



Universidad Nacional
Del Nordeste



Facultad de Ciencias
Agrarias

Trabajo Final de Graduación
Modalidad Pasantía

Producción de semillas en cultivares e híbridos F_1
de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw.

Alumno: Sergio Gastón Aquino

Asesor: Ing. Agr. (M.S., Ph.D.) Carlos A. Acuña

Año: 2016

Introducción

La principal actividad productiva después del arroz en la provincia de Corrientes es la ganadería de cría bovina, la cual se desarrolla principalmente sobre campo natural. La producción del pastizal es estacional debido a que predominan especies gramíneas de ciclo estival (Royo Pallarés y Pizzio, 1988; Gándara y Arias Mañotti, 1999). La introducción de leguminosas podría ser un método económico para mejorar el valor nutritivo del tapiz vegetal por su aporte de proteínas a la dieta animal.

El género *Stylosanthes* pertenece a la tribu Hedisareas, subfamilia Papilionoideas, familia Fabaceae y se caracteriza por contener un número importante de especies cultivadas como forrajeras (Skerman et al., 1991). *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. es una leguminosa forrajera subtropical que ha demostrado ser promisoría para el norte de Corrientes. Es una especie autógama capaz de producir grandes cantidades de forraje en ambientes húmedos con suelos ácidos y pobres en nutrientes. Por estas razones es considerada como una de las especies forrajeras más importantes de áreas tropicales y subtropicales (Pizarro, 2005).

Los primeros cultivares comerciales de este género se originaron en América, siendo liberados a partir de 1970 en Australia; pero cuando estos fueron exportados a áreas tropicales como Brasil y Colombia, el hongo *Colletotrichum*, causante de la antracnosis, atacó severamente los cultivos llevándolo a su desaparición. Trabajos de mejoramiento y selección dieron como resultado líneas y cultivares resistentes a la antracnosis por lo que el cultivo de esta especie retomó importancia en Sudamérica y Australia a partir de 1980 (Miles y Lascano, 1997).

S. guianensis es una especie cuya producción de forraje y semillas puede complementar el rendimiento forrajero del campo natural, en la región del nordeste argentino. Su producción de biomasa forrajera en dicha zona alcanza 10 t MS en suelos pobres y 18 t de MS en suelos fértiles y el rendimiento de semillas varía entre 100 y 200 kg/ha (Ciotti et al., 2003).

En el nordeste argentino, *S. guianensis* es una especie perenne, su época de crecimiento va desde septiembre a mayo, y si bien no produce durante el invierno, con las primeras lluvias y temperaturas primaverales su producción de biomasa vuelve a incrementarse (Ciotti et al., 1995). Además, su forraje es de alta calidad con valores de proteína bruta que

oscilan entre 12,1 y 18,1 % para toda la planta (Skerman et al., 1991). La planta puede tener entre 0,5 y 1,8 m de altura, tiene tallos fuertes que ramifican abundantemente. Los tallos inferiores crecen en contacto con el suelo. Es una planta que cubre totalmente el suelo y por ello sirve para protegerlo de la erosión y para controlar las malezas sin usar herbicidas (Tomei et al., 1997). Se siembra a razón de 4 a 6 kg ha⁻¹. Teniendo en cuenta que el precio de la semilla es de alrededor de 20 U\$/Kg (Ciotti et al., 1998), puede sembrarse mezclando con otras forrajeras como Cambá FCA (*Paspalum atratum*), Chané FCA (*Paspalum guenoarum*), Brachiaria (*Brachiaria brizantha*), Setaria (*Setaria sphacelata*), entonces se usan 2 a 3 kg/ha de semilla de *Stylosanthes* (Tomei et al., 1997). La siembra de leguminosas forrajeras tropicales y subtropicales conjuntamente con gramíneas permite aumentar la calidad y cantidad de forraje (Skerman et al., 1991).

Se han realizado trabajos de investigación en Corrientes sobre producción de semillas de líneas puras de *S. guianensis* obteniendo buenos resultados. El rendimiento promedio de semillas en la región NEA es de 145 kg ha⁻¹ (Ciotti et al., 1999). Estos valores fueron obtenidos en ensayos en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste, cuyo suelo es un Psamaquent típico, arenoso, con pH 5,7.

Así mismo, Insaurralde F. (2011), en su trabajo final de graduación analizó la producción de semillas de las cuatro líneas de *S. guianensis* obteniendo los siguientes resultados: 38 g. m⁻² para el cultivar Graham; 7,5 g. m⁻² para el cultivar Endeavour; 2,2 g. m⁻² para el cultivar Cook y 1,6 g. m⁻² para el cultivar CIAT 184. Estos resultados fueron observados en un año en donde las primeras heladas ocurrieron en los primeros días de junio.

Sin embargo, los cultivares disponibles en el mercado en su mayoría no toleran inviernos fríos y la ocurrencia de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) que es un fenómeno común (Ciotti et al., 1999). Debido a esto se ha decidido intentar mejorar genéticamente a la especie para las condiciones reinantes en el NEA, como parte de las actividades del programa de mejoramiento genético de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (Acuña, 2013). Como parte inicial del trabajo se han generado híbridos F₁ y se pretende producir semillas de los mismos y de los cultivares que mejor se adaptan a las condiciones locales.

Objetivos

- Adquirir conocimiento acerca del manejo del cultivo de *Stylosanthes guianensis*: siembra de cultivares e híbridos y su seguimiento.
- Evaluar la producción y calidad de semillas de los materiales en estudio.

Lugar de realización

Cátedra de Forrajicultura, Departamento de Producción Animal, en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, ubicada en Sargento Cabral 2131, en Corrientes Capital, Argentina.

Descripción de las tareas desarrolladas

Material vegetal

Se utilizaron 4 variedades comerciales de *Stylosanthes guianensis*: Cook, Graham, Endeavour y CIAT 184 y una quinta línea pura, Q 4306, recolectada por el Ing. Camilo Quarin en la localidad de Santa Ana de los Guácaras. Se intentó obtener híbridos a través de cruzamientos entre los materiales previamente mencionados en otoño de 2013.

Manejo del cultivo de las variedades comerciales

Al inicio del trabajo, las cuatro variedades y la línea Q 4306 ya se encontraban establecidas en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias, en líneas individuales de 5 metros cada una y distanciadas a 1 m. Durante todo el ciclo del cultivo se controlaron las malezas en forma manual mediante carpidas a intervalos de 10 días. Esto solo fue necesario al inicio del cultivo, ya que una vez que la planta cierra el surco y se establece bien, forma una mata grande que cubre todo el suelo evitando así la competencia con las malezas.

Cosecha

Las variedades al momento de plena floración alcanzaron una altura de 1,5 metros (Fig. 1a). Para proceder al inicio de la cosecha se consideraron resultados previos de Ciotti et al. (2000), que indican que el momento óptimo de la cosecha de *S. guianensis* ocurre entre 7 y

14 días desde el momento en que comienzan a desprenderse dos semillas en el 5% de las inflorescencias, esto ocurre aproximadamente a los 60 días de inicio de floración (Fig. 1b).



Figura 1. Variedades de *Stylosanthes guianensis* cultivadas en el Campus Sargento Cabral, FCA-UNNE. a) El cultivo en plena floración; b) El cultivo previo a la cosecha.

Una vez que una línea en particular llegó a su punto óptimo se procedió a la cosecha de la totalidad de lo producido hasta ese momento, el día 06/06/2014. La cosecha se realizó en forma manual con tijera, a unos 15 cm por debajo de la canopea. El material recolectado fue secado al sol durante tres días (Fig. 2) y luego en estufa hasta alcanzar su punto óptimo para la trilla. La misma se realizó en forma mecánica utilizando una máquina trilladora estacionaria de pequeña escala (Fig. 3). La semilla fue luego separada del resto del material utilizando una serie de tamices circulares con distintos tamaños (Fig. 4).



Figura 2. Secado al aire libre, del material cosechado de las variedades de *Stylosanthes guianensis*.



Figura 3. Trilla mecanizada del material cosechado de *Stylosanthes guianensis*.



Figura 4. Tamizado y separación de las semillas de *Stylosanthes guianensis*.

Para finalizar el proceso las semillas pasaron por un mecanismo de soplado usando un soplador de semillas de pequeña escala de la cátedra de Genética, donde aquellos residuos de menor peso eran arrastrados por el aire y luego desechados, mientras que las semillas quedaban en el fondo del recipiente. La producción de semillas fue mayor para Graham y Q 4306 (Tabla 1) siendo estos valores superiores a los datos de la zona.

Tabla 1. Producción de semillas de *Stylosanthes guianensis* de las 4 variedades más la línea Q 4306.

	CIAT 184	Cook	Endeavour	Graham	Q 4306
Producción de semillas (g)	97	105	76	371,5	404
Producción de semillas (g. m)	19,4	21	15,2	74,3	80,8

Siembra de híbridos

Los híbridos se sembraron en macetas, con sustrato estéril y luego de dos meses se realizó el trasplante al lugar definitivo, distanciados a 1 metro por 1 metro (Fig. 5).



Figura 5. Parcelas de los híbridos de *Stylosanthes guianensis* establecidas en el Jardín de Forrajicultura de la FCA-UNNE.

Manejo del cultivo de los híbridos

Se controlaron las malezas en forma manual mediante carpidas a intervalos de diez días (Fig. 6), ya que al inicio del establecimiento de la planta su crecimiento fue lento por lo cual no compitió bien con las malezas. Las malezas que más predominaron fueron cadillos (*Cenchrus echinatus*), cebollín (*Cyperus rotundus*) y algunas especies latifoliadas como yuyo colorado (*Amaranthus quitensis*) y flor de Santa Lucía (*Commelina erecta*).



Figura 6. Parcela de los híbridos de *Stylosanthes guianensis*, desmalezada en forma manual con azada.

Los riegos se realizaron solo cuando fue necesario. La floración se dio de forma escalonada en los distintos híbridos comenzando las más precoces en marzo, las de floración media en el mes de abril y las tardías en el mes de mayo (Fig. 7).



Figura 7. Parcelas de los híbridos de *Stylosanthes guianensis* en plena floración, establecidas en el Jardín de Forrajicultura de la FCA-UNNE.

Cosecha de semillas híbridas

Se realizó un seguimiento semanal de cada híbrido y se procedió a cosechar únicamente las inflorescencias que llegaron a la madurez (Fig. 8). La misma se realizó de manera escalonada, 2 veces por semana, durante cinco meses. Las semillas fueron secadas en estufa a 32°C y trilladas en forma manual (Fig. 9). Luego fueron separadas de los residuos utilizando una serie de tamices circulares de distintos tamaños, y por último se utilizaron sobres de papel para su conservación y almacenaje en la cátedra de Forrajicultura.



Figura 8. Cosecha manual de los híbridos de *Stylosanthes guianensis*.



Figura 9. Trilla manual del material cosechado de los híbridos *Stylosanthes guianensis*.

Tabla 2: Lista de híbridos y progenitores involucrados y producción de semillas.

Los progenitores utilizados en cada cruzamiento se indican en cada celda. En primer lugar aparece el progenitor femenino, luego el masculino y a continuación se le dio una numeración algebraica que va del 1 al 20 en el cual se individualizó la producción de semillas (g/pl.) para cada uno.

Madre	Padre	Híbrido	Producción de semillas (g/pl)
Q 4306	CIAT 184	1	18,1
Q 4306	CIAT 184	2	2,0
Q 4306	Endeavour	3	7,7
Graham	Cook	4	6,3
Graham	Endeavour	5	6,6
Q 4306	Cook	6	4,4
Graham	Cook	7	8,2
Q 4306	Endeavour	8	5,7
Q 4306	Cook	9	13,7
Q 4306	CIAT 184	10	6,1
Q 4306	CIAT 184	11	7,9
Q 4306	Cook	12	8,1
Q 4306	Endeavour	13	6,8
Graham	Cook	14	4,3
Graham	CIAT 184	15	13,2
CIAT 184	Graham	16	7,1
Endeavour	CIAT 184	17	7,9
Endeavour	CIAT 184	18	9,3
Endeavour	CIAT 184	19	5,4
Endeavour	CIAT 184	20	4,1

De los 20 híbridos con los que trabajé hubo uno que sobresalió del resto, en cuanto a su porte fue muy superior, incluso llegando a cubrir con sus tallos a los otros híbridos. Este fue el número 1. También fue el que más semillas produjo (Tabla 2), con la desventaja de que fue de floración-fructificación tardía. Cabe aclarar que las condiciones climáticas durante el periodo del trabajo fueron significativas ya que no se registraron heladas por lo que se extendió notoriamente el tiempo de la cosecha manual de los híbridos que fue hasta el 20/10/2014. El resto de los híbridos tuvieron valores medios, exceptuando solo uno con valores muy bajos, que fue el número 2, que pudo deberse al sombreado y la fuerte competencia que sufrió por parte del híbrido número 1.

Dentro de la parcela se pudo observar tres etapas de maduración de las semillas de los distintos híbridos:

- Los más precoces se comenzaron a cosechar el 27 de mayo y fueron el 3, 7, 9, 10, 15 y 16; terminando el 2 de junio.
- Los de fructificación media se comenzaron a cosechar el 2 de junio y fueron los híbridos 4, 12, 13, 14, 18, 19, y 20; terminando la cosecha el 14 de agosto.
- Los de fructificación tardía se cosecharon el 15 de julio y fueron los híbridos 1, 2, 5, 6, 8, 11 y 17; finalizando el 20 de Octubre.

Determinación de la calidad de la semilla

Se realizó la siembra de las semillas en un sustrato estéril, el día 6 de mayo del 2015 en 2 bandejas de 5 líneas con 30 semillas por línea (Fig. 10), previamente escarificadas (Fig. 11) con agua caliente a 80° C durante 10 minutos. A los 7 días de la siembra se determinó la energía germinativa y a los 15 días el poder germinativo (Tabla 3 y Fig. 12).



Figura 10. Siembra de las cinco líneas puras de *Stylosanthes guianensis*.

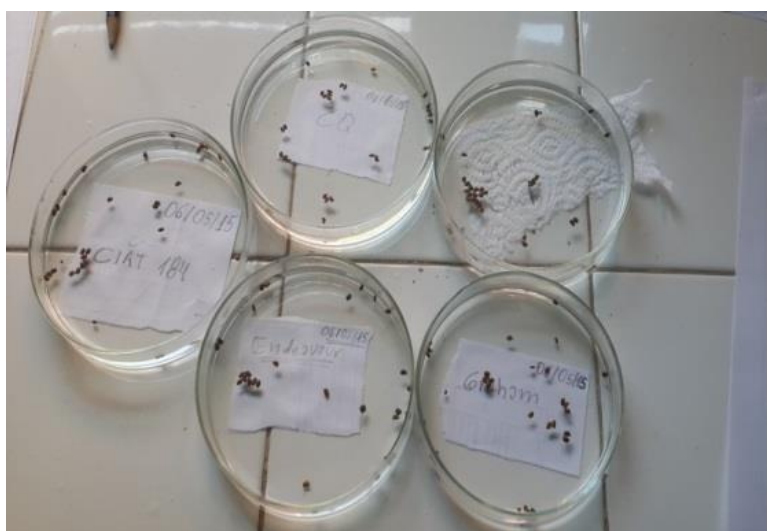


Figura 11. Semillas escarificadas de las cinco líneas de *Stylosanthes guianensis*.

Tabla 3. Poder germinativo y energía germinativa de las 5 líneas de *Stylosanthes guianensis*.

	CIAT 184	Cook	Endeavour	Graham	Q 4306
Energía germinativa (%)	20	43,3	53,3	23,3	36,6
Poder germinativo (%)	70	80	73,3	93,3	100



Figura 12. Germinación de las cinco líneas puras de *Stylosanthes guianensis*.

Trabajo en el laboratorio

También participé en la primera fase de la determinación del origen híbrido de la progenie. Proveniente de los cruzamientos antes mencionados. El trabajo fue realizado mediante el uso de marcadores moleculares ISSR. El mismo consistió en 1) obtención de ADN genómico y 2) amplificación de los marcadores moleculares ISSR en padres y progenie. Mi participación consistió en la colaboración para la obtención del ADN genómico y la evaluación de calidad y cantidad del ADN obtenido.

Obtención del ADN genómico

La muestra vegetal utilizada consistió en 5 hojas sanas y jóvenes de cada planta (Fig. 15). La muestra finamente molida, fue colocada en un tubo de polipropileno de 1,5 ml, se le agregó 700 µl de buffer de extracción (CTAB 2%; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 8; 700 mM NaCl; 140 mM β-mercaptoetanol) precalentado a 65 °C, y se procedió al macerado mediante la utilización de un taladro eléctrico de uso comercial (Bosch) provisto con una mecha de plástico (Fig. 16).



Figura 15. Muestra vegetal de *Stylosanthes guianensis* utilizada para la obtención de ADN genómico.



Figura 16. Maceración de las hojas de *Stylosanthes guianensis* mediante taladro con mecha de plástico.

Al macerado se le agregó aproximadamente otros 500 μ l de buffer de extracción y el tubo con la muestra fue colocado en un baño termostatzado para su incubación a 65 °C por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se retiraron los tubos, se los dejó sobre la mesada a temperatura ambiente, durante unos minutos, y luego se les agregó 500 μ l de

cloroformo (99% v/v) (Fig. 17). Esta mezcla fue agitada por 5 min y luego centrifugada en un micro centrífugo por 10 min a 13.000 rpm y a temperatura de ambiente (Fig. 18).



Figura 17. Procesamiento de muestras de *Stylosanthes guianensis* para la obtención de ADN genómico (fase de agregado de Cloroformo).



Figura 18. Centrifugado de las muestras de *Stylosanthes guianensis*.

La fase acuosa fue recuperada en otro tubo de 1,5 ml y se le agregó 2-propanol (99,7% v/v) frío para precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla fue agitada suavemente y luego se colocó en freezer a -20°C por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de precipitado la

mezcla fue centrifugada a 13.000 rpm a 4 °C por 20 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet resultante fue lavado con 500 µl de una solución de lavado (EtOH 75%; 0,2M NaOAc). Las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y los tubos fueron colocados en una estufa a 37 °C, durante 20 a 30 min, para evaporar el resto de alcohol. Luego, se agregó una solución de TE estéril (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8,0) para disolver el pellet. La integridad y cuantificación del ADN genómico fue realizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v TAE 1X (400mM Tris-HCl; 50 mM NaOAc; 7,7 mM EDTA pH 8,0) (Fig. 19). Luego el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (BrEt, 1 µg.ml⁻¹) y visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiados con GelDoc-It® Imaging System (UVP). Las muestras de ADN concentradas fueron mantenidas en un freezer -20 °C. Se realizaron diluciones estandarizadas a 10 ng.µl⁻¹ por cada muestra, las cuales fueron mantenidas en heladera a 4 °C para su posterior utilización en las amplificaciones por PCR (*Polimerase chain reaction*) de los marcadores moleculares ISSR.



Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa mediante cuba electroforética a 50 V. Para análisis de calidad y cuantificación de ADN genómico obtenido.

Comentarios finales

El cultivo de *Stylosanthes guianensis* realizado en el predio de la Facultad de la UNNE ha demostrado tener muy buena producción de semillas en las cinco líneas evaluadas. Se destacaron sobre todo las variedades Graham y Q 4306 las cuales obtuvieron un rinde superior para los datos promedio de esta zona. Dicha producción podría permitir ensayos de evaluación más extensos a nivel local o regional. Además se podrían realizar parcelas de mayor tamaño con el fin de aumentar el stock de semillas debido a la escases de las mismas. Esto significaría un importante aporte en leguminosas para mejorar la calidad y cantidad de forraje en la región.

En cuanto a los 20 híbridos, pude recolectar abundante cantidad de semillas. Las mismas podrían emplearse para un trabajo posterior en el cual se podría determinar si hubo hibridación en la F2 y a su vez, poder continuar con la técnica de selección y mejoramiento en cada filial.

Si bien yo no tuve problemas con las heladas, estas son frecuentemente una limitante en cuanto a la producción de semillas para la zona. La floración-fructificación temprana podría ser una opción de mejoramiento de los híbridos, y especialmente, trabajar con aquellos que sean tolerantes al frío y resistentes a la antracnosis.

Una parte menor de la pasantía significó también colaborar con las actividades del laboratorio de biología molecular, donde pude ver como se organizan las actividades y se utilizan algunos equipos y sobre procedimientos en general.

Durante el tiempo que llevó la realización del trabajo he adquirido experiencia en temas que no conocía. Los aportes fueron muy importantes ya que trabajé en mi cultivo y en laboratorio y también participe en tareas de control, mantenimiento y la cosecha de las pasturas del género *Paspalum*, lo que me permitió tener un mayor manejo de distintas pasturas, como así también del empleo de herramientas de trabajo que nunca había manipulado.

Al trabajar en equipo, me resultaron más fáciles y llevaderas las tareas. Pude intercambiar opiniones con compañeros y profesores que siempre es muy enriquecedor en nuestra formación como futuros profesionales.

Opinión del asesor

El Sr. Gastón Aquino ha realizado de manera muy satisfactoria todas las actividades originalmente descritas en su plan de trabajo. Aquino se ha destacado por su facilidad para trabajar en equipo junto a un grupo grande de alumnos de grado y posgrado y a los docentes de la cátedra de Forrajicultura. Además fue destacable su dedicación y compromiso frente a las actividades que demandaron un seguimiento constante como la cosecha de híbridos F₁ de *Stylosanthes guianensis*.

El trabajo que se presenta en este informe permitirá el avance de las actividades de evaluación y mejoramiento genético de *S. guianensis*. Además ha permitido el entrenamiento del Sr. Aquino en un conjunto de técnicas y acciones típicas de un trabajo inicial de un programa de mejoramiento genético de plantas autógamias. Por lo antedicho creo que se alcanzaron los dos objetivos planteados en el plan de trabajo.

Dr. Carlos A. Acuña

Referencias

- Acuña, C.A. 2013. Mejoramiento genético de especies forrajeras de ciclo estival en Corrientes. Informe Técnico N° 58 Información Técnica de Forrajeras Megatérmicas, INTA, EEA Rafaela. p. 42-48.
- Ciotti, E.M., Tomei, C.E., Castelán, M.E. y Capurro, R.M. 1995. Evaluación agronómica de *Stylosanthes* spp. en el Nordeste de Corrientes. Rev. Arg. Prod. Anim. 15:310-311.
- Ciotti, E.M., Castelán, M.E. y Tomei, C.E. 1998. Perspectivas de la producción de semillas de *Stylosanthes guianensis* en Corrientes. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Tomo III.5-33p.
- Ciotti, E.M., Castelán, M.E. y Tomei, C.E. 1999. Perspectivas de la producción de semillas de *Stylosanthes guianensis* en Corrientes. Agrotécnia 5:21-25.
- Ciotti, E.M., Castelán, M.E., Tomei, C.E. y Soneira, D. 2000. Momento de cosecha de semillas *Stylosanthes guianensis* CIAT 184. Agrotécnia 6:14-21.
- Ciotti, E.M., Castelán, M.E., Tomei, C.E., Mónaco, I.P. y Benítez, J. 2003 Respuesta de *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 a la fertilización con una baja dosis de fósforo. Rev. Inv. Agrop. (RIA) 32(2): 137-145.
- Gándara, F. y Arias Mañotti, A. 1999. Situación actual de la ganadería. Ganadería del NEA. Publicación técnica INTA: 31-39
- Insaurralde, F. 2011 Trabajo final de graduación, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- Miles, J.W. and C.E. Lascano. 1997. *Stylosanthes* development and utilization in South America. Tropical Grasslands, 31:454-459.
- Royo Pallarés, O. y Pizzio, R. 1998. Introducción de especies para el mejoramiento del campo natural en el Sur de Corrientes, Argentina. XIV Reunión Grupo Campos, INTA Tacuarembó: 31-38.
- Tomei, C., Ciotti, E.M. y Castelán M.E. 1997. *Stylosanthes*, alfalfa tropical. Boletín N° 7. Instituto Agrotécnico Fuentes Godo. 7 pp.
- Pizarro, E.A. 2005. Especies arbustivas, gramíneas y leguminosas para el trópico americano. IX Seminario de pastos y forrajes. Universidad Federal de Paraná. Curitiba, Paraná, PR, Brasil.
- Skerman, P.J., D.G. Cameron, Riveros F. 1991. Leguminosas Forrajeras tropicales. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal N°2: 425-438.