student-Newman-Kewls).

Estos resultados pueden indicar la presencia de diferentes niveles de reguladores del crecimiento endógenos en los tres explantes. Según Beyl (1999), en ocasiones un tejido o explante es autotrófico y puede producir su propio suministro de reguladores del crecimiento. Las máximas concentraciones de auxinas se encuentran en los ápices en crecimiento, es decir en la punta del coleóptilo, en las yemas y en los ápices en crecimiento de las hojas y de las raíces. Sin embargo, se encuentra también auxina ampliamente distribuida por toda la planta, procedente de las regiones meristemáticas. El hipocótilo, es un órgano que además de sostener la plántula, sirve de conexión entre las partes aéreas (hojas y ápices caulinares) y las raíces; y a través de él se traslocan los diferentes reguladores del crecimiento que se sintetizan en las partes de la planta antes mencionadas.

Al seccionar los Hi por debajo del ápice caulinar y por encima del cuello, las sustancias que se estaban transportando en uno u otro sentido, entre ellas auxinas y citoquininas; pudieron estimular la formación de callos en las zonas de los cortes. El hecho de haber perdido la conexión con los sitios de síntesis, pudo provocar que las concentraciones de reguladores no fueran lo suficiente como para formar grandes masas de tejido indiferenciado en toda la superficie vegetal, por lo que la respuesta fue muy pobre.

Como señalara Beyl (1999), generalmente cuando existen bajas concentraciones de auxinas ya sea exógena o endógena, la formación de raíces puede verse favorecida, mientras que a mayores concentraciones es que se favorece la formación de callos.

En la literatura consultada sobre el cultivo *in vitro* en el género *Stylosanthes* no se hace referencia a esta característica, pero otros autores como Pierik (1990) han manifestado que, aunque un callo es en principio un tejido no organizado y poco diferenciado, se pueden encontrar tejidos sin desdiferenciar en agregados grandes de tejido calloso. Más recientemente Fortes y País (2000) observaron la formación de tejido calloso en segmentos internodales de *Humulus lupulus* a partir del parénquima cortical, mientras que por debajo de este se observaron células esclerenquimáticas que formaban una capa alrededor de los tejidos vasculares evitando la desdiferenciación de las zonas más internas del explante; lo cual pudiera haber sucedido en este caso aunque no fue comprobado.

2.3. Consideraciones generales sobre la variación somaclonal.

El término variación somaclonal fue definido por Larkin y Scowcroft y (1981), y se refiere a la variación observada entre “somaclones”, es decir entre plantas derivadas de cualquier tipo de cultivo de tejidos. Estos autores mencionan que algunos de los posibles mecanismos y de los ejemplos de variabilidad parecen ajustarse más bien a un modelo donde las variaciones preexisten en las células somáticas del explante, en tanto que otros mecanismos y ejemplos más bien se ajustan a un modelo donde la variabilidad es solo generada durante la fase del cultivo de tejidos.

El uso y la utilidad de este término han sido discutidos, pues la naturaleza y la manifestación de los cambios en el fenotipo pueden o no ser detectados (Jayansakar, 1999). Es por ello que este autor hace

una distinción entre los términos “variación” y “mutación”, dado el hecho de que pueden aparecer variaciones fenotípicas sin una clara evidencia de la causa genética de ella. Por tanto él considera que el primero debe ser utilizado exclusivamente en casos donde se presente una clara evidencia de la alteración genética. En ocasiones los mutantes no presentan cambios fenotípicos apreciables. Esto obliga a utilizar otras técnicas auxiliares que permitan caracterizar genéticamente el material obtenido. Entre ellas se encuentran las citogenéticas y más recientemente, los marcadores moleculares.

Hasta estos momentos no se han podido determinar las causas de la variación somaclonal; sin embargo han surgido varias hipótesis al respecto. Según Phillips et al. (1994), los cambios durante el cultivo de tejidos podrían estar ocurriendo por un mecanismo de respuesta a estrés y, aunque los tipos de variación generalmente se basan en diferencias fenotípicas, las bases de estas alteraciones parecen ser cambios genéticos. Skirvin et al. (1994) sugirieron que si se usan diferentes explantes en la micropropagación no se puede asumir con seguridad que todos los explantes exhibirán igual variación, además señalaron que la variación tiene menor probabilidad de observarse cuando proviene de brotes preformados, como meristemos, que de explantes que no los tienen como en hojas o raíces.

Otro factor que puede influir en una mayor incidencia de variación somaclonal en vitroplántulas es el tipo de cultivo al cual son sometidos los explantes. Para algunos autores, la embriogénesis somática produce menos mutaciones que la regeneración *vía* organogénesis, debido a una supuesta mayor restricción impuesta por los requerimientos genéticos para la formación de embriones (Peschke y Phillips, 1992). Sin embargo, no siempre ocurre así, pues en algunas especies como el maíz se han obtenido regenerantes *vía* embriogénesis más inestables genéticamente que los formado a partir de callos organogénicos.

Desde el punto de vista fisiológico, también se han hecho múltiples referencias a los cambios detectados en relación con la exposición prolongada del explante a las auxinas más potentes como los ácidos fenoxiacéticos (2, 4-D y 2, 4, 5-T). En especies como *Elaeis guineensis* Jacq. (palma aceitera) se han detectado variaciones en regenerantes obtenidos luego de cultivos prolongados en medio con 2,4-D (Jayansakar, 1999). También se ha encontrado variabilidad en cultivos como la papa y la caña de azúcar al ser cultivados con el ANA y con Kinetina respectivamente (Darias, 1993).

Las causas genéticas de la variación en regenerantes están relacionadas con diferentes fenómenos como: aberraciones cromosómicas, la activación de elementos transponibles, cambios en la metilación, así como otras aberraciones a nivel del ADN (Jayansakar, 1999). Estos fenómenos han sido ilustrados por diferentes estudios realizados como los de Kaeppler y Phillips (1993) en regenerantes de maíz, y Taylor et al. (1995) en caña de azúcar. Bajo la influencia de las condiciones del cultivo *In Vitro* pueden ocurrir eventos de ruptura de cromosomas en determinados sitios de mayor concentración de heterocromatina, donde la replicación del cromosoma se hace más lenta; y la fusión por sitios no normales (Peschke y Phillips, 1992). La frecuencia de aparición de estos eventos en callos u otros tejidos vegetales, es variable entre especies diferentes y para cada evento.

También puede incrementarse la frecuencia de intercambio entre cromátidas hermanas, con una mayor incidencia en zonas de secuencias de ADN altamente repetitivas, fenómeno que fue descrito por Dolezel y Novak (1986) en estudios con ajo (*Allium sativum* L.). En el trabajo desarrollado por estos autores, se demostró como un pequeño incremento en la concentración del 2,4-D podía aumentar la frecuencia de este evento observado al microscopio, mediante tinción fluorescente. Mientras 5µM de 2,4 D produjeron un 108 % por encima de la frecuencia control, al utilizar 15 µM se obtuvo un 121% de intercambio entre cromátidas hermanas. Otro resultado interesante se reflejó en la diferencia detectada en cuanto a la razón entrecruzamiento/cromosomas en tejidos de callos con valores entre 7.1-7.8, en relación con otros explantes como el ápice radical con un valor de 6.4. De igual forma pueden incrementarse los eventos de entrecruzamientos somáticos, donde quedan involucrados dos homólogos, en lugar de dos cromátidas hermanas, como lo detectado en tabaco con los sectores gemelos *SU/SU* y *su/su*. Estos eventos pueden provocar cambios en el número de copias de los genes y por tanto alteraciones en la información genética. El proceso de desdiferenciación y crecimiento de los callos requiere de complejos cambios en la regulación génica, algunos pueden ser transitorios pero otros pueden perdurar por varias generaciones sexuales (Peschke y Phillips, 1992).

2.3.1. Variación somaclonal en *Stylosanthes* sp.

La propagación *In Vitro* de las especies de este género fue incluida desde la década de los 80 en uno de los tres programas desarrollados por diferentes instituciones como el CIAT y el CSIRO, con el

objetivo de obtener nuevas variedades mediante la selección de genotipos superiores o más resistentes a determinadas enfermedades como la antracnosis (Miles, Roca y Tabares, 1990).

En los estudios realizados por Meijer (1982, 1984), se referían a la presencia de plántulas morfológicamente anormales y una considerable variabilidad en el vigor de las mismas. En lo adelante varios autores que realizaban estudios en diferentes especies o cultivares del género, harían referencia a la variabilidad observada en la morfología y otros caracteres cualitativos de algunos regenerantes como albinismo, fertilidad reducida y variabilidad en la forma foliar (Godwin et al., 1987); cambios en la productividad y en la floración (Godwin et al., 1990); cambios en el número de tallos, en la longitud de los internodios, en el grosor de la planta, en la producción de semillas, entre otros (Miles et al., 1990), así como la presencia de plántulas con hábitos de crecimiento erecto y hojas extremadamente alargadas (Dornellas et al., 1997). En muchos casos, en las nuevas líneas obtenidas, estos caracteres eran inferiores a los de las plantas testigos, llegando en ocasiones a tener una mayor susceptibilidad a enfermedades.

También se han efectuado estudios más recientes sobre la variabilidad generada en caracteres cuantitativos como área basal (50, 7 %), diámetro basal (102, 2%) y en el vigor de las plántulas (61,9%) (Consoli et al., 1996). Por el contrario, en otros caracteres como producción de materia fresca y materia seca, ocurrió un decrecimiento en un 45,5% y un 32,9% de las poblaciones regeneradas, respectivamente. En todos los casos las medias en las poblaciones de regenerantes analizadas estuvieron siempre por debajo de las testigos a excepción de la media del peso de los tallos, que fue similar.

Al analizar el número de progenies estudiadas en todos los casos, los propios autores señalaron que fueron relativamente pequeñas; por lo que fueron un tanto conservadores en sus conclusiones. Miles et al. (1990) y Godwin et al., (1990) plantearon que la variación somaclonal de esta especie sólo sería de utilidad en las actividades de mejoramiento; si la generación de esta variación era combinada con procedimientos de selección sumamente eficaces, evaluando un número mayor de regenerantes, ya que poblaciones mayores podrían producir probablemente genotipos superiores al original. Por su parte Consoli et al. (1996), además de coincidir en lo limitado de las poblaciones estudiadas, hizo referencia

a la posibilidad de incrementar los valores promedios de los diferentes caracteres modificando condiciones de trabajo, concentraciones hormonales y otros factores implicados.

Como resultados alentadores se encontraron los obtenidos por Valarini et al., (1997) al evaluar el comportamiento de varios atributos relacionados con la fijación del N₂ y el crecimiento vegetativo en 168 regenerantes de *Stylosanthes scabra*. Aunque la medias de los diferentes caracteres (peso seco del tallo, peso seco de la raíz, contenido de N₂ en tallo y actividad reductora de acetileno) para la mayoría de los agrupamientos realizados; no mostraron diferencias estadísticamente significativas; si se detectaron cuatro agrupamientos (14 % de la población) que sobresalieron en uno o varios de estos caracteres; conformando un clúster independiente en el análisis multivariado. Ello hizo concluir a los autores que la variación somaclonal podría ser una fuente útil de inducir variabilidad en la nodulación.

III. Técnicas que permiten caracterizar el proceso organogénico.

Existen varias técnicas que permiten caracterizar los diferentes eventos biológicos que ocurren durante el cultivo de tejidos y células vegetales, así como evaluar la estabilidad genética del material vegetal obtenido como resultado final. Entre ellas se destacan como las más utilizadas: el estudio histológico mediante la Microscopía óptica, el conteo cromosómico luego de aplicar técnicas citogenéticas y los marcadores moleculares.

3.1. Estudios histológicos en el género *Stylosanthes* sp.

La evaluación histológica de los procesos de desdiferenciación y rediferenciación de tejidos sometidos a cultivo *In Vitro* constituye un complemento para la determinación de la influencia que la aplicación de estas técnicas pueden tener sobre la estabilidad genética de las muestras en cultivo. Según Pierik (1990) el cultivo *In Vitro* de células puede obtenerse a partir de meristemos apicales (centros de crecimiento), elementos vasculares y/o elementos de las traqueidas, o la producción espontánea de embriones, en presencia de diferentes estímulos. La examinación por microscopía del tejido a diferentes etapas del cultivo puede contribuir a comprender la secuencia del desarrollo de la plántula. También es muy útil la inclusión de muestras de tejido intacto con resinas inertes para posteriormente

realizar cortes histológicos examinar el efecto histopatológico de un patógeno en su lugar de incidencias.

Las preparaciones de las muestras biológicas pueden dividirse en 5 grandes etapas, estas comprenden la fijación, deshidratación, imbibición, corte del tejido, montaje y coloración de la muestra. Para algunos autores como Trigiano et al. (1999) el paso más crítico es la fijación, ya que deben conservarse las estructuras de los tejidos, de forma tal que queden sus características lo más aproximado a las que tenían en vida. Este proceso requiere de una inmersión del tejido durante al menos 24 horas en el fijador, entre los que se encuentran: el formol al 10%, el FAA (etanol-ácido acético y formol), el Navashin (ácido acético y ácido fórmico) entre otros. Entre ellos el primero es el que más rápidamente penetra en la célula y, conjuntamente con el etanol al 80%, son los que conservan indefinidamente la muestra.

Torres (1989) sugiere la utilización del fijador FAA para fijar callos, ápices radicales de leguminosas y brotes foliares de violetas, coincidiendo con Dornellas et al. (1992), quien obtuvo buenos resultados en la fijación de callos de *S. scabra* Vog. con FAA 50. Por su parte Vaquero et al. (1993) utilizó formol al 10 % para conservar callos de *Phaseolus coccineus* L., coincidiendo con Trigiano et al (1999), en cuanto a la durabilidad de los tejidos con este tipo de fijador.

La etapa de deshidratación se debe realizar mediante la inclusión del tejido en series ascendentes en la concentración del agente deshidratante, y decrecientes en agua. Generalmente se utilizan primero solventes no compatibles con las parafinas como el etanol y posteriormente un agente solubilizador de esta como el xilol o el isoamilacetato (Trigiano et al., 1999).

Una vez incluido el material vegetal en la parafina se realiza la tinción, basada en la afinidad específica entre los colorantes y estructuras celulares. Entre las tinciones más utilizadas para estudios histológicos de material cultivado *In Vitro* se encuentran el negro de clorazol-E en solución alcohólica al 70% (Torres, 1989), las combinaciones de hematoxilina y azul de anilina, safranina con verde-rápido y acetocarmín con azul de anilina (Torres, 1989; Trigiano et al., 1999). Para seleccionar la mejor variante debe tenerse en cuenta el contraste que se establece entre las diferentes estructuras

celulares observables al Microscopio óptico, como son la pared celular celulósica, la región nuclear y algunas inclusiones citoplasmáticas.

En el estudio realizado por Dornella et al. (1992), el mejor contraste en la tinción de los tejidos de callos de *S. scabra*, tanto embriogénicos como organogénicos; se logró con safranina-azul astra, mientras que para Vaquero et al. (1993) fue con safranina-verde rápido para callos de *P. coccineus* L. Sin embargo, en los cortes histológicos realizados en los callos de Stylo 184 (Fuentes 2005), de los tres tiempos utilizados para la fijación, los mejores resultados se obtuvieron cuando el material se mantenía más de 72 horas incluidos en formol al 10%; fundamentalmente en aquellos provenientes de Hi, los cuales en su mayoría eran callos más sueltos y suaves. Por menos de ese tiempo, aunque se obtienen cortes para observar al microscopio, en muchos casos hay rotura de células o pérdidas de parte del tejido. Varios autores (Dornellas, et al., 1992, Trigiano, Malueg y Graham, 1999, Fortes y País, 2000) coinciden al utilizar similar tiempo de fijación para estudios histológicos ya sea de especies del mismo género o no, o para diferentes soluciones fijadoras.

En cuanto a las variantes de tinción utilizadas por Fuentes et al (2005), la combinación safranina - verde rápido fue la que permitió obtener un mejor contraste entre pared celular y citoplasma de las células, así como una imagen más clara y nítida de los tejidos presentes en los cortes (Fig. 2).

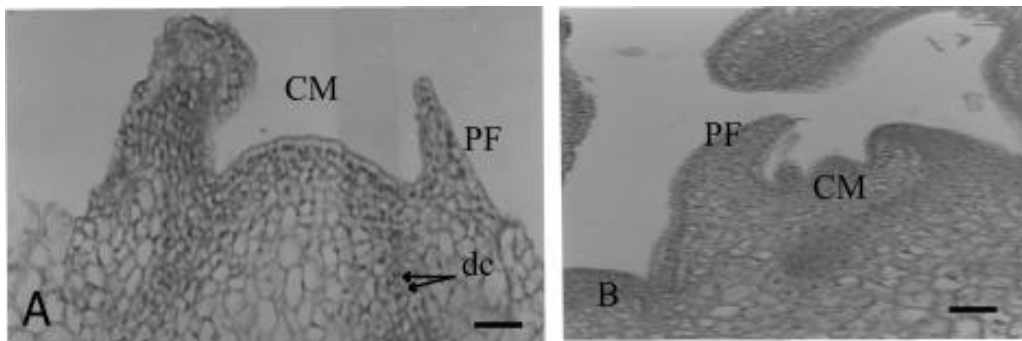


Fig. 2. Fotografía al microscopio óptico NIKON OPHITON (400 X) de cortes histológicos de fragmentos de callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, a los 25 días en medio de inducción. A) Callo de Hi en medio 2. Barra inferior izquierda= 50 μ m 2. B) Callo de HV en medio 2. Barra inferior izquierda= 100 μ m CM: cono meristemático, (PF) primordios foliares, dc: células en fase de división celular (Fuentes et al. 2005).

Dornellas et al. (1992) también utilizaron tinción con safranina pero combinada con azul astra en un estudio histológico de la organogénesis y la embriogénesis en *S. scabra*, la cual le permitió realizar una caracterización histológica, así como determinar la relación directa entre la hormona utilizada y la respuesta del tejido utilizado. También ha sido utilizada de forma exitosa en otras leguminosas como *Phaseolus coccineus* L. (Vaquero, Robles y Ruíz, 1993).

Por otra parte, como puede observarse en la figura 2, la formación del cono meristemático con los primordios foliares es apreciable ya en cortes efectuados a los callos a los 25 días en medio de inducción. Es conveniente recordar que estos callos tienen la peculiaridad de haberse formado en un medio donde la relación auxina/citoquinina fue menor que 1. Según indican Pierik (1990) y Krikorian (1995), la formación de vástagos puede producirse sobre el callo, si existe una baja concentración de auxina (aunque este no es exactamente el caso) y una alta concentración de citoquininas, siendo la 6-BAP la más eficaz. Por otra parte señalaron que la formación de estos sobre el callo, posiblemente esté influida por factores mucho más complejos que los que hasta ahora se conocen, tales como: la concentración de sales del medio de cultivo, condiciones de iluminación, entre otras.

Al analizar la estructura histológica de estos callos se observó una región periférica constituida por células con características similares a la hiperhídricas descritas por Gautheret 1957 (cit. por Dornellas et al., 1992). En algunos sectores del callo por debajo de estas células, se encontraron zonas con células de citoplasma muy denso con características meristemáticas. El resto del callo estaba compuesto por células parenquimatosas organizadas de forma compacta en algunas áreas y en otras de forma menos organizada.

También se pudieron apreciar zonas de tejido meristemático organizados en forma de bandas desde el cono meristemático hacia el interior del callo (fig. 2 B), que sugieren la formación de procambium a partir del cual se formarán los futuros tejidos vasculares. Dornellas et al. (1992) describió la presencia de nódulos vasculares en el interior del callo en los cuales posteriormente se desarrollaron el xilema y el floema manteniendo la misma orientación que en el tallo de una planta. Por su parte, Fortes y Pais (2000), describieron la formación de tejido vascular a partir de divisiones tangenciales que sufrieron determinadas células corticales de los segmentos internodales utilizados como explantes. Ello sería el

precursor de los llamados nódulos organogénicos, descritos anteriormente por otros autores como Warrag, Lesney y Rockwood, 1991 y Teng (1997).

Sin embargo, en cortes realizados por Fuentes et al (2005), a los 35 días (fig. 3) en algunos callos inducidos en las variantes de mayores concentraciones de 2,4-D (3 mg/L), los cuales desarrollaron una estructura con bordes sueltos o friables; se detectaron estructuras sin aparente conexión histológica con el resto del callo y con acumulación de células meristemáticas en su borde interno.

Según Schwarz y Beaty (1999) además de la naturaleza del explante utilizado, el tipo y concentración de hormona también puede influir en el proceso morfogénico que ocurra, donde el 2,4-D es la más utilizada y efectiva cuando lo que se desea es un callo embriogénico. Tal fue el caso de Dornellas et al., (1992) quienes obtuvieron callos embriogénicos a partir de cotiledones de *S. scabra* cultivados en presencia de esta hormona, en concentraciones superiores a los 3 mg/L.

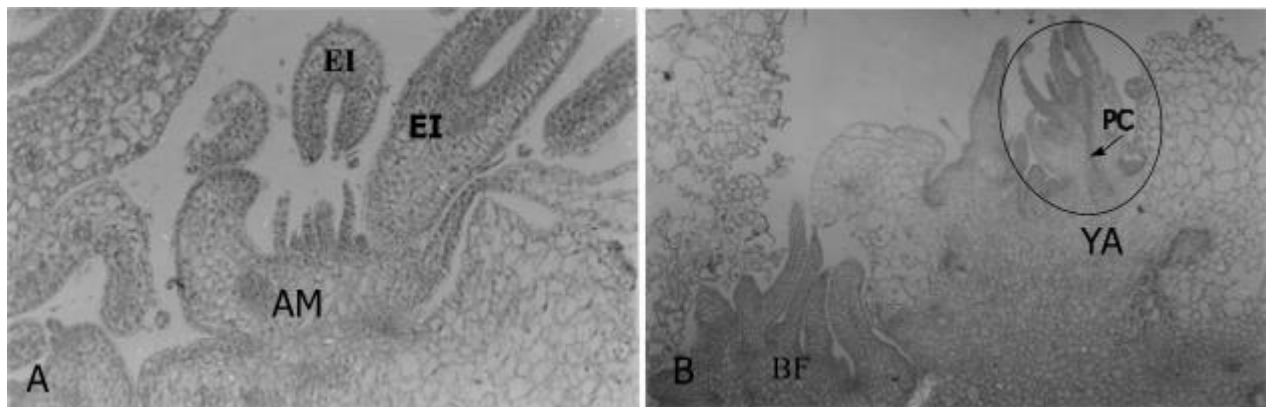


Fig. 3. Cortes histológicos de callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, a los 35 días en medio de inducción (A) y a los 10 días en medio de regeneración (B). AM: Ápice meristemático, EI: Estructuras independientes, BF: Brotes foliares, PC: Procambium, YA: Yema adventicia (Fuentes et al. 2005).

3.2. Estudios citogenéticos en el género *Stylosanthes* sp.

Varios autores han sugerido que entre los mecanismos involucrados en la generación de variabilidad genética están relacionados con diferentes causas como: cambios numéricos y estructurales a nivel cromosómico, activación de elementos transponibles, metilación de ADN y mutaciones puntuales (Peschke y Phillips, 1992). Estas últimas pueden estar ocasionadas por la ocurrencia de

recombinaciones mitóticas, tanto por crossing-over intercromátidas o intercambios intracromátidas de repeticiones invertidas, provocando pérdida o ganancia de información genética y por consiguiente, variabilidad en el número de secuencias repetidas en tándem (Phillips et al., 1994).

También se han detectado diferencias en la estabilidad genética en regenerantes, relacionadas con el tipo de explante utilizado debido a la existencia de variabilidad preexistente en las diferentes partes de la planta donora. El caso más ampliamente reconocido es la polisomatia (coexistencia de células con diferentes ploidías en el mismo tejido), la cual según lo referido por D'Ammato (1985), puede ser detectada en el 90% de las plantas. Realizando estudios en tomate, van den Bulk et al., (1990) encontró que el 58 % de los regenerantes obtenidos a partir de hipocótilos presentaban altos niveles de poliploidías, y lo relacionó con la polisomatia detectada en estos explantes a diferencia de las hojas y los cotiledones, donde apenas se observaron células no diploides.

Otros autores han hecho referencia a un mayor porcentaje de aparición de aberraciones cromosómicas asociadas a la regeneración vía organogénesis, la cual según Peschke y Phillips, (1992) involucra a varias células entre las que puede presentarse diferencias en la dotación cromosómica. Aunque se ha demostrado que también puede ocurrir en la embriogénesis somática de algunos cultivos como la alfalfa y especies del género *Citrus* L., capaces de regenerar a partir de cultivos mixoploides (Gmitter et al., 1991).

El tiempo en cultivo también ha provocado la aparición de regenerantes con diferentes niveles de poliploidías, motivado por diferentes causas como: diferencias en los requerimientos metabólicos de los tejidos en cultivo con relación a las plantas *In Vivo*; acumulación de mutaciones por un incremento en el ritmo de las divisiones celulares (Peschke y Phillips, 1992), entre otros.

El género *Stylosanthes* es altamente diversificado y polimórfico, y ello ha provocado algunas discrepancias en determinados aspectos de su taxonomía. Las primeras clasificaciones a nivel de especie estuvieron basadas fundamentalmente en la morfología del fruto y algunas otras características como: hábitos de crecimiento, tipo de venación en las hojas y número de conexiones vasculares (Vieira et al., 1993), excepto algunas consideraciones de tipo citogenéticas hechas por Cameron (1967) en seis especies diploides ($2n=20$), dos tetraploides ($2n=40$) y una hexaploide ($2n=60$). Fue por ello

que en trabajos posteriores como los de Vieira (1988), Vieira et al., (1993), se realizaron análisis comparativos detallados encaminados a aclarar aspectos de la evolución y parentescos dentro del género.

Según los estudios de Vieira et al. (1993), en el que realizaron la descripción de 12 taxa brasileños, incluyendo algunas variedades de la llamada "alianza guianensis" (*canescens*, *microcephala*, *pauciflora* y *vulgaris*) y especies relacionadas, el género presenta un patrón cariológico muy conservativo con un número cromosómico $2n=20$. Se describieron algunas diferencias en la talla y la morfología de sus cromosomas; la presencia de microsátélites en el cromosoma 10, y concluyeron que este grupo está bajo un proceso de evolución cromosómica por reordenamientos y cambios en el contenido del ADN. Más recientemente estos estudios se han complementado con los resultados obtenidos por investigadores como Kazan et al. (1993^c) y Gillies y Abbott (1996), utilizando técnicas moleculares.

En relación con la influencia del cultivo de tejidos en estudios realizados con *S. guianensis* cv. CIAT-2243, por Miles et al., (1990), se describieron varios cambios fenotípicos en regenerantes mantenidos en cultivos durante un año, provocados por un incremento en el número cromosómico de la especie originaria diploide a tetraploides. Aunque otros trabajos relativos al género *Stylosanthes* han descrito diferentes cambios tanto en caracteres tanto cuantitativos (Consoli et al., 1996, Valarini et al., 1997), como cualitativos (Meijer, 1984, Godwin et al., 1987, 1990), estos no han hecho referencia a posibles causas genéticas.

En los conteos cromosómicos efectuados en regenerantes de callos iniciales de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 (Fuentes (2001) no se encontraron cambios en cuanto a número y morfología en comparación con las plantas élites.

De los pretratamientos utilizados para el desarrollo de las técnicas citogenéticas, fue la 8-Hidróxiquinolina al 0.002M, aplicada durante tres horas; la que mejores metafases permitió observar. Singh (1993) refiere la gran efectividad de este pretratamiento para raíces de especies con cromosomas de gran talla, pero puede ser utilizado en muchas especies. El trabajo con hielo fundente tiene la gran ventaja de no ser nada nocivo a diferencia del reactivo antes mencionado, de naturaleza altamente

mutagénica; aunque es muy efectivo en otras especies de leguminosas como las del género *Lens* y en cereales (Singh, 1993) sin embargo en los ápices radicales de *S. guianensis* cv. CIAT- 184 no produjo señal alguna de acumulación de metafases.

La literatura consultada refiere el empleo de diferentes agentes químicos para realizar el pretratamiento en ápices radicales de especies y cultivares del género *Stylosanthes*. En el primer estudio realizado por Cameron (1967) se utilizó α -bromonaftaleno, para el pretratamiento de raicillas de varios cultivares australianos. Posteriormente, Vanni (1987), hizo un recuento cromosómico en *S. macrosoma*, y se refirió al empleo de 8-oxiquinoleína. Finalmente, Vieira et al. (1993) ya señalaron el uso de 8-hidroxiquinolina en un estudio más detallado del cariotipo de 12 taxa brasileños, incluyendo algunos ejemplares de la llamada “alianza guianensis”, dentro de los cuales no se encontraba el cultivar estudiado en este trabajo.

El mejor contraste se logró con la tinción Feulgen, con un squash en aceto-carmín, resultado que coincide con Vieira et al., (1993). Los restantes autores antes mencionados, aunque también utilizaron la tinción Feulgen, el squash lo hicieron en combinación con otros colorantes como la orceína lacto-ácética modificada (Vanni, 1987) y la orceína acética al 1% (Cameron, 1967).

Luego de analizar unas 20 metafases obtenidas de plántulas testigos, se comprobó que el cv. CIAT-184, también cuenta con un número cromosómico $2n=20$ (fig. 29), lo que coincide con lo informado para el género (Cameron, 1967) y para algunos integrantes de la llamada “alianza guianensis” (Vieira et al., 1993). Entre las características estructurales de los cromosomas observados se destaca el pequeño tamaño de los mismos, el cual oscila entre 1,5 y 2,5 micras, aunque algunos difieren un tanto en la longitud de sus brazos. Según los resultados obtenidos por Vieira et al., (1993) las variedades de *S. guianensis* estudiadas por ellos (*microcephala*, *canescens*, *vulgaris* y *pauciflora*), también mostraron cromosomas bien pequeños con un cariotipo bastante simétrico, a excepción de *microcephala*, así como diferencias en la longitud de los brazos de los cromosomas 1, 2 y 10, así como la presencia de microsátélites en este último para todos los taxa estudiados.

Entre los cambios más frecuentes que se han encontrado en somaclones de *Stylosanthes* está la tetraploidía observada por Miles et al., 1990 en somaclones del cv. CIAT-2243 mantenidos en cultivo

durante un año. Aunque no se hayan observado este tipo de alteración en regenerantes de poco tiempo en cultivo no se puede asegurar totalmente que no ocurran pues algunos ejemplares con cambios en su morfología externa no pudieron ser utilizados en los estudios citogenéticos por no haber enraizado adecuadamente; aspecto que se debe estudiar con más exactitud, incluyendo a regenerantes a partir de callos expuestos al medio de cultivo por tiempos prolongados.

IV. Técnicas moleculares y su utilización en el género *Stylosanthes* sp.

Los marcadores moleculares son de gran utilidad para realizar caracterizaciones genéticas de las especies de plantas con diferentes propósitos, como mapeo genético, selección mejorada en programas de mejora genética; así como para el clonaje de genes foráneos. Para poder amplificarlos y visualizarlos, en la actualidad se utilizan diferentes técnicas que permiten detectar polimorfismo en el ADN. Algunas de estas se basan en la digestión inicial del material genético con enzimas de restricción, otras dependen del uso de una reacción enzimática diferente, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (RCP), y en algunos casos se combinan ambos métodos.

El concepto de RCP, ideada por Karry B. Mullis en 1985, se aplica al proceso bioquímico *In Vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN *diana*, son duplicadas por la enzima ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción. Al final de cada ciclo las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, por lo que se logra una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso (Barrera et al., 1993).

Algunos autores agrupan estas técnicas en tres categorías: Métodos no basados en RCP, Técnicas RCP de amplificación a partir de secuencias desconocidas y Técnicas RCP-sitio-específico (Karp et al., 1997). Estas últimas se caracterizan por una alta repetibilidad de sus resultados a diferencia de las segundas y por ser menos costosas que las primeras. Además son muy aceptadas por posibilidad que brinda de amplificar fragmentos grandes de material genético con zonas de secuencia conocida para desarrollar el proceso de secuenciación. Sin embargo, según señalaran Strand et al., (1997) existen algunas desventajas motivadas por la necesidad de tener *primers* de secuencia conocida, que puedan ser utilizados en la amplificación de fragmentos específicos, útiles en estudios de polimorfismo

genético fundamentalmente en taxa inferiores al de especies; por lo que en la actualidad se encaminan los esfuerzos hacia la búsqueda de secuencias universales.

Las plantas poseen tres genomas diferentes, y por tanto tres fuentes potenciales de secuencias para el desarrollo de las RCP de secuencia específica (de las siglas en inglés STS: 'sequences-tagged-sites'): el genoma de los cloroplastos (ADNcp); el genoma mitocondrial (ADNmt) y el genoma nuclear (Demesure et al., 1995). En este último, los marcadores más utilizados son los de la familia de los ADNr (ADN ribosomales). Los genes ADN ribosomales están localizados en loci específicos del cromosoma (ONR: organizador nucleolar ribosomal), donde ellos están organizados en tándem repetidos, los cuales pueden reiterarse hasta miles de veces. Cada unidad repetida contiene una región de transcripción separada de la siguiente por un espaciador intergénico.

Dentro de esta familia de genes ribosomales se encuentran los genes Rrn5, los cuales se ubican como familia multigénica agrupada en dos o tres grupos en diferentes cromosomas y están conformados por unidades repetidas en tándem de una región altamente conservada (la secuencia codificadora para el ARN 5S) de aproximadamente 120 nucleótidos, separadas por una región de longitud variable (espaciador Rrn5), la cual puede diferir en longitud (200-500 pb), en secuencia o en el número de copias de unidades repetitivas. Esta familia génica aparece con mayor frecuencia en el genoma nuclear que otras familias de genes ribosomales, y varios autores han realizado su amplificación (Barciszewska et al., 1994; Ko y Henry, 1996; Brasier et al., 1999) en diferentes estudios de polimorfismo inter e intraespecíficos.

En la literatura consultada no se refiere la amplificación de este marcador molecular en miembros del género *Stylosanthes*, ni de otro tipo de marcador en estudios de evaluación de la variabilidad inducida por cultivo de tejidos. Si se han realizado otros estudios de interés taxonómico en diferentes especies del género con otros marcadores tanto de secuencia específica, a partir de otros *primers* seleccionados de clones genómicos y de genes de secuencia conocida por los investigadores Liu et al. (1996); como marcadores amplificados al azar (RAPDs) por Kazan et al. (1993^{a,b,c}); así como estudios de polimorfismo genético entre diferentes accesiones comparando las longitudes de fragmentos de restricción obtenidos a partir de ADNc y de ADN genómico (Liu y Musial, 1995; Gillies y Abbott, 1996).

En otras especies como la caña de azúcar se han realizado estudios de evaluación de determinadas técnicas como los RFLPs y los RAPDs para detectar variabilidad somaclonal en regenerantes, y sus ejecutores (Chowdbury y Vasil, 1993; Taylor et al., 1995, respectivamente) han concluido que estas son poco sensibles para detectar pequeños cambios que pudieron ser originados. Sólo fue posible revelar la ocurrencia de polimorfismo en callos derivados de protoplastos que manifestaron cambios notables en las secuencias amplificadas.

En la bibliografía consultada sobre la utilización de marcadores moleculares en el género *Stylosanthes*, no se halló referencias sobre su uso como complemento en los estudios de variación somaclonal de la especie. La mayoría de los trabajos han estado destinados a resolver algunas cuestiones de la tan controvertida taxonomía de este género.

Varios autores como Kazan et al. (1993^{b,c}) se vieron precisados a evaluar diferentes protocolos de extracción del ADN genómico para poder amplificar marcadores RAPDs y RFLPs, a consecuencia de una alta contaminación con polisacáridos acompañantes al material genético. Luego de probar disímiles alternativas, llegando incluso a la purificación en gradientes de cloruro de cesio (CsCl), sólo pudieron obtener algunos resultados con los primeros marcadores.

Fueron Liu y Musial (1995) quienes lograron amplificar marcadores RFLPs, luego de utilizar material liofilizado para extraer ADN genómico y cloroplástico y realizar algunas modificaciones a un buffer formado por Tris- HCl y SDS (dodecilsulfato de sodio), entre otros elementos. Según estos autores la liofilización favorece la precipitación de los contaminantes acompañantes del ADN, en un volumen bajo de isopropanol (0,1- 0,2%).

Un paso importante dentro de la amplificación de marcadores moleculares es el aislamiento y purificación del genoma nuclear. En ocasiones, en el caso de las plantas este puede estar acompañado de contaminantes inhibidores de la RCP, como la goma ghatti, formada por un 9,5 % de ácido glucorónico (Demeke y Adams, 1992). Existen diversos protocolos y hasta Kits (Puregene Nucleon) de purificación de ADN genómico de plantas que van desde el empleo de pases sucesivos en solventes orgánicos como los propuestos por Dellaporta et al (1983); Edwards et al (1991) Afanador et al.

(1994) y Zhu et al. (1993) con algunas diferencias en el número de pases sucesivos por cada solvente y la formulación de las soluciones tampones iniciales, los que sugieren la utilización de polímeros como TWEEN 20, DMSO (dimetil sulfóxido) o PEG (Polietilenglicol) como el propuesto por Demeke y Adams, (1992) y el Kit Puregene (Gentra System) que se basa en el empleo de PVP (Polivinil pirrolidona) y los que utilizan además procesos físicos como la liofilización (Liu et al., 1995).

Utilizando esta última alternativa se continuaron los trabajos de amplificación de otros marcadores más exigentes como los STS (sequences- tagged- sites: secuencias sitio específico) (Liu et al., 1996), lo cual fue posible aún cuando los propios autores sugirieron la necesidad de continuar optimizando estos métodos pues no siempre se obtienen los resultados deseados. Otros investigadores también han incursionado en la amplificación de fragmentos de restricción a partir de ADN cloroplástico (Gillies y Abbott, 1996).

La generalidad de estos estudios ha permitido establecer nuevas relaciones filogenéticas, como el posible origen de la especie tetraploide *S. hamata* L. a partir del diploide *S. humilis* Kunth (Kazan et al., 1993^b) Otro resultado importante detectado por todos los autores antes referidos en este epígrafe fue el bajo nivel de polimorfismo observado dentro de cada especie lo cual fue relacionado con la naturaleza predominantemente autógena de estas especies. Liu et al., (1996) concluyeron, además, que el bajo nivel de especificidad genómica de los marcadores STS era una evidencia de poca divergencia en estas especies, por lo que debían de utilizarse otros marcadores de secuencia específica que permitieran detectar variabilidad a niveles infraespecíficos.

Entre los marcadores de secuencia conocida (RCP-sitio-específico), los ADN_r han sido los más utilizados para diferentes estudios (Zhang et al., 1990). Dentro de esta familia, los genes Rrn5 aparecen con mayor frecuencia que cualquier otra familia de genes ribosomales (Barciszewska et al., 1994). Ellos se ubican en una familia multigénica, conformados por unidades repetitivas en tándem de una región altamente conservada (gen Rrn5) separadas por el espaciador del mismo nombre, el cual puede diferir entre especies en longitud, secuencia o número de copias de unidades repetitivas. Estos marcadores son menos costosos que otros de los mencionados como los RFLPs y AFLPs, y tienen la ventaja de una alta repetibilidad a diferencia de los RAPDs.

Para lograr su amplificación Fuentes (2000), utilizó varios protocolos de extracción de ADN genómico a partir de células de callos formados a partir de Hi. En la tabla 2 se recogen los principales resultados obtenidos. El protocolo de Dellaporta et al. (1983), permitió obtener cantidades apreciables de ADN genómico con poca contaminación de proteínas. Sin embargo la electroforesis mostró un ADN algo degradado en todas las muestras comparadas. Este protocolo emplea pases sucesivos en solventes orgánicos como solución de cloroformo octanol (24:1), dos veces en cloroformo isoamílico (24:1), que aunque pueden ser eficientes en la eliminación de proteínas, pueden contaminar la muestra o provocar degradación de las mismas. Según Wallace (1987) la habilidad para obtener ácidos poco degradados, utilizando extracciones con solventes orgánicos como el fenol depende de los métodos para inhibir nucleasas, lo cual pudiera resolverse con la adición de EDTA. Realmente este elemento es un componente del buffer de extracción que propone el método, pero todo parece indicar que para el material utilizado en este trabajo no resulta eficiente.

Tabla 2. Evaluación de protocolos para extraer DNA en muestras liofilizadas de callos de *Stylosanthes guianensis* cv CIAT 184 (Fuentes 2000).

PROTOCOLOS	RAZON 260/280	DNA ng/ μ l	PROTEINAS
Dellaporta et al. 1983	1.8-2.0	300	+
Afanador et al. 1994	1.6-2.0	90	++
Edwards et al. 1991	1.78-2.0	200	+
Zhu et al. 1993	1.78-2.0	500	---
Kit Puregene	1.3-1.5	20	---

Con el método desarrollado por Afanador et al. (1994), se obtuvo poca cantidad de ADN genómico, y algún residuo de proteínas; sin embargo las muestras electroforetizadas no mostraron señales de degradación como en el caso anterior. Este protocolo utiliza cloroformo: isoamílico (24:1) una vez, lo cual puede ser la causa de una menor degradación y una mayor cantidad de proteínas. Los intentos de amplificar el marcador molecular no fueron posibles con este DNA, a pesar de que se obtuvieron bandas útiles en algunas pruebas de amplificación de marcadores RAPDs, lo cual no fue posible con el ADN extraído con el protocolo de Dellaporta et al. (1993) y donde corrobora los resultados obtenidos en *Phaseolus vulgaris*, donde fue utilizado con ese objetivo. En esa especie la productividad promedio para 1500 ejemplares fue de 78 ng/μl en un volumen final de 100 μl de buffer Tris-EDTA (TE), similar a lo obtenido en esta experiencia. Afanador et al. (1994) agrega que utilizando el buffer CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) se puede eliminar una mayor cantidad de residuos celulares que empleando solución tampón Tris. Sin embargo, todo parece indicar que esto no es suficiente en el caso de *Stylosanthes*, género en el cual el aislamiento del ADN se dificulta pues este presenta un alto contenido en polisacáridos acompañantes (Kazan, Manners y Cameron, 1993^b).

Algunos autores (Demeke y Adams, 1992) sugirieron la utilización de polímeros como Tween 20, DMSO (dimetil sulfóxido) o PEG (polietilenglicol) para eliminar polisacáridos de alto peso molecular (ej. la goma ghatti, formada por 9.5% de ácido glucurónico, compuesto natural de las leguminosas, el cual es un fuerte inhibidor de la reacción PCR); pues como ellos señalan la mayoría de los métodos convencionales pueden remover proteínas pero no son efectivos para remover polisacáridos, los cuales son contaminantes muy comunes de ADN extraído de plantas (Do y Adams, 1991). El Kit Puregene basa su eficacia en el empleo de PVP (Polivinil pirrolidone) para provocar lisis celular. Es un protocolo diseñado para pequeñas cantidades de material (20-60 mg. de tejido liofilizado), y consume poco tiempo, lo cual constituye una ventaja. Sin embargo, las bajas concentraciones de ADN aislado evidenciaron que los resultados obtenidos en esta evaluación fueron poco confiables, lo cual fue comprobado en la electroforesis donde se revelaron bandas muy tenues o ausencia de ellas en algunos casos.

Al utilizar el protocolo de Edwards et al., (1991), se pudo constatar que era posible emplearlo para aislar ADN en óptimas condiciones para amplificar el marcador de interés cuando se utilizan muestras

liofilizadas de hojas, pero en el caso de las muestras de callos no se lograba una respuesta homogénea en la amplificación por PCR. Este protocolo permite extraer ADN a partir de cantidades limitadas de material vegetal y tiene la ventaja de no utilizar extracciones con cloroformo o fenol.

Kazan, Manners y Cameron (1992) utilizan este método para aislar ADN a partir de hojas jóvenes de especies de *Stylosanthes* de interés agronómico, con el objetivo de realizar estudios de herencia de marcadores RAPDs. Por su parte Liu y Musial (1995) utilizaron un protocolo parecido aunque con algunas modificaciones para estudios de polimorfismo de marcadores RFLPs en clones de ADN genómico y cADN (ADN cloroplástico) y posteriormente, Liu, Musial y Smith (1996) lo emplearon en estudios comparativos de especificidad genómica de marcadores STS (sequence- tagged- sites).

Con el protocolo de Zhu et al. (1993) se logró obtener un ADN en todas las muestras utilizadas aprovechable para amplificar el Rrn5 (Fuentes et al., 2000). Con este método el ADN es liberado con menor daño mecánico provocado por el cloruro de bencilo, el cual destruye las paredes celulares de las plantas, hongos o bacterias por reacción con el OH libre de los polisacáridos, los cuales según Raina y Chandlee (1996) pueden ser eliminados hasta en un 80%; además de tener la propiedad de eliminar las proteínas y otros residuos celulares desde la fase acuosa (Zhu et al., 1993).

La electroforesis del producto de amplificación mediante PCR del espaciador ribosomal Rrn5 en muestras de ADN extraídas de hojas liofilizadas de plantas testigos y de muestras liofilizadas de callos de tres subcultivos de Stylo 184 (Fuentes 2000); muestra una banda de 250 pb. aproximadamente sin diferencias aparentes en la longitud de las mismas, por lo que se puede inferir que en las muestras comparadas no ocurrieron las alteraciones genómicas de tipo deleciones o duplicaciones, las cuales afectan la longitud del fragmento.

En la literatura consultada no se refiere la amplificación de este marcador en la especie. Se han realizado estudios para determinar especificidad genómica con otros marcadores moleculares como los STS amplificados a partir de 20 primers seleccionados de clones genómicos y de genes de secuencia conocida (Liu et al., 1996).

El conocimiento actual de la organización de los genes de RNA ribosomal y sus espaciadores intergénicos se debe a la utilización de diferentes técnicas experimentales como el análisis de fragmentos de restricción del ADN genómico, determinación de la secuencia de nucleótidos y temperaturas de fusión de moléculas híbridas de DNAr.

Estos marcadores han sido utilizados para estudios de polimorfismo entre y dentro de especies de gramíneas para identificar individuos en poblaciones mezcladas (Ko y Henry, 1996). En las especies de cereales utilizadas (trigo, arroz, sorgo, maíz, avena, centeno y cebada), se determinó la posibilidad de amplificar más de un fragmento cuyas longitudes pueden oscilar entre 190 y 345 pb, con la excepción del centeno con una sola. Sin embargo, la banda de mayor intensidad para la mayoría de las especies, tiene una longitud entre 190 y 345 pb, rango en el que se ubica el fragmento amplificado en el presente experimento.

V. Transformación genética en *Stylosanthes guianensis* Sw.

Se entiende por transformación genética de plantas, la transferencia de genes exógenos (foráneos) al interior del genoma vegetal, los cuales previamente han sido modificados *in vitro* para permitir su expresión. En un programa de mejoramiento de cultivos por Ingeniería Genética, el aislamiento de genes de interés es un paso inicial y obligado, posteriormente, es necesario elegir el método para introducir dichos genes en el interior del genoma de la planta. La utilización de métodos biológicos o directos estará en función de la especie, del tipo de material vegetal que se empleará y de su capacidad de regeneración (Gil et al., 1998).

La transformación mediada por entes biológicos se basa en el empleo de microorganismos que infectan a la planta, a la que de forma natural le transmiten parte de la información genética que hospedan, como ocurre con las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* y algunos virus de plantas. Entre los métodos directos de transformación, los cuales se caracterizan por facilitar el movimiento del ADN foráneo directamente a través de la pared celular y de la membrana, se destacan: el biolístico, la electroporación, la microinyección, el ultrasonido y el empleo del polietilenglicol o de fibras de carburo de silicio. Las membranas biológicas están compuestas de fosfolípidos, moléculas antipáticas que tienen un grupo hidrofílico en la cabeza, unido a una cola hidrofóbica. Ante un campo

eléctrico son capaces de polarizarse y se forman poros transmembranas mantenidos por los pulsos eléctricos, a través de los cuales se pueden mover moléculas cargadas hacia el interior de la célula y del núcleo, donde se puede promover la transformación genética (Newmann et al., 1982).

Los primeros intentos de transformación genética de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. fueron realizados desde la década del 80 del siglo pasado, mediante métodos biológicos empleando a *Agrobacterium tumefaciens* y a *Agrobacterium rhizogenes* (Manners, 1987; Manners, 1988; Manners y Way, 1989, Sarria et al., 1994). Sin embargo, la eficiencia de transformación por esta vía es bastante baja debido a fenómenos de incompatibilidad leguminosas-bacterias (Ankenbauer y Nester, 1993; Consoli et al., 1995; Mauro et al., 1995; Yang, 1993) o a efectos negativos de los marcadores seleccionados sobre la regeneración de plantas (Hoffman, 1998; Colby y Meredith, 1990).

También se han realizado intentos con métodos directos como la electroporación de protoplastos (Quecini, 1999, Quecini et al., 2001) la cual permite la introducción de ADN foráneo en una gran variedad de células y estas pueden transformarse en plántulas dependiendo de la efectividad de los protocolos de regeneración. En este trabajo se determinó que los factores limitantes en un proceso eficiente están determinados por la magnitud del campo eléctrico y la frecuencia de los impulsos, con los mejores resultados para valores de 250 V. cm^{-1} descargados por capacitores de 900 y 1000 μF . Otro elemento a tener en cuenta es el método de regeneración, por lo se han probado otras alternativas con tejido intacto como fragmentos de 2 mm^2 de hojas, cotiledones e hipocótilos (Quecini et al., 2002), obteniéndose los mejores resultados con cotiledones sometidos a campos eléctricos de 100 a 250 V. cm^{-1} . Con este trabajo se pudo demostrar la aplicabilidad de la electroporación en tejidos intactos para el género.

Queda un largo camino por recorrer hasta llegar a la obtención de plantas transgénicas aptas para llevar a condiciones de campo, pero estos esfuerzos responden a la demanda creciente en términos del uso sostenible de recursos genéticos vegetales como impulso básico para la agricultura sostenible, lo cual constituye una prioridad para Latinoamérica como refieren Izquierdo y de la Riva, 2000).

CONCLUSIONES:

La necesidad imperiosa de desarrollar una ganadería que responda a las necesidades de la población tanto de Cuba como de otros países en vías de desarrollo, afectados por dificultades económicas, cambios climáticos con severas sequías, deterioro de sus suelos por diferentes causas, entre otros; han impulsado la búsqueda y/o introducción de especies capaces de persistir en condiciones adversas para otras más exigentes. Este es el caso de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw., perteneciente a un género ampliamente explotado y estudiado en diferentes regiones e instituciones de prestigio en el mundo. Instituciones prestigiosas como el CSIRO en Australia, el CIAT en Colombia, y varias universidades de América, entre otras muchas han desarrollado líneas de investigación relacionadas con estrategias de mejora de esta u otras especies del género.

La inclusión de temáticas relacionadas en el ICA, la EEPF “Indio Hatuey” en colaboración con la Universidad de Matanzas y otras instituciones cubanas son indicadores de las perspectivas que tiene para nuestra ganadería la inclusión de este género, toda vez que la mayoría de los suelos destinados a estos fines en nuestro país están afectados por diferentes causas (salinidad, pedregosidad, acidez, etc). Aunque el desarrollo de técnicas avanzadas como la transformación genética dependa de determinados niveles de financiamiento por lo costoso de las mismas, la aplicación del cultivo de células y tejidos combinados con métodos de selección *in vitro* pueden constituir una alternativa para el desarrollo de estrategias de mejora genética para instituciones con menos posibilidades económicas.

El hecho de que el género *Stylosanthes* constituya un modelo de regeneración *in vitro* facilita los trabajos de mejora de las especies, como pudieran ser la inducción de tolerancia a diferentes condiciones de estrés abiótico (térmico, salino, hídrico), línea en la que se encuentran trabajando varias instituciones incluyendo el Centro de estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, centro al que pertenecen los autores del presente trabajo.

RECOMENDACIONES:

Esta recopilación sobre los principales resultados en la aplicación de diferentes técnicas biotecnológicas en *Stylosanthes guianensis*, debe ser actualizada frecuentemente toda vez que el volumen de trabajos investigativos relacionados con ella es grande. Además permitirá continuar los

trabajos de investigación que se desarrollan en el CEBIO encaminadas a establecer metodologías de selección *in vitro* de somaclones tolerantes a diferentes condiciones de estrés abiótico.

BIBLIOGRAFÍA:

- Afanador**, L.K, Haley, S.D and Kelly, J.D. 1994. Adoption of a “mini-prep” DNA extraction method for marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *BioTechniques* **16**: 51-52.
- Ankenbauer** , R. G. and Nester, E. W. 1993. The *Agrobacterium* Ti plasmid and crown gall tumorigenesis: A model for signal transduction in host pathogen interactions. In: Nester, E. R. (ed). Signal transduction: prokaryotic and simple eukaryotic systems. Academic Press Inc. New York, pp. 67-104.
- Amezquita**, María Cristina; Toledo, J. M. and Keller-Grein, G. 1991. Agronomic performance of *Stylosanthes guianensis* cv. *Pucallpa* in the American tropical rain forest ecosystem. *Tropical Grassland (A.C.T)*. **25**(3):262-267.
- Barciszewska**, M.Z., Szymanski, M., Specht, T., Erdmann, V. A. and Barciszewski, J.1994. Compilation of plant 5S ribosomal RNA sequences on RNA and DNA levels. *Plant Science* **100**: 117-128.
- Barrera**, H. A.; Ortíz, Rocío; Rojas, A. y Resendez, D. 1993. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*. Enero/Febrero: 50-60.
- Beyl**, Caula A. 1999. Getting started with tissue culture media preparation, steril technique and laboratory equipment. In: Trigiano, RN and Grey, DJ (eds). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. LLC: 21-38.
- Brasier**, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 5878-5883.
- Cameron**, D. F. 1967. Chromosome number and morphology of some introduced *Stylosanthes* species. *Austr. J. Agric. Res.*, **18**: 375-9
- Cameron**, D. F.; Chakraborty, S.; Davies, R. D.; Edye, L. A.; Irwin, J. A. G.; Manners, J. M. and Staples, I. B. 1989. *A multidisciplinary approach to anthracnose diseases of Stylosanthes in a Australia*. Proceedings of the XVI International Grassland Congress, 4-11 de octubre 1989, Nice, France. 719-720.

- Cameron**, D. F.; Charchar, M. J. D'A.; Fernández, C. D.; Kelemu, S. and Chakraborty, S. 1997. Biodiversity, epidemiology and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides*. III. Field evaluation of *Stylosanthes* species for antracnosis resistance in their centre of diversity. *Tropical Grasslands* **31**: 402-407.
- Chakraborty**, S., Cameron, D. F. and Lupton, Janet. 1996. Management through improved understanding- a case history of *Stylosanthes* anthracnose in Australia. In: *Pasture and Forage Crop Pathology*. Miscellaneous Publication. Am. Soc. of Agronomy, Crop Science Soc. of America and Soil Science Soc. of America. Madison, WI 53711, USA. pp 603-619.
- Chowdhury**, M. K. U. and Vasil, I. K. 1993. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). *Theor. Appl. Genet.* **86**: 181-188.
- CIAT**, 1985. Biotechnology. *Informe Anual. Pastos Tropicales*. Documento de Trabajo #24. Cali, Colombia. pp 41-56.
- CITMA**, 1997. *Estrategia Ambiental Nacional. República de Cuba*. Ediciones Geo.
- Colby**, S. M. and Meredith, C. P. 1990. Kanamycin sensitivity of culture tissue of *Vitis* sp. *Plant Cell*. Rep. 9 :237-240.
- Consoli**, L.;Vieira, M. L. C.; Lopes de Souza, C. Jr. and Garcia, A. A. F. 1996. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics*. **19**: 3, 469-474.
- Crespo**, G. Y Curbelo, F. 1990. Response of *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 to phosphoric fertilization in a luvisol of Pinar del Río province. *Cuban. J. Agric. Science*. **24**: 131-138.
- Crespo**, G.; Ruiz, T. E. and Febles, G. 1995. Agronomy of tropical perennial legumes. *Cuban Journal of Agricultural Science*. **29**:2, 119-131.
- D'Ammato**, F. 1985. Cytogenetics of plants cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **3**: 73-112.
- Darias**, R. 1993. *Recopilación de temas sobre técnicas de cultivo in vitro*. Disertación de curso de Postgrado en la Universidad de Oruro, Bolivia. 168 pp.
- Davies**, B. J. 1964. Disc-electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **12**: 404-427.

- Dellaporta**, S.L., Wood,J., and Hicks,J.B. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant. Mol. Biol. Reporter*.1:19-21.
- Demeke** T. and Adams R. P. 1992. The Effects of Plant polysaccharides and Buffer Additives on PCR. *Biotechniques*. **12**(3):332-334.
- Demesure**, B., Sodzi, N. and Petit, R. J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plant. *Mol. Ecol.* **4**: 129-131.
- Devlin**, 1982. *Fisiología Vegetal*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 400 pags.
- Do**, N. and Adams, R. P. 1991. a simple techniques for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *Bio Techniques*. 10: 162.
- Dolezel**, J.; and Novak, F. J. 1986. Sister chromatid exchanges in garlic (*Allium sativum* L.) callus cells. *Plant Cell Rep.* 5: 280-283.
- Dornelas, M. C., Vieira, M. L. C. and Appezatto da Gloria, B. 1992. Histological Analysis of Organogenesis and Somatic Embryogenesis Induced in Immature Tissues of *Stylosanthes scabra*. *Annals of Botany* **70**: 477-482.
- Duncan**, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, **11**: 1-42.
- Edwards**, K.C., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis.. *Nuc. Acids. Res.***19**:1349.
- Edye**, L. A. 1984. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. In: Stace, H. M. and Edye, L. A., (eds). *The Biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, 547-570.
- Fortes, A. M. and. Pais, M. S. 2000.** Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (*Cannabaceae*): histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany*. 87:971-979.
- Fuentes**, Leticia; Mesa, A.; García, P.; Fernández, M.; Sosa, D. and Llorente, A. 2000. Amplificación del marcador molecular Rrn5 en ADN extraído de callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 23: 25-31.
- Fuentes**, Leticia. 2001. Estudio de la organogénesis indirecta de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. Tesis presentada en opción de la maestría en Biología Vegetal. Universidad de La Habana.

- Fuentes**, L.; Mesa, A.; Ruíz, M. L.; Peláez de Lucas, M. I. and Fernández, M. 2005. Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 28(3):199-202.
- Gil**, V., Martínez, Sandra and Mas, Leticia. 1998. Transformación Genética. In: Perez Ponce, JN. (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 369-390. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba.
- Gillies**, A. C. M. and Abbott, R. J. 1996. Phylogenetic relationships in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae) based upon chloroplast DNA variation. *Plant Systematic and Evolution*. **200** (3-4): 193-211.
- Gmitter**, F. G., Jr., Ling, X., Cai, C. and Grosser, J. W. 1991. Colchicine- induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Sci*. **74**: 135- 141.
- Godwin**, I. D., Gordon, G. H. and Cameron, D. F. 1987. Callus culture- derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Plant Breeding* **98**: 220- 227.
- Godwin**, I. D., Cameron, D. F and., Gordon, G. H. 1990. Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. *Austr. J. Agric. Res.* **41**: 645- 656.
- He**, C. Z. and Schultze- Kraft, R. 1988. Pi Hua Dou 184. (*Stylosanthes guianensis* CIAT-184) nueva leguminosa forrajera en China tropical. *Pasturas Tropicales* **10**: 1, 34- 35.
- Hoffman**, L. V. 1998. Regeneracao de plantas e expressao transiente de GUS em *Stylosanthes guianensis* (Aubl.). Sw. via *Agrobacterium*. M. Sc. Thesis Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, Sao Paulo.
- Izquierdo**, J.; de la Riva, G. A. 2000. Plant biotechnology and food security in Latin America and Caribbean. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15:1-13.
- Jayansakar**, 1999. In: Trigiano, R.N. and Grey, D.J. (eds.) *Plant Tissue culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press LLC, EEUU: 3-7.
- Jimenez**, E. 1998. Generalidades del Cultivo *In Vitro*. In: Perez Ponce, JN. (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 369-390. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba.

- Kazan, K., Manners, J. M. and Cameron, D. F. 1993¹.** Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 882-888.
- Kazan, K., Manners, J. M. and Cameron, D. F. 1993².** Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. *Genome* **36**:44- 49.
- Kazan, K., Manners, J. M. and Cameron, D. F. 1993³.** Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. *Genome* **36**: 50-56.
- Kaepler, S. M. and Phillips, R. L. 1993.** Tissue culture- induced DNA methylation variation in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 8773- 8776.
- Karp, A.; Kresovich, S. Bhat, K. V., Ayad, W. G. and Hodgkin, T. 1997.** Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *IPGRI Technical Bulletins,*
- Keoboualapheth, Ch. and Mikled, Ch. 2003.** Growth performance of indigenous pigs fed with *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 as replacement for rice bran. *Livestock Research for Rural Development.* 15: 9.
- Kirkbridge, J. H. and de Kirkbridge, C. G. 1985.** Typification of *Stylosanthes* (Leguminosae) and its sections. *Taxon* **36**: 455-458.
- Kitto, S.L. 1997.** Commercial Micropropagation. *Hort Science.* 23 (6).
- Ko, H.L. and Henry, R.J. 1996.** Specific 5S Ribosomal RNA Primers for Plant Species Identification in Admixture. *Plant Mol. Biol. Reporter.* **14**(1):33-43.
- Kommamine, A.; Morigaki, T.M. and Fujimura, T. 1982.** Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. En: *Frontiers of plant tissue culture.* Thorpe, T.A.(ed). Calgary, Canada. P. 159-168.
- Krikorian, A.D. 1995.** Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. In: Davies, P.J. (ed.), *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands. 774-796.
- Kruskal, W. H. and Wallis, W. A. 1952.** Use of ranks in one criterion analysis of variance. *J. Amer. Statis. Assoc.* **47**: 583-621.
- Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R. 1981.** Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures from plant improvement. *Theor Appl. Genet.* **60**:197-214.

- Liu**, C. J. and Musial, J. M. 1995. Restriction fragment length polymorphism detected by cDNA and genomic DNA clones in *Stylosanthes*. *Theor. and Appl. Genet.* **91**: 1210-1213.
- Liu**, C. J. ; Musial, J. M. and Smith, F. W. 1996. Evidence for a low level of genomic specificity of sequence-tagged-sites in *Stylosanthes*. *Theor.. Appl. Genet.* **93**: 864-868.
- Lovato** M. B. and Martins, P. S. 1997. Genetic variability in salt tolerance during germination of *Stylosanthes humilis* H.B.K. and association between salt tolerance and isozymes. *Bras. J. Genet.* **20**: 435-441.
- Machado**, Hilda y Chao, Laura. 1980. *Stylosanthes*. *Pastos y Forrajes* **3**: 3, 321-333.
- Manner**, J. M. 1987. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Report.* **6**: 204-207.
- Manner**, J. M. and Way, H. 1989. Efficient transformation with regeneration of tropical pasture legume *Stylosanthes humilis* using *Agrobacterium rhizogenes* and Ti plasmid binary vector system.. *Plant Cell Report.* . **8**: 341-345.
- Manner**, J. M. 1988. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. *Plant Sci.* **55**:61-68.
- Maposse**, I., Muir, JP. and Alage, Albertina. 2003 Status of range and forage research in Mozambique. *African Journal of Range and Forage Science* **20** (1): 63-68.
- Meijer**, E. G. M. 1982. Shoot Formation in Tissue Cultures of Three Cultivars of the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Z. Pflanzenzuchtg.* **89**: 169-172.
- Meijer**, E.G. 1984. Some Aspects of Long- Term Tissue Culture of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (*Leguminosae*). *J. Plant Physiol.* **117**: 131-135.
- Meijer**, E. J. M. and W. J. Broughton, 1981. Regeneration of whole plants from hypocotyl-, root- and leaf -derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guianensis*. *Physiol Plantarum.* **25**: 280-284.
- Meijer** and Steinbiss, H. H. 1984. Plantlet Regeneration from Suspension and Protoplast Cultures on the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Annals of Bot.* **52**: 305-310.
- Meijer** and Szabados, L. 1990. Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp. In: Bajaj, Y. P. S., de. *Biotechnology in agriculture and forestry. Legumes and oil seed crops*. Vol. 10, London Springer Verlag, 312-322.

- Mesa**, A. R.; Lajonchere, G.; Prieto, M. and Toral, Odalis. 1993. Organogénesis en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. *Pastos y Forrajes*. **16**: 3, 207-210.
- Miles**, J. W., W. M. Roca and E. Tabares. (1991). Assesment of somaclonal variation in *Stylosanthes guianensis*. (Aubl.) Sw., a tropical forage legume. In: Roca, W. M. and Miles, J. W. (eds). Application of tissue Culture in Agriculture. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. pp 249- 256.
- Misawa**, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural services bulletin 108. 87 p.
- Morel**, G. and Martin, C. 1955. Guerison de pomme de terre demaladie a virus. C. R. Acad. Sci. Paris. P. 1315-1324.
- Mroginski**, L. A. and Kartha, K. K. 1981. Regenerations of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant Science Letters*, **23**: 245-251.
- Murashige**, T. and Skoog, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**, 473-497.
- Newmann**, E. ; Schaefer-Ridder, Y.; Wang, Y.; and Hofschneider, P. 1982. Gene transfer in myloma cells by electroporation in hight electric fields. *EMBO J.* 1:841-846.
- Peschke**, Virginia M. and Phillips, R. L. 1992. Genetic implication of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*. **30**: 41-75.
- Phillips**, R. L., Kaeppler, S. M., and Olhoft, P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 5222-5226.
- Pierik**, R: L. M. 1990. *Cultivo in vitro de plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Polhill**, R. M. and Raven ,R. H. (eds.). 1981. *Advances in Legume Systematics*. *Royal Botanic Gardens*, Kew. 425 p.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M. and Olhoft, P. 1994. Genetic Instability of Plant Tissue Cultures: Breakdown of Normal Control. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* **91**:5222-5226.
- Quecini**, V.M., 1999. Transferencia directa de genes para plantas de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Ph. D. Thesis, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, Sao Paulo.
- Quecini**, V.M., Vieira, MLC.2001. Transient gene expresión in electroporated intact tissues of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Scientiae agricola*, 58, 4, 759-765.

- Quecini**, V.M., de Oliveira, C.A., Alves, A. C, Vieira, MLC.2002. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*. 25, 1, 73-80.
- Raina**, K and Chandlee, J.M. 1996. Recovery of Genomic DNA from a Fungus (*Sclerotinia homoeocarpa*) with High Polysaccharide contaminants from DNA. *Biotechniques* **10**: 162-166
- Reynolds**, S. T. 1990. Aeschynomeneae (Benth.) Hutch. (Leguminosae) in Australia. *Austrobaileya* **3**(2): 1777-202.
- Schwarz**, G. and Beaty, T. 1999. In: Trigiano, R.N. and Grey, D.J. (eds.) *Plant Tissue culture. Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press LLC, EEUU:
- Singh**, R. J (ed). The handling of plant chromosomes. In: *Plant Cytogenetics*. CRC Press, Inc., Boca Raton , Florida. pp 7- 23.
- Sousa Costa**, N. M. and Ferreira, M. B. 1984. Some brazilian species of *Stylosanthes*. In: Stace, H. M. and Edey, L. A., (eds). *The Biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, 547-570.
- Stace** and Cameron, 1984. In: Stace, H. M. and Edey, L. A., (eds). *The Biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press,
- Stace**, H. M. and Edey, L. A., (eds). 1984. In: *The Biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press,
- Strand**, A. E., Leebens-Mack , J. y Milligan, B. G. 1997. Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Mol. Ecol.* **6**: 113-118.
- Sutherst**, R.W., Wilson, L.J., Reid, R., and Kerr,J. D. 1998 A survey of the ability of tropical legumes in the genus *Stylosanthes* to trap larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust J Exp Agric* 28:473-479.
- Szabados**, L. and Roca, W. M. 1986. Regeneration of isolated mesophyl and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*. A tropical forage legume. *plant cell Reports* **3**: 174-177.
- Tabares**, E., Pachón, J. and Roca, W. M. 1991.Variación somaclonal y su aplicación en el mejoramiento de los cultivos. En: Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp 339-370.

- Taylor**, P. Y. J., Fraser, T. A., Ko, H-L., and Henry, R. J. 1995. RAPD analysis of sugar cane during tissue culture. In: Terzi, M. (ed). *Current Issues In Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 241-246.
- Teng**, W. L. 1997 An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. *Plant Cell Reports* 16: 454–457.
- Trigiano**, R. N., Malueg, Kathleen, R. and Graham, E. T. 1999. Histological techniques. In: Trigiano, R.N. and Grey, D.J. (eds.) *Plant Tissue culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press LLC, EEUU: 3-7.
- Valarini**, M. J., Otsuk, I. P. and Vieira, M. L. C. 1997. Changes in N₂ fixation in *Stylosanthes scabra* derived from tissue culture. *Brazilian Journal of Genetics*. **20** (4): 713- 716.
- van den Bulk**, R. W., Laffler, F. J. M., Lindhout, W. H. and Koornnef, M. 1990. Somaclonal variation in tomato. : Effect of explant source and comparison with chemical mutagenesis. *Theor. Appl. Genet.* **80**: 817-825.
- Vaquero**, F.; Robles, C. and Ruiz, M. L. 1993. A method for a long-term micropropagation of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cell Report*. 12: 395-398.
- Wallace**, D.M. 1987. Large- and Small- Scale Phenol Extractions. In: *Methods in Enzymology*. Abelson, JN and Simon, MI (eds). Academic Press. pp.33-48.
- Warrag**, E., M. S. Lesney, and D. J. Rockwood. 1991 Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. *Plant Cell Reports* 9: 586–589.
- Westhoff**, P., H. Jeske, G. Jurgens, K. Kloppstech, and G. Link. 1998. In: *Molecular plant development, from gene to plant*. 20–21. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Vieira**, M. L. C. 1988. Estudo citotaxonômico de espécies brasileiras do gênero *Stylosanthes* Sw. Doctoral Thesis, Univ. S. Paulo, Piracicaba. 135 p.
- Vieira**, M. L. C., Jones, B., Cocking, E. C., Davey, M. R. 1990. Plant regeneration from protoplast isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala* and *S. Scabra*. *Plant Cell Reports* **9**: 289-292.
- Vieira** , M. L. C., de Aguiar -Perecin, M. R. L. and Martins, P. S.; 1993. A Cytotaxonomic Study in Twelve Brazilian Taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae. *Cytologia* **58**: 305-311.

- Wallace, D.M. 1987.** Large- and small scale phenol extractions. In: J.N. Abelson and M.I. Simon (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York. p. 33.
- Williams, J.** and Chartres, C. J.; 1991. Sustaining productive pastures in the tropics. 1. Managin the soil resource. *Tropical Grasslands* **25**: 73-84.
- Williams, R. J.** Reid, R. J. Schultze- Kraft, R., Costa, N. M. S. and Tomas, B. D. 1984. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: Stace, H. M. and Edye, L. A., (eds). *The Biology and agronomy of Stylosanthes*. Sydney: Academic Press, 73-101.
- Withers, L. A.** 1985. preservation of germplasm. *Intl. Rev. Phytology. Suppl.*, 11B. p.101-136.
- Zhang, Q.**, Saghai- Maroof, M. A. and Allard, R. W. 1990. Effects of adeptness of variations in ribosomal DNA copy number in populations of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp *spontaneum*). *Proc.Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 8741-8745.
- Zhu, H.**, Qu, f. and Zhu, L. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants , fungi and bacteria using benzil chloride. *Nucleic Acids Research* **21**(22): 5279-5280.