

## BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL DESARROLLO SUSTENTABLE DE SABANAS

*Iselen Trujillo*

Universidad Simón Rodríguez. Centro de Estudios para el Desarrollo de la Agroecología Tropical (CEDAT).  
Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos IDECYT. Estado Miranda.  
Correo electrónico: [iselen03@yahoo.com](mailto:iselen03@yahoo.com)

### RESUMEN

A las leguminosas se les reconoce por el importante papel que desempeñan en los sistemas de producción, por los múltiples beneficios que de ellas se derivan, como el mejoramiento de la fertilidad del suelo, de la calidad del forraje, especialmente importante en la época seca, período en el cual se presentan las mayores limitaciones alimenticias. El ecosistema sabana, con sistemas de producción caracterizados porque generalmente son de baja productividad, asociada a suelos ácidos y de baja fertilidad, puede ser mejorado con la introducción de leguminosas. Las leguminosas, en general, son un componente importante en la vegetación de sabanas en nuestro país, por su significado ecológico y económico. Se describen brevemente algunas modalidades de uso de estas especies y finalmente se destaca la necesidad de diversificar los sistemas de producción de las sabanas, considerando su incorporación, teniendo como meta el beneficio integral y la sostenibilidad ambiental. Sin embargo, debido a que su tasa de regeneración en ambientes naturales es sumamente baja o que su distribución de forma amplia obedece mayormente a razones estacionales, se plantea la necesidad de implementar metodologías para una rápida propagación "in vitro" y para su mejoramiento genético, para lo cual se señalan algunos ejemplos exitosos.

### ABSTRACT

The legumes are recognized by their important role in production systems, by the multiple benefits derived of them, like the improvement of soil fertility, forage quality, specially important during the dry season, period with high nutritional limitations. The savanna ecosystem has production systems generally characterized by a low productivity; this is associated to acid soils and low fertility and can be improved with the introduction of legumes. The legumes, in general, are an important component in the savanna vegetation in our country, by their ecological and economical importance. Some modalities of use of these species are described briefly and the need to diversify savannas production systems is highlighted. The incorporation of legumes in the production systems is considered as a goal for sustainability and environmental benefit. Because of their extremely low rate of regeneration in natural systems and a seasonal dependent distribution, the necessity to apply methodologies for a fast propagation "in vitro" and for its genetic improvement is proposed. Some successful examples are indicated.

**Palabras clave:** leguminosas forrajeras, sistemas de producción, biodiversidad, sabana, propagación in vitro.  
**Keywords:** forage, legume, production systems, biodiversity, savannas, in vitro propagation.

## INTRODUCCIÓN

Las zonas de Venezuela que se encuentran dentro de la clasificación de sabanas neotropicales ocupan posiciones geográficas estratégicas para facilitar la implementación de los sistemas asociados al desarrollo de una agricultura sustentable. Muchas de las especies que conforman su inventario florístico, tienen un enorme potencial económico y ecofisiológico, lo que aunado a la relativa baja fertilidad natural de los suelos asociados a este tipo de ecosistema, hace necesario el énfasis en el desarrollo de especies vegetales adaptadas a esas condiciones edafoclimáticas. El estado Guárico, particularmente, posee en la

Región Centro y Sur Oriental enormes zonas de llanuras eólicas, con suelos de texturas arenosas y franco arenosas, interrumpidas por áreas de afloramiento de la formación Mesa y Oficina. Son caracterizadas por una baja fertilidad del suelo, una marcada estacionalidad en cuanto a la disposición de agua y por la presencia de una extensa variedad de tipos fisonómicos de vegetación (Medina y Bilbao, 1991). Las limitaciones que presentan estas zonas han sido ampliamente documentadas, así como las potencialidades de uso de las mismas. Entre las diferentes alternativas tecnológicas disponibles para mejorar estos ecosistemas, la siembra de leguminosas ocupa un lugar preponderante.

La familia de las leguminosas incluye grandes árboles, arbustos, enredaderas leñosas y hierbas anuales y perennes. Los usos que se le atribuyen son ampliamente variados: el grupo de las Mimoseae y las Cesapinoideas es apreciado como árboles madereros, fuentes decolorantes, taninos, resinas, gomas, insecticidas, medicinas, fibras y ornamentales; las que pertenecen a las Papilionidae son consideradas una excelente fuente de alimentos de alto valor nutritivo para consumo humano y animal, como abonos verdes, cultivos de cobertura y son utilizadas como una medida para el control de la erosión de suelos. Los atributos que las hacen componentes relevantes en los sistemas de producción son: la capacidad de fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico, por lo cual contribuyen a incrementar la producción de forraje, aumentar el contenido de nitrógeno y mejorar el valor nutritivo, bien sea por la transferencia del elemento fijado a las plantas adyacentes, como las gramíneas, como por la presencia de la leguminosa en sí, lo cual se traduce en el aumento de la productividad animal. (Domínguez y col, 1996). Las leguminosas poseen un sistema radicular profundo, que les permite extraer nutrimentos desde las capas más profundas y ponerlos a disposición para el reciclaje facilitado por la descomposición hojarasca. Adicionalmente, entre sus principales funciones, se plantea su uso como un elemento mejorador de la alimentación del ganado (al asociarse con gramíneas y conformar bancos de proteínas) son consideradas una fuente importante de proteínas de buena calidad, presentan una alta concentración de nitrógeno en las hojas, sus contenidos de proteína tienden a disminuir de forma gradual y no de forma violenta en relación con la edad de la planta, y son ampliamente utilizadas como cobertura en sistemas de labranza conservacionista. Poseen además un alto contenido en fósforo y calcio que contribuyen a la nutrición del ganado. Por tanto, al incluir leguminosas persistentes en las pasturas, se provee una fuente económica y continua, de nitrógeno al suelo y de proteína para los animales, contribuyendo así al incremento de la producción, y a la disminución de los costos.

Venezuela posee recursos naturales en forma abundante, es uno de los países de América Latina con una mega diversidad biológica, dentro de la

cual existe un gran número de plantas con potencial productivo que no han sido estudiadas, y que poseen un inmenso potencial de aprovechamiento, y que pueden constituir el punto de partida de diversas investigaciones, que permitan encontrar nuevos componentes naturales para generar diversos beneficios. Dentro de este panorama, las leguminosas constituyen un componente importante en la vegetación de sabanas en nuestro país. A pesar de la importancia de las leguminosas, su implementación como especies forrajeras por parte de los productores, ha sido escasa (Flores, 1999; Pérez, 2000). Adicionalmente, debido a que su tasa de regeneración en ambientes naturales es sumamente baja o a que su distribución de forma amplia obedece mayormente a razones estacionales, se plantea la necesidad de implementar metodologías para una rápida propagación "in vitro" y para su mejoramiento genético, por lo cual existe una importante necesidad de desarrollar técnicas que permitan aprovechar esos recursos como un conjunto de estrategias que garanticen una productividad alta sin provocar la destrucción de ecosistemas estables y diversos (Dewan et al., 1992; Ruffoni et al., 1992; Kolloge, 1997; Mannion, 1998; Whitters y Engelman, 1998; Pérez Ponce, 1998).

En el presente trabajo se hace una breve descripción de algunas modalidades de uso de estas especies en el ecosistema de sabana, que si aún no están establecidas o difundidas, pueden ser adaptadas y adoptadas en los sistemas de producción de estas áreas en Venezuela. Se plantea el uso de nuevas tecnologías en su proceso de propagación a través de biotecnología.

### **Distribución e importancia de las leguminosas en las sabanas**

Las sabanas neotropicales ocupan alrededor de un 20 % de la superficie terrestre, y de ese porcentaje, el 45 % se ubica en América del Sur, ocupando aproximadamente 269 millones de hectáreas (Rippstein et al., 2001). Las leguminosas ocupan el segundo lugar de importancia de plantas utilizadas por el hombre a escala mundial, después de las gramíneas. Comprenden aproximadamente 650 géneros y casi 18.000 especies (Schultze-Kraft, 1998; Florentino, 1998). Las leguminosas

son plantas de hojas anchas, cuyos frutos son denominados legumbres o vainas. Toleran la sequía y pueden prosperar bajo altas temperaturas y precipitaciones, en suelos excesivamente ácidos o alcalinos, bajo condiciones que no soportarían otras especies forrajeras. Son particularmente frecuentes en los trópicos y subtrópicos, y están presentes prácticamente en todas las formaciones vegetales. Su diversidad morfológica es extremadamente grande, extendiéndose desde hierbas rastreras a árboles altos.

Su principal importancia radica en que pueden fijar el nitrógeno del aire gracias a su asociación con bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, fijadoras de nitrógeno, a través de la formación de nódulos en sus raíces, y ser independientes del ambiente para cubrir las necesidades de este elemento. El nitrógeno fijado es transferido al suelo, en forma directa, por mecanismos de excreción desde los nódulos de sus raíces a las plantas asociadas, o en forma indirecta, por desprendimiento y liberación de los nódulos, principal mecanismo que ocurre una vez que los nitratos son liberados de los nódulos. Estos iones pasan a la solución del suelo donde están disponibles para las raíces de la planta asociada, pudiendo ser reabsorbidos por las raíces de la misma leguminosa; también se incorporarían a la solución del suelo por descomposición de los residuos orgánicos, tanto aéreos como subterráneos, proveniente de la planta (Florentino, 1998). A todo ello se agrega que las leguminosas poseen raíces que les permiten explorar el suelo a mayor profundidad que las gramíneas, particularmente los arbustos y árboles, actuando como bombas de succión de nutrimentos y agua, motivo por el cual soportan mejor la época seca, contribuyendo a mejorar la estructura y fertilidad del suelo (Haynes, 1980; Cadisch et al., 1994; Flores y Schultze-Kraft, 1994; Florentino, 1998; Rodríguez, 2000). Poseen además un alto contenido proteico, fósforo y calcio que contribuye a la nutrición del ganado. Por tanto, al incluir leguminosas persistentes en las pasturas, se provee una fuente económica y continua de nitrógeno al suelo y de proteína para los animales, contribuyendo así al incremento de la producción, y a la disminución de los costos. Efectivamente, dentro del precio del alimento concentrado para

animales el componente más costoso es precisamente la proteína, por lo que el suministro de ensilaje o forraje fresco de la leguminosa disminuiría considerablemente los gastos en alimentación (Haynes, 1980; Humpreys, 1994; Anzola et al, 1990).

Se ha demostrado que en los animales alimentados en pasturas con leguminosas el incremento de peso se debe a un mayor contenido de proteína. Además la digestibilidad y contenido de proteína de las gramíneas disminuye mucho más rápido con la edad que en el caso de las leguminosas. Esto es de gran importancia para la alimentación del rebaño en época seca, período durante el cual las gramíneas pierden drásticamente su valor proteico, ocasionando disminución del consumo de materia seca por parte del ganado y pérdida de peso (Humpreys, 1994). Al complementar estas pasturas con leguminosas el consumo de gramíneas aumenta, debido a que el contenido de proteína de la dieta mejora sustancialmente, las bacterias del rumen pueden digerir el pasto aún lignificado y de esta forma el ganado no pierde peso. Los beneficios de las leguminosas también se traducen en el aumento del número de terneros al destete, celos más rápidos después del parto, menor número de servicios por preñez, mayor porcentaje de preñez y pesos al destete más altos. Todo esto genera más ganancias al productor pues se reducen los costos de producción por una parte y simultáneamente, se incrementan los parámetros de producción (peso/animal, % de preñez, litro de leche/ordeño, etc.) (Ivory, 1990; Humpreys, 1994; Chacón et al., 1995).

#### **Utilización de las leguminosas en los ecosistemas de sabana**

El uso que hace el hombre de las leguminosas es casi tan variado como la diversidad de géneros de las mismas, por lo que se les suele denominar plantas multipropósitos. Considerando esta diversidad, Schultze-Kraft (1998) presenta una clasificación, distinguiéndolas principalmente en: Alimento para consumo humano: raíces, flores, frutos y semillas, que suministran proteínas, carbohidratos y grasas. Alimento para animales: forrajes y residuos de cultivos agrícolas,

particularmente importantes por su alto contenido proteico. Usos técnicos: madera, resinas, colorantes, fibras, elaboración de insecticidas, etc. Conservación y mejoramiento del suelo: por medio de mulch, abono verde y cobertura del suelo, con la finalidad de reducir la temperatura del suelo, y mejorar su balance hídrico y su estructura, combatir malezas y controlar la erosión, e incrementar la concentración de nutrimentos y materia orgánica en la capa arable. Otros usos importantes: cercas vivas, plantas medicinales, de sombra, ornamentales, etc. Entre las leguminosas usadas en la alimentación animal existe una gran variedad. Por su hábito de crecimiento se pueden agrupar en herbáceas y arbustivas o arbóreas.

### Diversidad del germoplasma vegetal en sabanas

La zona tropical contiene la mayor diversidad genética del mundo, expresada en el gran número de plantas vasculares por unidad de área, no obstante los modelos de alimentación animal se han basado principalmente en el uso de muy pocas especies vegetales (Rosales, 1998). Dentro de este ámbito nuestro país ocupa una posición relevante. Entre 1978 y 1986 se realizaron exploraciones para la recolección de germoplasma de leguminosas nativas en regiones de suelos ácidos y de baja fertilidad donde se evidencia la variedad de especies de leguminosas con potencial forrajero, donde el resultado de ello fue la colección de 1906 accesiones (diversos materiales de una misma especie colectados en diferentes regiones), representada por más de 20 géneros importantes y más de 60 especies de elevada potencialidad. Los géneros reconocidos con más frecuencia fueron *Centrosema* (434 muestras; 23 % del total de muestras colectadas), *Stylosanthes* (259 muestras; 14 % del total) y *Desmodium* (235 muestras; 12 % del total). Tomando en cuenta los resultados mencionados, recientemente se hizo otra exploración del territorio nacional, específicamente en el ecosistema sabana con sus distintas variantes, con la finalidad de preservar el germoplasma nativo, profundizar en el conocimiento de la diversidad biológica de leguminosas con potencial forrajero y promover su utilización para el mejoramiento de la productividad animal en las sabanas de Venezuela, centrando la recolección de germoplasma en tres

géneros importantes de leguminosas: *Centrosema* spp., *Desmodium* spp y *Stylosanthes* spp . El resultado se tradujo en 137 accesiones colectadas, 79 muestras botánicas y de nódulos de raíces para aislamiento de *Rhizobium* (Flores y Schultze-Kraft, 1994). Al comparar el número de especies (y accesiones dentro de la mismas) colectadas con las procedentes de otros viajes, se observa que dicha cantidad es menor (Schultze-Kraft, 1991). De esto se infiere que la biodiversidad en estos géneros ha disminuido significativamente en los últimos treinta años, como resultado del alto grado de intervención en las áreas aledañas a los caminos principales y zonas con vegetación natural donde abundaban los géneros bajo estudio.

### Alternativas de propagación en leguminosas forrajeras

Las diversas especies de leguminosas existentes poseen un potencial económico y ecofisiológico que debe ser desarrollado, debido la relativa baja fertilidad natural de los suelos asociados a este tipo de ecosistema, por lo cual se plantea incrementar el desarrollo de especies vegetales adaptadas a esas condiciones edafoclimáticas. El estudio de leguminosas forrajeras requiere de la generación eficiente de nuevas tecnologías, que puedan ser implantadas en programas de desarrollo sostenible, respetando los criterios para el mantenimiento de la biodiversidad, lo que podría generar respuestas parciales a los problemas de desertificación, degradación ambiental y cambios climáticos en este tipo de ecosistemas. El uso de leguminosas en sistemas silvopastoriles, ya sean arbóreas o hierbas anuales y perennes, constituye una alternativa económica, al disminuir costos de alimentación animal si se trata de leguminosas herbáceas, y como fuente maderera, como es el caso del alcornoque y el cují. En el caso de las sabanas que se encuentran ubicadas en la zona nororiental de nuestro país, entre algunas de las leguminosas que pueden contribuir al mejoramiento del hábitat de la fauna de este agroecosistema se pueden señalar a *Stylosanthes humilis*, *Centrosema venosum*, *Centrosema macrocarpum*, *Cassia moschata*, entre otras, de las cuales las herbáceas son géneros usados como alimento por varias especies de aves granívoras como la perdiz sabanera; todas son

especies que representan alternativas de gran valor económico y para la biodiversidad en sistemas de sabanas. Debido a que la disponibilidad de las diferentes especies de leguminosas dentro de las sabanas neotropicales no se presenta de forma uniforme durante todo el año, y que el número de individuos de una misma especie presentes en este agroecosistema no son suficientes para la implementación de ciertos estudios de diversa índole, el estudio de algunas especies de leguminosas podría proporcionar un modelo experimental para estudios morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos para programas de mejoramiento de leguminosas. El desarrollo de tecnologías de gran eficiencia desde el punto de vista biológico, cuantitativo y económico, que faciliten un mayor grado de automatización en los procesos de almacenamiento y multiplicación de germoplasma valioso, permitirán a su vez disminuir los costos en la producción de plantas *in vitro* (Pérez Ponce, 1998).

La propagación vegetativa representa una vía más directa para mantener características genéticas de una planta élite. Dentro de este tipo de propagación, el cultivo de tejidos ofrece un gran potencial de apoyo a los métodos tradicionales, al incrementar la producción de variedades genéticamente superiores, proveniente de la selección de poblaciones, del mejoramiento convencional o de un número limitado de semillas de polinización controlada. La propagación "*in vitro*" es una tecnología bien conocida y manejada con experiencia por más de tres décadas en muchos países del mundo. En la actualidad, se conoce que ha sido aplicada con diversos objetivos: producción masiva, mejoramiento, obtención de plantas libres de patógenos, etc. (Ashmore y Engelman, 1997; Altman y Loberant, 1998). La mayoría de los estudios realizados sobre micropropagación se han llevado a cabo en más de 50.000 variedades de más de 1000 especies de plantas ornamentales, agrícolas, forestales y en especies de uso industrial. Sin embargo, el uso de esta tecnología en especies nativas de diversos ecosistemas, ha resultado un proceso complejo en muchas de las especies que han sido estudiadas (Pérez Ponce, 1998). La micropropagación "*in vitro*" permite la obtención de altas tasas de multiplicación y de una gran estabilidad genética al

compararse con los sistemas de reproducción agámica y clonal, donde se ha facilitado la reducción en costos de manipulación, sin disminuir la eficiencia biológica y productiva, específicamente a nivel de plantas agrícolas y de uso industrial (Pérez Ponce, 1998). Es importante destacar que cualquier sistema de micropropagación de plantas debe garantizar la mayor estabilidad genética y calidad sanitaria del material propagado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objeto de inducir juvenilidad (rasgos de rejuvenecimiento en plantas adultas) y lograr un índice mayor de multiplicación a las plantas que servirán como donadoras de explantes, se les aplicó una serie de pretratamientos, tales como: aplicación de citocininas (BA) en forma de aspersion y con dosis que variaron entre 100 y 300 mg/l, podas regulares y fertilización periódica, paralelamente al control de patógenos y plagas de las plantas.

### Propagación *in vitro* de especies nativas de sabanas

Dentro del marco de la investigación propuesta, se estableció el trabajo de investigación con las especies seleccionadas que se mencionan a continuación: *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema venosum* y *Centrosema macrocarpum*, *Bowdichia virgiloides* (Alcornoque), *Stylosanthes humilis* y *Stylosanthes capitata* y *Cassia moschata* (Cañafistola). La técnicas de propagación *in vitro* empleadas para las especies de leguminosas señaladas anteriormente fueron las siguientes:

### Micropropagación a través de meristemos o inducción de yemas pre-existentes.

Para el proceso de iniciación se utilizaron meristemos y yemas apicales provenientes de las plantas seleccionadas. En esta experiencia se probaron diversos medios de cultivo: Medio de Murashige y Skoog (1962) y Medio de Schenck y Hildebrandt (1972) como medio de iniciación al 100% de su concentración, los cuales fueron suplementados con diferentes combinaciones de vitaminas, sacarosa y agar. Para alcanzar este

objetivo se emplearon bajas concentraciones de citocininas BA (6-Bencilaminopurina) y TDZ (Tidiazuron) de 0.5 y 2 mg/l para inducir el proceso (Dewan et al., 1992; Puri et al., 1992; Botta y Delle-Monache, 1993). En esta etapa sólo se determinó si existía o no abultamiento del explante. La duración de esta etapa fue de 4 semanas.

La multiplicación de los explantes, se llevó a cabo utilizando los medios seleccionados en la etapa de iniciación, pero incrementando la concentración de BA. Se probaron concentraciones de 2 y 5 mg/l de BA. En esta etapa se realizó la evaluación del proceso en base a los siguientes parámetros: número de brotes, velocidad de aparición de los brotes, fortaleza de los brotes y coloración de los mismos. La duración y evaluación de esta etapa se realizó a las 4 y 6 semanas posteriores a la inoculación del explante en los medios de multiplicación, con el objeto de comparar si el alargar la duración de esta etapa pudiera ser más beneficioso en la obtención de un mayor número de brotes. Posteriormente, los explantes fueron pasados al medio seleccionado para lograr el alargamiento de los brotes, donde la concentración de sales (Murashige y Skoog (1962) y Schenck y Hildebrant (1972)) fue disminuida (50 ó 25 %), además de eliminar completamente la fuente de citocininas (BA). La duración y evaluación de esta etapa se realizó a las 2 semanas posteriores a la inoculación de los explantes en los medios planteados para el desarrollo de esta etapa, donde el parámetro a evaluar fue el alargamiento de los brotes.

### **Organogénesis**

Para la micropropagación a través de organogénesis, se probaron diversos explantes: yemas, secciones de hoja, meristemos, etc. y se utilizaron diferentes medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962; Schenck y Hildebrant, 1972) como medio de iniciación al 100% de su concentración, los cuales fueron suplementados con diferentes combinaciones de vitaminas, sacarosa y agar. Se emplearon diferentes concentraciones de citocininas BA (6-Bencilaminopurina) en dosis bajas de 0.5 y 2 mg/l, y 0.5 mg/l de ANA (Ácido naftalenacético) para inducir el proceso, o sea la aparición del callo organogénico (Dewan et al.,

1992; Puri et al., 1992; Botta y Delle-Monache, 1993). En esta etapa sólo se determinó si existe o no abultamiento del explante y la generación de callo organogénico. La duración de esta etapa abarcó 4 semanas. La multiplicación de los explantes, se llevó a cabo utilizando los medios seleccionados en la etapa de iniciación, pero incrementando la concentración de BA. Se probaron concentraciones de 2 y 6 mg/l de BA, tanto para el medio de Murashige y Skoog (1962) como para el medio de Schenck y Hildebrant (1972). En esta etapa se realizó la evaluación del proceso en base a los siguientes parámetros: número de brotes, velocidad de aparición de los brotes, fortaleza de los brotes y coloración de los mismos. La duración y evaluación de esta etapa se realizó a las 4 semanas posteriores a la inoculación del explante en los medios de multiplicación.

Posteriormente, con el objeto de lograr el alargamiento de los brotes, especialmente en el caso de la especie arbórea, los explantes fueron pasados al medio seleccionado donde la concentración de sales (Murashige y Skoog (1962) y Schenck y Hildebrant (1972)) fue disminuida (50 y 25 %), además de eliminar completamente la fuente de citocininas (BA). La duración y evaluación de esta etapa se realizó a las 2 semanas posteriores a la inoculación de los explantes en los medios planteados para el desarrollo de esta etapa, donde el parámetro a evaluar fue la altura de los brotes.

### **Inducción de Embriogénesis Somática**

Para la inducción del callo se utilizaron diversos explantes provenientes de las plantas seleccionadas, con especial interés en los embriones inmaduros. En esta experiencia se probaron diversos medios de cultivo: Medio de Murashige y Skoog (1962) y Medio de Schenck y Hildebrant (1972) al 100 % de su concentración, los cuales fueron suplementados con diferentes combinaciones de vitaminas, sacarosa y empleando agar y gelrite como agentes gelificantes. Se utilizaron diferentes concentraciones de auxinas 2,4 D (ácido diclorofenoxiacético) en dos concentraciones (1-2 mg/l) con el objeto de determinar la más conveniente para inducir el proceso. Luego de la

siembra, un grupo de explantes permanecieron en cámaras de crecimiento, donde se ensayó con diferentes fotoperíodos pasando previamente por un período de oscuridad absoluta, y otro grupo se mantuvo en oscuridad absoluta, para determinar las condiciones ideales para el desarrollo del callo. En esta etapa sólo se determinó la formación del callo embriogénico en cada uno de los explantes. La multiplicación del callo, se llevó a cabo utilizando los medios seleccionados en la etapa de iniciación, en los cuales se ensayarán diferentes concentraciones de auxina (2 y 5 mg/l). En esta etapa se realizó la evaluación del proceso en base al desarrollo del callo embriogénico. Posteriormente, los callos fueron pasados a los medios seleccionados durante el proceso de multiplicación del callo, donde fue eliminada la concentración de auxinas, con el objeto de lograr la diferenciación de los embriones. La evaluación de esta etapa se realizó con base al porcentaje de los embriones que se encuentran en cada etapa de desarrollo embrionario (globular, corazón y torpedo). Posteriormente, se procedió a inducir el proceso de germinación de los embriones obtenidos "in vitro" en los medios señalados anteriormente, los cuales fueron suplementados con vitaminas de Morel y BA como fuente de citosina, en bajas concentraciones (0.5 y 1 mg/l). En esta etapa el parámetro a evaluar fue el porcentaje de germinación de los embriones.

### **Fase de enraizamiento y aclimatización de las plantas obtenidas in vitro**

En una etapa posterior a la obtención de plántulas a través de las técnicas de propagación in vitro señaladas previamente, se procedió al enraizamiento de las mismas. Para lograr este objetivo se plantearon diferentes alternativas, tales como: a) Uso de reguladores de crecimiento en forma directa (Impregnando la parte basal del explante con soluciones con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como el Ácido Indol Butírico entre 0.5-1.5 mg/l, que favorecen la aparición de raíces); b) Inducción de enraizamiento "in vivo", utilizando tierra abonada como sustrato; c) Utilización de diversos medios de enraizamiento (Murashige y Skoog (1962) y Schenck y Hildebrandt (1972) con diferentes fuentes hormonales (ácido indol butírico

(IBA) con concentraciones de 0.5 y 2 mg/l) y diversas condiciones de cultivo (disminución de la concentración de sales, variación de la temperatura, intensidad lumínica, etc.); d) Utilización de medios de cultivos con reducción de sales a la mitad y a un cuarto de concentración, o sea, utilizando las sales al 50 y al 25 % de su concentración; e) Utilización de sustancias antiestrés (brasinoesteroides)(0.1 mg/l) de plantas, que favorecen el proceso de enraizamiento; f) Micorrización de los explantes que no poseen raíces, utilizando las micorrizas directamente, o en solución. Cuando se menciona que se utilizarán micorrizas en solución, se trata de utilizar las micorrizas pulverizadas, y preparar soluciones con esta materia prima en diluciones al 50 y 75 % de concentración (Honrubia, 1995; Tarafdar y Praveen, 1996) y g) Calentamiento de la parte basal de los explantes por diferentes períodos de tiempo (1-5 minutos), o sea, aplicar temperaturas por encima de los 40 °C por períodos de tiempo comprendidos en el lapso señalado inicialmente.

Para la optimización de protocolos se utilizaron metodologías empleadas en trabajos realizados con especies similares a las utilizadas para esta investigación (Coleman y Thorpe, 1977; Arnold y Eriksson, 1979; Dewan et al., 1992; Puri et al., 1992; Badji et al., 1993; Botta y Delle-Monache, 1993; Feng et al., 1994; Goel y Behl, 1995; Valverde-Cerdas et al., 1997)

En esta etapa sólo se determinará si existe o no la aparición de raíces en los explantes. La duración y evaluación de esta etapa se realizó a las 4 semanas de que los brotes habían sido trasladados al medio de enraizamiento. En relación a la aclimatización de las plantas obtenidas in vitro, este proceso se realizará ajustando las condiciones de luz, temperatura y humedad relativa de forma paulatina para permitir la adaptación de las plantas obtenidas in vitro al desarrollar estructuras que no son funcionales en esa etapa.

## **DISCUSIÓN**

### **Proliferación masiva a partir de yemas axilares**

Al cultivar in vitro los meristemas apicales del vástago (MAV), podemos inducir el desarrollo

de yemas axilares preexistentes para formar brotes axilares o inducir la formación de yemas adventicias para formar brotes adventicios. La escogencia entre los dos objetivos anteriores depende del contenido de hormonas, en especial, del contenido de citoquininas. Cuando la concentración de citoquininas es baja se induce la formación de yemas axilares y cuando es alta, de yemas adventicias, permitiéndonos de esta forma propagar las plantas de forma asexual masiva. Para este tipo de propagación "in vitro" sólo se deben utilizar yemas axilares y meristemas aislados con el objeto de asegurar el mínimo grado de variabilidad en las plantas micropropagadas. A través de esta técnica, se han obtenido resultados exitosos en *Canafistola* (*Cassia moschata*) al utilizar TDZ (Tidiazuron) como fuente de citocininas, ya que se produce una menor oxidación, el cual es un problema típico de cultivo de leguminosas leñosas, el cual se genera debido a la producción de compuestos fenólicos y pardeamiento de los explantes y el medio (Trujillo et al., 2002).

### Organogénesis

Para la propagación in vitro a través de organogénesis se ha ensayado con diversos explantes: yemas, secciones de hoja, meristemas, etc; y se han utilizado diferentes medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962; Schenck y Hildebrandt, 1972). El proceso de propagación "in vitro" a través de organogénesis indirecta ha sido desarrollado para especies como *Centrosema macrocarpum*, *Centrosema venosum* y *Stylosanthes humilis* y *Stylosanthes capitata* (Pérez et al., 2006). En todos los casos, se presenta una excesiva formación de callo sobre el explante, lo cual se pudo disminuir posteriormente al eliminar las auxinas del medio de cultivo (Figuras 1 y 2).

### Embriogénesis

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual, células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas a través de estados embriológicos característicos, sin que ocurra la fusión de gametos. Este proceso se desarrollará en forma específica para cada una de las especies seleccionadas para conformar el

Banco de Germoplasma. Las auxinas constituyen el factor más importante para la regulación de la inducción y desarrollo de la embriogénesis, y tiene efectos diferentes en las distintas fases del proceso. La auxina es necesaria para que las células competentes (Estado 0) expresen totipotencia. Sin embargo, la auxina podría ser inhibitoria en las fases siguientes (Ammirato, 1987; Lukse et al., 1996). El desarrollo de esta técnica como una alternativa para la propagación "in vitro" de leguminosas ha sido desarrollada exitosamente para *Stylosanthes capitata* y *Stylosanthes humilis*, donde se ha logrado la producción de plantas completas (Fig.3) (Pérez et al., 2004).

### Enraizamiento y Aclimatización

Uno de los principales problemas encontrados en la propagación in vitro de leguminosas leñosas es el enraizamiento de los brotes. De las alternativas probadas, el suplemento hormonal con IBA ha sido exitoso en algunos casos (Weaver y Trigiano, 1989). Otra de las alternativas exitosas empleadas ha sido el enraizamiento ex vitro, empleando la inmersión en soluciones de IBA en el extremo cortado del brote, y el cultivo del mismo directamente en el suelo. Este fue el procedimiento empleado con las plantas in vitro de cañafistola, utilizando una solución de 600 mg/l para la inmersión, y regando el suelo interdiariamente con una solución enraizadora comercial por una semana. El suelo empleado para esta fase fue previamente esterilizado por 20 min en autoclave a 15 lb de presión y 121 °C, posteriormente se mantuvo en estufa por 3 d a una temperatura de 60 °C. Con este procedimiento se logró el enraizamiento de alrededor del 60 % de los brotes empleados en la experiencia, resultados que son similares a los presentados por Weaver y Trigiano en 1989.

Con respecto a la micorrización de las plántulas, hasta los momentos no se han obtenido resultados exitosos, sin embargo se ha considerado continuar los ensayos con otros aislados de micorrizas.

En relación a la aclimatización de las plantas obtenidas in vitro, se puede señalar que el porcentaje de plantas aclimatizadas fue

medianamente alto, donde sólo en el 40 % de las plantas propagadas in vitro se puede decir que fue un proceso exitoso, ya que las mismas a pesar de tener características muy frágiles luego de ser pasadas de condiciones in vitro a ex vitro, pudieron enraizar y asimilar las condiciones del ambiente en un porcentaje aceptable.

El conocimiento acerca de la manera en que el ambiente de desarrollo in vitro y aclimatización afectan la anatomía de las vitroplantas es necesario para diseñar prácticas de manejo más eficaces. Esto ha sido demostrado en los estudios realizados por Donnelly et al., (1985) en *Rubus idaeus*, Dami y Hughes (1995) in vid, Zobayed et al., (1999) en papa, Seon y col. (2000) en *Rehmannia glutinosa* y Anita et al., (2000) en *Dendrobium*. Estos autores describieron los efectos del ambiente sobre la anatomía de vitroplantas y señalaron que son determinantes para la adaptación en las condiciones ex vitro.

La biotecnología puede contribuir a la conservación de diversas especies a través de las diferentes técnicas que la conforman: cultivo in vitro de especies vegetales; caracterización del germoplasma a través de marcadores bioquímicos y moleculares y en la conservación de plantas a través de bancos de germoplasma. La utilización de técnicas de propagación in vitro en el cultivo de especies vegetales es muy útil en el rescate de aquellas que se encuentren en peligro de extinción, en la conservación de variedades en bancos de germoplasma; en la propagación selectiva de individuos con atributos valiosos y libres de enfermedades, y en la domesticación de especies silvestres. De igual manera, dichas técnicas pueden constituir una herramienta de utilidad para resolver problemas asociados con la colecta de germoplasma. Marinucci y col (2004) sugieren que algunas leguminosas nativas de la República Argentina pueden ser propagadas mediante técnicas de cultivo de tejidos.

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 tener la

disponibilidad de germoplasma dentro y fuera del país donde se encuentra la colección. El proceso de propagación in vitro de las especies estudiadas desarrollado en esta investigación permitirá la utilización de dichas especie en programas de conservación de colecciones de recursos fitogenéticos de las zonas de sabana.

La conservación de la diversidad vegetal en los ecosistemas con respecto a plantas cultivadas o no es vital, y en el de sabana es especialmente importante, porque de esto depende su supervivencia y su capacidad para responder a los retos de un ambiente cambiante.

## CONCLUSIONES

Las sabanas constituyen la frontera agrícola del país. A pesar de ser una zona frágil, con limitaciones de suelo y clima, posee potencialidades que es necesario explotar. En ellas están asentados diversos sistemas de producción agrícola, donde la ganadería es quizás la de mayor importancia y predominancia. La diversificación de estos sistemas, mediante la inclusión de especies de leguminosas, es una de las alternativas viables. Las leguminosas revisten 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.

El establecimiento de bancos de germoplasma "in vitro" que agrupe plantas de leguminosas con usos diversos, clasificadas en especies arbóreas y herbáceas, con usos en suplementación animal, agricultura y medicinales, permitirá trabajar en la conservación de especies vegetales utilizadas con diversos usos en la región de sabana de nuestro país.

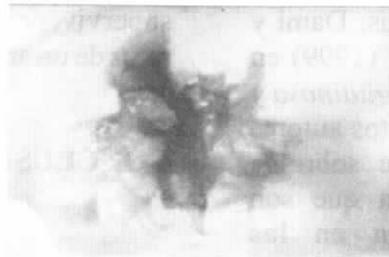
En la actualidad y en el futuro se debe concebir el uso de las leguminosas en las sabanas como un beneficio integral, teniendo en cuenta la

sostenibilidad ambiental, para lo cual el desarrollo de tecnologías como la producción de plantas in vitro será determinante, favoreciendo un mayor

grado de automatización en los procesos de almacenamiento y multiplicación de germoplasma valioso.



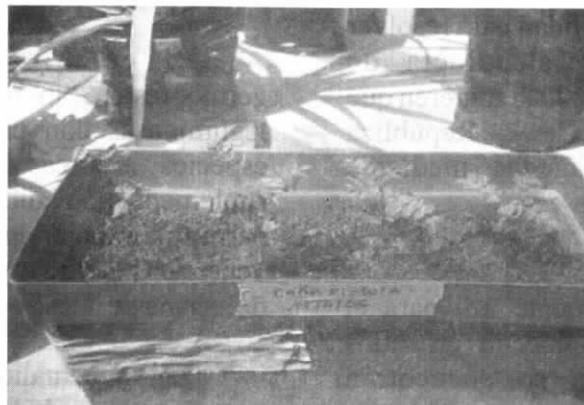
**Figura 1.** Callo organogénico de *Centrosema macrocarpum*.



**Figura 2.** Brotes de *Centrosema macrocarpum* obtenidos a partir de organogénesis directa.



**Figura 3.** Etapas de la propagación "in vitro" de *Stylosantes capitata* a través de embriogénesis somática: (1) Planta madre, (2) embrión somático en fase torpeda; (3) plantas enraizadas; (4) plantas en aclimatización.



**Figura 4.** Aclimatización de plantas de cañafistola (*Cassia moschata*).

## LITERATURA CITADA

- Altman, A. y B. Loberant. 1998. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. En: *Agricultural Biotechnology* New York. pp: 19-42.
- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. En: *Plant Tissue Culture*. C.E. Green; D.A. Somers; W.P Hackett y D.D. Biesboer (Eds.) Ed. Añam R. Liss. Inc. New York. pp: 55-81.
- Anita, S., L. Priya, K. Rajmohan y S. Alex. 2000. Comparison of chlorophyll content, water loss, and anatomical features of leaves of the normal, *in vitro* cultured and, hardened *Dendrobium* hybrid plants. *J. Orchid Soc. India* 14(1-2): 41-46.
- Anzola, H.; Martínez, G. ; Gómez, F. ; Hernández, I. y H. Huertas. 1990. Strategic supplementation of bypass protein and fat to dual purpose cattle in the Colombian tropics during the dry season. *Livestock Res. Rural Develop.* Vol 2. No. 3. p. 1-9.
- Arnold, S and Eriksson, T. 1979. Induction of Adventitious Buds of Norway Spruce (*Picea abies*) grown in vitro. *Physiol. Plant.* 45:29-34.
- Ashmore, S.E. y E. Engelman. 1997. Status Report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetics resources. IPGRI, Roma. 67 pp.
- Badji, S; Y. Mairone; I. Ndiaye; G. Merlin; P. Danthu; P. Neville and J.P. Colonna. 1993. In vitro propagation of the gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd). 1. - Developing a rapid method for producing plants. *Plant Cell Reports* 12: 629-633.
- Botta, B. y Delle-Monache, G. 1993. *Cassia didymobotrya* (wild senna): in vitro culture, biotransformation and the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Agric. For.* V.21:64-86.
- Cadisch, C.; Carvalho, E.F; Suhel, A. R.; Vilela, L.; Soares, W.; Spain, J.M.; Urquiaga, S.; Giller, K.E. y R.M. Boodey. 1994. Importance of legume nitrogen fixation in sustainability of pastures in the Cerrados of Brazil. En: *Proceedings of the XVII International Grassland Congress*, 8-21 February 1993, vol. 3. NZGA, TGSA, NZSAP, ASAP-Qld, and NZAIAS. Palmerston North, New Zealand. pp. 1915-1918.
- Chacón, E.; Camacaro, S.; Soler, P.; Díaz, J.; Torres, A. y F. Espinoza. 1995. Manejo de bancos de leguminosas con bovinos a pastoreo. En: Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. UNELLEZ, Guanare, 17 y 18 de febrero de 1995. pp. 124-134.
- Coleman, W.K and Thorpe, T.A. 1977. In vitro culture of western reedcedar (*Thuja plicata* Donn.). I. Plantlet formation. *Bot. Gaz.* 138: 298-304.
- Dami, I. Y H. Hughes. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 179-184.
- Dewan, A; K. Nanda y S. C. Gupta. 1992. In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. Indica Brenan via cotyledonary nodes. *Plant Cell Reports* 12: 18-21.
- Donnelly, D., W. Vidaver y K. Lee. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 43-50.
- Domínguez, C; P.Herrra; B.Birbe; A.González y N. Martínez. 1996. Experiencias en la utilización de fracciones de árboles forrajeros en estrategias de suplementación en sistemas de producción con bovinos de doble propósito en el Estado Guárico. Taller denominado "Los árboles en los sistemas de producción ganadera". Matanzas, Cuba. 11 p.
- Feng, H.H; J.M. Al-Khairi and E. Gbur. 1994. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In vitro Cell Dev. Biol.* 30 P: 70-74.
- Florentino de Andreu, A. 1998. Papel de las leguminosas en la conservación del suelo. En: Seminario Internacional Cobertura de Leguminosas en cultivos permanentes. Compendio. LUZ. Santa Bárbara del Zulia, 1 y 2 de octubre de 1998.
- Flores, S. 1999. Recordando el uso de las plantas en mapire. Impregráficas. S.R.L. 56 p.
- Flores, A. J. y R. Schultze-Kraft. 1994. Recolección de recursos genéticos de leguminosas forrajeras tropicales en Venezuela. *Agronomía Tropical* 44(5):357-371.
- Goel, V.L. and H.M. Behl. 1995. Propagation of *Prosopis juliflora* from rooted stem cuttings. *Int. Tree Crops J.* 8(4): 193-201.
- Gómez, R; L.Posada; M.Reyes. y M.Nuñez. 1996. Empleo de sustancias bioreguladoras (BIOBRAS-6) en la conversión y adaptación de plantas de fruta bomba (*Carica papaya* L.) Var. Maradol rojo obtenidas a partir de embriones somáticos. Material mimeografiado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cuba. 20 pp.
- Haynes; R. J. 1980. Competitive aspects of the grass-legume nitrogen to associated grass. *Ad. Agron.* 33:227-261.
- Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G.; Morte, A. 1995. Biotecnología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas. Material Impreso. Universidad de Murcia, España. 40 pp.
- Humphreys, L. R. 1994. Tropical forages: their role in sustainable agriculture. Longman Scientific and Technical, Harlow, Gran Bretaña.
- Ivory, D.A. 1990. Major characteristics, agronomic features and nutritional value of shrubs and tree fodders. En: C. Devendra (ed.) Shrub and tree fodders for farm animals. Proceedings of a Workshop in Denpasar, Indonesia, 24-29 July 1989. IDRC, Ottawa, Canada. 22-38.
- Lukse, E; T.D. Dinkova y M. Ramos. 1996. Aspectos Bioquímicos-Moleculares de la Embriogénesis Somática en Plantas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* Vol. 27. Nº 1-2-3: 13-17.
- Kolloge, S. 1997. Sustainable Agriculture. Agenda 2-The implementation of the action programme by the E.U. common agricultural policy. *Plant Res. Develop.* Vol 45: 8-21.
- Mannion, A.M. 1998. Can Biotechnology contribute to

- sustainable agriculture. *J. Sustain. Agric.* 11(4): 51-75.
- Marinucci, I.; M. Ruscitti y W. Abedini. 2004. Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Rev. Fac. Agron., La Plata*, 105 (2): 27-36.
- Medina, E and Bilbao, B. 1991. Significance of nutrient relations and symbiosis for the competitive interactions between grasses and legumes in a tropical savanna. In: *Facets of Modern Ecology*. Ed. by G. Esser. Kluwer, Dordrecht, pp. 295-320.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Pérez, E. M. 2000. Seasonal diet composition in the Crested Bobwhite in savannas of Central-Eastern Venezuela. *Stud. Neotrop. Fauna and Environ.* 35:91-99.
- Pérez, A; Trujillo, I.; Ribón, I. ; y M. Vidal. 2004. Embriogénesis Somática en una leguminosa nativa de sabana: *Stylosanthes humilis*. REDBIO 2004. Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola. Santo Domingo, República Dominicana.
- Pérez, A; I.Trujillo; M.Vidal y N.De Lima. 2006. Micropropagación acelerada de *Stylosanthes humilis* una especie de gran potencial forrajero. *Acta Bot. Venez.* 29(2): 335-346.
- Pérez Ponce, J.N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. GEO. Santa Clara, Cuba. 390 p.
- Puri, S; M.Jain and P. Sharma. 1992. In vitro plant regeneration of *Prosopis cineraria*. *Nitrogen-Fixing-Tree-Res.* 10:189.
- Rippstein, G; E. Escobar; F. Motta. 2001. Agroecología y Biodiversidad de las sabanas en los Llanos Orientales de Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIATN° 322. 308 p.
- Rodríguez, I. 2000. Fijación de nitrógeno en las leguminosas *Centrosema brasilianum* (L.) Benth. y *Stylosanthes capitata* Vog. y transferencia a sus asociaciones con *Brachiaria distyomeura* (Fig. and De Nof) Stapf. Tesis M. Sc.; Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias, Postgrado Producción Animal. UCV. 129 p.
- Rosales, M., M. 1998. Mezclas de forrajes: uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. Conferencia Electrónica de la FAO sorbe Agroforestería para la Producción Animal en Latinoamérica. 11 pp.
- Ruffoni, B; F.Massabo; C. Constantino; V. Arena y C. Damiano. 1992. Micropropagation of *Acacia mimosa*. *Acta Hort.* 300: 95-102.
- Schenck, R.V. y Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can.J.Bot.* 50:199-204.
- Schultze-Kraft, R. 1991. (Comp.). La colección de forrajeras tropicales del CIAT. 2. Catálogo de Germoplasma de Venezuela. Documento de Trabajo No. 85. Cali, Colombia. CIAT. 296 p.
- Schultze-Kraft, R. 1998. Leguminosas tropicales y diversidad de sus usos: una sinopsis. En: Seminario Internacional Cobertura de Leguminosas en cultivos permanentes. Compendio. LUZ. Santa Bárbara del Zulia, 1 y 2 de Octubre de 1998.
- Seon, J., Y. Cui, T. Kozai Y K. Paek. 2000. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 61: 135-142.
- Tarafdar, J.C. and K. Praveen. 1996. The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on crop, tree and grasses growth in an arid environment. *J. Arid Environ.* 34(2):197-203.
- Trujillo, I.; Ribón, I.; Pérez A. y M. Vidal. 2002. Propagación "in vitro" de cañafistola (*Cassia moschata*): una especie de gran potencial para la suplementación de la alimentación de ganado bovino. En: VIII Congreso Latinoamericano de Botánica. Cartagena, Colombia.
- Valverde-Cerdas, L; M.Dufour and V.M. Villalobos. 1997. In vitro propagation of *Phitecellobium saman* (raintree). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33 (1):38-42.
- Weaver, L.A. y R.N. Trigiano. 1989. Tissue culture of yellowwood. *Proc. South.Nursery. Assoc. Conf.* 34:15-18.
- Whiters, L.A. and F. Engelman. 1998. In vitro conservation of plant genetic resources. In: *Agricultural Biotecnology* New York. p. 57-88.
- Zobayed, S., F. Afreen-Zobayed, C. Kubota Y T. Kozai. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 35: 183-188.