

Capítulo 14

Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos

E. Tabares*

J. Pachón**

W. M. Roca*

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

** Programa de Arroz, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Variación Somaclonal

Está plenamente comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *in vitro*. Muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

Las observaciones hechas indican que esta variación, que se recupera en las plantas regeneradas, resulta tanto de las diferencias genéticas que preexisten en las células somáticas del explante como de efectos inducidos por los componentes del medio de cultivo. Por consiguiente, la variación somaclonal puede usarse, con mucha frecuencia, para recuperar la variación genética natural de una variedad.

A diferencia de otros procesos de variación genética, se ha encontrado variación somaclonal en la progenie del 15% de las plantas regeneradas; la tasa de ocurrencia de mutaciones espontáneas, p. ej., es sólo de una en un millón.

La variación somaclonal es superior también al mejoramiento por mutaciones inducidas puesto que en las plantas regeneradas que derivan de células individuales, la ocurrencia de mosaicos es mínima. En la mayor parte de los casos, por tanto, los somaclones pueden estabilizarse en una generación; las mutaciones, en cambio, requieren varias generaciones y retrocruces. La regeneración de plantas actúa como un filtro que elimina casi todos los cambios deletéreos; los cambios genéticos que interfieren con la regeneración de las plantas —por ejemplo, un bloqueo en el metabolismo primario— no pasan por variación somaclonal a las plantas regeneradas.

La variación somaclonal puede causar una variación temporal (epigenética) o una variación genética. Por definición, los cambios epigenéticos no se transmiten meióticamente, razón por la cual no son útiles en el fitomejoramiento. Una variación fenotípica tiene valor en el fitomejoramiento si proviene de una verdadera modificación del material genético, ya que una variación celular puede provenir bien de una mutación, de un cambio epigenético o de una combinación de ambos procesos (Meins, 1983).

Causas y manifestaciones

Un buen número de revisiones recientes sobre la variación somaclonal han tratado aspectos de este tema como su ubicuidad, sus posibles causas,

y su impacto potencial en el mejoramiento vegetal (Orton, 1984; Evans et al., 1984; Larkin et al., 1984; Scowcroft et al., 1987; Karp y Bright, 1985). Por su parte, los mecanismos que dan origen a la variación somaclonal son un tema de gran importancia, cuyo conocimiento permitirá principalmente aumentar el nivel de variabilidad y lograr una manipulación eficiente de las características que se desea modificar.

Es necesario entender los mecanismos que dan lugar a la inestabilidad genética durante el cultivo de tejidos, por razones de orden práctico. En primer lugar, la variación somaclonal es deseable para aumentar la ocurrencia de variabilidad en el mejoramiento de plantas; es además importante donde la uniformidad de las plantas obtenidas del cultivo de tejidos sea esencial, como en la micropropagación rápida; es importante, en tercer lugar, para la conservación del germoplasma *in vitro*; y es necesaria, finalmente, para controlar el mecanismo que genera esa misma variación.

Varios análisis han revelado un amplio espectro de eventos mutacionales que ocurren durante el cultivo de tejidos. Son ellos, por ejemplo, los mutantes que obran como clásicos mutantes mendelianos; los cambios genéticos que afectan caracteres controlados por familias multigénicas y que influyen en determinados rasgos poligénicos; y los cambios que resultan de la aparición de elementos trasportables (Scowcroft, 1984). La poliploidía y la aneuploidía, por su parte, son variantes que ocurren frecuentemente a consecuencia de reordenamientos cromosómicos, tales como duplicaciones, deficiencias, traslocaciones, y otros intercambios (Scowcroft et al., 1987).

El origen de la variación no siempre es claro, y puede diferir entre una planta y otra. Puede ser, por ejemplo, un reordenamiento cromosómico, considerado el principal mecanismo que genera la variación somaclonal; puede deberse también a un entrecruce (crossing over) somático, a un intercambio de cromátidas hermanas, a una alteración de los nucleótidos por metilación, a una perturbación de la replicación del ADN por culpa de un depósito de nucleótidos alterados, o también al silenciamiento o activación de genes por mutaciones ocurridas en regiones no codificadas.

En varias especies cultivadas se ha detectado variación somaclonal, y se ha demostrado el control genético de las mutaciones —mediante pruebas de transmisión genética o análisis de ADN— sólo en las siguientes: en tomate (color del fruto, resistencia a las enfermedades), en tabaco (color de la hoja, manchas en la hoja), en alfalfa (color de la flor), en papa (número de copias del ADN ribosomal, patrón de restricción del ADN mitocondrial), en trigo (patrón de la izoenzima ADH), y en arroz.

Se han detectado cambios en el ADN mitocondrial del maíz y la papa. La poliploidía es el cambio más frecuente observado en los somaclones. Otra variación significativa encontrada en éstos es la recombinación mitótica, que puede ser causa de mutaciones homocigóticas de genes individuales. Además, se han detectado mutaciones simples en los genes nucleares de los somaclones, y también variaciones en los genes citoplasmáticos.

Dado que los fitomejoradores han tenido acceso solamente a la variación transmitida normalmente por meiosis, la recuperación de los productos de la recombinación mitótica en los somaclones constituye la fuente de una nueva variación genética para el fitomejoramiento.

Una mutación de un solo gen ocurre en los somaclones cuando la variación no aparece en las plantas regeneradas (SC_1) pero sí aparece en una proporción de 3:1 en la progenie (SC_2) de la autofecundación. Para comprobar que el carácter en cuestión es controlado por un solo gen, se deben realizar pruebas de progenie en plantas individuales SC_2 seleccionadas: así se identifican segregantes y no segregantes y se asegura la transmisión 3:1 a las poblaciones segregantes. Las plantas mutantes no deben variar en la generación SC_3 .

El procedimiento general para buscar y seleccionar la variación somaclonal dentro de una variedad dada es el siguiente: 1) regeneración de plantas a partir de callos; 2) crecimiento de las plantas en el invernadero hasta la madurez (plantas SC_1) e identificación de las plantas SC_1 fértiles (por la formación de flores, frutos y semillas); 3) identificación de líneas mejoradas respecto a caracteres específicos dentro de las plantas SC_2 , en el invernadero, y traslado al campo de muestras, duplicadas de semillas SC_2 , de los nuevos somaclones identificados; 4) pruebas de campo según un diseño experimental apropiado para evaluar la estabilidad de los somaclones; será necesario hacer selecciones en las plantas SC_2 , para comprobar la estabilidad hereditaria; 5) reintroducción de las nuevas líneas promisorias en el cultivo de tejidos, para explorar algún carácter adicional o para mejorar el comportamiento agronómico de un somaclón relacionado con ellas; este último paso expresa el objetivo del uso de la variación somaclonal.

Potencial para el mejoramiento de plantas

Uno de los mayores beneficios de la variación somaclonal es la obtención de variabilidad genética en cultivares agroeconómicamente útiles, la cual se ha obtenido tradicionalmente recurriendo a la hibridación.

Los somaclones mutantes pueden enriquecerse durante el cultivo in vitro con las siguientes características: resistencia a enfermedades y a herbicidas, y tolerancia al estrés químico o ambiental. Además, la introgresión de genes de cultivares silvestres en especies cultivables es posible a juzgar por el reordenamiento de cromosomas observado hasta ahora en las plantas regeneradas in vitro. En general, esta técnica es relativamente sencilla, comparada con la del DNA recombinante, y es también una buena fuente de variabilidad genética; las plantas se pueden manipular fácilmente y se evalúan como parte de un programa de mejoramiento (Evans y Sharp, 1986).

La variación somaclonal será muy útil para incorporar nuevas características a una variedad, o para modificar las que ésta tiene; en efecto, la variabilidad genética inherente al somacultivo permite mejorar significativamente el valor agronómico de una especie cultivada.

En conclusión, el futuro desarrollo de la variación somaclonal depende del uso que hagan de ella los programas de mejoramiento y del establecimiento de una relación provechosa entre los investigadores del cultivo de tejidos, los genetistas y los fitomejoradores.

Variación Somaclonal en el Género *Stylosanthes*

El género *Stylosanthes* contiene algunas especies forrajeras de importancia económica que han mejorado la producción ganadera en los países de la zona tórrida. Se caracterizan ellas por su alto rendimiento de materia verde obtenida por corte, su buen crecimiento en suelos relativamente pobres, su tolerancia a la acidez, su resistencia a la sequía, su propagación y mantenimiento fáciles, y su buen comportamiento en praderas en asociación con las gramíneas. Producen forraje de gran calidad y de alto valor nutritivo y resisten el pastoreo continuo, pero desaparecen bajo el pastoreo intenso.

Stylosanthes guianensis es una leguminosa forrajera distribuida ampliamente en el centro y sur de América tropical. Ya fue introducida en Australia, Africa, Asia, y recientemente en los Estados Unidos (McIlroy, 1973).

Esta leguminosa es muy promisoría, especialmente sus cultivares del grupo 'tardío', a pesar de que el ataque de la enfermedad antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, limita un poco su

producción (Lenné et al., 1983). La antracnosis es una enfermedad endémica, ampliamente difundida en las regiones tropicales del centro y sur de América.

La eficiencia en el mejoramiento de una especie vegetal depende de la disponibilidad de la variación genética, de la selección, de la fijación genética, y de la rápida propagación de los materiales sobresalientes. Los métodos de cultivo de tejidos pueden integrarse a un programa de mejoramiento para aumentar la eficiencia de algunos de los procesos mencionados (Jaramillo, 1982).

Tres programas de fitomejoramiento se enfocan actualmente hacia *S. guianensis* (Cameron et al., 1984). Uno de ellos aplica intensamente la evaluación de repeticiones vegetativas de cruzamientos al azar, para seleccionar genotipos superiores de *S. guianensis*; este programa utilizaría, con grandes beneficios, la repetición en gran escala que proporcionan las técnicas in vitro. Cualquier programa de fitomejoramiento se puede beneficiar de las nuevas fuentes de variabilidad genética si éstas aportan genes que no se puedan obtener fácilmente de fuentes convencionales. De especial valor serían los nuevos atributos genéticos logrados en las variedades ya adaptadas.

En este capítulo se estudia la importancia de la variación somaclonal obtenida mediante el cultivo de tejidos in vitro de *S. guianensis*.

La regeneración de plantas a partir del cultivo de callos ha sido demostrada en varias especies del género *Stylosanthes*: *S. capitata* y *S. leiocarpa* (Mroginski y Kartha, 1984), *S. hamata* (Scowcroft y Adamson, 1976), *S. guianensis* (Mroginski y Kartha, 1981; Meijer y Steinbiss, 1983), y *S. humilis* (Meijer, 1982).

También han sido regeneradas plantas de suspensiones celulares de *S. guianensis* (Mroginski y Kartha, 1984; Meijer y Steinbiss, 1983). En cambio, los informes sobre cultivo de protoplastos de leguminosas han sido escasos hasta ahora (Mroginski y Kartha, 1984); se han obtenido resultados promisorios en *Trifolium repens* (Gresshoff, 1980), en *Medicago sativa* (Dos Santos et al., 1980; Kao y Michayluk, 1980; Johnson et al., 1981; Latunde-Dada y Lucas, 1983), y en *M. arborea* (Mariotti et al., 1984).

El aislamiento y el cultivo de los protoplastos de *Stylosanthes* se considera difícil (Mroginski y Kartha, 1984); la regeneración de plantas ha sido lograda solamente de protoplastos derivados de suspensiones celulares de *S. guianensis* donde la eficiencia de plaqueo fue relativamente baja (Meijer

y Steinbiss, 1983). Szabados y Roca (1986) regeneraron plantas de dos accesiones de *S. guianensis* partiendo de mesófilos foliares y de suspensiones celulares.

Materiales y métodos

Las semillas de *Stylosanthes guianensis* var. *pauciflora* CIAT 2243 fueron proporcionadas por el Dr. John Miles, del Programa de Pastos Tropicales del CIAT; provenían de una línea que venía de seis generaciones descendientes de una sola semilla mediante autopolinización, razón por la cual esas plantas se consideraron altamente autógamias y uniformes. Las semillas fueron esterilizadas con etanol al 70% (5 minutos) y con hipoclorito de sodio al 5% (8 minutos), y enseguida recibieron tres enjuagues con agua destilada estéril; luego se colocaron en tubos de ensayo que contenía el medio MS sin hormonas y solidificado con agar al 0.8%, con un pH de 5.8. Las semillas se colocaron en la oscuridad a 26°C durante 7 días para que germinaran, al cabo de los cuales se seleccionó una planta para la toma de explantes.

Se tomaron segmentos foliares de 4 mm², y segmentos de hipocótilo de 5 mm de largo, que fueron plaqueados en cajas Petri que contenían el medio MS suplementado con piridoxina (1.0 mg/litro), ácido nicotínico (1.0 mg/litro), inositol (100 mg/litro), tiamina (1.0 mg/litro), ácido naftalenacético (2.0 mg/litro) y bencilaminopurina (8.0 mg/litro).

Los cultivos se incubaron a 27°C, con una iluminación de 2000 lux y un fotoperíodo de 16/8 horas. Los primeros callos se observaron hacia los 12 días de cultivo; los callos de hoja eran compactos, clorofílicos, y ligeramente mejores que los callos provenientes del hipocótilo.

Los callos fueron inducidos, mantenidos y subcultivados en M.S. con 2.0 mg/litro de ANA y 8.0 mg/litro de BAP, en luz continua; los subcultivados se hicieron con 30 días de intervalo. Se indujo la organogénesis colocando los callos en el medio 4E (este medio está compuesto por MS, vitaminas B5, 2% de sacarosa, 0.04 mg/litro de BAP, 0.05 mg/litro de GA₃, 0.02 mg/litro de ANA, y 0.8% de agar; el pH era de 5.8).

Los callos fueron subcultivados de 30 a 60 días después de que los originales se habían establecido. Tanto de los callos originales como de los subcultivados se regeneraron plantas. Las plántulas de dos meses de edad, que tenían buen sistema radicular, fueron transferidas a una cámara de crecimiento con buena humedad relativa; cuando habían adquirido cierta consistencia, fueron trasplantadas a potes de 8 lb que contenían una mezcla de suelo:arena de 3:1, se colocaron en el invernadero hasta su total

crecimiento, y finalmente se evaluaron. Las plantas regeneradas (plantas SC₁, según la terminología de Larkin et al., 1984) fueron clasificadas según su fuente de explante (hoja o hipocótilo) y según su origen (primero y segundo subcultivo). Se obtuvieron 114 plantas (Cuadro 14.1).

Cuadro 14.1. Efecto del subcultivo sobre el nivel de ploidía en *S. guianensis*.

Subcultivo ^a	Ploidía		Totales
	2X (%)	4X (%)	
SO	83.1	17.0	71
S1	66.7	33.3	24
S2	79.0	21.1	19
Total			114

a. SO = ciclo original; S1 = primer subcultivo; S2 = segundo subcultivo.

Evaluación en el invernadero de plantas SC₁. Las plantas regeneradas crecieron, hasta su madurez, en el invernadero. Las plantas se evaluaron individualmente, antes de cosechar su semilla, para medir en ellas el grado de variabilidad. Se tomaron como base de la evaluación los parámetros más importantes, a saber, nivel de ploidía, altura de la planta, número de tallos, longitud de los entrenudos, tamaño de las hojas, tamaño de la flor, producción de semilla, y peso de 100 semillas; asimismo, se evaluó la respuesta a las inoculaciones con una suspensión de esporas de tres cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*: 46 B-CPAC, 2315 y 1808-CPAC, tarea en la que colaboró la sección de Fitopatología de Pastos Tropicales del CIAT.

En cada una de las plantas SC₁ se midió la anchura y la longitud de la hoja (en cm, promedio de 10 hojas por planta) y de las flores (en cm, promedio de 3 flores por planta); la longitud de los entrenudos (en cm), como promedio de los tres primeros entrenudos situados bajo la primera hoja completamente extendida, en cada uno de los tres tallos escogidos al azar en cada planta; la longitud del tallo más largo (en cm); el peso de 100 semillas (en mg); y la producción de semilla durante 2 meses de producción. En todas las medidas se compararon los diploides regenerados partiendo del cultivo de tejidos, las plantas testigo, y los tetraploides producidos.

Evaluación de campo de las progenies SC₂. Para comprobar si ocurre variabilidad heredable en el cultivo in vitro de tejidos de *S. guianensis*, y para evaluar el tipo y el grado de esa variabilidad, 77 plantas SC₁ (67

diploides y 10 tetraploides) produjeron suficiente semilla para la evaluación siguiente, es decir, de las progenies SC₂. Estas, junto con la progenie autopolinizada de cuatro plantas individuales de la línea autógena CIAT 2243, se evaluaron en una prueba de campo en la subestación del CIAT situada en Santander de Quilichao, Colombia (3° 06' lat. N, 990 msnm) en un suelo de arcilla orgánica de alta acidez (7.5% de materia orgánica, 74% de arcilla, pH 4.0). Se trasplantaron al campo plántulas de cinco semanas de edad, en un diseño de bloques completos al azar con 15 repeticiones. Las unidades experimentales, de una sola planta, se espaciaron en centros de 1 x 1 m. Las plantas se observaron durante un período de 12 meses y se evaluaron en esas unidades las siguientes características morfológicas:

1. Area foliar. Promedio de cinco hojas, tomadas al azar, por planta; las muestras se tomaron a los ocho meses del trasplante, y se midieron en un medidor de área portátil LICOR LI-3000 equipado con una estructura de transportador LI-3050A (LICOR Inc., Lincoln, Nebraska, E.U.).

2. Longitud del entrenudo. Promedio de los primeros tres entrenudos situados debajo de la primera hoja completamente extendida, en tres tallos tomados al azar por planta, cuatro meses después del trasplante.

3. Respuesta al ataque de antracnosis. Esta enfermedad, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, se evaluó como el promedio de seis mediciones hechas a intervalos mensuales, a los tres y a los ocho meses después del trasplante; se empleó una escala visual desde 0 (= ninguna enfermedad) hasta 5 (= planta muerta).

4. Cobertura de planta. Se midió a los cuatro meses del trasplante, tomando como referencia la rama más larga en la base del tallo.

5. Número de ramas basales. Se contaron a los tres meses del trasplante.

6. Rendimiento de semilla. Se evaluó en plantas maduras cosechadas aproximadamente un año después del trasplante; las plantas enteras se cortaron y se secaron y la semilla se trilló manualmente.

7. Peso de 100 semillas.

8. Materia seca. Se obtuvo la proporción de MS en el forraje cosechado un año después del trasplante, aproximadamente.

Los rasgos morfológicos se evaluaron en las 15 repeticiones, excepto el área foliar que se midió en siete repeticiones.

Los datos fueron sometidos a análisis estándar de varianza. Los 79 grados de libertad asignables a 'progenies' se distribuyeron en tres comparaciones ortogonales: una comparación entre las 70 líneas diploides (69 g.l.);

una comparación entre las 10 líneas tetraploides (9 g.l.); y una comparación de grado único de libertad entre diploides y tetraploides (Figura 14.1). Donde se detectaron diferencias entre líneas diploides por la prueba de F ($P < 0.05$), las líneas individuales se compararon con los promedios de las cuatro progenies testigo mediante la prueba de t, usando el término error agrupado.

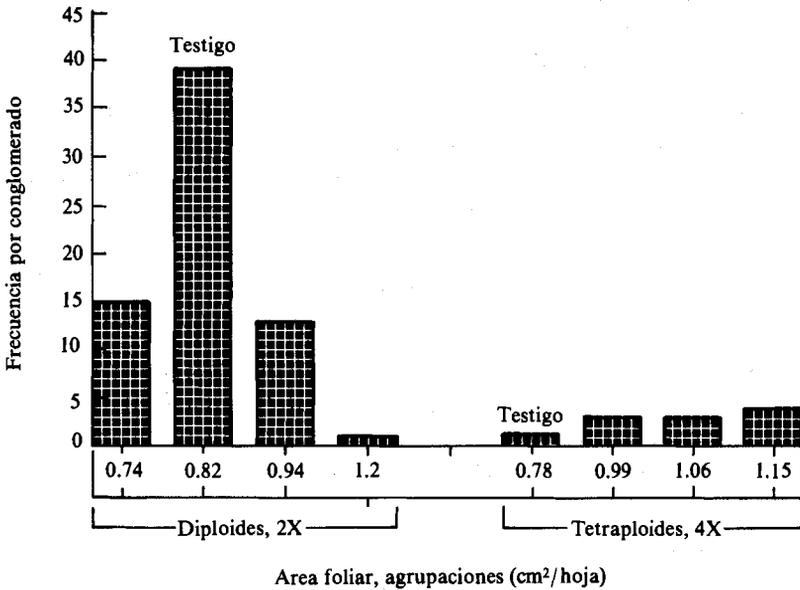


Figura 14.1. Si se clasifican en grupos de área foliar que difieren significativamente entre sí ($P < 0.05$), los conglomerados de líneas diploides presentan un área foliar que está tanto por encima como por debajo del testigo. Una línea 2X tiene valores muy altos. Todas las líneas 4X superan al testigo.

Cuando se midieron variables comparables, o sea, dimensiones de la hoja versus área foliar, longitud del entrenudo, longitud del tallo, peso de 100 semillas, así como ataque de antracnosis (Figura 14.2) y porcentaje de materia seca (Figura 14.3) —tanto en la planta progenitora (SC_1) como en las progenies (SC_2)— se calculó la regresión del promedio de la progenie respecto al valor de la planta progenitora. Estas regresiones se calcularon separadamente para los diploides (excluyendo los testigos) y para los tetraploides.

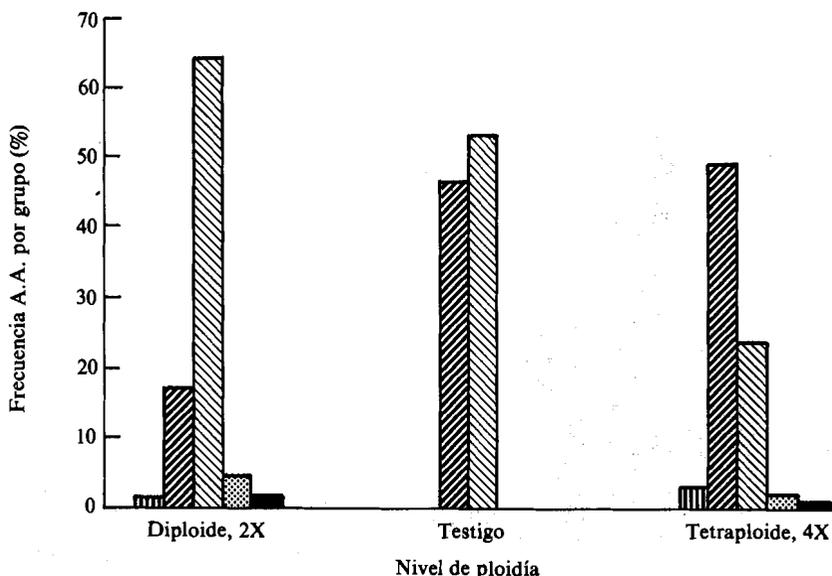


Figura 14.2. Efecto de la antracnosis respecto al nivel de ploidía. La variación en el rango del ataque de antracnosis tanto en un grupo de linaje 2X como en un grupo 4X tiende hacia ambos lados de la escala. La planta testigo, en cambio, presenta una calificación muy alta (2 y 3) en la escala de ataque de la enfermedad. A.A. = de ataque de antracnosis.

Escala: 0 1 2 3 4 5

Sin síntomas Muerta

Resultados: diploides difieren de tetraploides

En las progenies SC₁. Del análisis estadístico realizado para comparar el comportamiento de los diploides producidos in vitro, de los tetraploides y de las plantas testigo (provenientes éstas de semilla) se obtuvieron los resultados indicados en el Cuadro 14.2. Se encontraron diferencias significativas entre los diploides, los tetraploides y el testigo en la altura de planta, la longitud del entrenudo, la producción de semilla, el peso de 100 semillas, así como en la diferente respuesta a la inoculación con las tres cepas ya mencionadas. Estas diferencias se atribuyeron al cambio en el nivel de ploidía.

En las progenies SC₂. En cinco de los ocho rasgos medidos, las líneas diploides y tetraploides difirieron entre sí (Cuadro 14.3). Donde se midieron los rasgos comparables en las generaciones SC₁ y SC₂, las diferencias entre tetraploides y diploides se ajustaron al mismo esquema, es decir,

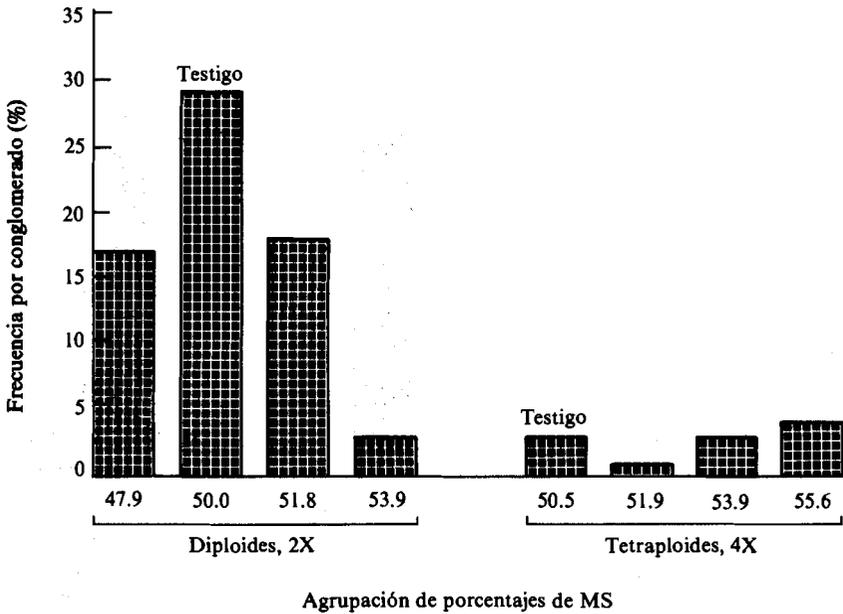


Figura 14.3. Agrupación según el porcentaje de materia seca (PMS). Como en la Figura 14.1 (agrupaciones según el área foliar), hay líneas 2X por debajo (según la frecuencia en la población, principalmente) y por encima (según el PMS) del testigo ($P < 0.05$). La mayor parte de las líneas 4X tienen un contenido de materia seca (en porcentaje) más alto que el del testigo; el máximo PMS, en promedio, se presentó en las líneas 4X.

Cuadro 14.2. Morfología de las plantas SC_1 de *S. guianensis* CIAT 2243 regeneradas a partir de cultivos de callos, por comparación con las plantas testigo.

Plantas ^a		Altura de planta (m)	Longitud de entrenudo (cm)	Brotos por pie (no.)	Relación ancho/largo		Pubs. ^b
Tipo	No.				En hoja	En flor	
Testigo	6	1.2	3.6	23	0.20	0.50	2
2X (Dipl.)	72	1.3	4.5	23	0.13	0.46	3
4X (Tetr.)	24	1.5	5.5	17	0.21	0.60	4

a. Dipl. = diploide, Tetr. = tetraploide.

b. Pubescencia (= Pubs.) evaluada en plantas de 5 meses aplicando la escala: 1 = ausente; 2 = baja; 3 = moderada; 4 = alta; 5 = muy alta.

Cuadro 14.3. Medias^a de siete caracteres evaluados en la progenie autogámica de plantas diploides o tetraploides de *Stylosanthes guianensis*, regeneradas de un cultivo de tejidos.

Carácter	Media en plantas: ^b	
	Diploides	Tetraploides
Area foliar ^c (cm ²)	0.818	1.142***
Tallos ^d (no.)	3.3	3.3 n.s.
Longitud del entrenudo ^e (cm)	4.16	4.32**
Radio máximo de la planta ^f (cm)	97.4	75.7***
Materia orgánica (%)	50.14	54.03***
Reacción a la antracnosis (calificación) ^g	2.7	2.5 n.s.
Rendimiento de semilla (g/planta)	0.317	0.093***
Peso de 100 semillas (mg)	219.4	217.8 n.s.

a. Tomadas en 15 repeticiones de planta individual.

b. Se evaluaron 70 diploides y 10 tetraploides.

c. Media de cinco hojas por unidad experimental (planta).

d. Número de ramas procedentes de la base del tallo principal.

e. Media de tres entrenudos medidos en cada uno de los tres tallos evaluados en cada unidad experimental.

f. Longitud de la rama lateral más larga.

g. Media de seis evaluaciones visuales de la severidad de la enfermedad hechas durante un período de 6 meses según una escala de 7 puntos, donde 0 = sin síntomas, b = planta muerta.

, * Hay diferencia en las medias a $P < 0.01$ o $P < 0.001$, respectivamente; n.s. = las medias no difieren a $P > 0.05$.

hojas más grandes, entrenudos más largos y tallos más cortos en las tetraploides que en las diploides. El peso de la semilla de las plantas tetraploides SC₁ fue mayor que el de las diploides, pero no se diferenció por ploidía en las líneas SC₂.

Evaluación de campo de la progenie SC₃. Las semillas autopolinizadas obtenidas de las líneas SC₂ germinaron en el invernadero, y las plántulas de dos meses de edad se llevaron luego al campo (en la subestación CIAT-Quilichao) y se compararon con la línea testigo CIAT 2243. Estas líneas fueron seleccionadas según las evaluaciones realizadas en la generación SC₂ (Cuadro 14.4).

En la segunda generación sexual, ninguna de las líneas diploides difirió del testigo; no obstante, la línea 26 fue significativamente más tolerante a la antracnosis que la línea testigo, y la línea 5 (tetraploide) mostró una tolerancia y un vigor significativamente altos con relación al testigo.

Estos resultados demuestran que las tres características mencionadas en las líneas 26 y 5 fueron estables y se transmitieron a sus progenies en la

Cuadro 14.4. Características principales evaluadas en las líneas SC₃ seleccionadas.

Línea SC ₂ (serie)	Ploidía	Características principales
18	2X	Area foliar, vigor
26	2X	Reacción a antracnosis, producción de semilla
52	2X	Vigor
57	2X	Vigor
5	4X	Vigor, reacción a antracnosis

generación SC₃. Asimismo, los fenotipos raros observados en la generación SC₂, como plantas cloróticas y plantas de tipo arbustivo, fueron transmitidos también a su progenie (líneas SC₃).

Discusión: tetraploidía estable y regeneración

La inducción de la variación heredable mediante el cultivo in vitro se ha demostrado en varias especies vegetales (Larkin et al., 1984), aunque no lo había sido anteriormente para *S. guianensis*. El principal efecto que el cultivo in vitro de callos causó en la línea *S. guianensis* empleada fue una tasa relativamente alta de inducción de tetraploidía. El hecho de que los tetraploides difirieran fenotípicamente de los diploides sugiere que la inducción de la tetraploidía se puede explotar para el mejoramiento de *S. guianensis*. Aparentemente, las diferencias fenotípicas entre los genotipos tetraploides y diploides inducidos son estables, por lo menos más allá de una generación sexual. Sin embargo, hubo indicios de que el rendimiento de semilla sería menor en las líneas tetraploides que en las diploides, lo cual se explica por el nivel de ploidía.

La evaluación de varios caracteres fenotípicos reveló un amplio rango de variación entre los diploides regenerados in vitro, los tetraploides y el testigo, y señaló además la ocurrencia de doblamiento cromosómico. Se indujo también variación heredable de varios caracteres en las líneas diploides y tetraploides.

En algunos de los caracteres analizados hubo diferentes significancias entre las líneas diploides y tetraploides, y dentro de ellas, así como entre las progenies y el testigo (Figuras 14.1 y 14.2).

Se transfirieron en total 114 plantas regeneradas; de ellas, el 80% parecen morfológicamente normales, aunque hubo una considerable variación en

el vigor observado en dos generaciones sexuales, SC₂ y SC₃. Las demás plantas exhibieron anomalías respecto a la forma y al tamaño de la hoja, al grosor del tallo, a la longitud de los entrenudos, y al color de la flor. Este estudio mostró finalmente que es posible regenerar varios fenotipos de *S. guianensis* partiendo del cultivo de tejidos de esta leguminosa.

La regeneración de un gran número de plantas permitiría la obtención de genotipos con variantes útiles que podrían utilizarse en un programa de mejoramiento que considere como las líneas resistentes a enfermedades o con tolerancia al estrés ambiental.

Variación Somaclonal en el Arroz

La variación ocurrida en líneas somaclonales de arroz y la herencia de tal variación han sido estudiadas por diversos autores. La evidencia obtenida por ellos indica que para caracteres de gran importancia económica como la altura, la habilidad de macollamiento, la floración, y la fertilidad del grano se puede generar variación heredable por la vía del somacultivo (Oono, 1983; Sun et al., 1983; Jun, 1987).

Aunque se conoce poco acerca de la naturaleza y de los mecanismos particulares de la variación somaclonal, estudios como los realizados por Fukui (1983) señalan que tales variaciones se producen durante el estado de callo en forma independiente y, a veces, simultánea. Este aspecto es muy importante puesto que las variedades de amplia aceptación comercial, en las cuales se requiere modificar uno o varios caracteres indeseables, se pueden mejorar por este método.

El presente trabajo se realizó en el CIAT (Pachón, 1988) y tuvo dos objetivos: primero, evaluar el potencial de la variación somaclonal para mejorar algunas variedades comerciales de arroz, y segundo, determinar los caracteres de importancia económica que pueden variar por la vía somaclonal y su frecuencia de variación.

Se evaluaron progenies somaclonales de ocho variedades comerciales de arroz sembradas en América Latina: CICA 8, Oryzica 1, IRGA 409, IAC 165, Bluebelle, BG 90-2, Oro, Diamante, y la línea CT 6513-7-Ca-1 del Programa de Arroz del CIAT.

Los callos se indujeron sobre el medio básico de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 1360 mg/litro de extracto de levadura, 300 mg/litro de caseína hidrolizada, 1.5 g/litro de Gelrite, 60 g/litro de azúcar, 2 mg/litro de 2,4-D, 2 mg/litro de ANA, 3 mg/litro de cinetina, 2 mg/litro

de tiamina, 2 mg/litro de glicina, 0.5 mg/litro de piridoxina, y 0.5 mg/litro de ácido nicotínico.

La regeneración de las plántulas se logró sobre el medio MS suplementado con 100 mg/litro de inositol, 1.5 g/litro de Gelrite, 30 g/litro de azúcar, 1 mg/litro de ANA, 4 mg/litro de cinetina, 3 mg/litro de tiamina, 2 mg/litro de glicina, 0.5 mg/litro de piridoxina y 0.5 mg/litro de ácido nicotínico.

Las plantas regeneradas se adaptaron a condiciones ambientales en el invernadero, y de allí se trasplantaron al campo hasta que se recolectó su semilla. Cada somaclón obtenido dio origen a una línea somaclonal que fue evaluada respecto a caracteres como el vigor inicial, la altura, la habilidad de macollamiento, la esterilidad, la resistencia a piricularia (*Pyricularia oryzae* Cav.), la tolerancia a la toxicidad del hierro, la longitud del grano, el 'centro blanco,' y el contenido de amilosa. Todos los caracteres medidos se analizaron y compararon estadísticamente contra el respectivo genotipo donante.

Se obtuvieron 5425 líneas somaclonales provenientes de igual número de plantas regeneradas (Cuadro 14.5). Los mayores porcentajes de variación se observaron en los caracteres vigor inicial, floración, altura, macollamiento, y centro blanco (Figura 14.4). Se encontró un intenso efecto del genotipo donador en la frecuencia de variación de características como la floración, la altura y el macollamiento.

Cuadro 14.5. Número de somaclones obtenidos a partir de panículas inmaduras de nueve genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.)

Genotipo	Somaclones (no.)
CICA 8	1429
BG 90-2	984
IRGA 409	837
Bluebelle	808
IAC 165	611
CT 6513-7-Ca-1	405
Oryzica 1	160
Oro	118
Diamante	73
Total	5425

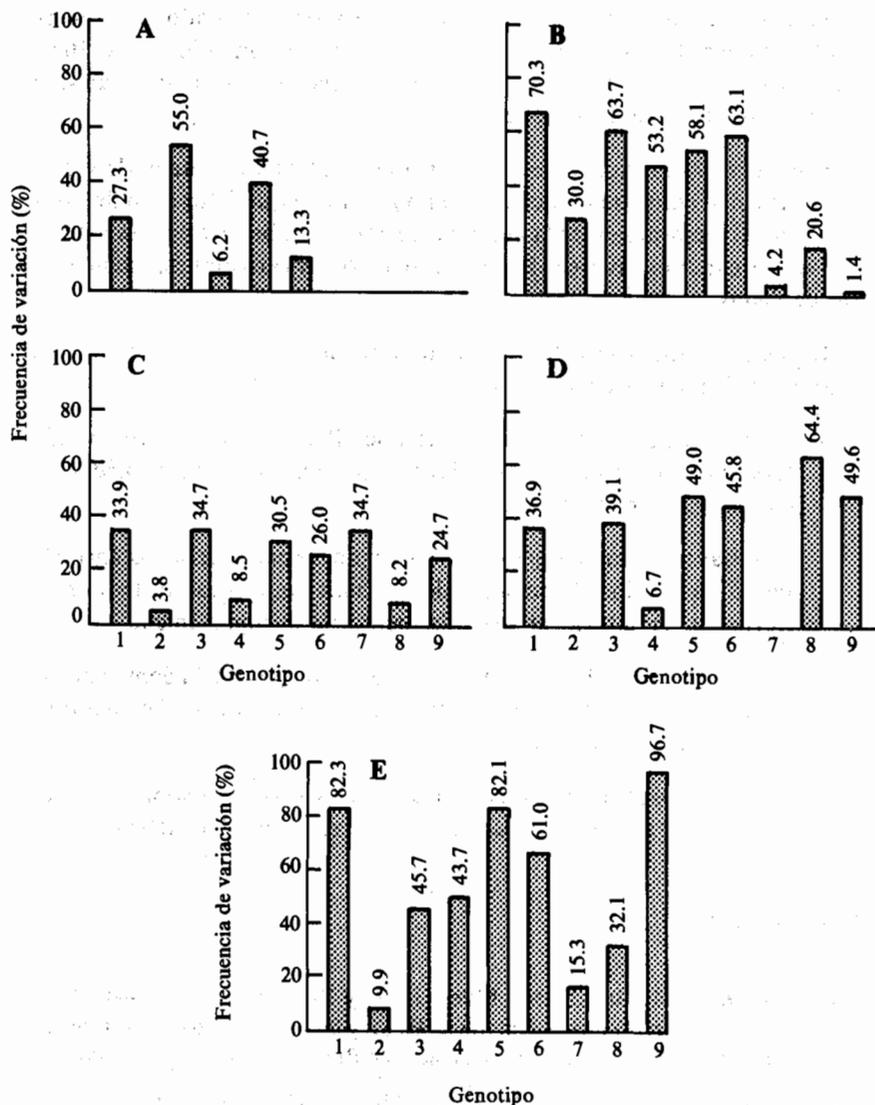


Figura 14.4. Frecuencias de variación de cinco caracteres evaluados en las líneas somaclonales de nueve genotipos de arroz. A) Vigor inicial; B) floración; C) macollamiento; D) altura; E) centro blanco. Genotipos: 1 = CICA 8, 2 = *Oryzica* 1, 3 = Bluebelle, 4 = IAC 165, 5 = IRGA 409; 6 = AG 90-2, 7 = Oro, 8 = Diamante, 9 = CT 6513-7-Ca-1.

Con respecto a la resistencia a la piricularia y a la tolerancia a la toxicidad por hierro, la gran mayoría de los somaclonales presentaron comportamientos similares a los de los genotipos donadores; sólo se hallaron pocas líneas variantes que pertenecían a los genotipos IAC 165 y CT 6513-7-Ca-1; esas líneas deben reevaluarse para constatar que han sido el resultado de cambios genéticos estables.

Conviene anotar que el hecho de encontrar altos porcentajes de variación para determinada característica no garantiza que éstos sean de utilidad para el mejoramiento; la ausencia de control sobre el tipo y la magnitud de los cambios favorece la obtención de otras variaciones, además de las deseadas.

De este estudio sobre la variación somaclonal del arroz se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La incidencia del centro blanco de la semilla presentó un alto porcentaje de variación en los somaclones si se compara con esa incidencia en los genotipos donantes.
- Los mayores porcentajes de variación de las características agronómicas de las líneas somaclonales se hallaron (en ese orden) en la floración, la altura, el macollamiento, y el vigor inicial.
- Existe influencia del genotipo en la variación generada dentro de las líneas somaclonales para características como la floración, la altura de la planta y el macollamiento.
- Los resultados observados indican que la variación somaclonal es una fuente potencial importante de variabilidad genética.

Referencias

- Cameron, D. F.; Hutton, E. M.; Miles, J. W. y Brolmann, J. B. 1984. Plant breeding in *Stylosanthes*. En: Stace, H. M. y Edey, L. A. (eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Australia. p. 589-606.
- Dos Santos, A. U. P.; Outka, D. E.; Cocking, E. C. y Davey, M. R. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue derived from leaf protoplast and leaf explants of *Medicago sativa*. Z. Pflanzenphysiol. 99:261-270.
- Edey, L. A.; Grof, B. y Wolker, B. 1984. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. En: The biology and agronomy of *Stylosanthes*. p. 547-570.

- Evans, D. A. y Sharp, W. R. 1983. Single gene mutations in tomatoe plants regenerated from tissue culture. *Science* 221:949-951.
- y ———. 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Ammirato, P. V. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 4, p. 97-132.
- ; ——— y Medina Filho, H. P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variations. *Am. J. Bot.* 71(6):759-774.
- Fukui, K. 1983. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *Theor. Appl. Genet.* 65:225-230.
- Gresshoff, P. M. 1980. In vitro culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture and plant regeneration. *Bot. Gaz.* 46:157-164.
- Jaramillo, S. 1982. Estudios sobre la inducción de callo y la regeneración de plantas de *Stylosanthes* spp. *in vitro*. Tesis (MS). Programa de estudios para graduados, Universidad Nacional/ICA, Bogotá, Colombia. 110 p.
- Johnson, L. B.; Stuteville, D. L.; Higgins, R. K. y Skinner, D. Z. 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S. clones. *Plant Sci. Lett.* 20:297-304.
- Jun, C. 1987. Improvement of rice through somaculture. Tesis (Ph.D.). Louisiana State University, E.U.
- Kao, K. N. y Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol.* 96:135-141.
- Karp, A. y Bright, S. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford Surveys on Plant Molecular and Cell Biology* 2:199-234.
- Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Gen.* 60:197-214.
- ; Ryan, S. A.; Bretell, R. y Scowcroft, W. R. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67:443-455.
- Latunde-Dada, A. O. y Lucas, J. A. 1983. Somaclonal variation and reaction to *Verticillium* wilt in *Medicago sativa* L. plants regenerated from protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 32:205-211.
- Lenné, J. M.; Vargas, A. y Torres, C. 1983. Descripción de las enfermedades de las principales leguminosas forrajeras tropicales: Guía de estudio. (CIAT Serie 04SP-03.03). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 50 p.
- Mariotti, D.; Arcioni, S. y Pezzoti, M. 1984. Regeneration of *Medicago arborea* L. plants from tissue and protoplasts culture of different organ origin. *Plant Sci. Lett.* 37:149-156.

- McIlroy, R. J. 1973. Introducción al cultivo de los pastos tropicales. Editorial Limusa, México. 168 p.
- Meijer, E. G. M. 1982. High frequency plant regeneration from hypocotyl- and leaf-derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. *Physiol. Plant.* 56:381-385.
- y Steinbiss, H. H. 1983. Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. *Ann. Bot.* 52:305-310.
- Meins, F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34:327-346.
- Mroginski, L. A. y Kartha, K. K. 1981. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant Sci. Lett.* 23:245-251.
- y ———. 1984. Tissue culture of legumes for crop improvement. *Plant Breed. Rev.* 2:215-264.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Oono, K. 1983. Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture. En: IRRI (International Rice Research Institute) (ed.). *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Science Press, Beijing, China. p. 95-104.
- Orton, T. J. 1983. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Molec. Biol. Rep.* 1:67-76.
- . 1984. Somaclonal variation: Theoretical and practical considerations. En: Gustafson, J. P. (ed.). *Gene manipulation in plant improvement*. Academic Press, Nueva York. p. 273-298.
- Pachón, J. 1988. Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento de algunos caracteres de importancia económica en el arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis. Universidad Javeriana, Bogotá.
- Roca, W. M. 1986. Biotecnología de plantas: Nuevas oportunidades para la agroindustria. En: *Agroindustria 2000*. Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle, Cali, Colombia. 12 p.
- Scowcroft, W. R. 1984. Genetic variability. En: *Tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization*. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma. 41 p.
- y Adamson, J. A. 1976. Organogenesis from callus cultures of the legume *Stylosanthes hamata*. *Plant Sci. Lett.* 7:39-42.

- ; Brettell, R. I. S.; Ryan, S. A.; Davies, P. A. y Pallotta, M. A. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. En: Plant tissue and cell culture. p. 275-286.
- Sun, Z. X.; Zhao, C. Z.; Zheng, K. L.; Qi, X. F. y Fu, Y. P. 1983. Somaclonal genetics of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 67:67-73.
- Szabados, L. y Roca, W. M. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. Plant Cell Reports 5:174-177.