

## **Propagación in vitro de *Stylosanthes Capitata* Vogel : una especie de gran potencial forrajero**

Andreína PÉREZ, Iselen TRUJILLO, María del Carmen VIDAL y Norka DE LIMA

*Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Centro de Estudios de Agroecología Tropical (CEDAT). Laboratorio de Biotecnología Agrícola. Apartado 47925. Caracas 1010. Venezuela. jarn1234@telcel.net.ve.*

### **RESUMEN**

*Stylosanthes capitata* (Leguminosae) es una especie de importancia en la vegetación de sabanas de Venezuela. Esta especie perenne, que extiende su rango de distribución hacia el subtrópico de América del Sur (10°N-22°S), se ha reportado solamente en Brasil y Venezuela. Es resistente a la sequía, pudiendo aumentar el período de crecimiento hasta nueve meses en climas con sequías bien definidas. Debido a la importancia económica y ecológica de esta leguminosa forrajera, a su presencia de acuerdo a patrones estacionales, y a la relevancia de la propagación *in vitro* como herramienta de utilidad en la conservación de recursos filogenéticos, es importante desarrollar un proceso de propagación *in vitro* óptimo para la especie que permita su disponibilidad todo el año. Para el ensayo se utilizaron como explante yemas florales, y como medio base, sales de Murashige & Skoog (1962), enriquecido con vitaminas como tiamina (5 mg/l), mioinositol (100 mg/l) y ácido nicotínico (1mg/l). Adicionalmente se añadió sacarosa (30 g/l) como fuente de carbohidratos y agar (8 g/l) como sustancia gelificante. Se emplearon dos concentraciones de BA (Bencilaminopurina) como fuente de citocinina (0,25 y 0,50 mg/l) para la fase de iniciación, observándose en la concentración de 0,50 mg/l los primeros cambios morfogénéticos a los 60 días de la siembra de los explantes. En la fase de multiplicación se utilizaron dos concentraciones de citocinina, 0,50 mg/l y 1 mg/l. Esta última concentración paraliza la evolución de los explantes y reduce el número de brotes por explante. En la etapa de enraizamiento, al utilizar 0,50 mg/l de IBA (ácido indolbutírico) y eliminar la citocinina se obtuvo un desarrollo adecuado del sistema radical. Las plántulas obtenidas fueron aclimatadas y trasladadas con éxito a condiciones de vivero.

**Palabras clave:** Leguminosae, Propagación *in vitro*, *Stylosanthes capitata*

**In vitro propagation of *Stylosanthes capitata* Vogel: a species of great forrage potential**

### **ABSTRACT**

*Stylosanthes capitata* (Leguminosae) is a species of great importance in the vegetation of savannas of Venezuela. This perennial species which extends its range of distribution toward the subtropical area of South America (10°N-22°S), has been reported only in Brazil and Venezuela. It is resistant to drought, being able to extend its growing period to nine months in climates where droughts are well defined. Due to the ecological and economic importance of this forage legume, and the use of *in vitro* propagation as a tool of utility for the conservation of phylogenetic resources and its presence according to seasonal periods, it is of importance to develop an optimum process of *in vitro* propagation for this species that allows its availability all year around. For testing purposes floral buds as ex-

plants, and Murashige & Skoog (1962) salts as base medium supplemented with vitamins as thiamine (5 mg/l), myoinositol (100 mg/l) and nicotinic acid (1 mg/l) were used. Additionally sucrose (30 g/l) as source of carbohydrates and agar (8 g/l) as gelling medium were added. Two concentrations of BA (Bencilaminopurine) were employed as source of cytokinin (0.25 and 0.50 mg/l) as the initiation phase. The first morphogenetic changes appeared after 60 days of the explants initiation at the concentration of 0.50 mg/l. In the multiplication phase two concentrations of cytokinins were used (0.50 mg/l and 1 mg/l), at higher concentration of this hormone (1 mg/l of BA) the evolution of the explants is paralyzed and the number of buds by explant is reduced. In the rooting phase when 0.50 mg/l of IBA (indolbutiric acid) were used and no cytokinin in the medium an adequate development of the radical system was obtained. The obtained seedlings were then acclimated and transferred with success to greenhouse conditions.

**Key words:** *In vitro* propagation, Leguminosae, *Stylosanthes capitata*

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de las leguminosas forrajeras son originarias del trópico, con un elevado número de cultivares, tanto autóctonos como introducidos. Constituyen una fuente importante de proteínas; tienen la característica de albergar bacterias en sus raíces, las cuales toman el nitrógeno del aire, lo fijan al suelo y las plantas lo toman en forma de solución nítrica (Guzmán 1996).

El uso de las leguminosas arbóreas o hierbas anuales y perennes, en sistemas silvopastoriles, constituye una alternativa económica, al disminuir el costo de alimentación animal si se trata de leguminosas herbáceas. En Venezuela, *Stylosanthes capitata* es una especie herbácea de importancia en la vegetación de sabanas. Diversas especies de *Stylosanthes* han sido utilizadas con éxito en asociación con gramíneas, entre las que se pueden nombrar *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala*, *S. capitata*, *S. scabra* y *S. humilis* (Grof 1985).

Una de las especies que ha generado resultados exitosos en la suplementación de la alimentación animal es *S. capitata*, donde se observa aumento en el peso del ganado y mayor número de hembras preñadas (Tergas *et al.* 1984; Thomas *et al.* 1992). Debido al valor económico y ecológico de esta forrajera, a la relevancia del empleo de la propagación *in vitro* como herramienta de utilidad en la conservación de recursos fitogenéticos (Pence *et al.* 2002; Engelmann & Engels 2002), y a la presencia de esta especie de acuerdo a patrones estacionales, es de interés desarrollar un proceso de propagación *in vitro* óptimo, con miras a obtener un recurso forrajero de manera continua a lo largo del año, de gran calidad y vigor (Montaldo *et al.* 1989; Trujillo 1999). Aunque en otros estudios se señala a *S. capitata* como altamente prolífica en la producción promedio de semillas (Ferguson *et al.* 1983; Edye 1987), en el ambiente natural donde se llevó a cabo este estudio exhibe baja tasa de regeneración, lo cual respalda el desarrollo de esta investigación.

El objetivo de la presente investigación es desarrollar un proceso de propagación *in vitro* óptimo para *S. capitata* que permita la obtención de altos índices de multiplicación con la finalidad de conservar y proteger especies potenciales de las sabanas, además de lograr la disponibilidad de la especie todo el año.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Propagación *in vitro* de *Stylosanthes capitata*

#### a. Material vegetal

Las plantas de la especie en estudio fueron colectadas en la Estación Experimental La Iguana (Santa María de Ipire, estado Guárico) y trasladadas al vivero del Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT), para asegurar la disponibilidad de material vegetal durante el desarrollo de las experiencias planteadas.

#### b. Desinfección del material vegetal

Se utilizaron como explante yemas florales. Para la desinfección de éstos, se realizaron dos lavados sucesivos de 5 min cada uno, en una mezcla jabonosa (50% v/v) bajo agitación. Posteriormente, fueron enjuagados con agua corriente, y sumergidos en una solución yodada al 50%, agitando en una plancha magnética por un período de 5 min, con tres lavados consecutivos de agua destilada. Luego fueron sumergidos en una solución de cloro comercial al 80% por 5 min aplicando vacío, y posteriormente trasladados a la cámara de flujo laminar, donde se realizaron tres lavados con agua estéril para proceder a la iniciación.

#### c. Etapa de iniciación

Para iniciar la propagación *in vitro* se emplearon 20 explantes por tratamiento (yemas provenientes de material parental seleccionado en campo). Los explantes fueron colocados en medio nutritivo constituido por sales de Murashige & Skoog (1962), enriquecido con vitaminas como tiamina (5 mg/l), mioinositol (100 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l) y sacarosa (30 g/l) como fuente de carbohidratos, agar (8 g/l) como agente gelificante, y la fuente de citocininas fue BA (Bencilaminopurina) en dos concentraciones diferentes ([Tabla 1](#)). El pH del medio se ajustó a 5,8 con una solución de NaOH (1N), posteriormente fue servido en alícuotas de 30 ml por envase en frascos de vidrio de 500 ml, que luego fueron esterilizados. Después de la siembra, los explantes permanecieron en cámara de crecimiento, expuestos a luz continua (70 UE/min<sup>2</sup>.seg).

**Tabla 1.** Concentraciones de BA (mg/l) utilizadas en la fase de iniciación de *S. capitata*.

Tratamiento	BA (mg/l)
A	0,25
B	0,5
Control	0

#### d. Etapa de multiplicación

Esta etapa se llevó a cabo utilizando los mismos tratamientos de la etapa de iniciación, pero se incrementó la concentración ([Tabla 2](#)). Los explantes permanecieron en cámaras de crecimiento, expuestos a luz continua (70 UE/min<sup>2</sup>.seg).

**Tabla 2.** Concentraciones de BA (mg/l) utilizadas en la fase de multiplicación de *S. capitata*.

Tratamiento	BA (mg/l)
A	0,5
B	1
Control	0

e. Etapa de enraizamiento

Para el enraizamiento se probaron tres medios, basados en sales de Murashige & Skoog (1962) al 100% de concentración, enriquecidos con tiamina (1 mg/l), mioinositol (100 mg/l), ácido nicotínico (20 mg/l), sacarosa (30 g/l) y agar (8 g/l) como agente gelificante. Como suplemento hormonal se utilizó ácido indolbutírico (IBA) y ácido indolacético (AIA) en concentración de 0,50 mg/l para inducir el proceso ([Tabla 3](#)). Los explantes permanecieron en cámaras de crecimiento, expuestos a luz continua (70 UE/min<sup>2</sup>.seg).

**Tabla 3.** Tratamientos utilizados para el enraizamiento de plántulas de *S. capitata*.

Tratamiento	IBA (mg/l)	AIA (mg/l)
A	0,5	0,5
B	0,5	0
C	0	0,5
Control	0	0

f. Etapa de aclimatación

Las vitroplantas fueron transplantadas a vasos plásticos que contenían una mezcla de tierra y arena en proporción 2:1, previamente esterilizada. Estos envases se colocaron en cajones de aclimatación en ambiente con humedad relativa de 85% y temperatura de 27°C. Las vitroplantas fueron sometidas durante la primera semana a fotoperíodos cortos de 30 min, tres veces al día. En la segunda semana, los períodos de luz se incrementaron a 2 h tres veces al día, y en la tercera semana las plantas fueron sometidas a fotoperíodo de 8 h por día. Posteriormente, las plantas fueron trasladadas a condiciones de vivero.

## 2. Análisis estadístico

El diseño experimental se basó en la evaluación de diferentes tratamientos en cada etapa del proceso de propagación *in vitro* de la especie en estudio.

Para establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados se realizó un ANOVA para cada etapa del proceso de propagación *in vitro* con un nivel de significancia de 95%, y si existían diferencias, se aplicó el coeficiente de correlación de Tukey (Siegel 1974; Chacín 1999), para determinar cual de los tratamientos es diferente.

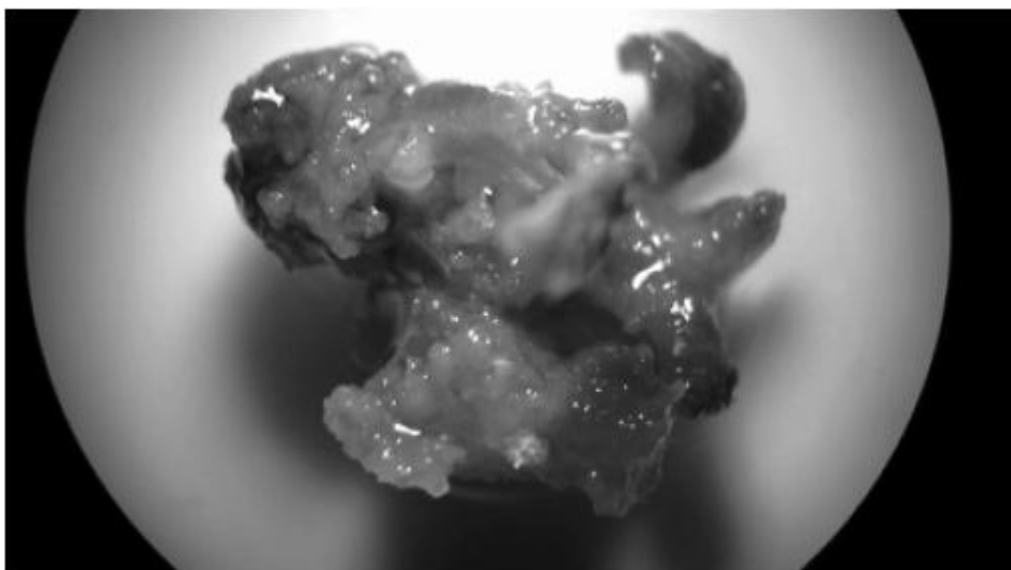
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la etapa de iniciación de *S. capitata* se pudo evidenciar que la concentración de 0,5 mg/l de BA indujo mayor respuesta de los explantes a los 60 días de cultivo, encontrándose que el 70% de los mismos mostraron producción abundante de callo organogénico, mientras que al usar 0,25 mg/l de BA ([Tabla 4](#); [Fig. 1](#)) se encontró 10% de respuesta y poca producción de callo sobre los explantes. Los análisis estadísticos realizados indican que las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.** Porcentaje y características de la respuesta morfológica de los explantes durante la etapa de iniciación en el proceso de propagación *in vitro* de *S. capitata*.

Tratamiento	BA (mg/l)	% de explantes con respuesta positiva a los 60 días de cultivo	Presencia de callo organogénico	Observaciones
A	0,25	10	+	Callo verde sin presencia de brotes
B	0,50	70	+++	Callo verde sin presencia de brotes
Control	0	0	-	Sin respuesta

(-) Ausencia de callo, (+) Poca presencia de callo, (+++) Abundante callo. Las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas ( $F = 6,166$ ;  $p < 0,05$ ).



**Fig. 1.** Callo organogénico *in vitro* de *S. capitata* (4X).

Godwin *et al.* (1987) encontraron que para obtener cultivos de callos y brotes en forma exitosa en *Stylosanthes scabra*, se deben utilizar concentraciones de BA en un rango superior (entre 1,0 - 2,0 mg/l) a las utilizadas en esta experiencia. No obstante, en este estudio se planteó el uso de concentraciones menores de reguladores de crecimiento, con el objeto de optimizar los recursos empleados en el proceso de propagación *in vitro*, ya que al disminuir la concentración de hormonas usadas los costos son menores. Los resultados de Godwin *et al.* (1987) difieren de los obtenidos en esta investigación, probablemente debido a las concentraciones de citocinina presentes en el tejido empleado en este estudio, lo cual podría estar asociado a la variedad utilizada. Esto es respaldado por estudios que señalan que el proceso de propagación *in vitro* es definitivamente particular para cada especie

vegetal, e inclusive para variedades o cultivares dentro de una misma especie (Ishikawa & Evans 1995; Pérez-Ponce 1998; García 2001).

Diferentes trabajos de investigación señalan que el tipo de explante, su estado fisiológico y las características de la especie son factores que influyen en la respuesta morfogénica del tejido (Ishikawa & Evans 1995; Pérez-Ponce 1998; García 2001).

Colmenares & Jiménez (2003) señalan que en banano cv. Grand Nain (AAA) del subgrupo Cavendish multiplicados en 2,5 mg/l de BA, ha sido reportado un índice de multiplicación de 2,1 para medio sólido y 5,2 en sistemas de inmersión temporal. Para meristemas de banano FHIA-18, bajo condiciones similares, se obtuvieron 60 brotes por meristemo a través de sistemas de inmersión temporal, mientras que en medio sólido lograron obtener 12 brotes por explante inicial cultivado, lo que indica que los índices de multiplicación son dependientes del cultivar (Colmenares & Jimenez 2003).

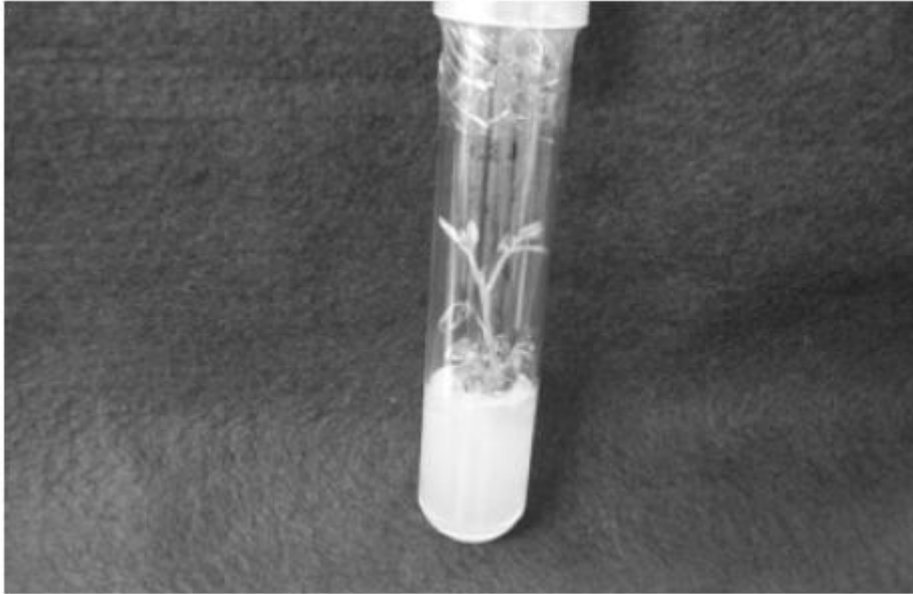
También se ha señalado que la combinación de reguladores de crecimiento puede promover mayor respuesta de los explantes en *S. scabra* (Godwin *et al.* 1987). Dichos investigadores encontraron que al utilizar una concentración de 2 mg/l de BA en combinación con 1 mg/l de ANA y concentraciones de IBA que oscilaron entre 0,50 - 1,50 mg/l, obtuvieron mejor respuesta morfogénica en *S. scabra*.

En la etapa de multiplicación se observó que al incrementar la concentración de BA a 1 mg/l, se reduce significativamente el porcentaje de explantes con presencia de callo organogénico. También se encontró menor número de brotes por explante en los medios con esta misma concentración ([Tabla 5](#); [Fig. 1](#) y [2](#)), mientras que al pasar los explantes a medio fresco pero con la misma concentración de BA, se incrementó significativamente la respuesta morfogénica y el número de brotes por explante. Los análisis estadísticos realizados indican que las diferencias entre los tratamientos para esta etapa son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.** Número promedio de brotes y porcentaje de explantes con callo organogénico en la fase de multiplicación en la propagación *in vitro* de *S. capitata*.

Medio	Concentraciones de BA (mg/l)	% de explantes con callo organogénico	Nº promedio de brotes	Observaciones
A	1	5	0,25 ± 0,42	Callo compacto verde con escasos brotes
B	0,50	80	2,9 ± 1,2	Callo compacto verde con numerosos brotes
C	Control	0	0	Sin respuesta

Las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas ( $F = 30,009$ ;  $p < 0,05$ )



**Fig. 2.** Brotes en la fase de multiplicación *in vitro* de *S. capitata* (4X).

Se ha señalado que, durante la fase de multiplicación, la proliferación de explantes en el cultivo *in vitro* puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras del crecimiento como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un manejo adecuado del proceso *in vitro*. Los explantes al ser divididos y cultivados nuevamente en medio fresco inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de propágulos deseados para pasar a la fase de enraizamiento (Villalobos 1990). Pérez-Ponce (1988) igualmente señala que la formación de yemas adventicias se estimula en el momento que los callos organogénicos son divididos, pero a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, se consigue una mejor respuesta si los segmentos del explante se transfieren a otro medio fresco con una concentración mayor de citocinina a las utilizadas en la etapa de iniciación. Estos resultados pueden explicarse debido a la presencia de concentraciones endógenas del tejido utilizado como explante. Las plantas no se limitan a aumentar en masa y volumen, sino que se diferencian, se desarrollan y crean una variedad de células, tejidos y órganos, lo cual se logra a través de la conjunción de numerosos factores internos y externos, donde la concentración de los reguladores de crecimiento o fitohormonas y el balance entre ellos juegan un papel determinante (Fonnesbech 1974; Welander 1977; Abbott 1978; Ishikawa & Evans 1995).

El proceso de enraizamiento es fundamental para la supervivencia de las plantas *in vitro*, al permitir la adecuada adaptación al ser transferidas al suelo. En esta investigación se encontró que la concentración de 0,5 mg/l de IBA promovió mayor respuesta de las plántulas de *S. capitata* al enraizamiento, donde el 80% de las mismas presentaron el sistema radical bien desarrollado ([Fig. 3](#)). En el tratamiento con 0,5 mg/l de AIA el porcentaje de enraizamiento alcanzó 40%, y se obtuvo menor respuesta al usar simultáneamente y en igual concentración los dos reguladores de crecimiento empleados ([Tabla 6](#); [Fig. 4](#)). Los análisis estadísticos realizados indican que las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).





Fig. 3. Brotes enraizados obtenidos *in vitro* de *S. capitata* (4X).

Tabla 6. Porcentaje de enraizamiento en diferentes tratamientos aplicados a *S. capitata*.

Tratamientos	Concentraciones de IBA (mg/l) y AIA (mg/l)	% de plántulas que presentaron enraizamiento
A	0,50 IBA y 0,50 AIA	40
B	0,50 IBA	80
C	0,50 AIA	60
Control	Sin hormonas	20

Las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas ( $F = 3,00$ ;  $p < 0,05$ )



Fig. 4. Plantas micropropagadas de *S. capitata* en la fase de aclimatación.



En diversas investigaciones se ha destacado el efecto promotor de las auxinas en el proceso de rizogénesis y el antagonismo de éstas con las concentraciones de citocininas en el desarrollo de este proceso (Barba 1978; Margara 1988; Villalobos, 1990; Bandurski *et al.* 1993). Adicionalmente se ha señalado que la presencia de AIA o IBA en el medio de inducción de callo contribuye de algún modo a contrarrestar el efecto inhibitorio del BA en la aparición de raíces (Barba 1978).

Una vez superada la fase de enraizamiento de las plántulas de *S. capitata*, en fase de aclimatación se obtuvo alta tasa de supervivencia ubicada en un 80%, entonces se puede decir que este proceso fue exitoso bajo las condiciones establecidas. La aclimatación es trascendental debido a las características particulares que presentan las plantas producidas *in vitro*. Estas pueden presentar un desarrollo anormal en la zona de transición entre la raíz y el tallo, con conexiones vasculares débiles, generando problemas en la absorción y circulación de agua desde las raíces al tallo, lo cual puede corregirse con adecuada aclimatación. En otras ocasiones las raíces que crecen en agar son defectuosas, carecen de pelos radicales y suelen presentar necrosis al transplantar las plántulas, lo que provoca retraso en el crecimiento de la planta. Además, las plantas producidas *in vitro* presentan poca lignificación, y desarrollo cuticular y estomático incompleto, lo que requiere condiciones especiales de aclimatación antes de su traslado al campo.

En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido *in vitro* y que por lo tanto, sólo han estado expuestas a un microambiente con mínimo estrés y óptimas condiciones para la multiplicación de las plantas, se adapten a ambientes *ex vitro* donde el crecimiento es autótrofo y las condiciones no son asépticas, y factores como luz, temperatura y humedad no están controlados. Por esto, la necesidad de desarrollar sistemas de adaptación *in vitro*, induciendo fotoautotrofia mediante incrementos de la tasa de CO<sub>2</sub> y de radiación en los envases de cultivo, a objeto de mejorar la calidad de la planta, los niveles de producción y los costos del proceso de micropropagación. De igual manera, se debe controlar el proceso de adaptación evitando al máximo la pérdida de agua y consecuente-mente la deshidratación en plantas debido, entre otros aspectos, a que bajo las condiciones de cultivo *in vitro* hay una considerable disminución o ausencia total de ceras en la cutícula de las hojas, situación que las hace más susceptibles de deshidratarse (Grout 1975).

El proceso de propagación *in vitro* de *S. capitata* desarrollado en esta investigación permitirá la utilización de la especie en programas de conservación de colecciones de recursos fitogenéticos. El uso de la propagación *in vitro* puede fortalecer investigaciones relativas al establecimiento de colecciones de recursos fitogenéticos, permitiendo obtener mayor número de muestras, y por lo tanto disponer de diversidad genética proveniente de las expediciones para recolección de material (Pence *et al.* 2002; Engelman & Engels 2002).

Las técnicas de propagación *in vitro* de especies vegetales pueden constituir una herramienta de utilidad para resolver problemas asociados con la colecta de germoplasma. Esta técnica es especialmente útil para el trabajo con material vegetal ubicado en sitios remotos, cuyas semillas no se encuentran disponibles en abundancia, o presentan problemas de viabilidad *in vitro*. También permite la disponibilidad de germoplasma dentro y fuera del país donde se encuentra la colección (Pence *et al.* 2002).

Esta manera de obtener un número elevado de plantas de *S. capitata* en períodos relativamente cortos, puede favorecer el área de la agroecología y de producción animal, donde se requiere la obtención de este recurso forrajero durante períodos críticos o de manera continua a lo largo del año. Por ser una leguminosa, esta

especie reviste especial connotación ecofisiológica, agronómica y económica, fundamentalmente por la fijación de nitrógeno a través de nódulos que posee el sistema radical, lo cual le confiere valor determinante para procesos agrícolas donde puede ser usada, tales como sistemas de labranza conservacionista o en forma directa como abono verde.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de investigación contó con el apoyo financiero del Proyecto La Iguana, Iniciativas Científicas del Milenio y del Proyecto FONACIT S1-99000106.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Abbott, A.J. 1978. Practice and promise of micropropagation of woody species. *Acta Hort.* 79: 113-127.
2. Bandurski, R.S., J. Slovin & J. Cohen. 1993. Auxinas. In: *Fisiología y Bioquímica Vegetal* (Azcón-Bieto, J. & M. Talón, eds.), pp. 285-300. Editorial Interamericana, Mc Graw Hill, Barcelona.
3. Barba, A. 1987. Reguladores del crecimiento vegetal. In: *Cultivo de Tejidos Vegetales* (Hurtado, D. & M.E. Merino, eds.), pp. 48-65. Editorial Trillas, México.
4. Colmenares, M. & C. Giménez. 2003. Multiplicación *in vitro* *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista Fac. Agron. (Maracay)* 20: 468-477.
5. Chacín, F. 1999. *Avances recientes en el diseño y análisis de experimentos*. Facultad de Agronomía. Servicios Gráficos. Universidad Central de Venezuela.
6. Ede, L.A. 1987. Potential of *Stylosanthes* for improving tropical grasslands. *Outlook Agric.* 16: 124-130.
7. Engelmann, F. & J.M.M. Engels. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: *Managing plant genetic diversity* (Engels, J.M.M., V.R. Rao, A.H.D. Brown, M.T. Jackson, eds.), pp. 89-104. CABI, Wallingford, et IPGRI, Rome.
8. Ferguson, J.E., D. Thomas, R.P. De Andrade, N. De Souza Costa & S. Jutzi. 1983. Seed production potencial of eighth tropical pasture species in regions of Latin America. Proceedings of the XIV International Grassland Congress. Lexington KY, USA.
9. Fomesbech, M. 1974. The influence of NAA, BA and *Begonia cheimanta* petiole segments grown *in vitro*. *Physiol. Plant* 32: 49-54.
10. García, E. 2001. Propagación clonal masiva de *Begonia* (*Begonia rex*) y *Violeta* Africana (*Saintpaulia ionantha*). In: *Biotechnología Agrícola: Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas* (Perea Dallos, M., ed.), pp. 127-136. ACEVIC. Editora Guadalupe, Colombia.
11. Godwin, I., H.Y. Geoffrey & D. Cameron. 1987. Plant regeneration from leaf derived callus cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra* Vog. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.* 9: 3-8.
12. Grof, B. 1985. Forage attributes of the perennial groundnut *Arachis pintoi* in a tropical savanna environment in Colombia. Proceedings of the XV International

Grassland Congress, Kyoto, Japan. Science Council of Japan and Japanese Society of Grassland Science, Nishi-Nasuno, Tochigiken. Japan.

13. Grout, B. W.W. 1975. Wax development on leaf surface of *Brassica oleracea* var. *currawong* regenerated from meristem culture. *Pl. Sci. Lett.* 5: 401-405.

14. Guzmán, P.J. 1996. Pastos y forrajes. Espasande S.R.L. Editores, Caracas.

15. Ishikawa, H. & M.L. Evans. 1995. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727.

16. Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Ediciones Mundiprensa, Madrid.

17. Montaldo, A., J.J. Montilla, J. Viera, J.D. Holmquist & R.E. Vargas. 1989. *Uso actual y potencial de Leguminosas tropicales*. Publicación especial. Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Agronomía. Litopar, Caracas.

18. Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 18: 473-497.

19. Pence, V.C., J.A. Sandoval, V.M. Villalobos & F. Engelmann. 2002. *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. IPGRI Technical Bulletin. N° 7.

20. Pérez-Ponce, J.N. 1998. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas, Santa Clara.

21. Siegel, S. 1974. *Estadística no paramétrica*. Editorial Trillas, México.

22. Tergas, L.E., O. Paladines, I. Kleinheisterkamp & J. Velásquez. 1984. Productividad animal de *Brachiaria decumbens* sola y con pastoreo complementario de *Pueraria phaseoloides* en los Llanos Orientales de Colombia. *Prod. Ani. Trop.* 9:1-13.

23. Thomas, R.J., C.E. Lascano, J.I. Sanz, M.A. Ara, J.M. Spain, R.R. Vera & M.J. Fisher. 1992. The role of pastures in production systems. In: *Pastures for tropical lowlands* (Tergas, J., ed.), pp. 121-144. CIAT'S Contributions, Cali.

24. Trujillo, I. 1999. Desarrollo de técnicas de micropropagación in vitro para especies de interés económico y de impacto en el mantenimiento de la biodiversidad de sabanas neotropicales del estado Guárico. Proyecto S1-CONICIT-S1- 99000106. Caracas, Venezuela.

25. Villalobos, A. V. 1990. Organogénesis. In: *Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales* (Rosell, C. & V. Villalobos, eds.). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma.

26. Welander, T. 1977. *In vitro* organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia x hiemalis*. *Physiol. Plant.* 41: 142-145.