



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

Maestría en Producción Vegetal



**“Propagación *in vitro* de diferentes genotipos de mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz) vía inducción de múltiples vástagos”.**

Tesis presentada como parte de los requisitos
para optar al grado académico de MAGISTER EN
PRODUCCIÓN VEGETAL de la Facultad de Ciencias
Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste.

Tesista:

Ing. Agr. Marisa Zahner

Director: Ing. Agr. (Dr.) Ricardo Daniel Medina

Co-director: Lic. (Dra.) Natalia Raquel Dolce

Corrientes, Argentina

Año: 2021

Prefacio:

Esta tesis es presentada como requisito para el otorgamiento del grado académico de Magister en Producción Vegetal de la Universidad Nacional del Nordeste. La misma contiene los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste y del Instituto de Botánica del Nordeste (Universidad Nacional del Nordeste – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), bajo la dirección del Dr. Ricardo Daniel Medina y la codirección de la Dra Natalia Raquel Dolce.

Esta tesis está dividida en 5 capítulos:

El Capítulo 1 contiene un marco general sobre el cultivo de la mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), que incluye su taxonomía, origen y distribución, su morfología y la importancia del cultivo como así también sus usos. Incluye el cultivo tradicional y sus limitantes, así como también contiene las bases de cultivo *in vitro* de mandioca, con sus ventajas. Se presenta además la descripción del problema de estudio, la hipótesis y los objetivos.

En el Capítulo 2 se describen los materiales y métodos de los ensayos realizados; el primer experimento fue llevado a cabo con el objeto de determinar el efecto de diferentes fuentes y dosis de citocininas en la regeneración *in vitro* de explantes con múltiples vástagos (MV) en 10 cultivares de mandioca. El segundo experimento fue diseñado para evaluar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración de MV de diferentes cultivares de mandioca. El tercero se efectuó para estudiar el efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca.

El Capítulo 3 incluye los resultados de los 3 experimentos ejecutados, con su correspondiente discusión.

El Capítulo 4 presenta las conclusiones generales de esta tesis.

En la sección bibliografía se exhiben las citas bibliográficas enunciadas en esta tesis.

Parte de este trabajo fue presentado en eventos científicos nacionales y uno de nivel internacional.

Trabajos publicados en Actas de congreso

Zahner, M., R. D. Medina (*ex aequo*), N. Dolce y L. Mroginski. 2014. Promoción de la regeneración de múltiples vástagos en diferentes genotipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante el uso de distintas citocininas. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura, Mendoza, Argentina, del 23 al 26-IX-14. Horticultura Argentina 33 (82): 45. ISSN on line 1851-9342.

Zahner, M., R. D. Medina (*ex aequo*), N. R. Dolce y L. A. Mroginski. 2015. Inducción *in vitro* de múltiples vástagos mediante el uso de citocininas en cinco genotipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). XVI Congresso Brasileiro de Mandioca y I Congresso Latinoamericano e Caribenho de Mandioca, Foz de Iguazú, Brasil, N° 84, Mejoramiento Genético y Biotecnología, del 9 al 13-XI-15.

Zahner, M., R. D. Medina (*ex aequo*), N. Dolce y L.A. Mroginski. 2016. Eficiencia de la multiplicación *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta*) a partir de segmentos uninodales cultivados en medios suplementados con diferentes citocininas, por XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes, Argentina, del 13 al 16-XI-16.

Agradecimientos:

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE y al Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET) por permitirme utilizar las instalaciones e insumos para realizar mi tesis.

A mi director, el Dr. Ricardo Medina, por todos los conocimientos, el compromiso, la dedicación, el interés y el trabajo realizado para la concreción de esta tesis.

A mi codirectora, la Dra. Natalia Dolce, por la colaboración y disponibilidad durante la realización de los experimentos y al trabajo realizado para lograr la concreción de esta tesis.

A los profesionales y técnicos del Laboratorio de Fisiología Vegetal del IBONE, principalmente al Ing. Luis Mroginski, a la Lic. Silvia Schaller, a la Ing. Carolina Ramírez, al Dr. Francesco Mignolli, a la Dra. María Laura Vidóz y a la Lic. Mirta Faloci.

Al Ing. Juan José Bermúdez, por facilitar el tiempo para la realización de esta tesis.

A la Ing. Agr. Mabel Bennasar Vilchez por su colaboración en la traducción del resumen al inglés.

A mi hermosa y amada familia, a mi esposo, y mis dos hijos que nacieron durante la ejecución de esta tesis, por apoyarme en todo momento y por los sacrificios que hicieron para que la pueda concluir.

Resumen

La mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) es un arbusto cultivado principalmente por la producción de raíces tuberosas amiláceas. Su propagación tradicional se realiza a través de estacas de tallos, la cual es sencilla, pero conlleva algunos inconvenientes. La propagación *in vitro* de mandioca ha permitido mejorar la tasa de multiplicación, sin embargo, hasta el momento, las metodologías puestas a punto son eficientes en algunos genotipos. El objetivo de esta tesis fue determinar las condiciones óptimas necesarias para la propagación *in vitro* de mandioca, utilizando la vía de regeneración organogénica directa por inducción de múltiples vástagos (MV), aplicable a 10 cultivares de interés para la agricultura del Nordeste argentino. Para ello, se planteó evaluar el efecto de diferentes factores que afectan la propagación *in vitro* mediante la promoción de la regeneración de MV. En primer lugar, se evaluó el efecto de los medios de cultivo adicionados con citocininas (BAP, CIN y TDZ), en 5 dosis (0,5, 1, 5, 10 y 15 mg/L), y 2 controles (MS y MS + 0,01 mg/L BAP + 0,01 mg/L ANA + 0,1 mg/L AG₃ empleado de rutina en micropropagación de mandioca) sobre la inducción de MV. En el Experimento 1 se demostró que los medios adicionados con 0,5 o 1 mg/L de BAP o bien 5 o 10 mg/L de CIN, fueron los que permitieron que el 100% de los cultivares evaluados respondan positivamente. Además se estudió la capacidad de enraizamiento de los vástagos derivados de MV y la calidad de las plantas regeneradas en términos de peso seco. En el Experimento 2 se observó que, los medios adicionados con BAP (0,5 y 1 mg/L) fueron los que manifestaron las mejores respuestas de regeneración de MV. El tiempo de inducción mínimo favorable resultó ser de 20 días, aunque persistieron las diferencias genotípicas en la regeneración de MV. La interacción entre el cultivar, los medios de cultivo y el tiempo de exposición a las citocininas sobre la longitud de vástagos derivados de MV, demostró que hubieron cultivares que formaban los vástagos más altos (cv. Surubím y MCol 1505), otros los más bajos (cvs. Ramada Paso y Santa Catarina) y un tercer grupo que presentaba variaciones con una tendencia al aumento de la longitud cuando el medio se encontraba suplementado con las concentraciones más bajas de citocininas y tiempos de inducción más cortos. En el Experimento 3, se analizó el efecto de 3 medios de cultivo destacados (*i.e.* MS + 0,5 mg/L de BAP; MS + 1 mg/L de BAP y MS + 10 mg/L de CIN) y distintas condiciones lumínicas (*i.e.* tratamientos con luz blanca, luz azul, luz roja y oscuridad) sobre la diferenciación de MV, la producción de nudos por explante y la elongación de los vástagos derivados de MV. El medio con BAP promovió una mayor diferenciación de MV y producción de nudos, favoreciendo su elongación, en particular, cuando se empleó una concentración de 0,5 mg/L. Cuando los explantes fueron sometidos a luz blanca, azul o roja no se observaron variaciones significativas en la diferenciación de MV, sin embargo, fue deprimida en oscuridad así como la producción de nudos. La incubación en luz blanca o azul ejerció efectos similares sobre la producción de nudos. Será necesario entonces seguir explorando otras alternativas para optimizar la elongación, sin perjuicio de la eficiencia de la propagación. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se sugiere un protocolo de multiplicación *in vitro* de mandioca vía múltiples vástagos aplicable a genotipos diferentes de mandioca.

Abstract

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) is a shrub cultivated mainly for the production of starchy tuberous roots. It is traditionally propagated through stem cuttings, which is a simple method, but has some inconvenient. The *in vitro* propagation of cassava has made possible to improve the multiplication rate, however, until now the methodologies developed are efficient only for a few genotypes. The aim of this thesis was to determine the optimal conditions for the *in vitro* propagation of cassava, through direct shoot organogenesis by induction of multiple shoots (MV), applicable to 10 cultivars of interest for the agriculture of Northeast Argentina. For this, it was proposed to evaluate the effect of different factors that affect *in vitro* propagation by promoting MV regeneration. First, were evaluated the effect of the culture media added with cytokinins (BAP, CIN and TDZ), in 5 doses (0.5, 1, 5, 10 and 15 mg/L), and 2 controls (MS and MS + 0.01 mg/L BAP + 0.01 mg/L ANA + 0.1 mg/L AG₃ frequently used in cassava micropropagation) on the induction of MV regeneration. Results from Experiment 1 showed that the media added with a cytokinin, either 0.5 or 1 mg/L of BAP or 5 or 10 mg/L of CIN, were those that allowed to 100% of the evaluated cultivars respond positively. The rooting capacity of the shoots derived from MV and the quality of the regenerated plants in terms of dry weight were also studied. In Experiment 2 it was observed that the media added with BAP (0.5 and 1 mg/L) were those demonstrated the best MV regeneration responses. The minimum favorable induction time was 20 days, although genotypic differences in MV regeneration persisted. The interaction between the cultivar, the culture media and the time of exposure to cytokinins on the length of shoots derived from MV, showed that some cultivars formed the highest shoots (cv. Surubím and MCol 1505), others the lowest (cvs. Ramada Paso and Santa Catarina), and a third group that presented variations with a tendency to increase in length when the medium was supplemented with the lowest concentrations of cytokinins and shorter induction times. In Experiment 3, the effect of the best MV induction culture media (*i.e.* MS + 0.5 mg/L BAP; MS + 1 mg/L BAP and MS + 10 mg/L CIN), combined with different light conditions (*i.e.* treatments with white, blue and red light, and darkness) on the differentiation of MV, the production of nodes by explant and the elongation of the stem derived from MV were analyzed. Medium with BAP promoted a greater differentiation of MV and production of nodes, favoring their elongation, in particular, when a concentration of 0.5 mg/L was added. When the explants were subjected to white, blue or red light, no significant variations were observed in the differentiation of MV; however it was depressed in the dark as well as the production of nodes. Incubation in white or blue light had similar effects on nodes production. Thus, it will be necessary to continue exploring other alternatives to optimize elongation, without prejudice to the propagation efficiency. Based on the results obtained in this thesis, an *in vitro* multiplication protocol for cassava via multiple shoots applicable to different genotypes is suggested.

ÍNDICE:

| | |
|------------------|------|
| LISTA DE TABLAS | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| ABREVIATURAS | xix |

CAPITULO 1

| | |
|---|----|
| 1. Introducción general | 1 |
| 1.1. Generalidades de la mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) | 1 |
| 1.1.1. Taxonomía, origen y distribución de la especie | 1 |
| 1.1.2. Morfología de la mandioca | 2 |
| 1.1.3. Importancia del cultivo | 3 |
| 1.1.4. Usos de la mandioca | 5 |
| 1.2. Cultivo tradicional de la mandioca | 6 |
| 1.2.1. Limitantes del cultivo tradicional de mandioca | 7 |
| 1.3. Cultivo de tejidos | 9 |
| 1.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de mandioca | 10 |
| 1.3.2. Ventajas del cultivo de tejidos vs. Sistemas convencionales de propagación en mandioca | 11 |
| 1.4. Hipótesis | 12 |
| 1.5. Objetivos | 12 |
| 1.5.1. Objetivos Generales | 12 |
| 1.5.2. Objetivos específicos | 12 |

CAPITULO 2

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2. Materiales y Métodos | 14 |
| 2.1. Material vegetal | 14 |
| 2.2. Establecimiento <i>in vitro</i> | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.3. Multiplicación <i>in vitro</i> de diferentes genotipos de mandioca vía inducción de múltiples vástagos (MV) | 16 |
| 2.4. Efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración <i>in vitro</i> de MV de diferentes cultivares de mandioca | 18 |
| 2.5. Efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración <i>in vitro</i> de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca | 19 |
| 2.6. Análisis estadísticos | 21 |

CAPITULO 3

| | |
|--|-----------|
| 3. Resultados y Discusión | 22 |
| 3.1. Multiplicación <i>in vitro</i> de diferentes genotipos de mandioca vía inducción de múltiples vástagos | 22 |
| 3.2. Efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración <i>in vitro</i> de MV de diferentes cultivares de mandioca | 69 |
| 3.3. Efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración <i>in vitro</i> de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca | 86 |

CAPITULO 4

| | |
|----------------------------------|------------|
| 4. Conclusiones generales | 111 |
|----------------------------------|------------|

| | |
|---------------------|------------|
| BIBLIOGRAFIA | 117 |
|---------------------|------------|

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1: Composición del medio basal según Murashige y Skoog (1962). | 15 |
| Tabla 2.2: Descripción de los medios de cultivo empleados para la multiplicación <i>in vitro</i> de diferentes genotipos de mandioca vía inducción de MV. | 16 |
| Tabla 2.3: Descripción de los tratamientos realizados para estudiar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración <i>in vitro</i> de MV de diferentes genotipos de mandioca | 19 |
| Tabla 2.4: Descripción de los tratamientos realizados para estudiar el efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración <i>in vitro</i> de MV y la elongación de los vástagos. | 20 |
| Tabla 3.1: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca. | 63 |
| Tabla 3.2: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 63 |
| Tabla 3.3: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca. | 64 |
| Tabla 3.4: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 64 |
| Tabla 3.5: Porcentaje de vástagos enraizados (%), derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 65 |
| Tabla 3.6: Peso seco de vástagos enraizados (mg), derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 67 |
| Tabla 3.7: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca. | 78 |
| Tabla 3.8: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 79 |
| Tabla 3.9: Longitud promedio de vástagos derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 79 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 3.10: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca. | 97 |
| Tabla 3.11: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 97 |
| Tabla 3.12: Longitud promedio de vástagos derivados de MV de 10 cultivares de mandioca. | 100 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1: Diferentes condiciones lumínicas evaluadas para la elongación de vástagos, e inducción de la regeneración de explantes con MV. | 21 |
| Figura 3.1: Respuestas morfológicas obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de segmentos uninodales de mandioca. | 22 |
| Figura 3.2: Regeneración de MV obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> de segmentos uninodales de mandioca. | 24 |
| Figura 3.3: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' | 26 |
| Figura 3.4: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' | 26 |
| Figura 3.5: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' | 27 |
| Figura 3.6: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' | 27 |
| Figura 3.7: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' | 29 |
| Figura 3.8: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' | 29 |
| Figura 3.9: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' | 30 |
| Figura 3.10: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' | 30 |
| Figura 3.11: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' | 32 |
| Figura 3.12: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' | 32 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.13: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' | 33 |
| Figura 3.14: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' | 33 |
| Figura 3.15: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' | 35 |
| Figura 3.16: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' | 35 |
| Figura 3.17: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' | 36 |
| Figura 3.18: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' | 36 |
| Figura 3.19: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' | 38 |
| Figura 3.20: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' | 38 |
| Figura 3.21: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' | 39 |
| Figura 3.22: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' | 39 |
| Figura 3.23: Regeneración <i>in vitro</i> de vástagos, raíces y callos basales de segmentos uninodales de mandioca | 40 |
| Figura 3.24: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' | 42 |
| Figura 3.25: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.26: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Santa Catarina’ | 43 |
| Figura 3.27: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Santa Catarina’ | 43 |
| Figura 3.28: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Rocha’ | 45 |
| Figura 3.29: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Rocha’ | 45 |
| Figura 3.30: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Rocha’ | 46 |
| Figura 3.31: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Rocha’ | 46 |
| Figura 3.32: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. | 48 |
| Figura 3.33: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ | 48 |
| Figura 3.34: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ | 49 |
| Figura 3.35: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ | 49 |
| Figura 3.36: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Palomita’ | 51 |
| Figura 3.37: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Palomita’ | 51 |
| Figura 3.38: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Palomita’ | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.39: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' | 52 |
| Figura 3.40: Regeneración <i>in vitro</i> de MV con callo basal y de MV con callo basal y raíces a partir de cultivo de segmentos uninodales de mandioca | 53 |
| Figura 3.41: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' | 55 |
| Figura 3.42: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' | 55 |
| Figura 3.43: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' | 56 |
| Figura 3.44: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' | 56 |
| Figura 3.45: Enraizamiento de vástagos derivados de MV | 66 |
| Figura 3.46: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' | 70 |
| Figura 3.47: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' | 70 |
| Figura 3.48: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' | 71 |
| Figura 3.49: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC12.829' | 71 |
| Figura 3.50: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' | 73 |
| Figura 3.51: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' | 73 |
| Figura 3.52: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.53: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ | 74 |
| Figura 3.54: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Palomita’ | 75 |
| Figura 3.55: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘MCol 1505’ | 76 |
| Figura 3.56: Aspecto de MV obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> de segmentos uninodales de mandioca | 82 |
| Figura 3.57: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Ramada Paso’ | 87 |
| Figura 3.58: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘MPar 75’ | 87 |
| Figura 3.59: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Catiguá’ | 88 |
| Figura 3.60: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘IAC 12829’ | 89 |
| Figura 3.61: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Surubim 41’ | 90 |
| Figura 3.62: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Santa Catarina’ | 90 |
| Figura 3.63: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Rocha’ | 91 |
| Figura 3.64: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ | 92 |
| Figura 3.65: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Palomita’ | 93 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3.66: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' | 94 |
| Figura 3.67: Aspecto de MV obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> de segmentos uninodales de mandioca | 102 |
| Figura 4.1: Protocolo de regeneración de MV de mandioca a partir del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos uninodales | 116 |

ABREVIATURAS:

| | |
|------------------------------------|--|
| AG ₃ | Ácido giberélico |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| BAP | 6- bencilaminopurina |
| CIN | Cinetina |
| cm. | Centímetro |
| cv | Cultivar |
| °C | Grados centígrados |
| HCL | Ácido clorhídrico |
| Hs | horas |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| µm m ⁻² s ⁻¹ | Micromoles por metro cuadrado por segundo |
| mg | Miligramo |
| mg/L | Miligramos por litro |
| min | Minutos |
| MS | Medio de Murashige y Skoog (1962) |
| MV | Múltiples vástagos |
| NEA | Nordeste Argentino |
| PAR | Radiación fotosintética activa (Photosynthetically active radiation) |
| pH | Potencial hidrogeno |
| VS | Vástago simple |
| TDZ | Tidiazurón |

CAPÍTULO 1

1. Introducción general

1.1. Generalidades de la mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

1.1.1 Taxonomía, origen y distribución de la especie

La mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertenece al orden Euphorbiales, familia Euphorbiaceae, tribu Manihotae. La familia Euphorbiaceae, constituida por unas 7200 especies, se caracteriza por su notable desarrollo de los vasos laticíferos compuestos por células secretoras llamadas galactocitos, la producción de flores unisexuales y cápsulas tricocas (Puonti-Kaerlas, 1998; Ceballos y de la Cruz, 2002; Suárez Guerra y Mederos Vega, 2011). Un género muy importante de esta familia lo constituye *Manihot*, que es originario del continente americano. Se han descrito alrededor de 98 especies asignadas a este género, de las que solo *M. esculenta* y *M. glaziovii* (de la cual se extrae caucho) tienen relevancia económica y son cultivadas (Raemakers *et al.*, 1997).

La mandioca es una especie nativa de América del Sur (Olsen y Schaal, 1999) y constituye uno de los cultivos más antiguos conocidos. Por hallazgos arqueológicos en el Amazonas, algunos autores estiman que su domesticación comenzó 5000 a 7000 años A.C. (Allem, 2002). Numerosas evidencias apuntan a que el área de domesticación de la mandioca comprende una vasta región desde Brasil hasta México (Simmonds, 1976; Suárez Guerra y Mederos Vega, 2011; Carvalho *et al.*, 2018). Al ser una especie de origen tropical prefiere climas cálidos y húmedos, aunque se adapta a diferentes tipos de suelo y condiciones climáticas. Se cultiva entre los paralelos 30° Lat N y 30° Lat S, siendo el límite de altitud para este cultivo los 2000 m.s.n.m. Puede crecer en zonas con lluvias de 1000 a 3000 mm anuales, aunque en este caso necesita muy buen drenaje. Si bien en América del Sur fueron encontradas poblaciones selváticas, las plantas crecen bien y pueden expresar su potencial de rendimiento si son cultivadas a pleno sol (Cock, 1989; Raemakers *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2018).

1.1.2 Morfología de la mandioca

Según Domínguez *et al.* (1983), la mandioca es un arbusto perenne de 1 a 3 m de altura. Posee tallos cilíndricos y lignificados a la madurez, pudiendo alcanzar de 2 a 6 cm de diámetro. Los tallos están formados por la alternación de nudos y entrenudos cuya longitud es muy variable dependiendo del cultivar y la influencia de otros factores bióticos y abióticos. Es una planta de ramificación simpodial, que dependiendo de los cultivares lo hace de manera dicotómica, tricotómica o tetracotómica, originando ramas secundarias que a su vez, dan lugar a ramificaciones sucesivas. Estas ramificaciones son inducidas por la floración, por lo cual, se denominan ramificaciones reproductivas y constituyen el carácter genotípico más estable. Sin embargo, estas ramas se desarrollan diferenciándose o no la inflorescencia. El momento en el cual se producen estas ramificaciones y los factores que la controlan, aún no están totalmente elucidados. A pesar de ello, algunos cultivares tienen fuerte dominancia apical y sólo desarrollan un tallo sin ramificaciones reproductivas (Cock, 1989). Existe otro tipo de ramificaciones denominadas laterales, las cuales son esporádicas y su ocurrencia también depende de la influencia de distintos factores intrínsecos y extrínsecos. Es importante conocer la conformación del tallo y su compartimento frente a distintos factores dado que son el medio más utilizado para la multiplicación comercial de la especie sirviendo como "semilla asexual". Tiene hojas simples y están compuestas por la lámina foliar y el peciolo. La lámina foliar es palmada y profundamente lobulada. El tamaño y el color de las hojas también son características típicas de cada cultivar (Fukuda *et al.*, 2010). En las plantas provenientes de estaca-semilla, las raíces se diferencian en forma adventicia, formándose en la base inferior cicatrizada de la estaca y también próximas a las yemas axilares que están bajo tierra. Estas raíces, al desarrollarse, forman un sistema fibroso. La planta adsorbe el agua y los nutrientes por medio de las raíces fibrosas. En general, el sistema radical presenta una baja densidad de raíces, pero una penetración muy profunda, llegando las raíces fibrosas hasta los 2,5 metros, lo que contribuye a que la planta tenga la capacidad de soportar periodos prolongados de sequía. Posteriormente, algunas de las raíces fibrosas

experimentan un engrosamiento y se convierten en raíces tuberosas. Las raíces tuberosas son morfológica y anatómicamente idénticas a las raíces fibrosas, la diferencia esencial radica en que la polaridad del crecimiento de la raíz cambia de longitudinal a radial por medio del crecimiento secundario, aumentando el tamaño del parénquima de reserva donde luego se acumulará almidón como compuesto de reserva. Las raíces tuberosas tienen como característica principal una gran capacidad de almacenamiento de almidón, por lo que es el órgano de la planta que hasta el momento tiene el mayor valor económico (Domínguez *et al.*, 1983; Ceballos y De la Cruz, 2002).

La mandioca se caracteriza por ser diclino-monoica, de polinización cruzada, debido a que las flores femeninas de un racimo se abren antes que las masculinas (protoginia), por lo que cada individuo descendiente de una semilla exhibirá un alto grado de heterocigosis (Alves, 2002; Ceballos y de la Cruz, 2002). Ésta es una de las principales razones por las que el cultivo de la mandioca es comercialmente realizado en forma agámica, mediante estacas de tallo o estacas caulinares (Cock, 1989; López, 2002; El-Sharkawy, 2003). Esta forma de propagación asexual permite una mayor homogeneidad en el crecimiento, comportamiento y rendimiento de las plantaciones. Por otra parte, las poblaciones de mandioca a partir de semillas son difíciles de lograr por la baja producción de simientes, las cuales son poco viables y de muy bajo porcentaje de germinación (Domínguez *et al.*, 1983). De todos modos, el uso de semillas tiene un incalculable valor en el mejoramiento genético del cultivo (Ceballos y De la Cruz, 2002; Domínguez *et al.*, 1983), donde el propósito puede ser generar híbridos, los cuales podrían perpetuarse mediante su propagación vegetativa (Mussio *et al.*, 1998).

1.1.3 Importancia del cultivo

En los trópicos, la mandioca constituye la cuarta fuente más importante de carbohidratos, antecedida por el arroz, la caña de azúcar y el maíz (Puonti-Kaerlas, 1998). Sus raíces tuberosas proveen de alimento a más de 1.000

millones de personas, en su mayoría agricultores de pequeña escala y familias campesinas (Roca *et al.*, 1991; Cavallero *et al.*, 2012).

La mandioca posee características que le permiten desarrollarse en ambientes marginales, donde los agricultores carecen de recursos para mejorar las condiciones del suelo con el agregado de fertilizantes (Puonti-Kaerlas, 1998). Este cultivo tolera suelos ácidos, sequías periódicas, defoliación por plagas y puede intercalarse con diferentes cultivos (Henry y Hershey, 1991). A diferencia de otros cultivos, una sequía reduciría los rendimientos de las plantas de mandioca, pero las pérdidas solo serán totales si la sequía es tan prolongada que cause su muerte. Esto casi nunca ocurre, ya que la mandioca tiene mecanismos estomáticos que la protegen, lo que le permite una buena adaptación en regiones donde las lluvias son inciertas. Al no tener periodos críticos de crecimiento, este cultivo es menos vulnerable ante una sequía lo que hace posible su plantación durante un mayor periodo de tiempo que muchos otros cultivos; lo que facilita su adaptación a diferentes sistemas de producción (Cock, 1989). Debido a su rusticidad y tolerancia a condiciones ambientales adversas, es un cultivo capaz de producir en lugares marginales en los cuales otros cultivos no prosperarían, con buenos rendimientos aun en suelos pobres (Puonti-Kaerlas, 1998; Li *et al.*, 1998, Mejía de Tafur, 2002).

Actualmente, la mandioca se cultiva en más de 100 países en el mundo, tanto de África, Asia y América Latina. La mitad de las hectáreas dedicadas al cultivo de la mandioca se encuentran en África, un 30% en Asia y el 20% restante en América Latina (Ceballos *et al.*, 2004). Se calcula que en 2018 la producción mundial fue de 278 millones de toneladas distribuidas en 24,5 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2020).

Otra característica destacable de la mandioca es que posee una gran flexibilidad en el tiempo de cosecha (Henry y Hershey, 1991; Cock, 1989). La mayoría de los cultivos se tienen que cosechar durante un período específico, porque si la cosecha se retrasa, generalmente los productos se deterioran o caen al suelo y germinan o se pudren. En cambio, la mandioca puede permanecer en el campo

hasta cuando se necesite y continúa creciendo, inclusive puede dejarse en el campo sin cosechar hasta por dos a tres años o puede cosecharse parcialmente, cuando se necesita para alimento (Cock, 1989).

1.1.4 Usos de la mandioca

La mandioca tiene su principal valor económico en su órgano de reserva o almacenamiento de energía, las raíces tuberosas; las cuales contienen hasta un 85% de su peso seco de almidón. En muchos países en desarrollo es la fuente de calorías más económica disponible (Puonti-Kaerlas, 1998), teniendo diversos usos en la alimentación humana y animal, así también como materia prima en varios procesos industriales (El-Sharkawy, 2004). Sus hojas -que generalmente se desperdician en el campo- también pueden utilizarse para alimentar el ganado, particularmente por su aporte proteico (Burgos *et al.*, 2019).

Si bien el principal producto de renta de la mandioca son sus raíces tuberosas para alimentación humana, tanto las raíces tuberosas como las hojas pueden ser empleadas en alimentación animal (Ceballos y de la Cruz, 2002). Las primeras se usan como fuente de hidratos de carbono y las segundas como fuente de proteínas, minerales y vitaminas, principalmente vitamina C y carotenos. La presencia de glucósidos cianogénicos, tanto en raíces como en hojas, es un factor determinante en el uso que se le dará. Muchos cultivares tienen bajos niveles de estos glucósidos y pueden ser consumidas de manera segura, luego de los procesos normales de cocción. Otros cultivares, en cambio, tienen altos niveles de estas sustancias, por lo que solo se utilizan generalmente para procesos industriales como ser extracción de almidón (Ceballos y de la Cruz, 2002).

El producto industrial más importante elaborado a base de raíces tuberosas de mandioca es el almidón, que se usa en la industria alimenticia y textil, en la fabricación de papeles y adhesivos, aunque también tiene potencial en la producción de dextrosa y múltiples derivados, además de su capacidad para producir bioetanol. Las propiedades de claridad y baja retrogradación del almidón de mandioca hacen que se pueda utilizar en muchos productos alimenticios. Sus

características orgánicas se asemejan bastante al almidón del maíz (Suárez Guerra y Mederos Vega, 2011).

En Brasil, una gran proporción de mandioca es consumida como farinha, la cual se utiliza para diferentes platos típicos. La farinha se obtiene pelando, rallando y exprimiendo las raíces tuberosas mediante diferentes métodos; luego es vuelta a rallar, hornear y moler. En países como Nigeria, las raíces se lavan, se pelan y se rallan, luego son colocadas en bolsas y son exprimidas con contrapesos durante varios días para que fermenten. Este producto luego se fríe hasta que se seca, para ser almacenado o comercializado (Cereda, 2002).

En Argentina, en la zona norte y principalmente en el nordeste del país, el almidón o fécula de mandioca es utilizada en forma directa para la elaboración de alimentos, fundamentalmente el chipa o chipá, preparación horneada a base de almidón y queso. Desafortunadamente, el aprovechamiento integral de la mandioca en Argentina es muy reducido (Morandi y Pirker, 2012).

1.2. Cultivo tradicional de la mandioca

Como se mencionó en un apartado anterior, tradicionalmente la mandioca se propaga mediante estacas de tallo. Esta forma de propagación asexual permite una mayor homogeneidad en el crecimiento, comportamiento y rendimiento de las plantaciones. Los tallos o ramas de mandioca se cortan de la planta cuando se encuentran maduros, condición que alcanzan entre los 7-8 meses de la plantación, pudiendo coincidir con el momento de cosecha de las raíces tuberosas. Estos tallos serán acondicionados y conservados unos meses, refugiados de las heladas bajo monte o al abrigo de árboles de hoja perenne durante otoño e invierno (Pletsch y Uset, 2013). Al momento óptimo de plantación en primavera, los tallos que sobrevivan al período de conservación serán fraccionados en estacas de tallos de 10 a 20 cm y serán utilizados como estaca-semillas para la implantación del cultivo. Las estacas-semillas contienen suficientes reservas de carbohidratos y nutrientes esenciales para regenerar y desarrollar raíces y hojas (El-Sharkawy, 2003; 2004).

Si bien la plantación de estacas de tallo es un método de propagación sencillo y económico, que al mismo tiempo permite conservar las características varietales, esta técnica presenta tasas de multiplicación muy bajas (10 a 20 estacas por año por cada planta) y es un importante medio de diseminación de plagas y enfermedades (Roca y Jayasinghe, 1982; Roca, 1984; Garsaball y Cuevas, 2006; Smith *et al.*, 1986; Puonti-Kaerlas, 1998; Pedroso de Oliveira *et al.*, 2000; Caballero *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 2009), lo que afecta el crecimiento y rendimiento del cultivo (Albarrán *et al.*, 2003). Por lo tanto, si se quiere garantizar el desarrollo regional del cultivo de mandioca, es necesario multiplicar plantas correspondientes a líneas mejoradas o a cultivares de interés, libres de enfermedades y de patógenos sistémicos de un modo más eficiente, a fin de ponerlas a disposición de los agricultores (Smith *et al.*, 1986; Puonti-Kaerlas, 1998; Thro *et al.*, 1999; Mapayi *et al.*, 2013).

Durante su cultivo a campo, las raíces comienzan a engrosarse a los 3 meses de la plantación y continúan incrementando su peso hasta el final del ciclo (que si el destino es consumo en fresco será de cosecha anual o si se destina como materia prima industrial será de cosecha bianual) (Aristizábal y Calle, 2015). Generalmente, el ciclo de producción de la mandioca para destino a consumo en fresco, es de alrededor de 9 meses, momento en que generalmente se realiza la cosecha en el Nordeste argentino.

1.2.1. Limitantes del cultivo tradicional de mandioca

Entre las características limitantes del cultivo tradicional de la mandioca pueden mencionarse las siguientes:

- Bajo potencial de almacenamiento: El material de propagación de la mandioca se deteriora durante el almacenamiento debido a la deshidratación de los tallos, pérdida de reservas por brotación y por ataque de plagas por patógenos, lo cual ocasiona una disminución paulatina de la cantidad de estacas aprovechables, a medida que aumenta el periodo de almacenamiento (López, 2002).

- Baja tasa de multiplicación: En promedio, una planta madura de mandioca en buenas condiciones produce en promedio 10-20 estacas de 20-10 cm de longitud, lo que representa una tasa de multiplicación baja en comparación con otros cultivos. Esto trae las siguientes consecuencias: 1) es muy difícil expandir rápidamente el área sembrada y 2) se debe dedicar una gran superficie a la obtención de material de siembra (Cock, 1989).

- Agricultores de baja escala: La mayor parte de la producción de mandioca la realizan pequeños productores, utilizando sistemas tradicionales de producción y obteniendo rendimientos bajos, aunque estables. Generalmente, la mandioca se produce en áreas marginales, de suelos de pobre fertilidad (Pletsch, 2004), por lo que se obtiene una reducida producción de raíces y material de plantación de baja calidad por su bajo contenido de reservas (López, 2002).

- Deterioro de las raíces luego de la cosecha: Las raíces de mandioca pueden conservarse en la planta durante mucho tiempo, pero una vez que son cosechadas deben ser utilizadas rápidamente para que no se deterioren. En muchos cultivares, el deterioro fisiológico de las raíces comienza a las 24 horas posteriores a la cosecha y se manifiesta con un estriado vascular de color azulado, lo que las hace inaceptables para su uso (Puonti-Kaerlas, 1998; Ceballos y de la Cruz, 2002; Raemakers *et al.*, 1997). La ocurrencia de este deterioro fisiológico está asociado a los daños mecánicos que ocurren con la cosecha, pero también depende del genotipo; por otra parte, como consecuencia de estos daños también se manifiesta un deterioro microbiológico de las raíces tuberosas entre 5 a 7 días de su cosecha (Ceballos y De la Cruz, 2002).

- Enfermedades y plagas transmitidas por estacas: La mandioca puede ser atacada por varios agentes patógenos que se transmiten por el material de plantación. Entre ellos podemos contar a los hongos, bacterias, micoplasmas y virus. Así también, son atacadas por ácaros, trips, barrenadores del tallo. En regiones muy afectadas con virus y bacterias, es necesario el saneamiento del material utilizado (López, 2002).

Es por todo esto que se requiere la implementación de técnicas de multiplicación masiva, que generen material de propagación con características deseables y libres de plagas y enfermedades a una tasa de propagación más eficiente. Para lograr este objetivo, la biotecnología constituye una herramienta fundamental.

1.3. Cultivo de tejidos

El cultivo de células y tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que surgió a comienzos del siglo XX de la mano de Gottlieb Haberlandt (Krikorian y Berquam, 1969), la cual se fundamenta en la totipotencialidad de las células vegetales. En su acepción más amplia, comprende un heterogéneo conjunto de técnicas mediante las que un explante (una parte separada del vegetal que puede ser protoplasto, células, tejidos y órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski, 1993; Mroginski *et al.*, 2011). Existe una diversidad de tejidos que pueden utilizarse en diferentes especies como material de partida para la micropropagación, siempre dependiendo del objetivo del cultivo. Algunos de estos tejidos son: meristemas, ápices terminales (caulinares y radicales), segmentos nodales, embriones zigóticos, hojas, semillas, anteras, ovarios, óvulos, etc. (Mroginski *et al.*, 2011). Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* son numerosos y diferentes, como ser: estudios básicos de botánica, genética y fisiología, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, conservación e intercambio de germoplasma y propagación masiva de plantas (Mroginski y Roca, 1993).

En cuanto a la producción de plantas y productos naturales de interés, el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales constituye una tecnología interesante debido a las siguientes consideraciones: 1) la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar a campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en

vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, y 7) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad (Llorente, 2002).

Respecto a los factores que afectan el proceso de regeneración y crecimiento *in vitro*, estos pueden ser divididos en dos grupos: 1) aquellos relacionados al tipo y estado fisiológico del tejido o explante a cultivar y 2) aquellos relacionados a las condiciones de incubación del cultivo. Asimismo, dentro del primer grupo merece la pena mencionar el efecto de la variación genética de las plantas dadoras de los explantes, lo cual afecta significativamente la tasa de propagación de varias especies y cultivares. Dentro de las condiciones de incubación, el medio de cultivo donde se inocula el explante juega un rol muy importante y generalmente contiene componentes esenciales para la supervivencia y el normal crecimiento de las plantas, tales como agua, minerales, fuente de carbono, vitaminas, aminoácidos y, si fuera necesario, reguladores de crecimiento vegetal. Un medio nutritivo universalmente empleado es el denominado MS, propuesto por Murashige y Skoog (1962). La fuente carbonada frecuentemente usada es la sacarosa a una concentración óptima de 3 a 5% dependiendo de la vía de regeneración a estimular y el estado de crecimiento o desarrollo de la planta. Por lo general, para colaborar con la promoción de múltiples vástagos (MV) se utilizan bajas concentraciones de sacarosa, siendo de elección 3%.

1.3.1. Cultivo *in vitro* de mandioca

En las últimas décadas, la mandioca ha recibido una mayor atención por parte de las instituciones de investigación agrícola, llevando a cabo estudios que buscan elevar su productividad a menores costos de producción. Varios grupos internacionales están cooperando en el desarrollo de nuevos cultivares y el mejoramiento de los cultivares existentes en relación a aspectos como rendimiento de raíces, calidad de proteínas y resistencia a enfermedades y plagas (Mathews *et al.*, 1993). En las investigaciones realizadas se emplean técnicas de estudio del

área de la biotecnología vegetal, la cual incluye tres componentes básicos que interactúan entre sí: (a) técnicas microbianas de bioprocesamiento; (b) técnicas de cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos; (c) procedimientos moleculares y celulares para la caracterización y modificación de genomas, incluyendo técnicas para la identificación, recombinación, clonación, transferencia y expresión de material genético (Kartha y Roca, 1993; Cereda, 2002).

Con respecto al cultivo de tejidos, los primeros registros de la utilización de estas técnicas en mandioca datan de 1974, incluyendo estudios relacionados con el crecimiento de callos (Eskes *et al.*, 1974) y el cultivo de meristemas caulinares (Kartha *et al.*, 1974). Esta última técnica ha permitido principalmente la propagación de plantas libres de virus y de cualquier otro patógeno sistémico, lo cual ha facilitado el intercambio internacional de germoplasma. Por su parte, el cultivo de segmentos nodales ha permitido la multiplicación rápida de plantas fácilmente aclimatables y la conservación *in vitro* de diferentes variedades por tiempo indefinido (Smith *et al.*, 1986). A partir de entonces, el cultivo *in vitro* de tejidos de mandioca ha tenido gran aplicación tanto en el área de la regeneración y propagación como del mejoramiento genético de este cultivo. Sin embargo, hasta el momento las metodologías desarrolladas presentan un alto grado de dependencia genotípica (Bhagwat *et al.*, 1996; Pedroso de Olivera *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2017; Mapayi *et al.*, 2013).

1.3.2. Ventajas del cultivo de tejidos vs. sistemas convencionales de propagación en mandioca

De acuerdo a Villalobos y Thorpe (1993), las ventajas obtenidas con el cultivo de tejidos en mandioca son:

- incremento acelerado del número de plantas,
- reducción del tiempo de multiplicación,

- posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados,
- mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.

De este modo, el potencial de propagación *in vitro* de la mandioca supera ampliamente al de las técnicas tradicionales en la obtención de un material de buena calidad (Roca *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1986; Pedroso de Olivera *et al.*, 2000). Es por esto, que la propagación *in vitro* es una alternativa prometedora para la multiplicación de plantas de mandioca en Argentina, ya que permite tasas de propagación (Abd Alla *et al.*, 2013) y rendimiento a campo superiores a los obtenidos por métodos tradicionales de propagación (Cavallero *et al.*, 2012).

1.4. Hipótesis:

La multiplicación *in vitro* de mandioca podría optimizarse con la regulación de factores intrínsecos y extrínsecos para obtener un sistema de micropropagación masiva de plantas, vía inducción de múltiples vástagos.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivos generales:

- Determinar las condiciones óptimas necesarias para la propagación *in vitro* de mandioca, utilizando la vía de regeneración organogénica directa por inducción de múltiples vástagos (MV), aplicable a diferentes genotipos de interés para la agricultura del NEA.
- Evaluar el efecto de diferentes factores que afectan la propagación *in vitro* mediante la promoción de la regeneración de MV.

1.5.2. Objetivos específicos:

- Establecer una metodología para la multiplicación *in vitro* de 10 cultivares de mandioca vía inducción de MV, evaluando diferentes medios que involucren

distintas fuentes y concentraciones de citocininas frente al medio de micropropagación de rutina y el medio libre de reguladores de crecimiento.

- Analizar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración *in vitro* de MV de 10 cultivares de mandioca.

- Evaluar el efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración *in vitro* de MV y la elongación de los vástagos de diferentes cultivares de mandioca.

CAPÍTULO 2

2. Materiales y Métodos:

2.1. Material vegetal:

Los cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) con los que se trabajó son pertenecientes al Banco de Germoplasma Activo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste y del Instituto de Botánica del Nordeste (Universidad Nacional del Nordeste – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), las cuales corresponden a clones de interés para la agricultura del NEA. Se emplearon los siguientes 10 cultivares: Amarilla, Catiguá, Palomita, Ramada Paso, Rocha (empleados y recolectados en Argentina); Mandioca Colombiana 1505 (MCol 1505) (proveniente de Colombia); Mandioca Paraguaya 75 (MPar75) (proveniente de Paraguay); Blanca de Santa Catarina (Santa Catarina), Instituto Agronómico de Campiñas 12829 (IAC 12829) y Surubim-41 (Surubim-41) (provenientes del Brasil).

2.2. Establecimiento *in vitro*:

Para el establecimiento *in vitro* de los cultivares de mandioca mencionados anteriormente, se plantaron estacas caulinares en macetas con tierra fértil (arena: tierra negra, 1:1), las cuales regeneraron plantas que se mantuvieron en condiciones de invernadero durante la primavera. Al mes de cultivo, se procedió a extraer vástagos sanos de las plantas madres, los cuales fueron defoliados y sometidos a una desinfección superficial para poder iniciar el cultivo *in vitro*.

Los vástagos multinodales fueron desinfectados sumergiéndolos en etanol (70%) durante 1 minuto y luego transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (1,1%) de Tritón® X-100 (0,05%) durante 20 min, siendo posteriormente enjuagados 3 veces con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar de aire estéril. De los vástagos desinfectados se extrajeron segmentos uninodales que oficiaron de explantes, los cuales se cultivaron asépticamente en el medio basal de Murashige

y Skoog (1962) MS (Tabla 2.1), suplementado con 0,01 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA), 0,01 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0,1 mg/L de ácido giberélico (AG₃) (Cavallero *et al.*, 2012). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH y/o HCl y se solidificó con 0,75 % de Agar Sigma 1296. Los tubos fueron esterilizados en autoclave a 1 atmósfera de presión (120°C) durante 20 min. Los explantes cultivados se incubaron en un cuarto iluminado con lámparas Philips TL-D Reflex Blanco Frío (fotoperíodo de 14 hs e irradiancia PAR de 116 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y climatizado a 27±2 °C.

Tabla 2.1: Composición del medio basal según Murashige y Skoog (1962).

| Composición química | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Macronutrientes | Concentración en mg/L |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KNO ₃ | 1900 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 |
| Micronutrientes | --- |
| FeSO ₄ .7 H ₂ O | 27,8 |
| Na ₂ .EDTA | 37,3 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 |
| KI | 0,83 |
| Vitaminas y Aminoácido | --- |
| Myo-Inositol | 100 |
| Tiamina HCl | 0,1 |
| Ácido Nicotínico | 0,5 |
| Piridoxina HCl | 0,5 |
| Glicina | 2 |
| Otros | Concentración en g/L |
| Sacarosa | 30 |
| Agar SIGMA 1296 | 7,5 |

2.3. Multiplicación *in vitro* de diferentes genotipos de mandioca vía inducción de múltiples vástagos (MV)

Una vez multiplicado material suficiente de los 10 cultivares de mandioca seleccionados se iniciaron los ensayos de multiplicación vía inducción de MV. Para ello, se cultivaron asépticamente segmentos uninodales basales en posición vertical, derivados de plantas *in vitro* de aproximadamente 3 meses de edad. Los medios de cultivo evaluados para la multiplicación *in vitro* se describen en la Tabla 2.2 y consistieron en medio basal MS (que ofició de control libre de reguladores de crecimiento), MS adicionado con 6-bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) o tidiazurón (TDZ) en distintas dosis (0,5; 1; 5; 10 y 15mg/L) y un medio de multiplicación de rutina (en adelante Medio M) empleado para mandioca (MS + 0,01mg/L de BAP + 0,01mg/L ANA + 0,1mg/L de AG₃; Cavallero *et al.*, 2012).

Tabla 2.2: Descripción de los medios de cultivo empleados para la multiplicación *in vitro* de diferentes genotipos de mandioca vía inducción de MV.

| Medios | Composición de los medios de cultivo |
|---------------------|--|
| M1 (control) | MS |
| M2 | MS + 0,5 mg/L BAP |
| M3 | MS + 1 mg/L BAP |
| M4 | MS + 5 mg/L BAP |
| M5 | MS + 10 mg/L BAP |
| M6 | MS + 15 mg/L BAP |
| M7 | MS + 0,5 mg/L CIN |
| M8 | MS + 1 mg/L CIN |
| M9 | MS + 5 mg/L CIN |
| M10 | MS + 10 mg/L CIN |
| M11 | MS + 15 mg/L CIN |
| M12 | MS + 0,5 mg/L TDZ |
| M13 | MS + 1 mg/L TDZ |
| M14 | MS + 5 mg/L TDZ |
| M15 | MS + 10 mg/L TDZ |
| M16 | MS + 15 mg/L TDZ |
| M17 | MS + 0,01mg/L de BAP + 0,01mg/L de ANA y 0,1mg/L AG ₃ |

Referencias: MS abreviatura del medio basal de Murashige y Skoog (1962).

Los explantes cultivados fueron incubados en las condiciones ambientales previamente descritas para el Establecimiento *in vitro* del material vegetal.

Para este experimento, el diseño experimental fue completamente aleatorizado, con 4 repeticiones de 8 explantes cada una, para cada cultivar y medio de cultivo ensayado.

A los 20 y 40 días de cultivo, se registraron las respuestas morfológicas que se observaron en cada cultivar y para cada medio de cultivo probado. Las respuestas morfológicas que se registraron fueron porcentaje de explantes sin respuesta; porcentaje de explantes muertos; porcentaje de explantes con raíces; porcentaje de explantes con callo basal; porcentaje de explantes con callo basal y raíces; porcentaje de explantes con vástago simple (VS) y raíces; porcentaje de explantes con VS y callo basal; porcentaje de explantes con VS, callo basal y raíces; porcentaje de explantes con MV y callo basal; porcentaje de explantes con MV, callo basal y raíces; algunas de ellas ilustradas en la Figura 3.1.

Se evaluaron también las siguientes variables: porcentaje de explantes con VS, porcentaje de explantes con MV, número de nudos por explante y longitud de VS y MV regenerados en cada explante.

Posteriormente, los vástagos regenerados de MV, fueron transferidos a un medio de multiplicación de rutina empleado para mandioca (MS + 0,01mg/L de BAP + 0,01mg/L ANA + 0,1mg/L de AG₃; Cavallero *et al.*, 2012), para determinar su potencial de enraizamiento, según su medio de origen. Se cuantificó el porcentaje de enraizamiento de los vástagos derivados de MV, y se registró el peso seco de las plantas derivadas de MV enraizados, cuyo secado se realizó en estufa a 70°C hasta peso constante.

2.4. Efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración *in vitro* de MV de diferentes cultivares de mandioca.

Para estudiar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración *in vitro* de MV de 10 cultivares de mandioca, se emplearon los medios de cultivo cuyo tipo de citocinina y concentración ensayada resultaron óptimas en la promoción de MV como resultado del primer experimento. Seleccionados los medios de inducción de MV a emplear (Tabla 2.3), se cultivaron asépticamente segmentos uninodales de los 10 cultivares de mandioca mencionados anteriormente, permaneciendo en dichos medios por el término de 10, 20, 30 y 40 días. En el caso de los explantes cultivados por 10, 20 y 30 días, transcurrido ese periodo los mismos fueron transferidos a medio basal MS libre de reguladores de crecimiento, para que continúen su crecimiento hasta la toma de datos final a los 40 días.

Los explantes cultivados fueron incubados en las condiciones ambientales previamente descritas para el Establecimiento *in vitro* del material vegetal.

Para este experimento, el diseño experimental fue factorial cuyos factores principales fueron el factor medio de cultivo (4 niveles) *versus* el factor tiempo de inducción (4 niveles) (Tabla 2.3) por cultivar. Cada tratamiento fue repetido 4 veces, con 8 explantes por cada repetición.

Finalizado el experimento a los 40 días de cultivo se registraron las siguientes variables: porcentaje de explantes con VS, porcentaje de explantes con MV, longitud y número de nudos de VS y derivados de MV.

Tabla 2.3: Descripción de los tratamientos realizados para estudiar el efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración *in vitro* de MV de diferentes genotipos de mandioca.

| Tratamientos | Medios de cultivo | Tiempo de inducción (días) |
|--------------|-------------------|----------------------------|
| T1 | MS + 0,5 mg/L BAP | 10 |
| T2 | MS + 1 mg/L BAP | 10 |
| T3 | MS + 5 mg/L CIN | 10 |
| T4 | MS + 10 mg/L CIN | 10 |
| T5 | MS + 0,5 mg/L BAP | 20 |
| T6 | MS + 1 mg/L BAP | 20 |
| T7 | MS + 5 mg/L CIN | 20 |
| T8 | MS + 10 mg/L CIN | 20 |
| T9 | MS + 0,5 mg/L BAP | 30 |
| T10 | MS + 1 mg/L BAP | 30 |
| T11 | MS + 5 mg/L CIN | 30 |
| T12 | MS + 10 mg/L CIN | 30 |
| T13 | MS + 0,5 mg/L BAP | 40 |
| T14 | MS + 1 mg/L BAP | 40 |
| T15 | MS + 5 mg/L CIN | 40 |
| T16 | MS + 10 mg/L CIN | 40 |

Referencias: MS abreviatura del medio basal de Murashige y Skoog (1962).

2.5. Efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración *in vitro* de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca.

Para evaluar el efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración *in vitro* de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca, se emplearon los medios de cultivo cuyo tipo de citocinina, concentración ensayada y tiempo de inducción, resultaron óptimos en la promoción de MV como resultado del segundo experimento (Tabla 2.4). Transcurridos 20 días de cultivo en los medios para inducir la formación de MV, los explantes fueron transferidos al medio basal MS

libre de reguladores de crecimiento y continuaron expuestos al tratamiento lumínico inicial.

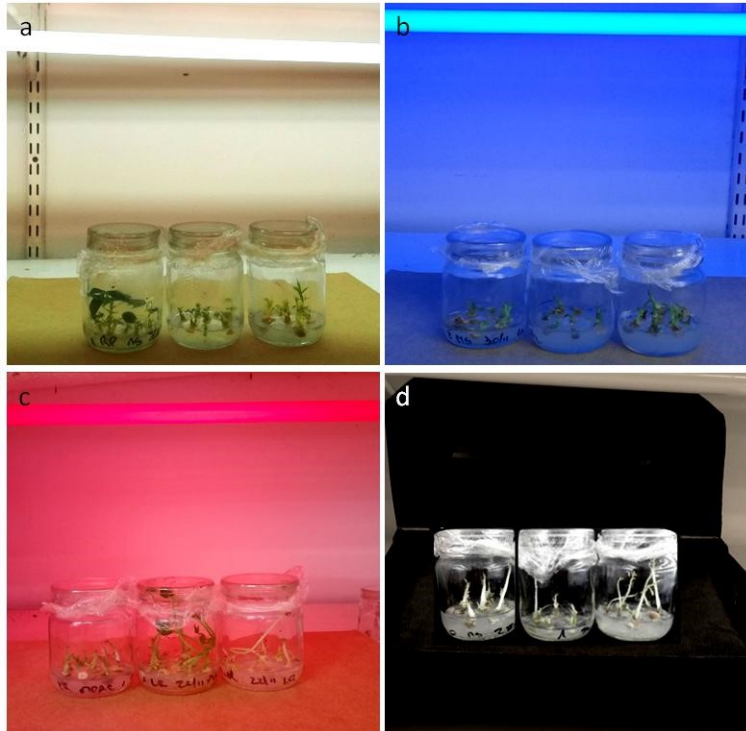
Tabla 2.4: Descripción de los tratamientos realizados para estudiar el efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración *in vitro* de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca.

| Tratamientos | Medios de cultivo | Tratamiento lumínico |
|-------------------|--|----------------------|
| T1 T2 T3 | MS + 0,5 mg/L BAP MS + 1 mg/L BAP MS + 10 mg/L CIN | Luz blanca |
| T4 T5 T6 | MS + 0,5 mg/L BAP MS + 1 mg/L BAP MS + 10 mg/L CIN | Luz azul |
| T7 T8 T9 | MS + 0,5 mg/L BAP MS + 1 mg/L BAP MS + 10 mg/L CIN | Luz roja |
| T10 T11 T12 | MS + 0,5 mg/L BAP MS + 1 mg/L BAP MS + 10 mg/L CIN | Oscuridad |

Referencias: MS abreviatura del medio basal de Murashige y Skoog (1962).

El diseño experimental empleado fue completamente aleatorizado, con 4 repeticiones de 8 explantes cada una, para cada cultivar, medio de cultivo y tratamiento lumínico ensayado.

Figura 2.1: Diferentes condiciones lumínicas evaluadas para la elongación de vástagos, e inducción de la regeneración de explantes con MV. a) Lámparas fluorescentes blancas (control); b) luz azul; c) luz roja y d) oscuridad.



A los 40 días de cultivo se registraron las siguientes variables: porcentaje de explantes con VS, porcentaje de explantes con MV, longitud y número de nudos de vástagos simples y derivados de MV.

2.6. Análisis estadísticos

Los datos fueron graficados utilizando el software Graph Pad Prism 5.0. Para ello se calcularon las medias aritméticas y los errores estándar. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de la varianza, utilizando el programa estadístico InfoStat/P versión 1.1 (InfoStat, 2002), previa verificación de la normalidad de las variables y se compararon las medias aritméticas de las variables evaluadas mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

CAPÍTULO 3

3. Resultados y Discusión:

3.1. Multiplicación *in vitro* de diferentes genotipos de mandioca vía inducción de múltiples vástagos:

Al cabo de 20 y 40 días de cultivo *in vitro*, los segmentos uninodales manifestaron un total de 13 respuestas morfogénicas tales como: explantes sin respuesta, muertos, con vástagos simples (VS) con o sin formación de callo basal, con VS con o sin callo basal con o sin raíces, con múltiples vástagos (MV) con o sin callo basal, con MV con o sin callo basal con o sin raíces. Algunas de ellas se ilustran en la Figura 3.1. Los VS se formaron como resultado de la brotación de la yema axilar del segmento uninodal (Figura 3.1 f, g y h) y los vástagos múltiples derivaron de la ramificación basal de los VS inicialmente brotados y crecidos (Figura 3.1 i e j), en todos los casos mediada por la vía de la regeneración directa.

Figura 3.1: Respuestas morfogénicas obtenidas por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) en medios con distintas citocininas y en diferentes concentraciones.



Referencias: a: explante sin respuesta; b: explante muerto; c: explante con raíces; d: explante con callo basal; e: explante con callo basal con raíces; f: explante con VS y raíces; g: explante con VS y callo basal; h: explante con VS y callo basal con raíces; i: explante con MV y callo basal; j: explante con MV y callo basal con raíces. Barras = 1 cm.

Medina *et al.* (2007) identificaron 12 respuestas morfogénicas evaluando la capacidad rizogénica y de tuberización de diferentes cultivares de mandioca cultivados *in vitro* en medios libres de reguladores de crecimiento, o adicionados con ANA, BAP o sus combinaciones. Si bien algunas respuestas detalladas por Medina *et al.* (2007) como ser explantes uninodales con o sin callo, con o sin raíces coinciden con las observadas en esta tesis, como resultado de la misma se describen otras respuestas que específicamente están relacionadas a la morfogénesis caulinar.

En la Figura 3.2 se muestran explantes que regeneraron MV obtenidos en los cvs. Surubim-41, IAC 12829 y Catiguá al cabo de 40 días de cultivo. Se puede observar la formación de un callo basal en la herida practicada a nivel del entrenudo al momento de cultivar, lo cual no se relaciona con la caulogénesis directa manifestada por la yema axilar que porta el explante. Es necesario mencionar que el callo basal sí podría afectar la supervivencia de la yema axilar en el nudo y su posterior crecimiento y conversión en vástago, hecho observado en algunos tratamientos en donde el explante finalmente terminaba muerto. Es importante considerar estas apreciaciones dado que el callo que se regenera en la base del explante nodal al no presentar yemas *de novo* no representaría un riesgo de variación somaclonal del material propagado. Si bien se han citado resultados disímiles en relación a la estabilidad genética de plantas derivadas de organogénesis indirecta en mandioca (Medina *et al.*, 2003; Mussio *et al.*, 1998), no existe peligro de variaciones somaclonales a partir de la metodología empleada en esta tesis debido a que la yema axilar del segmento uninodal es preexistente.

Figura 3.2: Regeneración de MV obtenidos por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) en medios con distintas citoquininas y en diferentes concentraciones, para los cultivares Surubim-41, IAC 12829 y Catiguá luego de 40 días del cultivo.



A continuación, se describen los resultados obtenidos a los 20 y 40 días de cultivo en relación a las respuestas morfogénicas en función de los medios de cultivo evaluados para cada cultivar.

En todos los cultivares se observó que el medio de multiplicación o Medio M (Cavallero *et al.*, 2012) promovió un alto porcentaje de explantes con VS con raíces. Este medio es el empleado de rutina para la micropropagación de mandioca y aunque si bien induce un alto porcentaje de explantes que responden regenerando plantas completas (*i.e.* vástagos enraizados) presenta una tasa de multiplicación heterogénea en relación al cultivar empleado (Cavallero, 2010; Medina *et al.*, 2017). Por otra parte, es notable la capacidad de la especie en relación a la regeneración de vástagos y raíces adventicias, ya que con el MS libre de reguladores de crecimiento también se observaron muy altos porcentajes de explantes con VS con o sin raíces (Figuras 3.3 a 3.43), la diferencia radicó básicamente en la altura de los vástagos regenerados (dato no mostrado). Aunque en esta tesis un cultivar denominado IAC 12829 respondió generando MV en MS (Figura 3.16), es un hecho inusual ya que se ha informado en mandioca y otras especies que cuando los segmentos nodales son cultivados en medio libre de reguladores de crecimiento por lo general únicamente son capaces de generar VS (Hutchinson *et al.*, 2014; Faye *et al.*, 2015; Abd Alla *et al.*, 2013).

Para el cv. Ramada Paso, las respuestas más frecuentes involucraron la formación de vástagos, ya sea con o sin callo basal (Figuras 3.3 y 3.4). También se pudo observar que los medios adicionados con TDZ promovieron una mayor proporción de explantes con callo basal, llegando a los 40 días con casi un 50 % de estas respuestas (Figuras 3.3 y 3.4).

Tanto a los 20 como a los 40 días de cultivo, los medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP son los que presentaron la mayor promoción de MV seguidos por los medios adicionados con 5 y 10 mg/L de CIN, aunque en menor proporción (Figuras 3.5 y 3.6). La promoción de MV también se observó en los medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de TDZ, sin embargo a los 40 días se encontraban muertos (Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6).

Los vástagos derivados de MV provenientes de los medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP fueron los que presentaron los más altos porcentajes de enraizamiento (Tabla 3.5).

Figura 3.3: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* 2012).

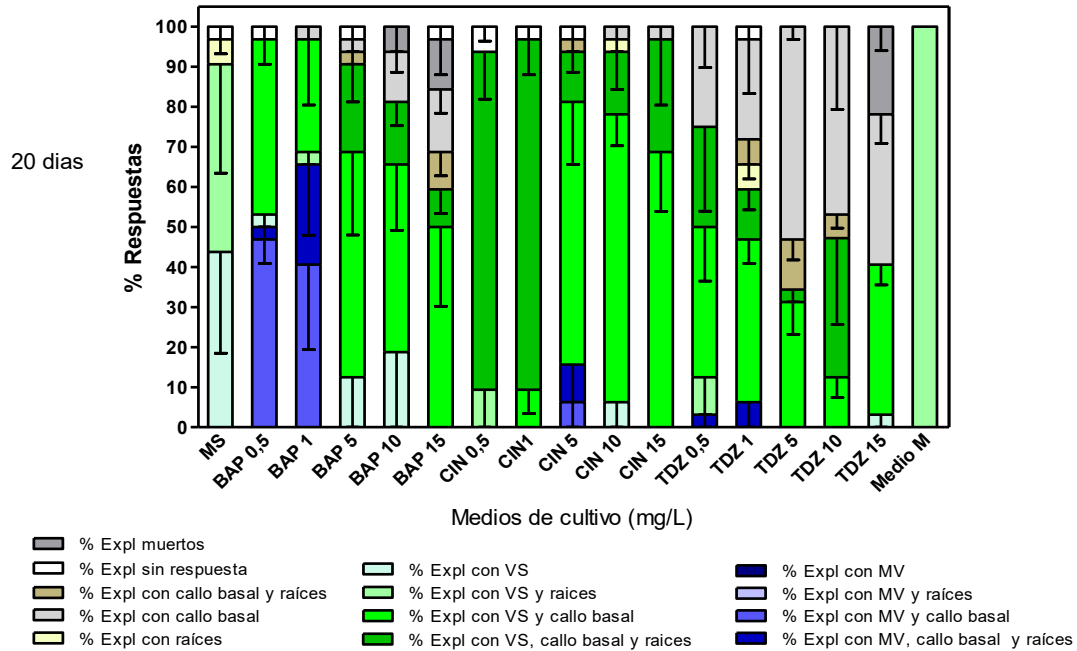


Figura 3.4: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* 2012).

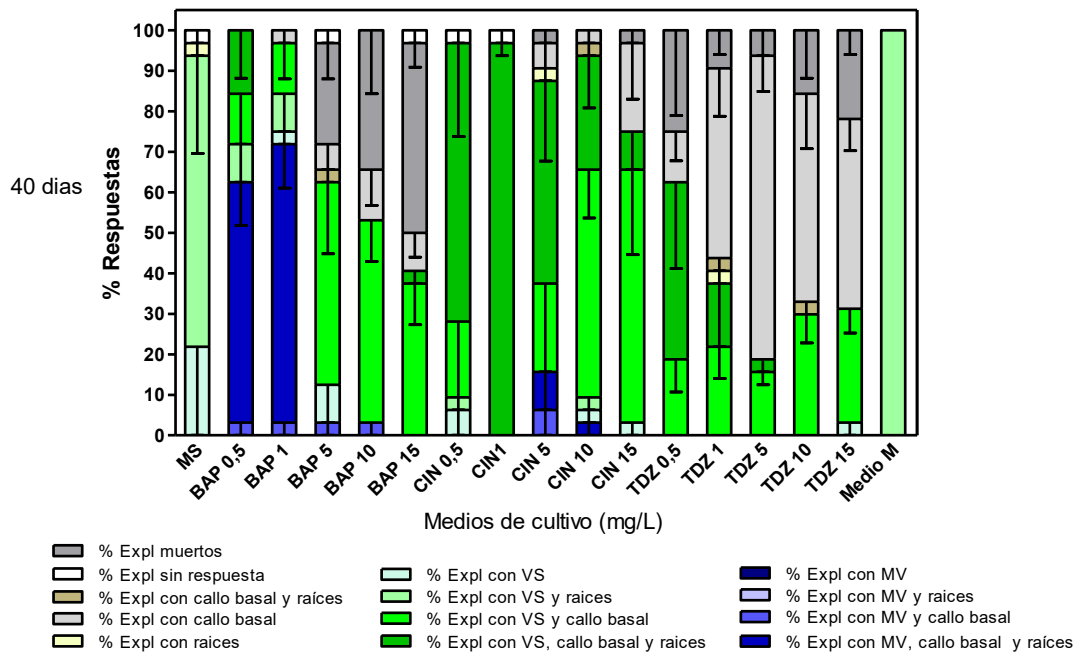
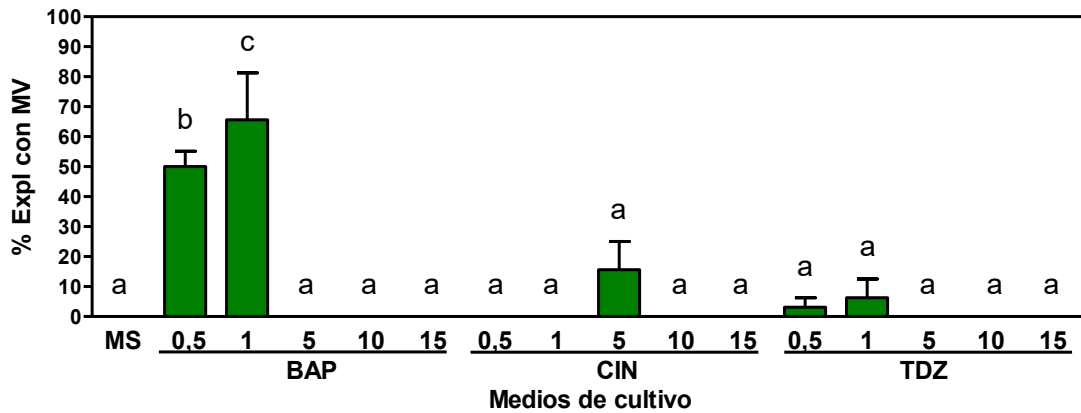
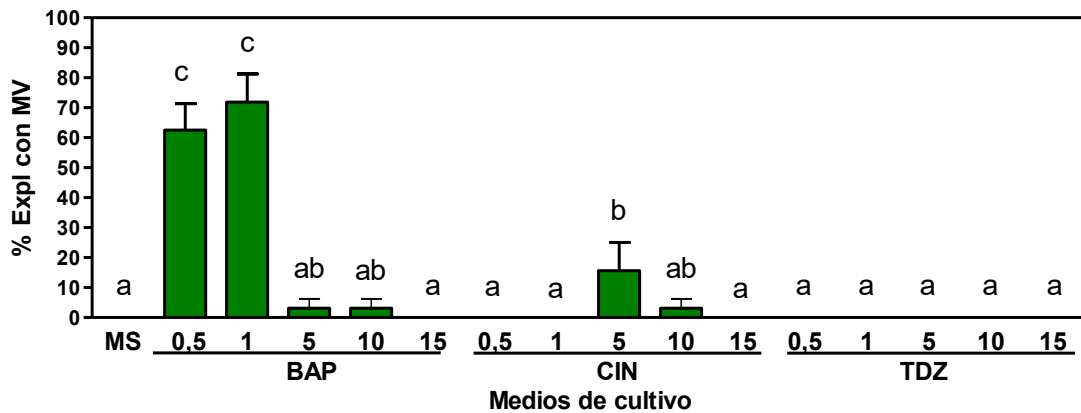


Figura 3.5: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 3.6: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En el cv. MPar 75 fue muy frecuente la formación de vástagos con o sin callo basal (Figura 3.7 y 3.8). En general, a los 40 días aumentó la proporción de explantes con MV en diferentes medios de cultivo (Figura 3.9 y 3.10). Los tratamientos con CIN, fueron los que presentaron los mayores porcentajes de proliferación de MV, destacándose los medios adicionados con 10 y 15 mg/L de CIN a los 40 días (Figura 3.10). En los medios adicionados con BAP, la concentración más promisoría en relación a la formación de MV fue la menor dosis ensayada (0,5 mg/L). En el caso de los medios adicionados con TDZ no sólo que el porcentaje de explantes que regeneraron MV fue muy bajo sino que además presentaban un aspecto arrosetado con pocos nudos (Tabla 3.8) y callo basal de gran dimensión, similar a los observado en otros cultivares (Figura 3.23 y 3.39). A los 40 días, en las dosis más altas de TDZ (5, 10 y 15 mg/L), se observaron muy altos porcentajes de explantes con callo basal y explantes muertos (Figura 3.7 y 3.8). Los mayores porcentajes de enraizamiento se registraron en los vástagos que provenían de MV regenerados en los medios adicionados con 0,5 mg/L de BAP y 10 y 15 mg/L de CIN (Tabla 3.5).

Figura 3.7: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

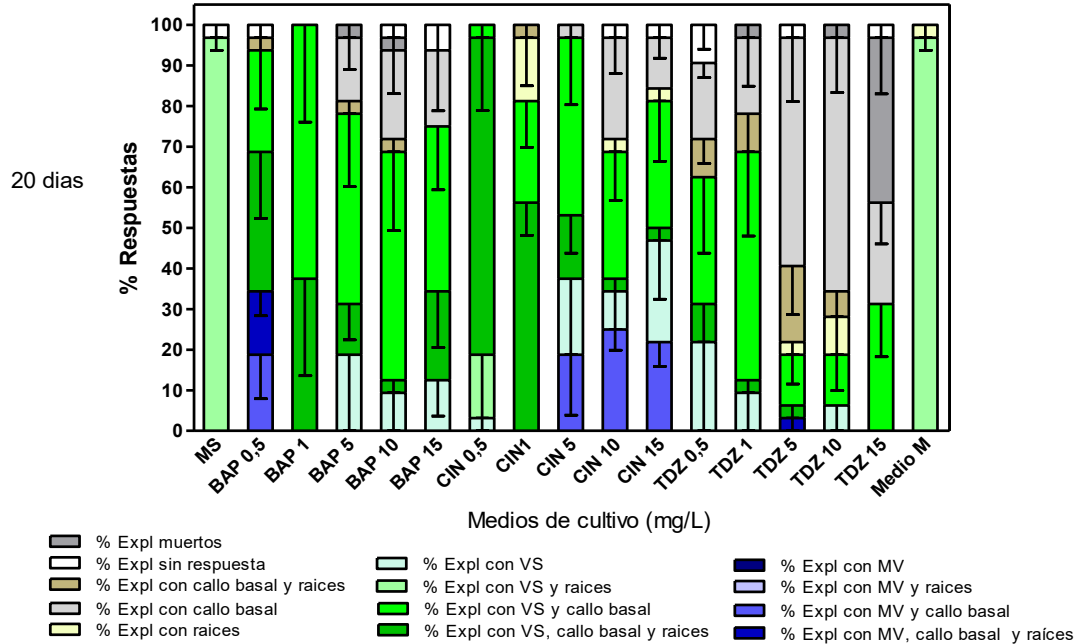


Figura 3.8: Respuestas morfogénicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

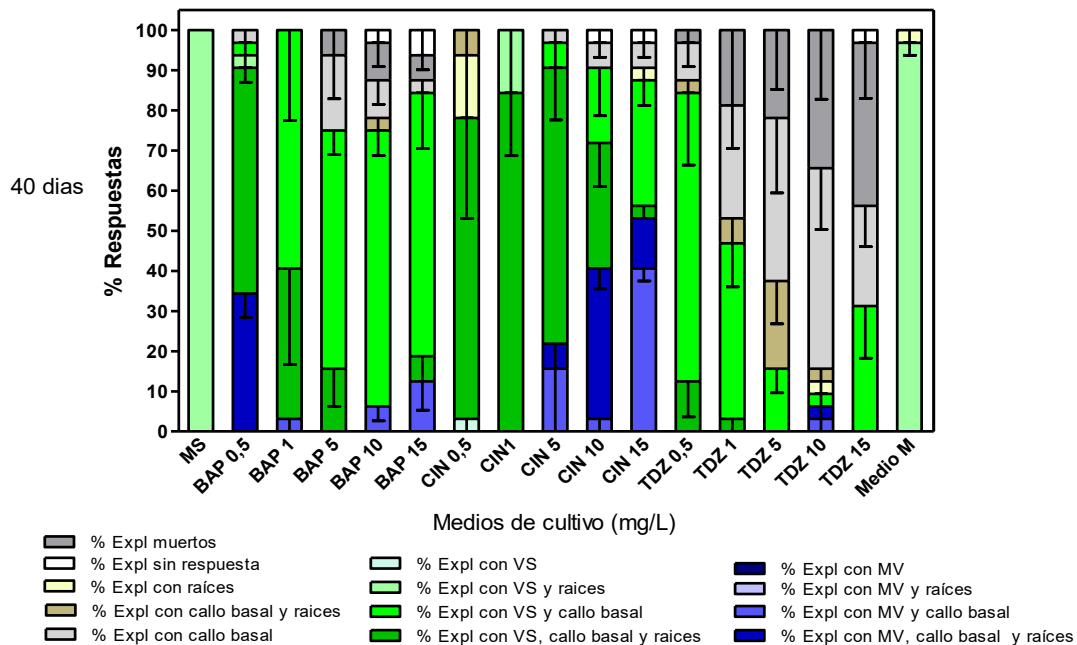


Figura 3.9: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

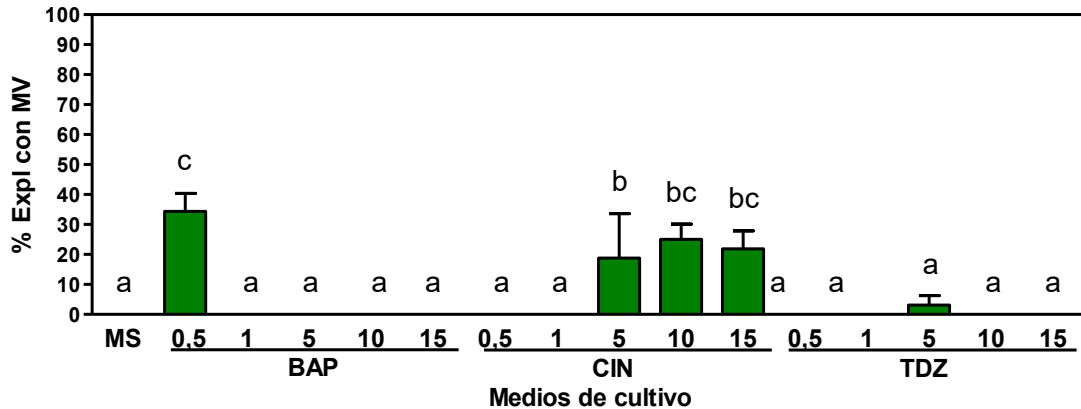
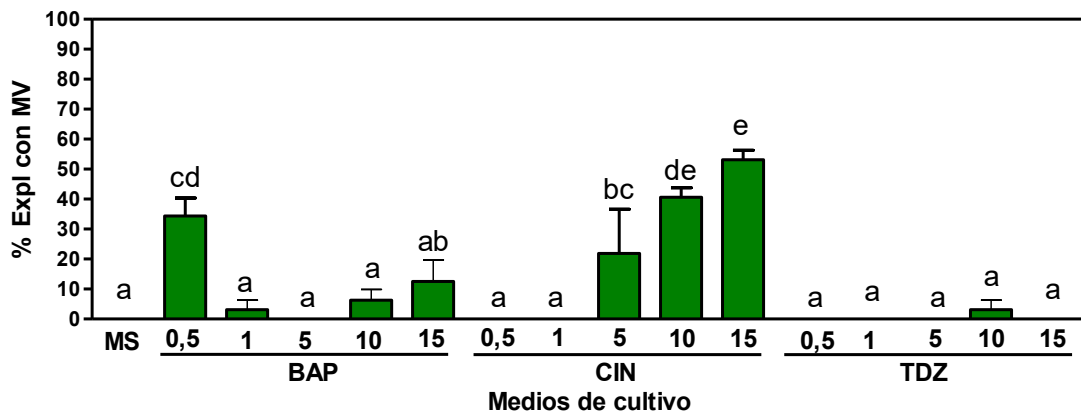


Figura 3.10: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En el cv. Catiguá, los explantes regeneraron vástagos en todos los medios, la mayoría de las veces con la presencia de callo basal (Figuras 3.11 y 3.12). Los medios de cultivo que promovieron la mayor proporción de explantes con MV fueron los que estaban adicionados con BAP (0,5 y 1mg/L) y CIN (5 a 15mg/L) (Figuras 3.13 y 3.14). La adición de TDZ, en todas sus concentraciones, promovió la formación de callos (Figuras 3.11 y 3.12) y la regeneración de vástagos muy pequeños con callo basal. Se registraron explantes con MV en las concentraciones más bajas de TDZ (0,5 y 1 mg/L) (Figuras 3.13 y 3.14) aunque los mismos eran arroquetados y de muy escasos nudos, los cuales al ser transferidos a medio de multiplicación sólo enraizaron en un muy bajo porcentaje (Tabla 3.5). Si bien a los 40 días no se registró una gran variación en la promoción de MV en relación a 20 días, se observó que la misma se afianzó en los medios con 5-15 mg/L de CIN (Figura 3.14).

Si bien los mayores porcentajes de enraizamiento se observaron en los vástagos que provenían de MV regenerados en los medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP y 5 mg/L de CIN, los mismos se diferenciaron estadísticamente sólo de los que provenían de medios con 15 mg/L de BAP.

Figura 3.11: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

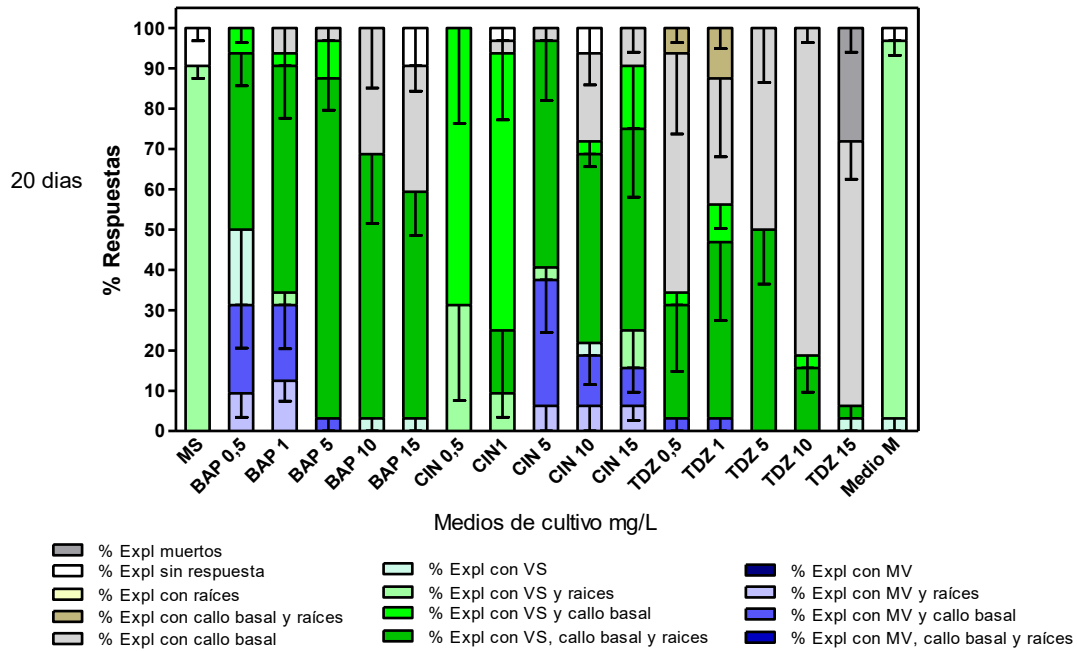


Figura 3.12: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

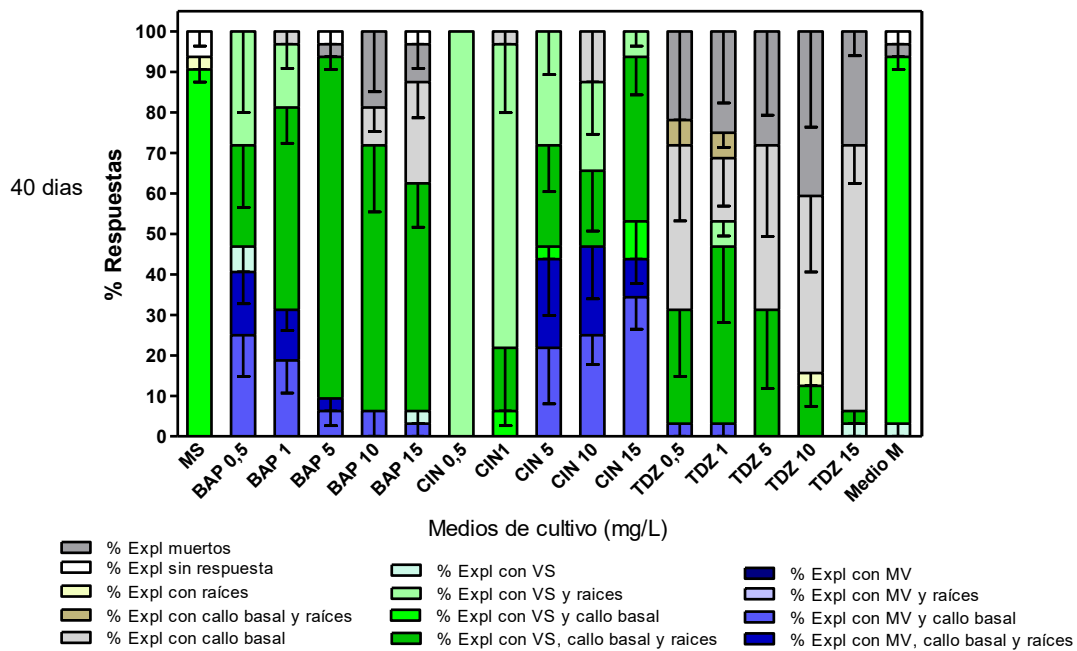
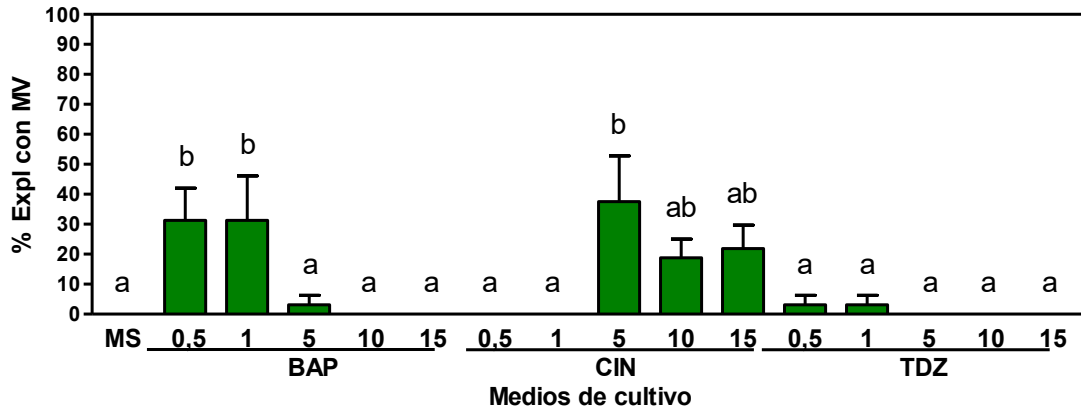
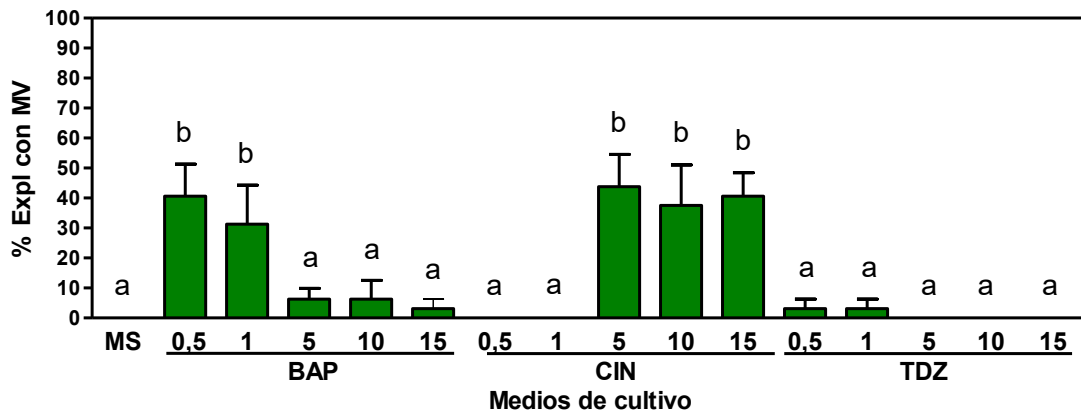


Figura 3.13: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 3.14: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Para el cv. IAC 12829, lo más notable fue su capacidad de regenerar explantes con MV, observándose esto en 13 de los 17 medios evaluados (Figuras 3.15, 3.16, 3.17 y 3.18). Fue el único cultivar que regeneró MV en MS sin la adición de citocininas (Figura 3.16 y 3.18). Si bien la adición de BAP al medio de cultivo indujo la formación de MV en todas sus concentraciones, se destacaron las concentraciones 1 y 5 mg/L (Figura 3.17 y 3.18). Con CIN, la mayor promoción de la formación de MV se obtuvo mediante la adición de 5 a 10 mg/L CIN (Figura 3.18). Los vástagos derivados de MV provenientes de medios con BAP y CIN, transferidos al medio de micropropagación, demostraron altos porcentajes de enraizamiento (Tabla 3.5), diferenciándose estadísticamente respecto de la concentración y de la fuente.

En los medios de cultivo adicionados con TDZ, en sus menores concentraciones, se registraron explantes con MV aunque en porcentajes muy bajos en comparación al resto de las citocininas probadas. En las dosis más altas de TDZ se obtuvieron altos porcentajes de explantes con callo basal y en el peor de los casos se registró más del 30% de explantes muertos a los 40 días de cultivo (Figura 3.16).

Figura 3.15: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

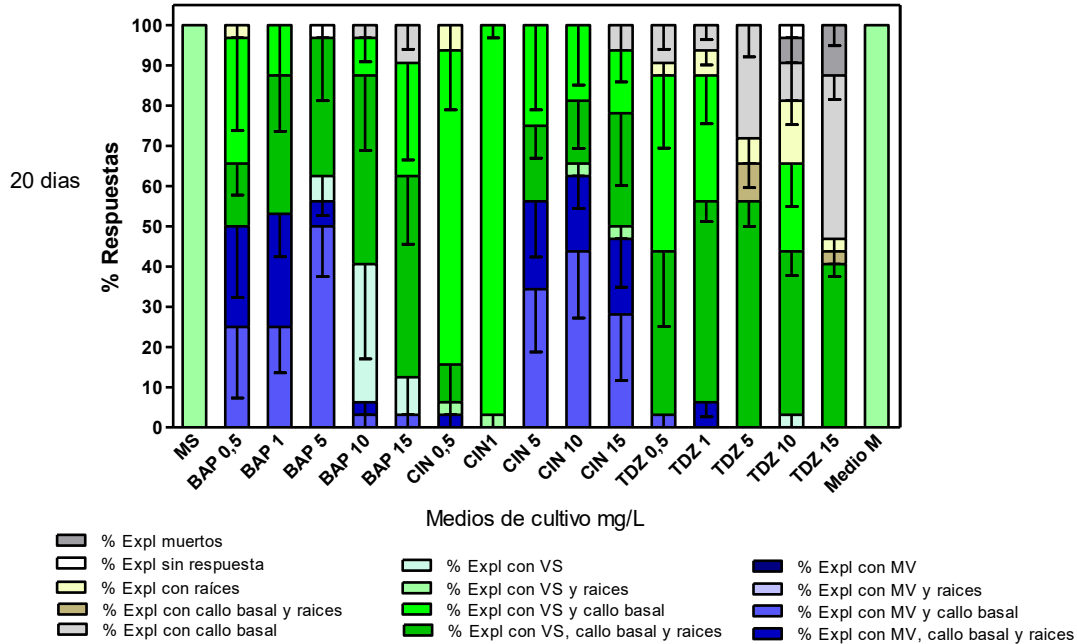


Figura 3.16: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

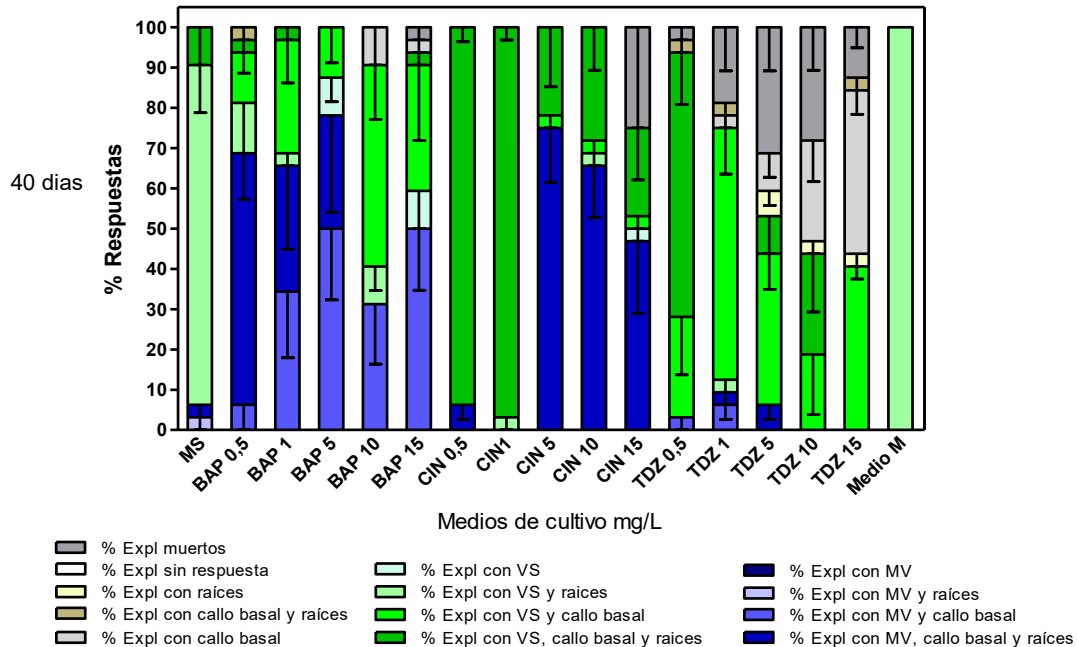


Figura 3.17: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

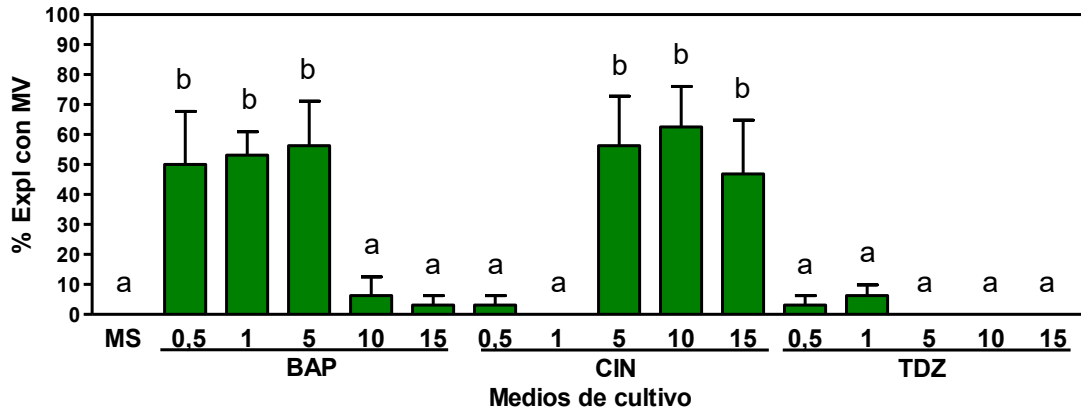
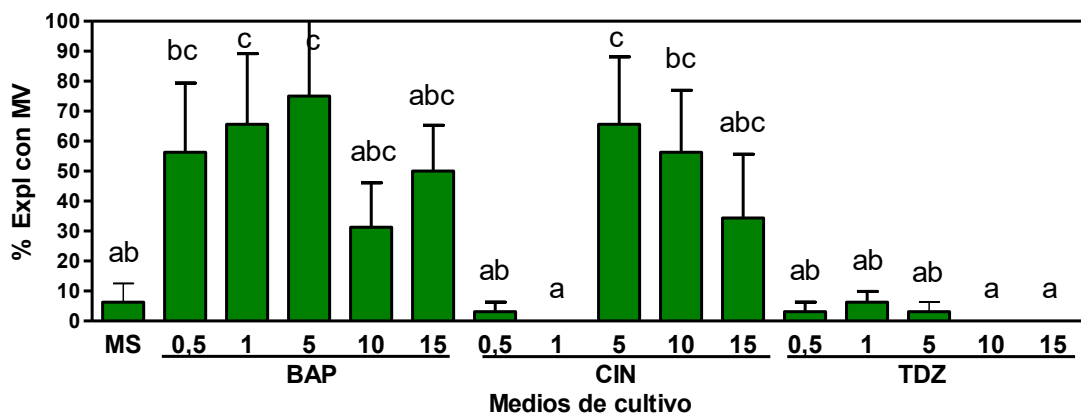


Figura 3.18: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En el cv. Surubím-41, se evidenció una gran proporción de explantes con callo basal acompañado de diferentes respuestas de la yema axilar preexistente, ya sea dando lugar a la formación de VS o MV (Figuras 3.19 y 3.20).

La respuesta morfogénica más representativa provocada por la adición de BAP fue la inducción de MV en todas las concentraciones probadas (Figuras 3.19 y 3.21), acentuándose esta a los 40 días de cultivo (Figuras 3.20 y 3.22). La utilización de CIN en sus dosis más bajas (0,5 y 1 mg/L) promovió principalmente la manifestación de explantes con VS o VS y raíces, con o sin callo basal. Asimismo, el empleo de CIN indujo la formación de MV en casi todas las concentraciones ensayadas con excepción de 0,5 mg/L (Figuras 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22).

La respuesta morfogénica ampliamente evidenciada con la adición de TDZ fue la generación de explantes con callos, los cuales eran muy prominentes en todas sus concentraciones, y en particular, a partir de la concentración de 10 mg/L de TDZ. La adición de TDZ indujo la formación de MV, aunque en menor medida con respecto a las restantes citocininas probadas. También se pudo apreciar a los 20 días que la menor dosis de TDZ (0,5 mg/L) promovió la regeneración de explantes con MV (Figura 3.19), aunque a los 40 días se encontraban muertos (Figura 3.20).

Con respecto a la capacidad de enraizamiento de los vástagos derivados de MV, los resultados señalaron que los vástagos provenientes de medios adicionados con BAP, enraizaron entre un 72,1 y 97,9% en promedio, registrándose los mayores valores cuando derivaron de los medios con 0,5 a 10 mg/L de BAP (Tabla 3.5). Asimismo, los vástagos provenientes de MV regenerados en medios con CIN (5 y 10 mg/L) mostraron valores de enraizamiento por encima de 70% (Tabla 3.5). Se observó enraizamiento de vástagos derivados de MV que provenían de los medios adicionados con TDZ, sin embargo, los porcentajes promedios no superaban el 50%.

Figura 3.19: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

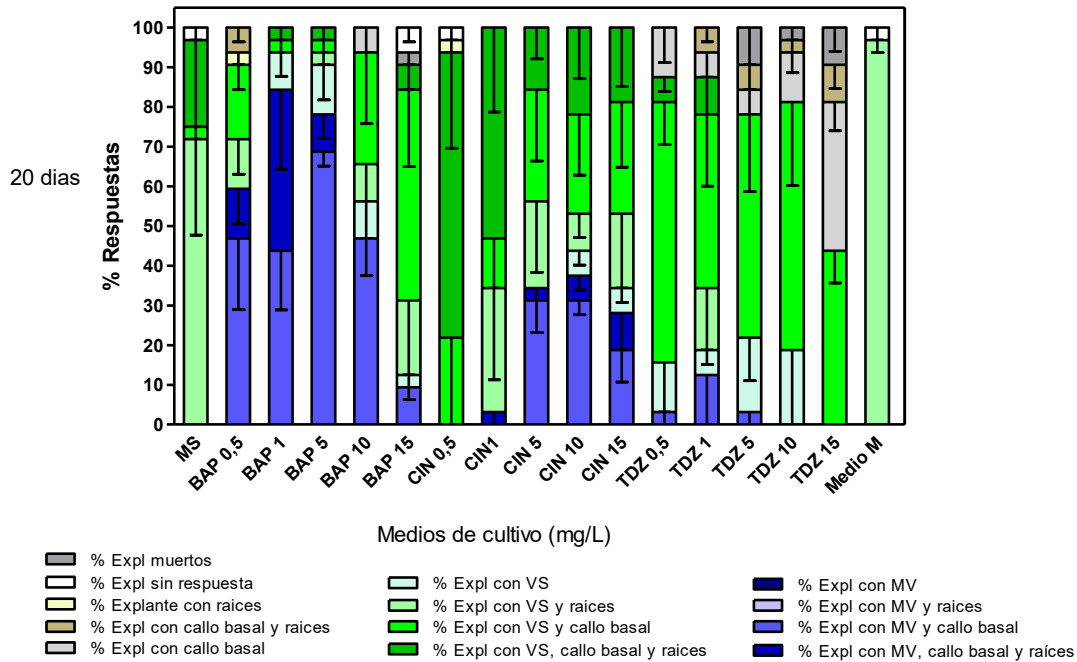


Figura 3.20: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

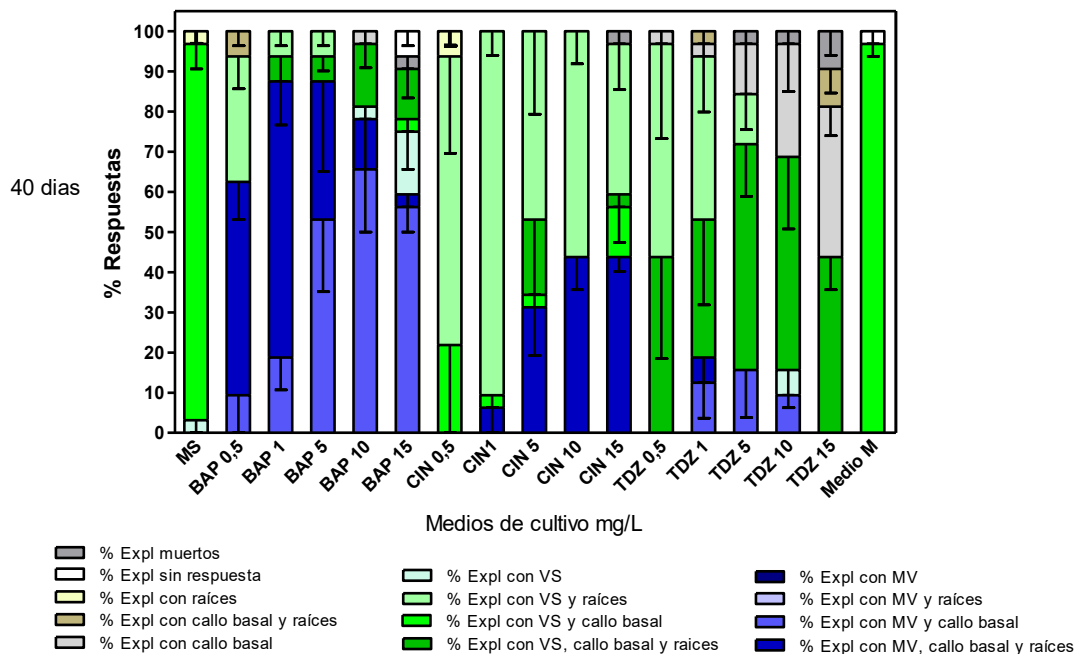


Figura 3.21: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

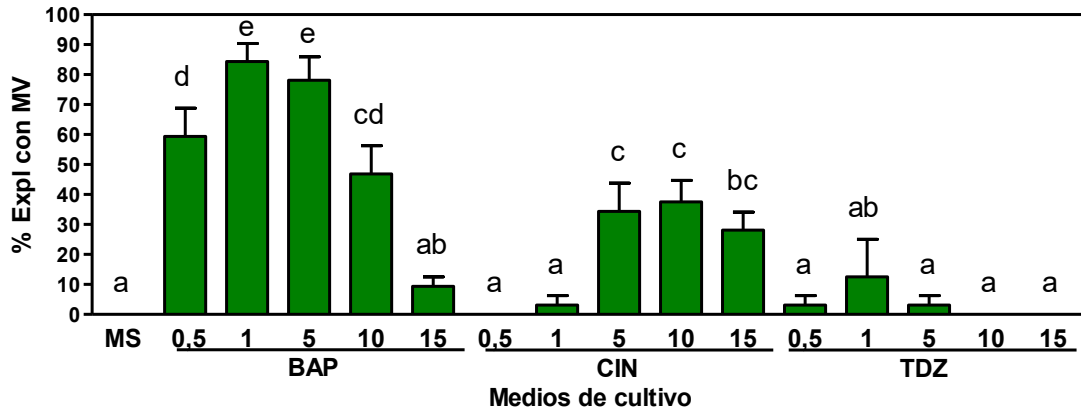
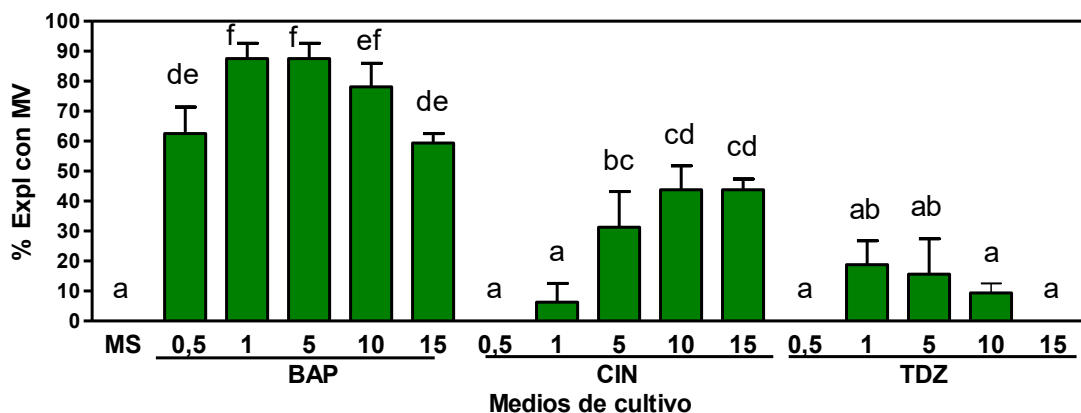


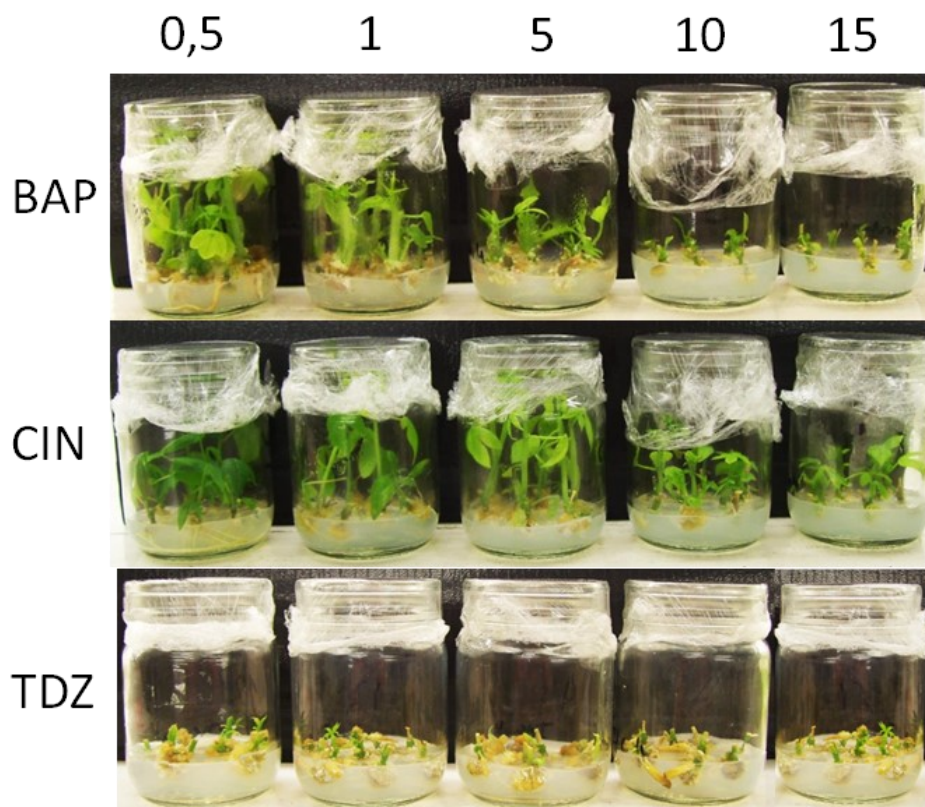
Figura 3.22: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En la Figura 3.23 se ilustran las respuestas obtenidas en relación a la regeneración *in vitro* de vástagos, raíces y callos basales a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. Surubím-41 a los 40 días de cultivo en medios con distintas citocininas y en diferentes concentraciones. Obsérvese la notable proliferación de MV en medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP ó con 1 a 10 mg/L de CIN. Por otra parte, si bien en todos los explantes se evidencia la formación de callos basales, es de considerar que los medios adicionados con TDZ provocan una exacerbación de la proliferación de los mismos lo cual condiciona el crecimiento de los vástagos formados. Se puede apreciar también la influencia que ejercen las citocininas sobre la longitud de los vástagos regenerados según el tipo y la concentración de las mismas.

Figura 3.23: Regeneración *in vitro* de vástagos, raíces y callos basales de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. Surubím-41 cultivados en medios adicionados con distintas citocininas y en diferentes concentraciones.



Referencias: las concentraciones se expresan en mg/L.

En el cv. Santa Catarina, las respuestas más registradas a los 20 días de cultivo fueron la de explantes con callo basal ó con VS con callo basal, regenerándose raíces sobre esos callos o finalmente muriendo a los 40 días (Figura 3.24 y 3.25). La proporción de explantes sólo con callo basal ó muertos aumentó en función del aumento de la concentración de las citocininas evaluadas (Figura 3.24 y 3.25).

Asimismo, en los medios adicionados con BAP y TDZ en sus concentraciones más altas, el porcentaje de explantes con callo basal fue muy alto incluso en algunos casos superó el 80%. Por otra parte, a los 40 días de cultivo en medios adicionados con altas dosis de BAP y TDZ el porcentaje de explantes muertos superó el 50%.

A los 20 días de cultivo, los explantes del cv. Santa Catarina respondieron a la adición de citocininas regenerando MV en determinadas concentraciones, tales como 0,5 a 5 mg/ de BAP y 5 a 15 mg/L de CIN (Figuras 3.24 y 3.26). Es notable como se repite el efecto observado en los otros cultivares ensayados, donde la proliferación de MV con BAP se da mayormente en las dosis bajas y con CIN en las dosis altas. Recién a los 40 días de cultivo, la adición de 0,5 mg/L de TDZ propició la regeneración de MV aunque en bajísimo porcentaje (Figuras 3.25 y 3.27). El medio que promovió el mayor porcentaje de explantes con MV resultó ser el adicionado con 1 mg/L de BAP, acentuándose esta respuesta a los 40 días de cultivo.

En cuanto al enraizamiento de los vástagos provenientes de explantes con MV, los mayores valores de enraizamiento se dieron en vástagos derivados de medios suplementados con 0,5-1 mg/L de BAP, si bien no se diferenciaron estadísticamente del resto de los tratamientos (Tabla 3.5).

Figura 3.24: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

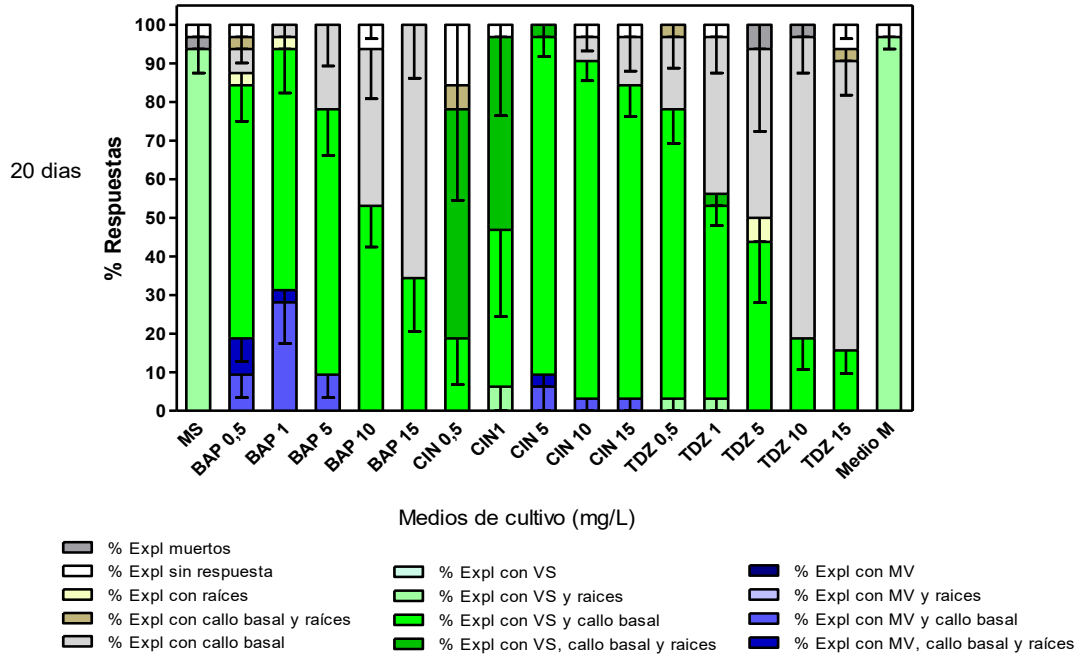


Figura 3.25: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

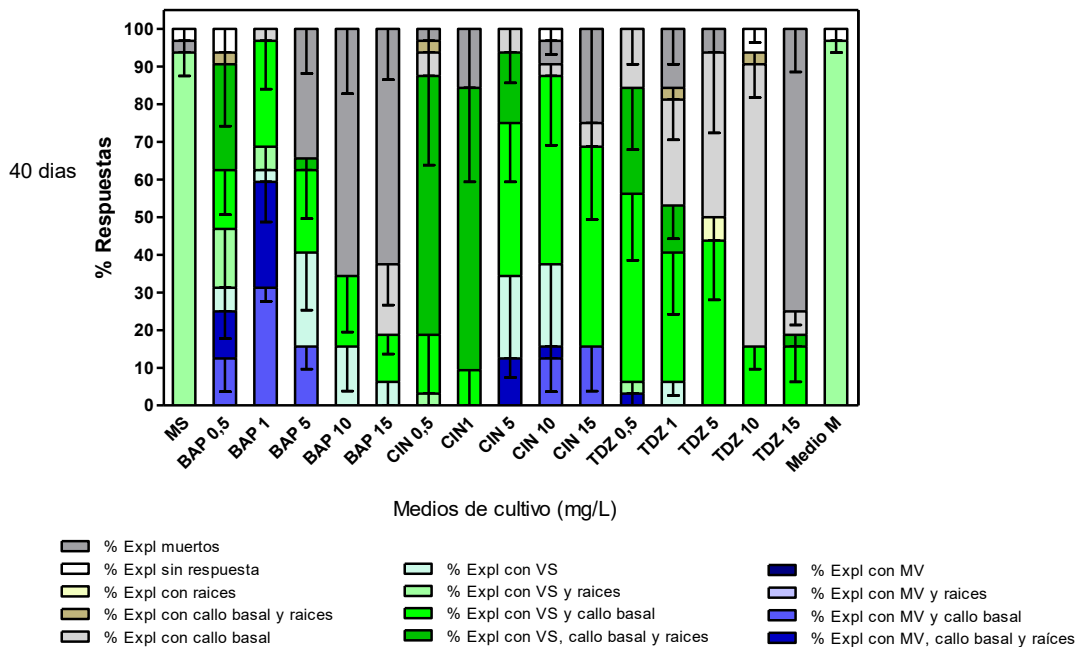


Figura 3.26: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

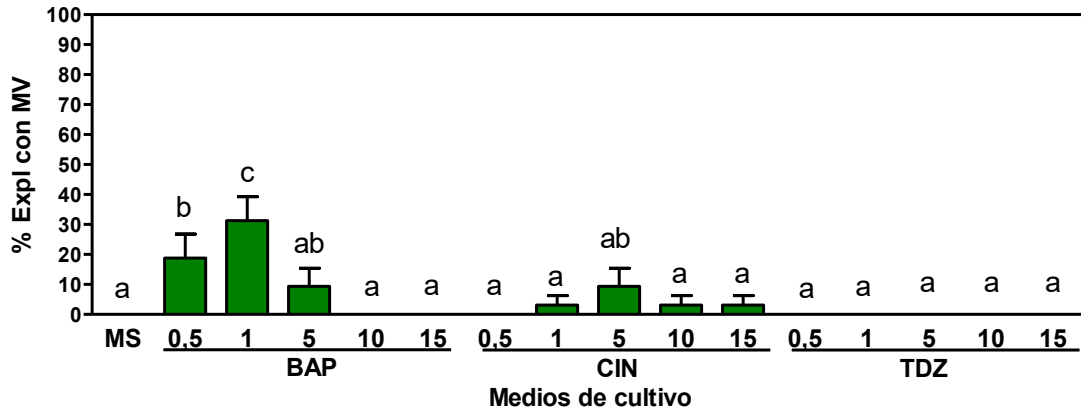
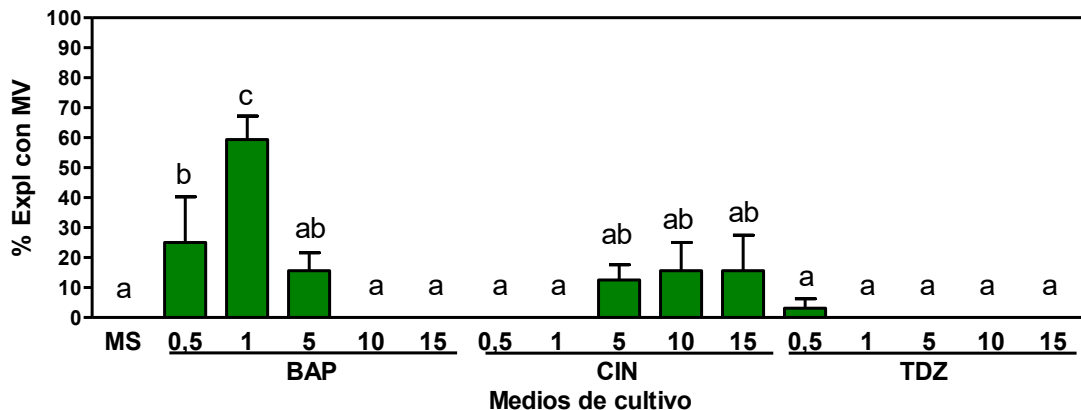


Figura 3.27: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Para el cv. Rocha, el empleo de BAP y CIN produjo una alta proporción de explantes con VS y en determinadas concentraciones la regeneración de MV, predominado la respuesta caulogénica acompañada del callo basal (Figuras 3.28 y 3.29). Bajas dosis de CIN generaron un alto porcentaje de explantes con VS, callo basal y raíces (Figura 3.29). El aumento de la concentración de TDZ produjo una proporción creciente de explantes con callo basal (Figuras 3.28 y 3.29). La promoción de MV fue posible cuando se adicionó 0,5 a 5 mg/L de BAP (Figura 3.30) y 0,5 a 15 mg/L de CIN. En el caso de la CIN la regeneración de MV aumentó en proporción al aumento de la concentración evaluada (Figura 3.31). La adición de TDZ, promovió la proliferación de MV aunque sin presentar un patrón definido (0,5 y 10 mg/L) (Figuras 3.30 y 3.31). La diferenciación de MV fue significativa con el uso de 0,5-1 mg/ de BAP y 10-15 mg/L de CIN (Figura 3.31).

En este cultivar, se observó una decreciente capacidad rizogénica en función al aumento de la concentración empleada de BAP. Sin embargo, se observó una creciente respuesta rizogénica de los vástagos en función del aumento de la concentración de CIN, hasta llegar a un máximo cuando derivaron de 10 mg/L de CIN (Tabla 3.5). Los vástagos derivados de MV formados con TDZ fueron capaces de enraizar en muy bajo porcentaje no superando el 25% (Tabla 3.5).

Figura 3.28: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

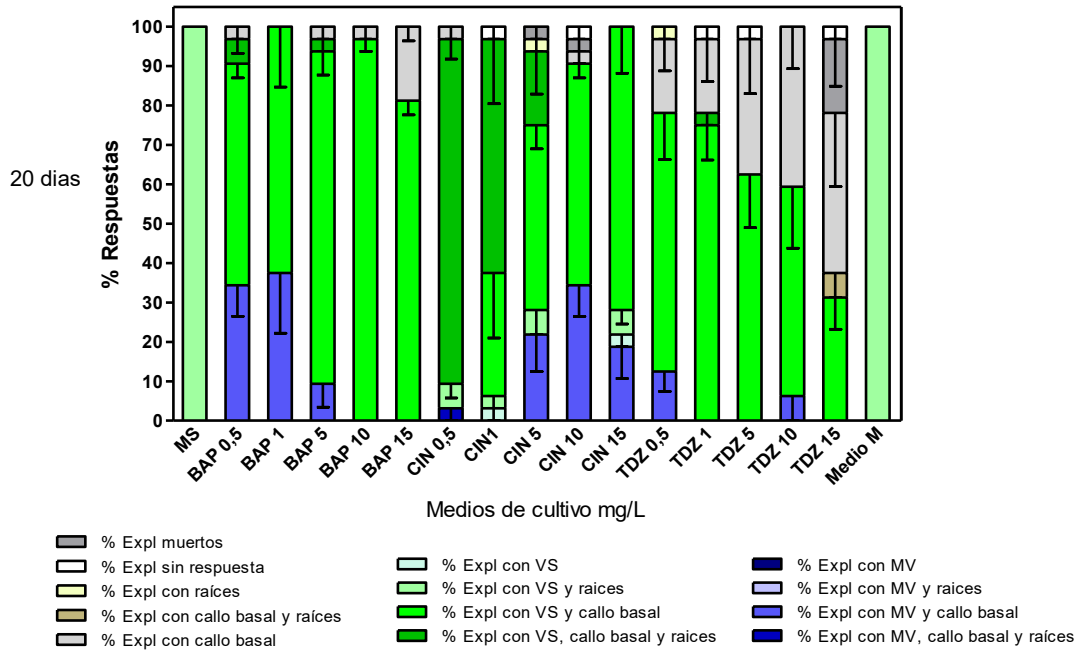


Figura 3.29: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

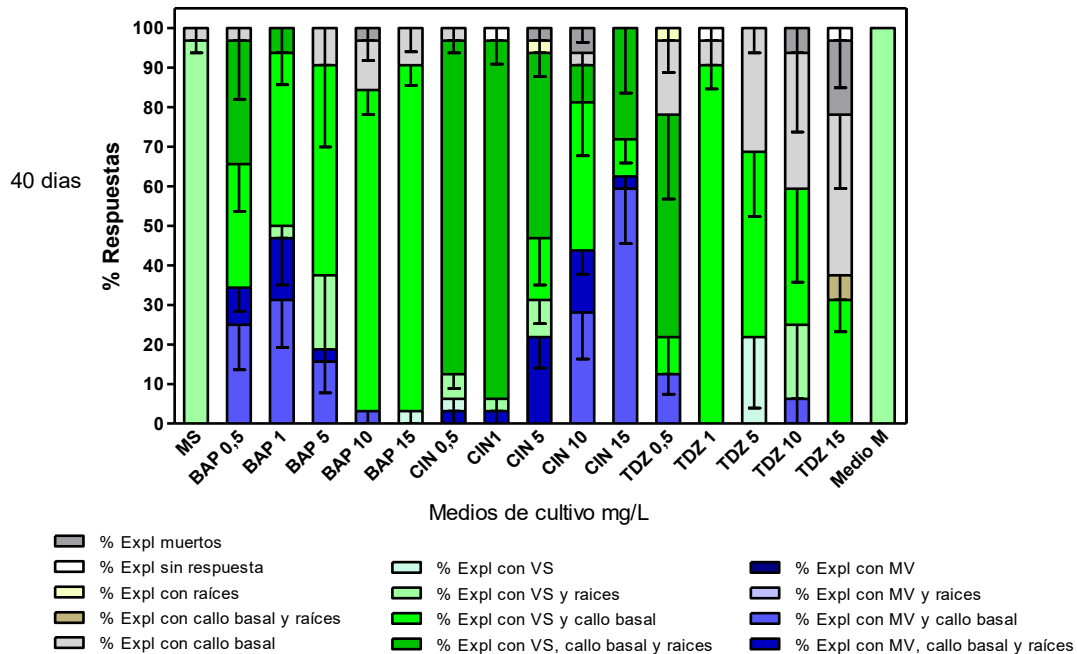


Figura 3.30: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

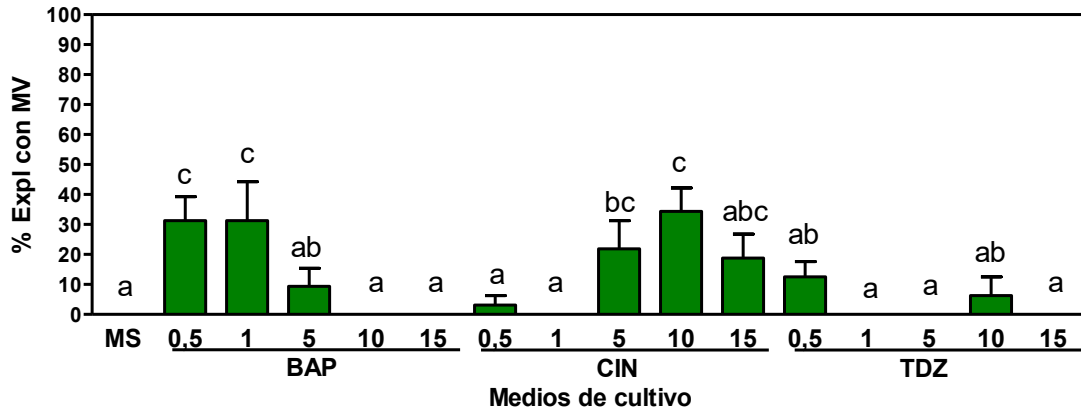
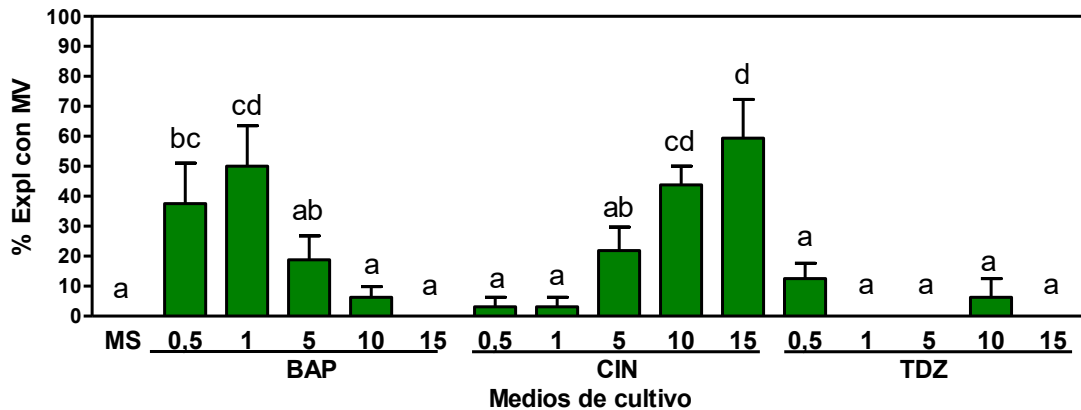


Figura 3.31: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En el cv. Amarilla, si bien hubo predominio de explantes que manifestaron una respuesta caulogénica en respuesta a las citocininas probadas, en altas concentraciones de BAP y TDZ se incrementó la proporción de explantes sólo con callos basales a los 20 días de cultivo. También se registró un aumento del porcentaje de explantes muertos a los 40 días de cultivo (Figuras 3.32 y 3.33). El empleo de CIN favoreció la regeneración de vástagos, ya sean VS ó MV, siendo notable la promoción de explantes con VS, callo basal y raíces en los medios suplementados con las dosis más bajas (Figura 3.33). En relación a la promoción de respuestas relacionadas con la proliferación de MV, se observó una inducción decreciente en relación al aumento de la concentración de BAP y de modo creciente con el aumento de la concentración de CIN (Figuras 3.34 y 3.35). A los 40 días, sólo con 10 mg/L de TDZ se registraron explantes con MV en muy bajo porcentaje (Figura 3.35). Los medios que propiciaron el mayor porcentaje de explantes con MV fueron los adicionados con 0,5 mg/L de BAP y 15 mg/L de CIN. Los vástagos derivados de MV regenerados en medio adicionado con 15 mg/L de CIN fueron los que manifestaron la máxima capacidad de enraizamiento. Los vástagos derivados de MV de medio adicionado con 10 mg/L de TDZ no fueron capaces de enraizar al ser transferidos a Medio M (Tabla 3.5).

Figura 3.32: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Amarilla' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

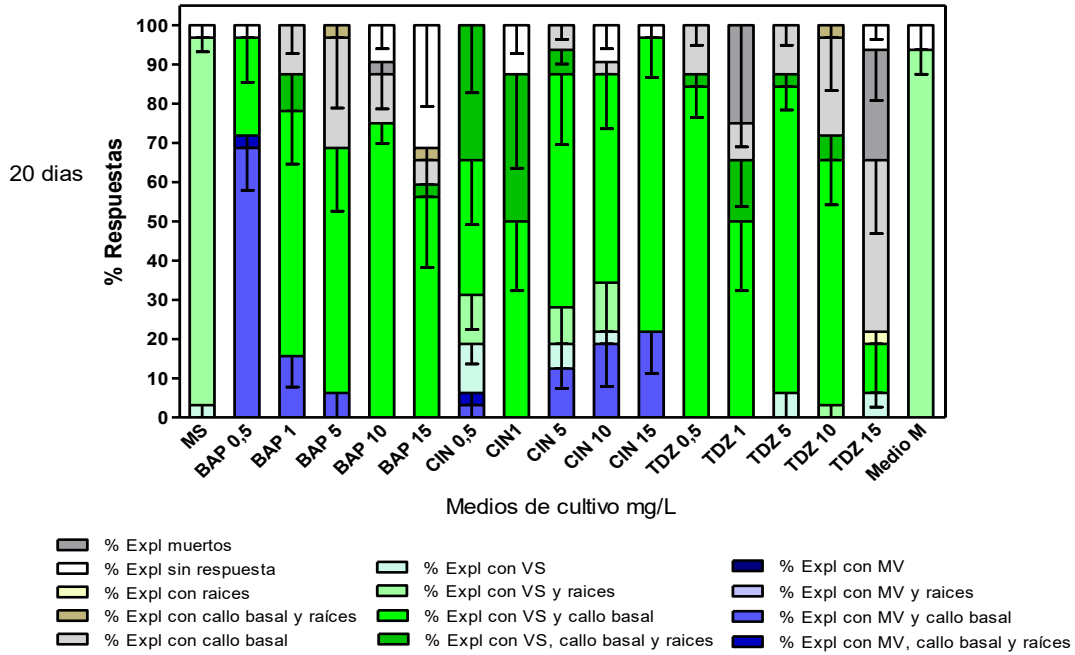


Figura 3.33: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Amarilla' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

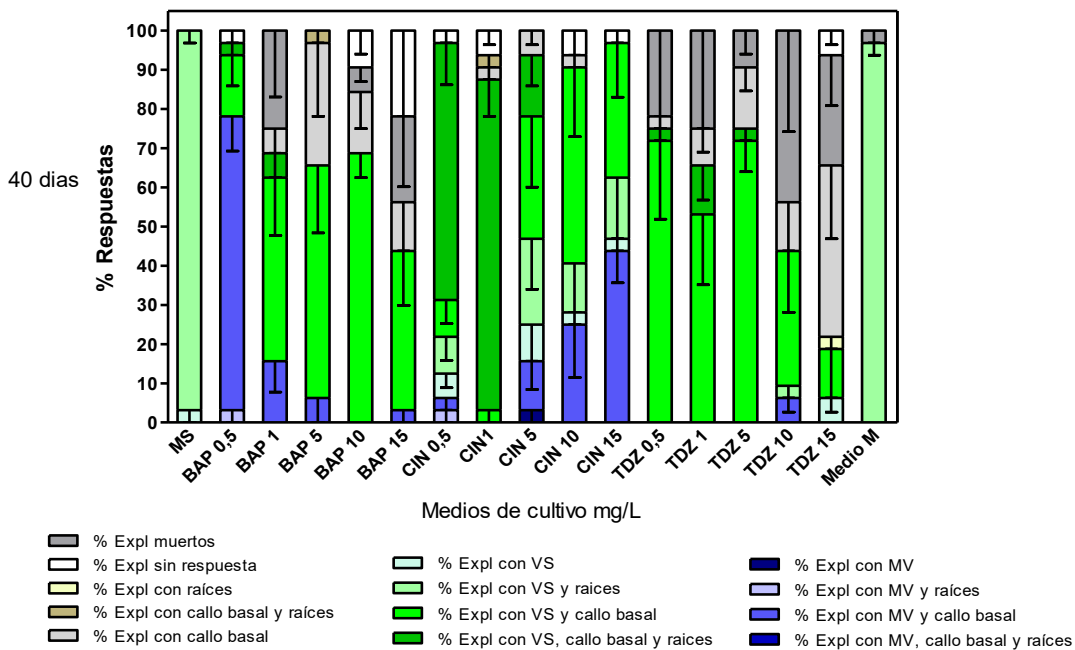


Figura 3.34: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

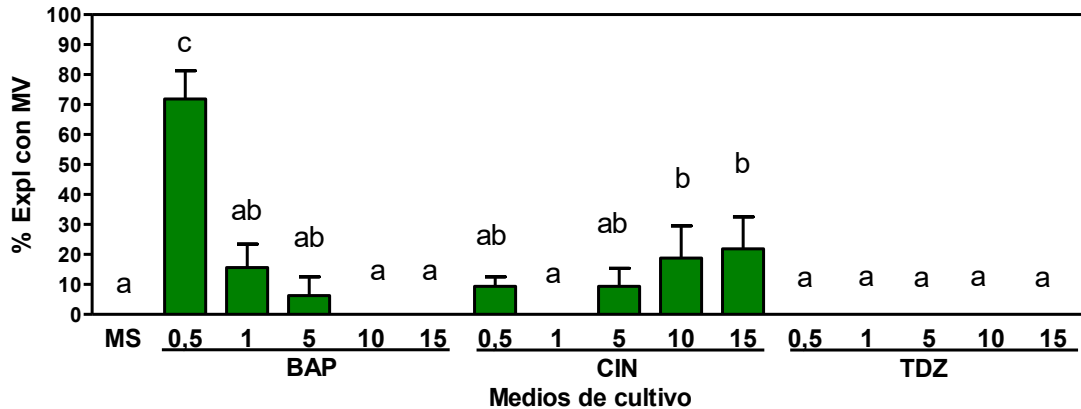
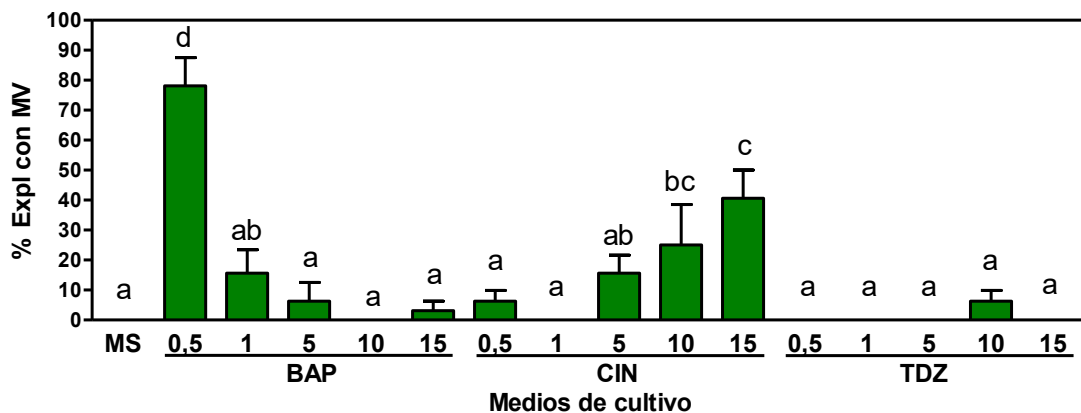


Figura 3.35: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Amarilla’ obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En el cv. Palomita, el empleo de BAP y CIN en el medio de cultivo generó una gran proporción de explantes con VS con callo basal con o sin raíces y, en determinadas concentraciones, la inducción de explantes con MV (Figuras 3.36, 3.37, 3.38 y 3.39) los cuales se presentaban con callo basal con o sin raíces (Figura 3.40). Ambas citocininas en altas concentraciones sólo produjeron explantes con callo basal a los 40 días, incluso provocaron la muerte de explantes (Figura 3.36). El uso de CIN en bajas concentraciones produjo un alto porcentaje de explantes con VS con callo basal y raíces (Figuras 3.36 y 3.37).

A mayor concentración de TDZ, aumentó la regeneración de explantes con callo basal y si bien a los 20 días se registró un considerable porcentaje de explantes con VS con callo basal hasta con 15 mg/L de TDZ, transcurrido 40 días de cultivo la proliferación masiva de callos reabsorbió los pequeños vástagos emitidos y en ese momento se manifestaban como explantes sólo con callo basal (Figura 3.37).

En el cv. Palomita, la regeneración de MV fue factible en los medios adicionados con las más bajas concentraciones de BAP (0,5 a 5 mg/L) y TDZ (0,5 y 1 mg/L) y en los medios que tenían las más altas concentraciones de CIN probadas (5 a 15 mg/L) a los 20 días de cultivo (Figura 3.38). En el caso de los explantes con MV derivados de medios con TDZ también poseían callo basal con o sin raíces (Figura 3.40) notándose en algunos casos la formación de raíces tuberosas (Figura 3.40 f). A los 40 días, se amplió el rango de concentraciones de BAP (10 y 15 mg/L) que resultaron inductoras de MV aunque en un bajo porcentaje de respuesta (Figura 3.39). El medio con 1 mg/L de BAP fue el que favoreció la mayor diferenciación de explantes con MV (Figuras 3.36, 3.37, 3.38 y 3.39).

Los vástagos derivados de MV de medios adicionados con 0,5 y 1mg/L de BAP y 0,5 mg/L de CIN fueron los que presentaron los mayores valores de enraizamiento (Tabla 3.5).

Figura 3.36: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

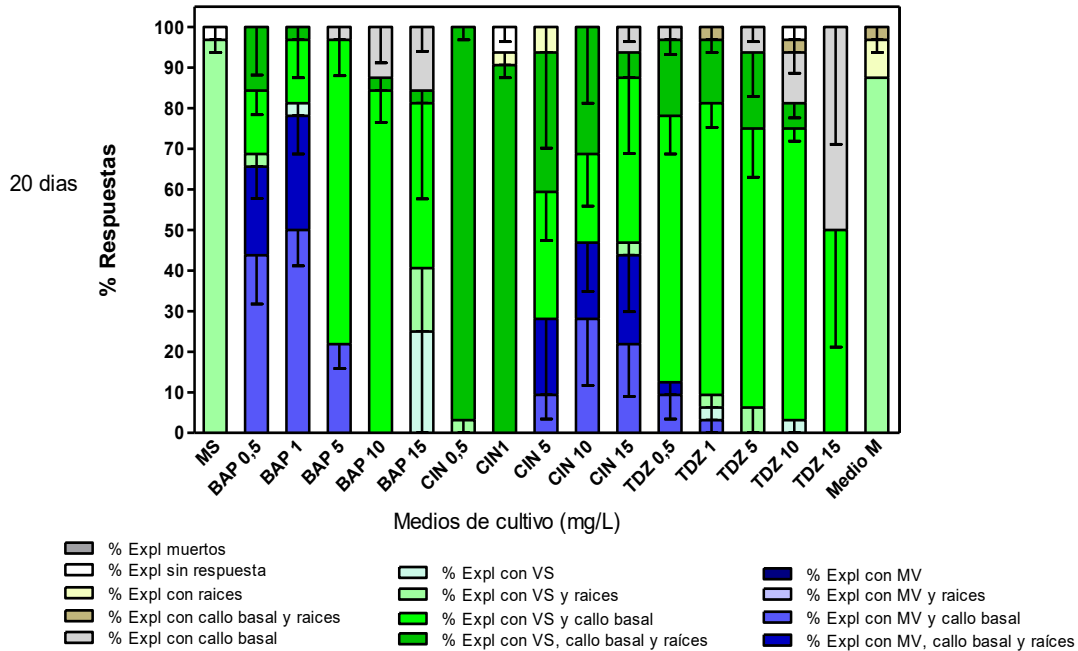


Figura 3.37: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

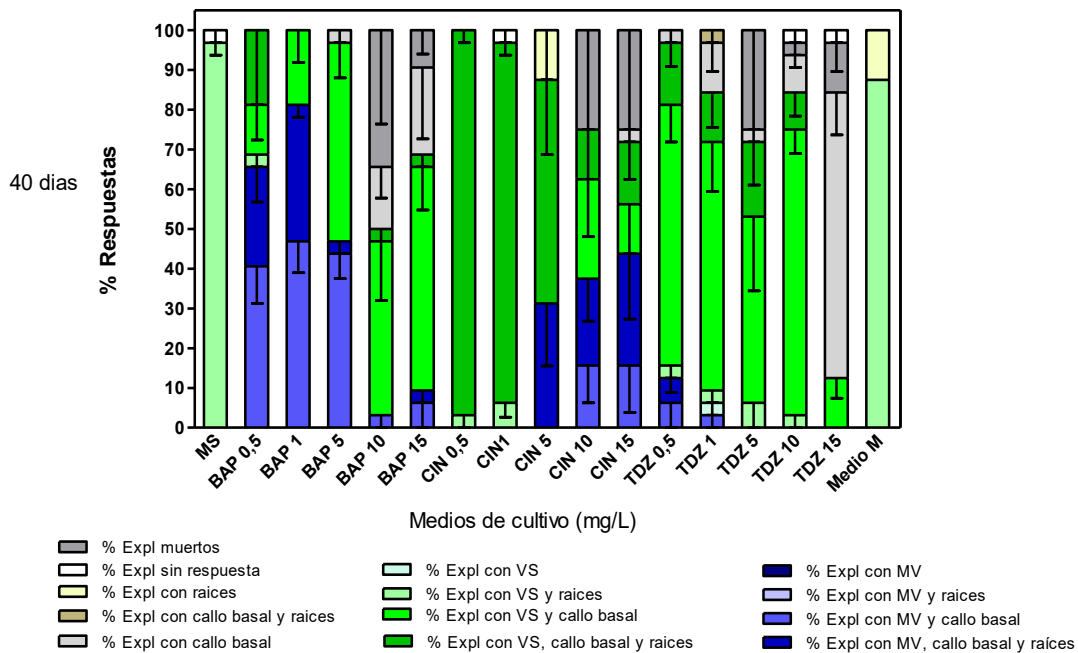


Figura 3.38: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

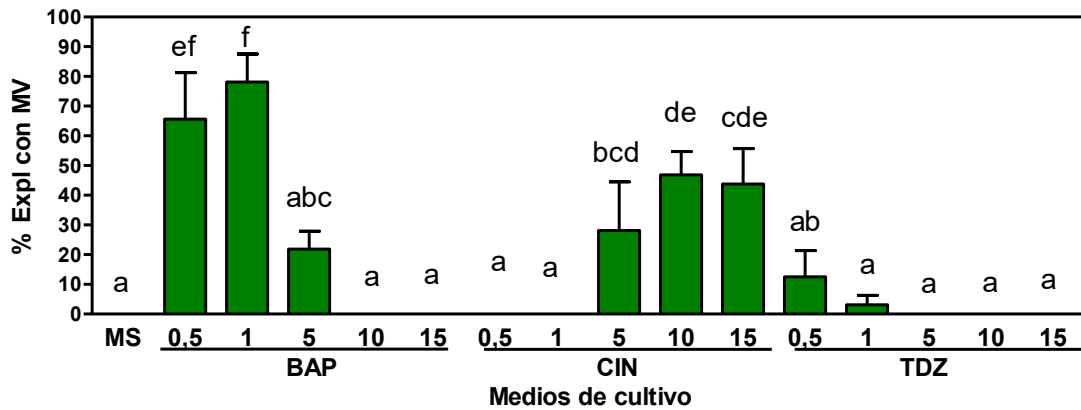
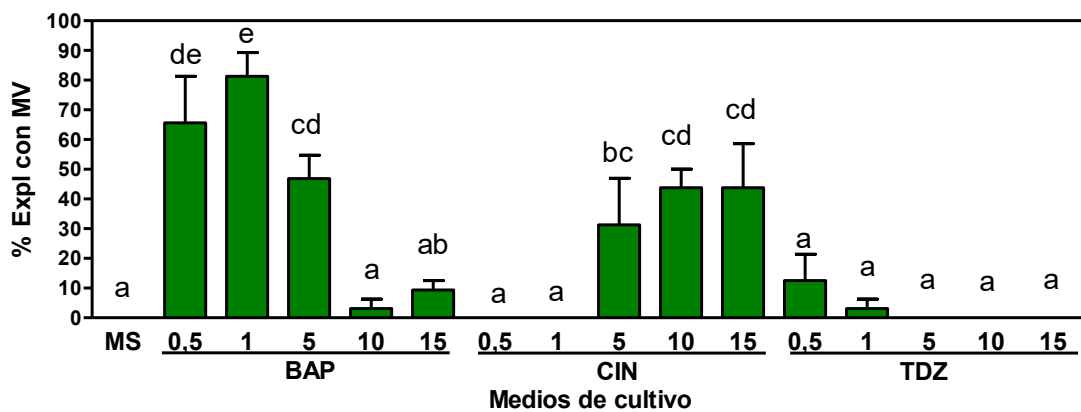
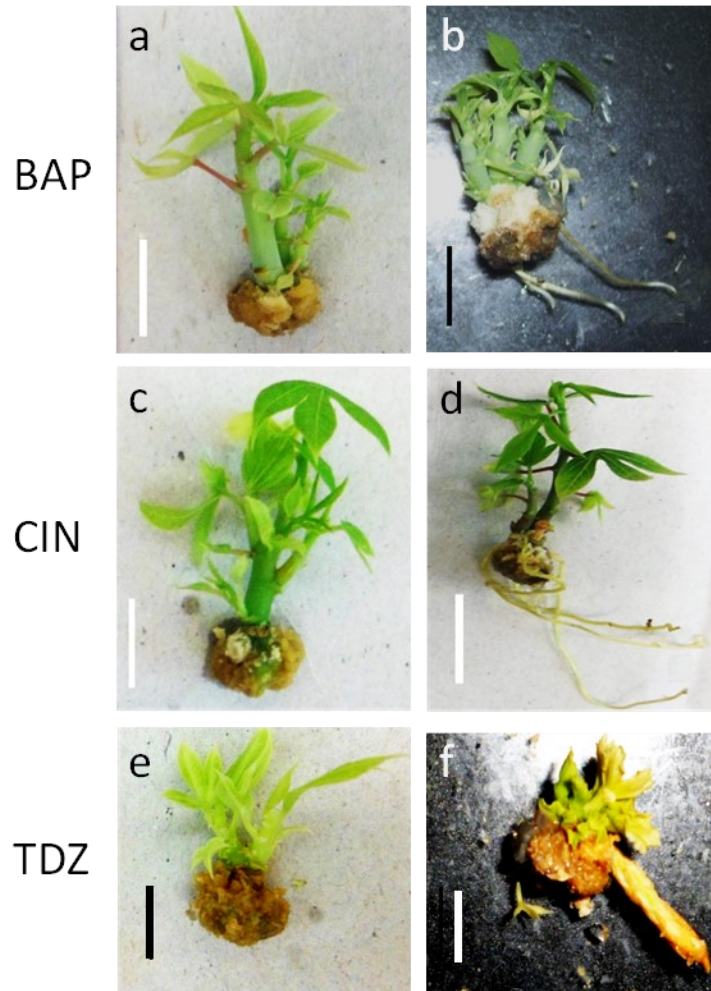


Figura 3.39: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 3.40: Regeneración *in vitro* de MV con callo basal y de MV con callo basal y raíces a partir de cultivo de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. Palomita, en medios adicionados con BAP, CIN y TDZ.



Referencias: a y b: explantes con MV con callo basal o MV con callo basal y raíces regenerados en medios con 0,5 y 1 mg/L de BAP, respectivamente; c y d: explantes con MV con callo basal o MV con callo basal y raíces regenerados en medio con 10 mg/L de CIN; e y f: explantes con MV con callo basal o MV con callo basal y raíces regenerados en medios con 0,5 mg/L de TDZ. Barras = 1 cm.

En el cv. MCol 1505, la adición de BAP y CIN propició la diferenciación de un alto porcentaje de explantes con respuestas caulogénicas es decir la emisión de VS con o sin callo basal con o sin raíces y en casi todas las concentraciones ensayadas la regeneración temprana de MV (Figura 3.41). Sin embargo, el uso del TDZ si bien indujo la producción de VS con callo basal, en altas concentraciones aparentemente inhibió la brotación y eso provocó que los explantes sólo presentaran abundantes callos a los 20 días de cultivo (Figura 3.41).

A los 40 días de cultivo, todas las concentraciones de CIN evaluadas demostraron un alto porcentaje de explantes brotados (> 80%), principalmente formando VS, sin embargo, en casi todas las concentraciones de BAP (excepto 15 mg/L) se registró la muerte de un determinado porcentaje de explantes, incluso de los que ya habían brotado, y en concentraciones crecientes de TDZ se evidenció una alta proporción de explantes con callo basal con o sin raíces (Figura 3.42).

Los medios adicionados con BAP fueron los que demostraron una mayor capacidad de inducir la proliferación de MV, destacándose la concentración de 1 mg/L (Figuras 3.43 y 3.44). La CIN fue capaz de promover la diferenciación de MV aunque en un bajo porcentaje (Figuras 3.43 y 3.44), así como lo demostró el TDZ recién a los 40 días de cultivo (Figura 3.44). En general, a los 40 días de cultivo no se registraron mayores diferencias en relación a la inducción de MV, con excepción de la evidenciada con TDZ (Figura 3.42 y 3.44). MCol 1505 fue el único cultivar que diferenció MV en el Medio M (Figuras 3.41, 3.42, 3.43 y 3.44).

Los vástagos derivados de MV de todos los medios con citocininas y del medio M presentaron capacidad rizogénica. Si bien no se evidenciaron diferencias estadísticas, los mayores valores de porcentaje de enraizamiento se registraron en los vástagos provenientes de medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP.

Figura 3.41: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' obtenidas en distintos medios a los 20 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

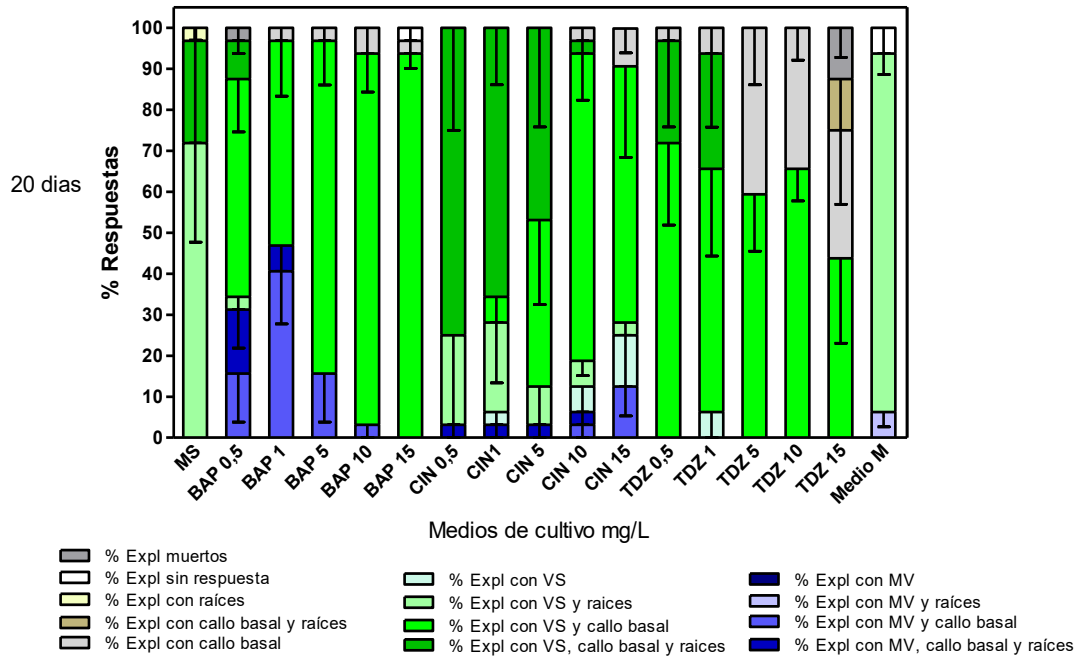


Figura 3.42: Respuestas morfológicas (en %) de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' obtenidas en distintos medios a los 40 días de cultivo. MV= múltiples vástagos; VS= vástago simple; MS según Murashige y Skoog (1962); Medio M= medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012).

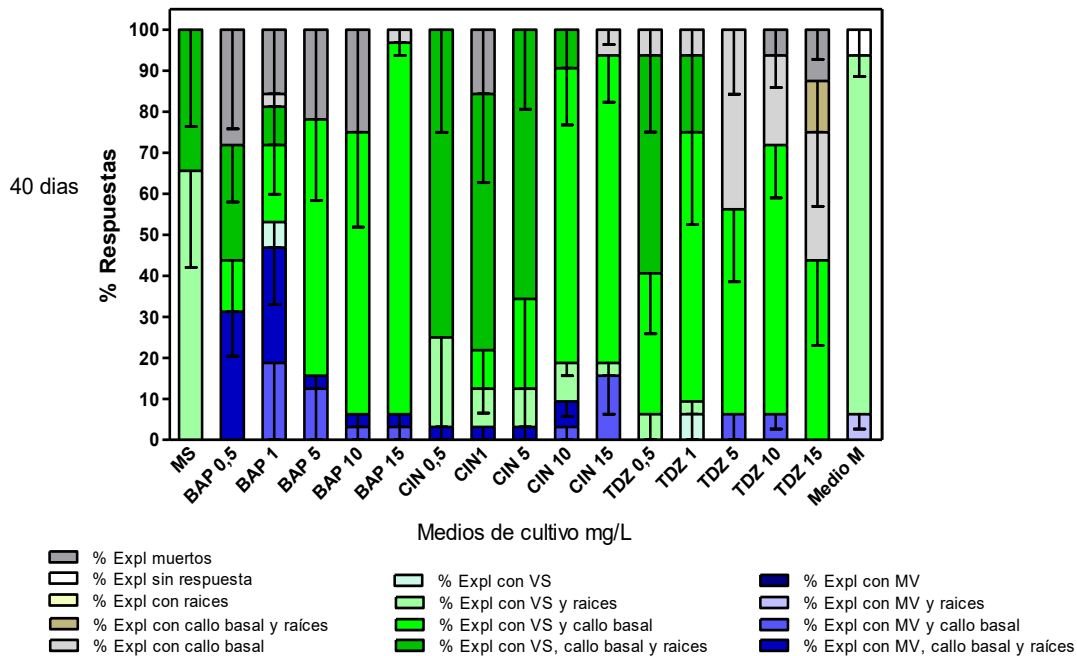


Figura 3.43: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' obtenida en distintos medios a los 20 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).

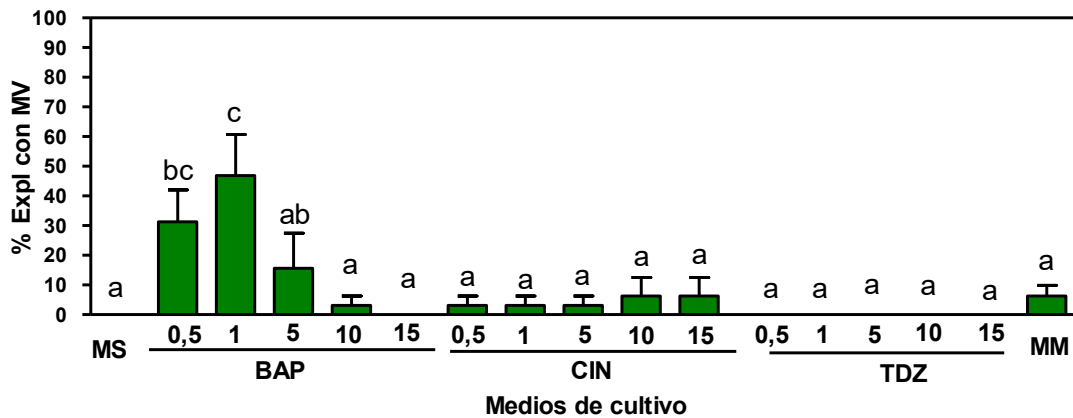
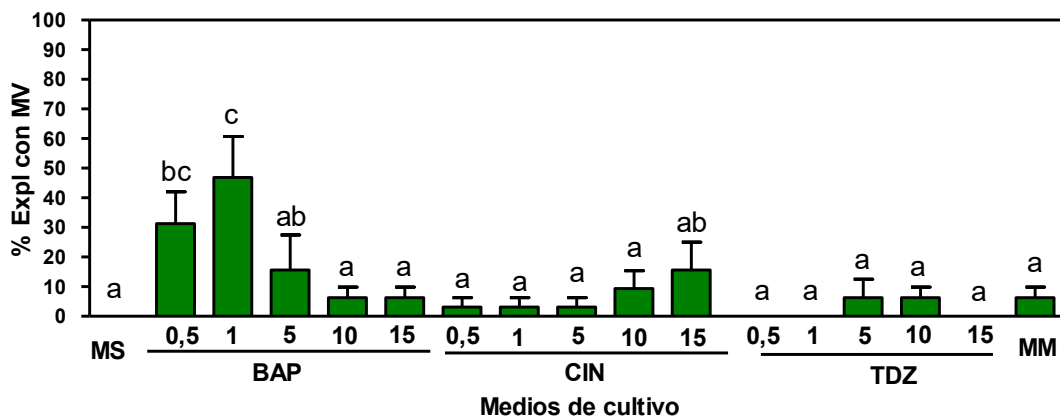


Figura 3.44: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' obtenida en distintos medios a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas); MS según Murashige y Skoog (1962).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

La diferenciación de callos en los segmentos uninodales empleados como explantes de todos los cultivares de mandioca y en todos los medios suplementados con citocininas, fue una de las respuestas morfogénicas más representativas, que ha sido informada numerosas veces en la bibliografía y relacionada con diferentes situaciones. Se ha citado regeneración de callos cuando los explantes fueron sometidos a medios adicionados con citocininas en diferentes concentraciones o su combinación con otros reguladores de crecimiento, o a diferente número de subcultivos (Pedroso de Olivera *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2007; Mapayi *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2017). Si bien no se ha analizado estadísticamente la interacción del genotipo con los medios de cultivo respecto de la producción de callos, en esta tesis se evidenciaron variaciones en su diferenciación relacionado con los diferentes cultivares, en concordancia con lo planteado por Roca (1984). Asimismo, este fenómeno de callogénesis ha sido mencionado por Smith *et al.* (1986), quienes la observaron en distintos materiales genéticos. Según Pedroso de Olivera *et al.*, (2000), el fenómeno de callogénesis es algo común que se debe a una adaptación de los explantes al medio de cultivo, y como se observa en los resultados de esta tesis, su producción en la base del explante al no estar relacionada directamente a la formación del VS o de los MV no representa un peligro de inestabilidad genética en la progenie clonal. Se han citado efectos negativos que podrían afectar el crecimiento del vástago regenerado, como ocurre cuando se produce el crecimiento exagerado de los callos (Smith *et al.*, 1986). Por ejemplo se ha informado que el aumento de la dosis de citocinina (*i.e.* BAP) en el medio de cultivo genera un aumento en la proporción de formación de callo que termina inhibiendo el crecimiento del vástago (Onuoch y Onwubiku, 2007). Si bien otros autores no hablan de inhibición, mencionan que al aumentar la concentración de BAP no se evidencia un aumento significativo en la frecuencia de organogénesis (Le *et al.*, 2007), que podría relacionarse con un efecto tóxico de dosis supraóptimas de citocininas que interfiere en la regeneración de vástagos.

Independientemente de la manifestación de callo en la base del segmento uninodal, en la presente tesis se observó que en la gran mayoría de los tratamientos fue posible regenerar vástagos, ya sean simples ó múltiples, con o

sin raíces. Mapayi *et al.*, (2013) y Medina *et al.* (2017) citaron que es factible la regeneración de plantas en medios adicionados con reguladores de crecimiento (*i.e.* citocininas combinadas o no con auxinas y giberelinas), independientemente que se formen callos o no en la base del explante. Es de destacar que en esos trabajos los medios fueron suplementados con concentraciones bajas de los reguladores de crecimiento y que su combinación guardaba un balance adecuado no generando anomalías, tales como inhibición de la rizogénesis adventicia o problemas durante el crecimiento de vástagos y/o raíces.

Las citocininas más usadas para inducción de la regeneración de vástagos comúnmente son las purinas substituidas (BAP y CIN) y algunas ureas substituidas como TDZ, que tiene actividad como citocinina y cuya propiedad principal es la de estimular la división celular (Krikorian, 1995). Al parecer, en cultivo de tejidos, las citocininas actúan acelerando la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser enzimas o proteínas estructurales necesarias para la mitosis (Salisbury y Ross, 1994).

La técnica más simple para la micropropagación de la mandioca es el cultivo de segmentos nodales de plantas regeneradas *in vitro* (Smith *et al.*, 1986; Roca *et al.*, 1991). Esta técnica permite la rápida multiplicación de plantas y la conservación *in vitro* de diferentes cultivares de mandioca (Albarrán *et al.*, 2003). Según Roca *et al.* (1991) mediante esta técnica es posible obtener de 3 a 5 nudos por mes que se convertirán en plantas a partir de cada segmento nodal. Se debe destacar que la eficiencia de la técnica varía con el genotipo, ya que algunos clones se adaptan con mayor facilidad que otros al proceso de propagación *in vitro* (Pedroso de Oliveira *et al.*, 2000; Albarrán *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2017).

Según varios autores, los requerimientos para lograr una multiplicación más rápida de clones élite se pueden satisfacer mediante la inducción de MV en medios con diferentes citocininas, a partir de ápices caulinares (Roca, 1984; Puonti-Kaerlas, 1998) o de yemas axilares (Smith *et al.*, 1986; Konan *et al.*, 1997). La adición de determinadas dosis de una citocinina al medio de cultivo sola o en combinación con bajas concentraciones de auxinas puede utilizarse para romper la dominancia apical, permitiendo de este modo, la formación de un cultivo en roseta con

proliferación de MV (Smith *et al.*, 1986; Puonti-Kaerlas, 1998). Según Roca *et al.* (1991) la obtención de MV a partir de explantes nodales permitiría producir hasta 65×10^4 estacas en 18 meses.

Una observación relacionada con la dosis de citocininas empleadas para estimular el desarrollo del vástago *in vitro* fue que el uso de bajas concentraciones (*i.e.* BAP y CIN), por lo general, promueve la formación de vástagos simples (Smith *et al.*, 1986, Abd Alla *et al.*, 2013). Según Margara (1988), las citocininas generalmente se utilizan en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos y en concentraciones más elevadas para desencadenar la neoformación de yemas sobre los callos. Esta última situación no se observó en los resultados de esta tesis, los callos no fueron morfogénicos y la yema axilar preexistente en el segmento uninodal brotó en forma directa diferenciando VS o MV, dependiendo del tipo y la concentración de la citocinina y del cultivar. Un hecho notable fue la gran capacidad de esta especie en responder positivamente a la caulogénesis directa, habiéndose sometido a los explantes a diferentes tratamientos, los que comprendieron un amplio rango de concentraciones de las diferentes citocininas evaluadas y a su vez distintos medios.

En cuanto a la regeneración de explantes con MV para los distintos medios y cultivares estudiados, se puede decir que para la mayoría de los genotipos los mejores resultados se alcanzaron empleando los medios adicionados con BAP, y para el resto de los cultivares esto se logró utilizando medios adicionados con BAP y CIN indistintamente. Es así, que para los cvs. Ramada Paso, Surubim-41, Santa Catarina, Amarilla, Palomita y MCol 1505 se consiguieron los mayores porcentajes de explantes con MV con distintas concentraciones de BAP, a predominio de 0,5-1 mg/L. En cambio, para el cv. MPar 75, Catiguá, IAC 12829 y Rocha los mayores porcentajes de regeneración de MV se evidenciaron ya sea con BAP (0,5, 1 y 5 mg/L) o con CIN (5, 10 y 15 mg/L). En el 100 % de los cultivares, los explantes respondieron diferenciando MV en los medios con 0,5 y 1 mg/L de BAP y 5 y 10 mg/L de CIN. Asimismo, se puede decir que con altas dosis de BAP (10 y 15 mg/L), la inducción de MV fue muy baja para la mayoría de los cultivares, con excepción de los cultivares IAC 12829 y Surubim-41; lo mismo se puede indicar

que ocurrió con bajas dosis de CIN (0,5 y 1 mg/L) en donde los porcentajes de explantes con MV obtenidos fueron también muy bajos. Considerando todos los medios adicionados con TDZ, los valores de regeneración de MV fueron muy inferiores a las demás citocininas empleadas, no superando el 20% en promedio.

Considerando los reguladores de crecimiento evaluados, BAP y CIN se destacaron en cuanto a su capacidad para inducir la regeneración de explantes con MV con respecto al TDZ. En numerosas especies se ha observado que el TDZ exhibe una fuerte actividad promotora de la morfogénesis *in vitro* produciendo la ruptura de la dormancia de yemas axilares o la ruptura de la dominancia apical y la promoción de la formación de yemas o MV (Faisal *et al.*, 2005; Husain *et al.*, 2007; Ahmad y Anis, 2007; Ahmad y Anis, 2012) incluso en mandioca (Konan *et al.*, 1997), sin embargo en esta tesis se ha evidenciado un desempeño ineficaz del mismo con respecto a las citocininas derivadas de purinas sustituidas, a pesar de haberse probado dosis similares a las empleadas en los trabajos citados.

Varios autores investigando la posibilidad de optimizar la multiplicación de cultivares diferentes de mandioca han arribado a que es posible lograr una mayor eficiencia en la propagación empleando BAP como agente inductor (Konan *et al.*, 1997; Faye *et al.*, 2015). Según estos autores, el desempeño del BAP, CIN y TDZ resultan similares en términos de porcentaje de explantes con MV, sin embargo, tanto CIN como TDZ resultan menos efectivos en producir mayor cantidad de vástagos por explante, incluso este último provoca la diferenciación de vástagos hiperhídricos condición que los inhabilita para su utilización en un programa de multiplicación masiva.

Por otra parte, Konan *et al.* (1997) determinaron que aumenta la producción de vástagos por explante cuando los explantes cultivados en medio con 10 mg/L de BAP son transferidos luego de 4-6 días de inducción a otro medio adicionado con 5 mg/L de BAP por 40 a 50 días, es decir se contempla un subcultivo a medio fresco y exponiendo al explante por mayor tiempo a un medio inductivo. Estos resultados advierten que sería importante evaluar el tiempo de inducción o de exposición del explante a un determinado regulador de crecimiento para lograr una mayor eficacia en la multiplicación *in vitro*.

Otra variable evaluada, la cual está relacionada con la capacidad de multiplicación de los explantes, fue el número de nudos producidos por explante. Los datos registrados de número de nudos por explante fueron contabilizados, a los 20 y 40 días de cultivo, discriminando el tipo de vástago formado (VS ó MV) (Tablas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

A los 20 días de cultivo, considerando los promedios obtenidos por cultivar, el 50% de estos produjo la misma cantidad de nudos por explante, independientemente del tipo de vástago regenerado. El otro 50% fue capaz de duplicar la cantidad de nudos por explante cuando regeneraron MV respecto de cuando formaron VS. En todos los medios evaluados, fue factible la regeneración de VS y por lo tanto hubo producción de nudos por explante en todos los casos, sin embargo, la posibilidad de diferenciar MV aunque sea en un determinado porcentaje y en algunos medios de cultivo esto siempre mejoró la cantidad de nudos por explante (Tablas 3.1 y 3.2) En general, el mayor número de nudos promedio por VS se observó empleando el Medio M (Cavallero *et al.*, 2012), seguido de medios adicionados con BAP y CIN. Los menores valores de número de nudos por VS se presentaron en medios suplementados con TDZ (Tabla 3.1) Los mayores valores de número de nudos promedio por MV se obtuvieron en diferentes medios (> 5), sin delinear un patrón definido (Tabla 3.2).

A los 40 días de cultivo, teniendo en cuenta los valores promedio por cultivar, el 100% de los cultivares al menos duplicó el número de nudos por explante cuando se compararon los MV respecto de los VS (Tabla 3.3 y 3.4). La producción de nudos por explante derivados de MV en medios adicionados con citocininas fue siempre mayor (entre 5-11,1) que la diferenciada por los VS (entre 1,8-4,6), si se compararan los promedios obtenidos por medio de cultivo (Tabla 3.4). La cantidad de nudos por explante con MV producida por el cv. IAC 12829 en MS y el cv. MCol 1505 en Medio M fue de 4, comparable con lo registrado en VS (Tabla 3.4).

El número de nudos promedio por explante por medio en VS regenerados sólo con citocininas no supera de 4,8 a los 40 días de cultivo; sin embargo, en explantes con MV este número parte de 5 y llega hasta un valor de 11,1 (Tabla 3.3 y 3.4).

Curiosamente, el mayor valor de número de nudos promedio por explante tanto para VS como para MV se contabilizó en el cv. Surubim-41 a los 20 y 40 días de cultivo y el menor valor en el cv. Amarilla a los 40 días de cultivo (Tabla 3.3 y 3.4). Los mayores valores de número de nudos promedio por MV se registraron en los medios adicionados con 0,5-1 mg/L de BAP y 5-15 mg/L de CIN (Tabla 3.4).

Algunos autores han sugerido la combinación de BAP y ANA para acelerar la multiplicación de mandioca vía promoción de MV (Smith *et al.*, 1986; Abd Alla *et al.*, 2013). Demeke *et al.* (2014), observaron un aumento significativo en cuanto a número de vástagos, hojas y nudos, y peso de vástagos, adicionando al medio inductivo dos citocininas (BAP y CIN) en iguales concentraciones (0,75 mg/L). Los resultados de esta tesis demostraron que la adición de una sola citocinina al medio rompe la dominancia apical de las yemas axilares y permite la formación de MV, particularmente, cuando se utiliza BAP o CIN en determinadas concentraciones. Konan *et al.* (1995), adicionando 0,1 a 20 mg/L de BAP, evidenciaron la promoción de explantes con MV (entre 15-55 %) sólo en los medios que contenían menos de 5 mg/L de BAP y una inhibición de la formación de MV a partir de 10 mg/L.

Por otra parte, Smith *et al.* (1986) y Faye *et al.* (2015) informaron que el BAP permite diferenciar mayor cantidad de vástagos y hojas y, por extensión, un mayor número de nudos por explante, aunque los últimos revalorizaron la acción de la CIN como citocinina que favorece la elongación de vástagos y raíces, además del normal desarrollo del canopeo. En la Figura 3.39 se puede evidenciar la apariencia de los vástagos o plantas formadas en medios diferentes y se destaca el buen aspecto de las derivadas de medios con CIN. Si bien se rescatan las virtudes de cada citocinina, es de recordar que las plantas regeneradas serán donadoras de explantes y que cuando la citocinina logre estimular más la formación de nudos serán mejores en relación a la multiplicación. Es decir que en la etapa de inducción hay que priorizar la mayor producción de número de nudos por explante, ya que recién en la próxima etapa los mismos se convertirán en plantas y su calidad se verá asegurada cultivándolos en el medio de multiplicación (Figura 3.45) (Cavallero *et al.*, 2012) objetivo no buscado en la inducción.

Tabla 3.1: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios a los 20 días del cultivo.

| Medio \ Cultivar | Ramada paso | Mpar 75 | Catigua | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | Mcol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|-------------|---------|---------|-----------|------------|----------------|---------|----------|----------|-----------|-----------------------------|
| MS | 3,8±0,3 ** | 3,4±0,2 | 3,6±0,2 | 3,1±0,3 | 3,2±0,1 | 3,8±0,3 | 3,6±0,1 | 3,6±0,2 | 3,6±0,2 | 3,5±0,3 | 3,5±0,1 |
| BAP* 0,5 | 3,9±0,4 | 3,7±0,2 | 3,9±0,2 | 3,6±0,3 | 3,7±0,5 | 4,1±0,3 | 3,6±0,1 | 3,4±0,4 | 4,5±0,1 | 4,3±0,1 | 3,9±0,1 |
| BAP 1 | 3,8±0,5 | 3,3±0,3 | 3,5±0,2 | 3,2±0,9 | 2,7±0,7 | 3,7±0,2 | 3,3±0,1 | 3,1±0,2 | 4,3±0,3 | 4,7±0,3 | 3,6±0,2 |
| BAP 5 | 2,2±0,4 | 2,0±0,3 | 2,5±0,3 | 3,3±0,6 | 2,9±0,2 | 2,4±0,1 | 3,1±0,2 | 1,9±0,4 | 3,4±0,2 | 3,1±0,3 | 2,7±0,2 |
| BAP 10 | 2,1±0,3 | 2,0±0,2 | 2,2±0,4 | 2,4±0,2 | 3,3±0,2 | 2,1±0,1 | 2,5±0,2 | 2,4±0,2 | 2,7±0,1 | 2,2±0,2 | 2,4±0,1 |
| BAP 15 | 1,9±0,3 | 2,3±0,2 | 1,9±0,3 | 2,5±0,4 | 2,5±0,2 | 2,0±0,1 | 2,0±0,3 | 2,1±0,4 | 2,4±0,2 | 2,6±0,3 | 2,2±0,1 |
| CIN 0,5 | 3,8±0,2 | 3,8±0,3 | 3,6±0,3 | 3,5±0,3 | 3,5±0,3 | 4,1±0,4 | 3,6±0,1 | 3,4±0,3 | 3,8±0,1 | 3,6±0,3 | 3,6±0,1 |
| CIN 1 | 3,7±0,3 | 3,7±0,2 | 3,6±0,2 | 3,7±0,2 | 3,6±0,2 | 4,1±0,2 | 3,8±0,2 | 3,7±0,2 | 3,7±0,1 | 3,2±0,3 | 3,6±0,1 |
| CIN 5 | 3,8±0,3 | 3,8±0,3 | 2,9±0,2 | 3,4±0,4 | 3,7±0,4 | 3,4±0,3 | 3,9±0,3 | 3,4±0,6 | 4,7±0,3 | 3,3±0,2 | 3,6±0,1 |
| CIN 10 | 3,4±0,3 | 3,1±0,5 | 3,1±0,3 | 3,4±0,1 | 3,7±0,4 | 3,1±0,2 | 3,7±0,2 | 3,5±0,6 | 4,2±0,3 | 2,9±0,2 | 3,5±0,1 |
| CIN 15 | 2,4±0,4 | 3,3±0,4 | 2,4±0,3 | 3,2±0,4 | 3,2±0,4 | 3,0±0,3 | 3,7±0,2 | 2,7±0,3 | 4,0±0,4 | 3,0±0,3 | 3,1±0,1 |
| TDZ 0,5 | 2,1±0,3 | 1,6±0,2 | 1,9±0,9 | 2,0±0,4 | 2,5±0,3 | 3,7±0,1 | 2,2±0,1 | 2,2±0,2 | 3,2±0,3 | 2,4±0,2 | 2,4±0,2 |
| TDZ 1 | 1,9±0,3 | 1,4±0,3 | 1,5±0,1 | 1,7±0,3 | 1,8±0,3 | 2,1±0,3 | 2,4±0,2 | 2,2±0,6 | 2,6±0,2 | 2,4±0,4 | 2,0±0,1 |
| TDZ 5 | 1,4±0,2 | 1,8±0,1 | 1,2±0,2 | 1,7±0,1 | 1,6±0,2 | 1,6±0,3 | 1,9±0,1 | 2,0±0,3 | 2,3±0,3 | 2,3±0,5 | 1,8±0,1 |
| TDZ 10 | 1,5±0,2 | 1,8±0,4 | 1,2±0,2 | 1,4±0,2 | 1,7±0,3 | 2,0±0 | 2,3±0,6 | 1,6±0,3 | 2,0±0,2 | 2,0±0,3 | 1,8±0,1 |
| TDZ 15 | 1,7±0,3 | 1,9±0,1 | 1,7±0,1 | 1,9±0,1 | 1,9±0,1 | 1,7±0,1 | 1,9±0,1 | 1,7±0,3 | 1,9±0,1 | 1,9±0,1 | 1,8±0,0 |
| Medio M | 3,9±0,1 | 4,4±0,1 | 4,0±0,1 | 3,9±0,0 | 3,9±0,1 | 4,9±0,1 | 4,1±0,2 | 4,7±0,2 | 3,6±0,0 | 4,4±0,1 | 4,2±0,1 |
| Promedio por cultivar | 2,8±0,2 | 2,8±0,2 | 2,6±0,2 | 2,8±0,2 | 2,9±0,1 | 3,3±0,2 | 3±0,1 | 2,8±0,2 | 3,0±0,2 | 3,1±0,2 | - |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan las medias aritméticas y sus errores estándar.

*** Medio M según Cavallero *et al.* (2012).

Tabla 3.2: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios a los 20 días del cultivo.

| Medio \ Cultivar | Ramada paso | Mpar 75 | Catigua | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | Mcol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|-------------|---------|---------|-----------|------------|----------------|---------|----------|----------|-----------|-----------------------------|
| MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| BAP* 0,5 | 6,5±0,2 ** | 6,4±1,3 | 7,2±1,5 | 7,1±0,3 | 8,0±1,3 | 3,9±0,1 | 2,9±0,1 | 3,0±0,1 | 3,6±0,1 | 3,5±0,1 | 5,2 |
| BAP 1 | 7,7±0,4 | - | 5,1±0,7 | 5,6±1,6 | 8,2±1,1 | 3,7±0,2 | 3,0±0,1 | 2,8±0,1 | 3,2±0,1 | 3,9±4,2 | 4,8 |
| BAP 5 | - | - | 6,0±0,2 | 5,9±0,9 | 7,6±0,8 | 3,6±0,1 | 2,9±0,1 | 2,5±0 | 3,0±0,2 | 3,6±0,1 | 4,5 |
| BAP 10 | - | - | - | 5,5±0 | 6,0±0,2 | - | - | - | - | 2,0±0 | 4,5 |
| BAP 15 | - | - | - | 5,0±0 | 6,6±0,6 | - | - | - | - | - | 5,3 |
| CIN 0,5 | - | - | - | 3,0±0 | - | - | 3,5±0 | 3,2±0,2 | - | 3,5±0 | 3,3 |
| CIN 1 | - | - | - | - | 4,0±0 | 3,0±0 | - | - | - | 2,5±0 | 3,1 |
| CIN 5 | 7,2±1,2 | 7,8±1,2 | 6,3±1,1 | 6,2±0,7 | 6,5±0,6 | 3,7±0,0 | 3,3±0,2 | 3,4±0,6 | 3,2±0,6 | 2,3±0 | 5 |
| CIN 10 | - | 9,9±3,0 | 5,6±0,4 | 7,8±1,6 | 7,2±1,6 | 3,0±0 | 3,7±0,3 | 2,9±0,6 | 3,0±0,2 | 3,5±0 | 5,2 |
| CIN 15 | - | 4,7±1,3 | 7,2±1,7 | 7,9±0,8 | 8,5±0,8 | 3,5±0 | 3,5±0,2 | 2,8±0,4 | 3,1±0,3 | 3,5±0,1 | 5 |
| TDZ 0,5 | 6,0±0 | - | 4,0±0 | 6,0±0 | 6,0±0 | - | 3,2±0,2 | - | 2,8±0,7 | - | 4,6 |
| TDZ 1 | 5,0±0 | - | 6,0±0,2 | 5,5±1,5 | 6,0±0 | - | - | - | 2,5±0 | - | 4,7 |
| TDZ 5 | - | 4,0±0 | - | - | 6,0±0 | - | - | - | - | - | 5 |
| TDZ 10 | - | - | - | - | - | - | 3,2±0 | - | - | - | 3,2 |
| TDZ 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Medio M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Promedio por cultivar | 6,5 | 6,5 | 5,9 | 5,9 | 6,6 | 3 | 3,2 | 2,9 | 3,1 | 3,5 | - |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan las medias aritméticas y sus errores estándar.

*** Medio M según Cavallero *et al.* (2012).

Tabla 3.3: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios a los 40 días del cultivo.

| Medio \ Cultivar | Ramada paso | Mpar 75 | Catigua | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | Mcol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|-------------|---------|---------|-----------|------------|----------------|---------|----------|----------|-----------|-----------------------------|
| MS | 5,2±0,2 ** | 4,8±0,4 | 4,5±0,5 | 4,0±0,2 | 4,6±0,1 | 5,1±0,4 | 4,8±0,1 | 4,7±0,1 | 5,1±0,1 | 4,2±0,1 | 4,7±0,1 |
| BAP* 0,5 | 5,0±0,9 | 5,5±0,3 | 5,2±0,4 | 4,3±0,3 | 4,7±0,3 | 5,4±0,2 | 5,1±0,1 | 2,8±0,9 | 4,2±1,4 | 3,6±1,2 | 4,6±0,2 |
| BAP 1 | 5,6±1,1 | 4,7±0,3 | 4,9±0,4 | 4,5±0,6 | 3,3±0,3 | 4,8±0,3 | 4,1±0,2 | 3,7±0,3 | 4,1±1,3 | 5,2±0,4 | 4,5±0,2 |
| BAP 5 | 4,4±0,7 | 3,3±0,4 | 3,9±0,4 | 4,6±0,3 | 4,8±0,4 | 3,8±0,3 | 4,1±0,3 | 2,3±0,3 | 3,8±0,3 | 3,5±0,2 | 3,8±0,2 |
| BAP 10 | 2,9±0,3 | 2,6±0,5 | 2,9±0,5 | 3,8±0,1 | 2,7±1,1 | 2,1±0,8 | 2,7±0,3 | 2,6±0,2 | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | 2,7±0,1 |
| BAP 15 | 3,0±0,2 | 3,0±0,5 | 2,7±0,2 | 3,2±0,2 | 4,1±0,4 | 1,5±0,5 | 2,2±0,2 | 2,4±0,5 | 2,5±0,4 | 3,0±0,4 | 2,8±0,2 |
| CIN 0,5 | 5,0±0,2 | 4,9±0,1 | 5,2±0,2 | 4,3±0,1 | 5,4±0,2 | 5,0±0,5 | 4,8±0,1 | 4,0±0,3 | 4,8±0,0 | 4,6±0,1 | 4,8±0,1 |
| CIN 1 | 4,8±0,3 | 4,6±0,2 | 4,8±0,1 | 4,8±0,2 | 4,6±0,3 | 5,3±0,1 | 5,2±0,2 | 5,0±0,1 | 4,8±0,3 | 4,4±0,4 | 4,8±0,1 |
| CIN 5 | 5,3±0,4 | 4,9±0,4 | 4,8±0,4 | 4,5±0,3 | 5,1±0,5 | 4,4±0,3 | 5,2±0,6 | 4,3±0,3 | 5,6±0,3 | 4,5±0,2 | 4,8±0,1 |
| CIN 10 | 4,7±0,3 | 4,2±0,3 | 4,0±0,5 | 4,2±0,6 | 4,8±0,1 | 4,2±0,2 | 4,7±0,3 | 4,0±0,2 | 3,5±1,2 | 3,5±0,2 | 4,2±0,1 |
| CIN 15 | 4,0±0,2 | 4,1±0,8 | 4,1±0,1 | 5,0±0,7 | 4,7±0,3 | 2,5±0,9 | 4,2±0,4 | 3,6±0,4 | 3,1±1,1 | 3,8±0,2 | 3,9±0,2 |
| TDZ 0,5 | 3,9±0,3 | 2,5±0,2 | 2,5±1,0 | 4,1±0,2 | 4,3±0,3 | 4,4±0,4 | 3,2±0,3 | 3,3±0,3 | 4,3±0,1 | 3,6±0,3 | 3,5±0,2 |
| TDZ 1 | 3,4±0,2 | 2,5±0,3 | 1,7±0,3 | 3,4±0,2 | 3,2±0,3 | 3,2±0,5 | 2,5±0,3 | 2,1±0,8 | 2,9±0,5 | 3,5±0,4 | 2,8±0,1 |
| TDZ 5 | 2,1±0,4 | 1,4±0,5 | 1,8±0,4 | 2,2±0,1 | 2,1±0,4 | 1,0±0,6 | 2,1±0,1 | 2,1±0,3 | 2,0±0,8 | 2,6±0,8 | 1,9±0,1 |
| TDZ 10 | 2,0±0,3 | 2,5±0,5 | 1,6±0,3 | 2,8±0,2 | 2,0±0,3 | 1,0±0,6 | 2,2±0,3 | 1,3±0,5 | 2,1±0,2 | 2,9±0,5 | 2,0±0,1 |
| TDZ 15 | 1,7±0,3 | 1,9±0,1 | 1,7±0,1 | 1,9±0,1 | 1,9±0,1 | 1,7±0,1 | 1,9±0,1 | 1,7±0,3 | 1,9±0,1 | 1,9±0,1 | 1,8±0,0 |
| Medio M | 5,7±0,0 | 5,6±0,1 | 5,3±0,2 | 6,6±0,1 | 4,7±0,2 | 5,0±0,1 | 4,1±0,2 | 5,5±0,2 | 4,4±0,2 | 4,5±0,2 | 5,1±0 |
| Promedio por cultivar | 3,9±0,3 | 3,7±0,3 | 3,6±0,3 | 3,9±0,2 | 4,0±0,2 | 3,6±0,2 | 3,7±0,2 | 3,2±0,2 | 3,6±0,2 | 3,5±0,3 | - |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan las medias aritméticas y sus errores estándar.

*** Medio M según Cavallero *et al.* (2012).

Tabla 3.4: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios a los 40 días del cultivo.

| Medio \ Cultivar | Ramada paso | Mpar 75 | Catigua | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | Mcol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|-------------|----------|----------|-----------|------------|----------------|----------|----------|----------|-----------|-----------------------------|
| MS | - | - | - | 4,0±0 | - | - | - | - | - | - | 4 |
| BAP* 0,5 | 8,3±0,6 ** | 9,9±0,9 | 10,0±0,7 | 9,0±0,4 | 8,8±0,7 | 8±1,1 | 9,7±0,2 | 10,0±0,7 | 9,0±0,7 | 9,9±1,1 | 9,3 |
| BAP 1 | 10,1±0,8 | 9,0±0 | 8,5±0,3 | 7,4±1,7 | 11,1±0,9 | 11±1,2 | 6,7±2,3 | 9,6±2,7 | 8,2±0,7 | 10,2±0,8 | 9,2 |
| BAP 5 | 4,0±0 | - | 9,6±1,7 | 9,6±0,9 | 10,8±0,4 | 4±0 | 6,5±2,2 | 6,5±0 | 9,4±0,9 | 14,5±0 | 8,3 |
| BAP 10 | 7,0±0 | 7,0±2 | 13,0±0 | 10,4±1,7 | 10,7±0,0 | - | 3,5±3,5 | - | 7±0 | 7,0±0 | 8,2 |
| BAP 15 | - | 7,5±2,0 | 7,0±0 | 9,2±0,9 | 10,7±0,5 | - | - | 6,0±0 | 5,0±1 | 5,5±1,5 | 7,3 |
| CIN 0,5 | - | - | - | 5,0±0 | - | - | 8,0±0 | 6,0±0 | - | 8,0±0 | 6,8 |
| CIN 1 | - | - | - | - | 8,5±0 | - | 8,0±1 | - | - | 8,0±0 | 8,2 |
| CIN 5 | 10,0±1,4 | 8,0±0,6 | 9,2±9,4 | 8,6±0,2 | 9,2±1,6 | 10±1 | 8,7±3,0 | 10,0±1,7 | 6,6±2,4 | 10,0±0 | 9 |
| CIN 10 | 10,0±0 | 13,3±1,1 | 11,5±1,5 | 11,9±0,7 | 11,4±0,2 | 10±0 | 12,5±1,1 | 12,2±1,2 | 7,7±1,8 | 10,7±0,7 | 11,1 |
| CIN 15 | - | 11,4±1,5 | 12,7±1,1 | 11,2±1,0 | 9,5±0,9 | 8,5±0,5 | 11,3±1,4 | 10,7±1,4 | 8,7±0,4 | 7,8±0,1 | 10,2 |
| TDZ 0,5 | - | - | 4,0±0 | 3,0±0 | - | 6±0 | 9,6±0,8 | - | 8,3±4,1 | - | 6,2 |
| TDZ 1 | - | - | 6,0±0 | 5,0±1,0 | 7,4±0,4 | - | - | - | 7,0±0 | - | 6,3 |
| TDZ 5 | - | - | - | 3,5±0,5 | 7,0±0 | - | - | - | - | 6,0±0 | 5,5 |
| TDZ 10 | - | 4,0±0 | - | - | 5,7±1,3 | - | 5,0±0 | 4,0±0 | - | 6,5±2,5 | 5 |
| TDZ 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Medio M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 4,0±0 | 4 |
| Promedio por cultivar | 8,2 | 8,7 | 9,1 | 7,5 | 9,2 | 8,2 | 8,1 | 7,2 | 7,6 | 7,5 | - |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan las medias aritméticas y sus errores estándar.

*** Medio M según Cavallero *et al.* (2012).

Todos los vástagos derivados de MV de los 10 cultivares de mandioca evaluados y que fueron regenerados en los distintos medios de inducción, fueron transferidos al Medio M para evaluar su capacidad de enraizamiento (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Porcentaje de vástagos enraizados (%), derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) provenientes de distintos medios adicionados o no con citocininas y transferidos al Medio M (según Cavallero *et al.*, 2012.)

| Medio \ Cultivar | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio |
|-----------------------|--------------|---------|---------|-----------|------------|----------------|----------|----------|-----------|-----------|--------------------|
| MS | - | - | - | 25 ab | - | - | - | - | - | - | 25,0 |
| BAP 0,5* | 66,8 ** b*** | 93,7 c | 75 b | 96,8 c | 78,5 d | 47,9 b | 65,6 c | 29,2 cd | 70,1 d | 58,3 a | 68,2 |
| BAP 1 | 82,6 b | 12,5 ab | 58,3 b | 90,6 c | 85,7 d | 46,2 b | 70 c | 28,1 bcd | 58,3 d | 59,9 a | 59,2 |
| BAP 5 | 21 a | - | 35 b | 69,4 bc | 87,3 d | 13,5 ab | 58,3 bc | 25 abc | 37,5 abcd | 25 a | 41,3 |
| BAP 10 | 12,5 a | 37,5 b | 45,8 b | 46,5 abc | 97,9 d | - | 25 ab | - | 12,5 abc | 47,5 a | 40,7 |
| BAP15 | - | 25 ab | 0,0 a | 100 c | 72,1 cd | - | - | 14,6 abc | 37,5 bcd | 25 a | 39,2 |
| CIN 0,5 | - | - | - | 25 ab | - | - | 12,5 ab | 16,7 abc | - | 25 a | 19,8 |
| CIN 1 | - | - | - | - | 18,8 abc | - | 25 ab | - | - | 25 a | 22,9 |
| CIN 5 | 25 a | 45,9 b | 66,7 b | 75 bc | 71,9 cd | 25 ab | 63,5 bc | 8,3 ab | 60,4 cd | 25 a | 46,7 |
| CIN10 | 18,8 a | 93,7 c | 44,8 b | 96,3 c | 75 cd | 18,8 ab | 82,3 c | 38,5 bcd | 53,8 bcd | 25 a | 54,7 |
| CIN 15 | - | 95,8 c | 40,8 b | 75 bc | 68,1 bcd | 16,7 ab | 46,5 abc | 85,5 d | 36,9 abcd | 18,8 a | 53,8 |
| TDZ 0,5 | - | - | 12,5 b | 25 ab | - | 12,5 ab | 25 ab | - | 22,9 abcd | - | 19,6 |
| TDZ 1 | - | - | 12,5 b | 25 ab | 12,5 ab | - | - | - | 6,3 ab | - | 14,1 |
| TDZ 5 | - | - | - | 25 ab | 50 bcd | - | - | - | - | 25 a | 33,3 |
| TDZ 10 | - | 12,5 a | - | - | 50 abcd | - | 12,5 ab | 0,0 a | - | 12,5 a | 17,5 |
| TDZ 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Medio M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 12,5 a | 12,5 |
| Promedio por cultivar | 37,8 | 52,1 | 39,1 | 59,6 | 64,0 | 25,8 | 44,2 | 27,3 | 39,6 | 29,6 | - |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presenta el porcentaje de vástagos enraizados promedio.

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En cuanto a la efectividad en el enraizamiento de los vástagos derivados de MV, se puede mencionar que si bien en su gran mayoría fueron capaces de enraizar se registraron diferencias estadísticas relacionadas con el medio de origen, excepto en el cv. MCol 1505. Los vástagos que fueron subcultivados en Medio M (Cavallero *et al.*, 2012) para evaluar su enraizamiento, evidenciaron capacidad rizogénica en el 100% de los cultivares cuando provenían de los medios de inducción de MV adicionados con 0,5-1 mg/L de BAP y 10-15 mg/L de CIN. Sin embargo, cabe mencionar que los vástagos de los cvs. Catiguá, Rocha y Palomita que provenían del medio adicionado con 5 mg/L de CIN también demostraron

elevados porcentajes de enraizamiento elevados. En general, los vástagos derivados de MV provenientes de medios con TDZ presentaron una muy baja capacidad de enraizamiento que no superó el 50%. Esto concuerda con Guo *et al.* (2011), que indicaron que el TDZ manifestó una influencia negativa sobre la rizogénesis de vástagos derivados de medios inductivos provistos de esta citocinina. Li *et al.* (1998) comprobaron que los vástagos regenerados en medios adicionados con 0,5 a 2 mg/L de BAP fueron capaces de enraizar normalmente. Los mayores valores de porcentaje de vástagos enraizados se registraron en el cv. Surubím-41 y los menores en los cvs. Santa Catarina y Amarilla (Tabla 3.5). En la Figura 3.45 se puede observar como lucían los vástagos enraizados derivados de MV regenerados en medios con BAP (Figura 3.45 a) y CIN (Figura 3.45 b).

Figura 3.45: Enraizamiento de vástagos derivados de MV provenientes de diferentes medios con citocininas y transferidos en Medio M según Cavallero *et al.* (2012).



Referencias: a) vástago del cv. Catiguá derivado del medio adicionado con 1 mg/L de BAP; b) vástago del cv. IAC 12829 derivado del medio adicionado con 10 mg/L de CIN. Barras = 1 cm.

Tabla 3.6: Peso seco de vástagos enraizados (mg), derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) provenientes de distintos medios adicionados o no con citocininas y transferidos al Medio M (según Cavallero *et al.*, 2012).

| Medio \ Cultivar | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio |
|-----------------------|---------------|---------|----------|-----------|------------|----------------|--------|----------|----------|-----------|--------------------|
| MS | - | - | - | 8,1 ab | - | - | - | - | - | - | 8,1 |
| BAP 0,5* | 19,7 ** b *** | 23,2 a | 23,1 c | 21,8 c | 25,1 c | 9,4 b | 20,1 a | 17,3 d | 16,2 d | 15,1 b | 19,1 |
| BAP 1 | 16,3 b | 4,8 a | 10,9 bc | 18,6 c | 27,6 c | 9,2 b | 15,9 a | 17,9 d | 14,8 d | 12,8 b | 14,9 |
| BAP 5 | 7,8 a | - | 4,3 ab | 9,8 abc | 31,7 c | 4,5 ab | 11,6 a | 5,8 abc | 11,6 bcd | 2,2 a | 9,9 |
| BAP 10 | 5,3 a | 5,5 a | 9,9 abc | 12,8 abc | 16,8 bc | - | 16,7 a | - | 3,4 ab | 4,2 a | 9,3 |
| BAP15 | - | 5,6 a | - | 17,5 c | 27,7 c | - | - | 1,2 ab | 1,2 ab | 0,7 a | 9,0 |
| CIN 0,5 | - | - | - | 8,7 ab | - | - | 2,49 a | 6,8 abcd | - | 2,4 a | 5,1 |
| CIN 1 | - | - | - | - | 13,5 ab | - | 11,0 a | - | - | 12,9 b | 12,5 |
| CIN 5 | 6,1 a | 12,3 a | 16,2 abc | 18,1 bc | 13,4 ab | 5,2 ab | 19,1 a | 15 cd | 6 abc | 5,3 a | 11,7 |
| CIN10 | 2,4 a | 24,5 a | 12,6 abc | 19,1 c | 23,9 bc | 1,7 ab | 4,5 a | 9,1 bcd | 14 cd | 12,1 b | 12,4 |
| CIN 15 | - | 19,7 a | 14,8 bc | 13,5 abc | 19,3 bc | 0,7 a | 2,7 a | 6,4 abc | 18,1 d | 2,8 a | 10,9 |
| TDZ 0,5 | - | - | 6,8 ab | 9,1 ab | - | 0,6 a | 3,3 a | - | 7,1 abcd | - | 5,4 |
| TDZ 1 | - | - | 3,3 ab | 15,9 abc | 11,2 ab | - | - | - | 4,6 abc | - | 8,8 |
| TDZ 5 | - | - | - | 7,2 ab | 12,2 ab | - | - | - | - | 6,5 a | 8,6 |
| TDZ 10 | - | 0,8 a | - | - | 10,4 ab | - | 3,0 a | - | - | 6,5 a | 5,2 |
| TDZ 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Medio M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,0 a | 5,0 |
| Promedio por cultivar | 9,6 | 12,1 | 11,3 | 13,9 | 19,4 | 4,5 | 10,0 | 9,9 | 9,7 | 6,8 | - |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presenta el peso seco de vástagos enraizados promedio en mg.

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

El peso seco de vástagos enraizados o peso seco de plantas completas fue afectado por el medio de cultivo del cual provenían en 8 de los 10 cultivares estudiados, obteniéndose diferencias estadísticas en favor de los medios de inducción de MV que contemplaron la adición de 0,5 y 1 mg/L de BAP. Los vástagos derivados de medios adicionados con 5, 10 y 15 mg/ de CIN y puestos a enraizar también mostraron valores de peso seco similares a aquellos registrados en los medios adicionados con BAP, dependiendo del cultivar. La mayoría de vástagos enraizados provenientes de MV obtenidos en medios con TDZ presentaron pesos muy bajos, es decir, que demostraron una baja capacidad de crecimiento. En otra especie se ha observado una influencia diferencial del medio inductivo para la multiplicación que contemplaba variaciones en las concentraciones de citocinina, habiendo una concentración ideal que favorecía significativamente la ganancia de peso de las plantas regeneradas (Cioć *et al.*,

2018). Los mayores valores de peso seco de vástagos enraizados o de plantas enteras se registraron en el cv. Surubím-41 y los menores en los cvs. Amarilla y Santa Catarina (Tabla 3.6).

Con los resultados obtenidos en este experimento, y considerando que el objetivo principal de esta tesis fue la inducción de la proliferación de MV, teniendo en cuenta la eficacia de los medios con citocininas en romper la dominancia apical y diferenciar MV (expresada como porcentaje de explantes con MV) se puede decir que los medios adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP y 5 y 10 mg/L de CIN fueron los que permitieron que el 100% de los cultivares respondan positivamente y en un alto porcentaje (principalmente derivados de medios con BAP). Por otra parte, los vástagos derivados de MV regenerados en los medios de inducción mencionados mostraron, en general, una adecuada capacidad de enraizamiento y de crecimiento.

Seleccionados estos medios de inducción de MV, se prosiguió con el estudio de la incidencia del tiempo de exposición a estas concentraciones de citocininas para el mismo grupo de cultivares de mandioca.

3.2. Efecto del medio de cultivo y el tiempo de inducción sobre la regeneración *in vitro* de MV de diferentes cultivares de mandioca.

Al analizar el cv. 'Ramada Paso', en cuanto al efecto de los distintos tiempos de exposición de los explantes a los medios adicionados con reguladores de crecimiento sobre la regeneración de MV (Figura 3.46), se puede decir que no se evidenciaron diferencias estadísticas debidas a los efectos simples del medio de cultivo ($P=0,0582$), el tiempo de inducción ($P=0,1973$), ni a su interacción ($P=0,9930$). Si bien pareciera que los medios adicionados con BAP indujeron mayor proporción de explantes con MV, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

En la Figura 3.47 se pueden observar los resultados obtenidos para el cv. 'MPar 75'. Con respecto al medio de cultivo, los valores de porcentaje de explantes con MV fueron mayores cuando se adicionó el medio con 0,5 mg/L de BAP y 5-10 mg/L de CIN ($P=0,0067$). En general, a partir de 20 días de exposición, los explantes manifestaron un aumento significativo en la regeneración de MV respecto a 10 días ($P=0,0038$). No se evidenciaron diferencias significativas debidas a la interacción entre medio de cultivo vs. tiempo de exposición ($P=0,099$).

Cuando se evaluó el cv. 'Catiguá' (Figura 3.48) no se evidenciaron diferencias estadísticas respecto de los medios de cultivo ($P=0,4486$), ni al tiempo de exposición a las citocininas ($P=0,3241$), ni a su interacción ($P=0,1454$). Si bien algunos medios de cultivo se destacaron en su capacidad para inducir la regeneración de MV a partir de 20 días, las diferencias no fueron significativas.

Examinando los resultados obtenidos para el cv. 'IAC 12829', (Figura 3.49) se observa que la regeneración de MV no presentó diferencias significativas debidas a los medios de cultivo evaluados ($P=0,3611$). Tal como se evidencio en el cv. 'MPar 75', los explantes respondieron mejor a la inducción de la regeneración de MV cuando el tiempo de exposición al medio de cultivo fue de al menos de 20 días respecto a 10 días ($P=0,0188$). No se detectaron diferencias significativas respecto de la interacción de los factores estudiados ($P=0,1579$).

Figura 3.46: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).

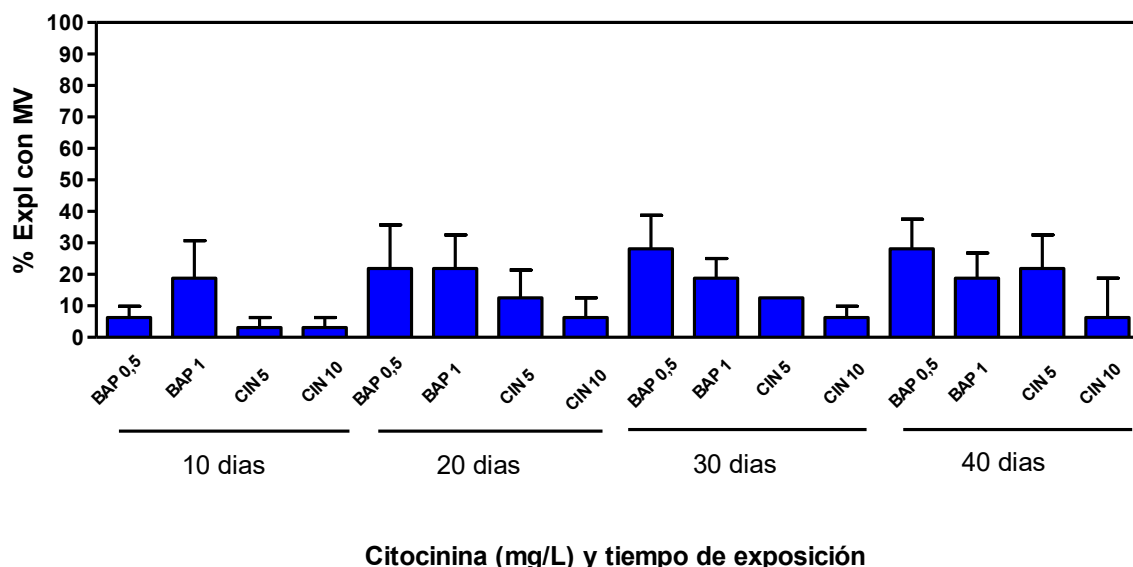


Figura 3.47: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).

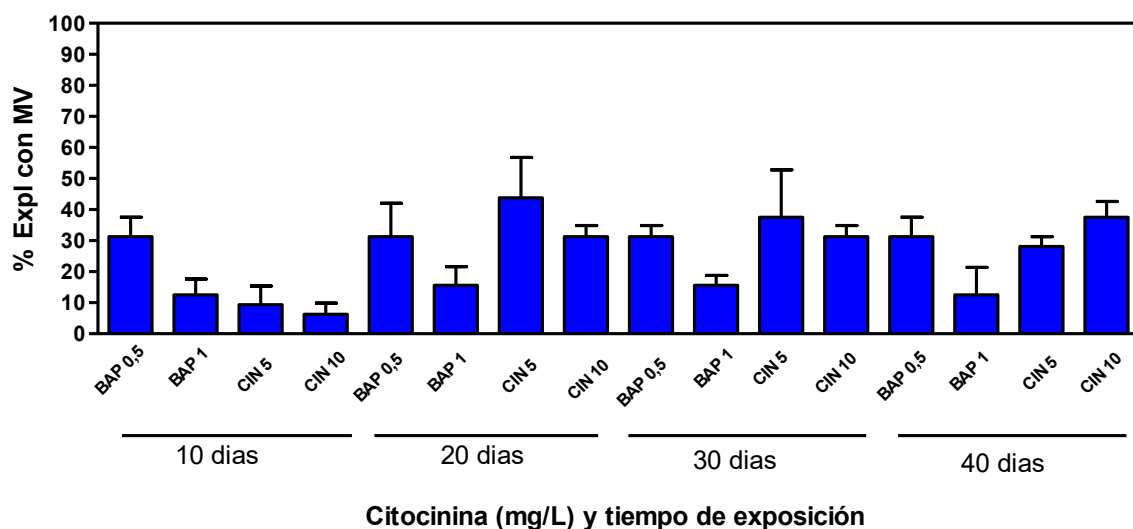


Figura 3.48: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).

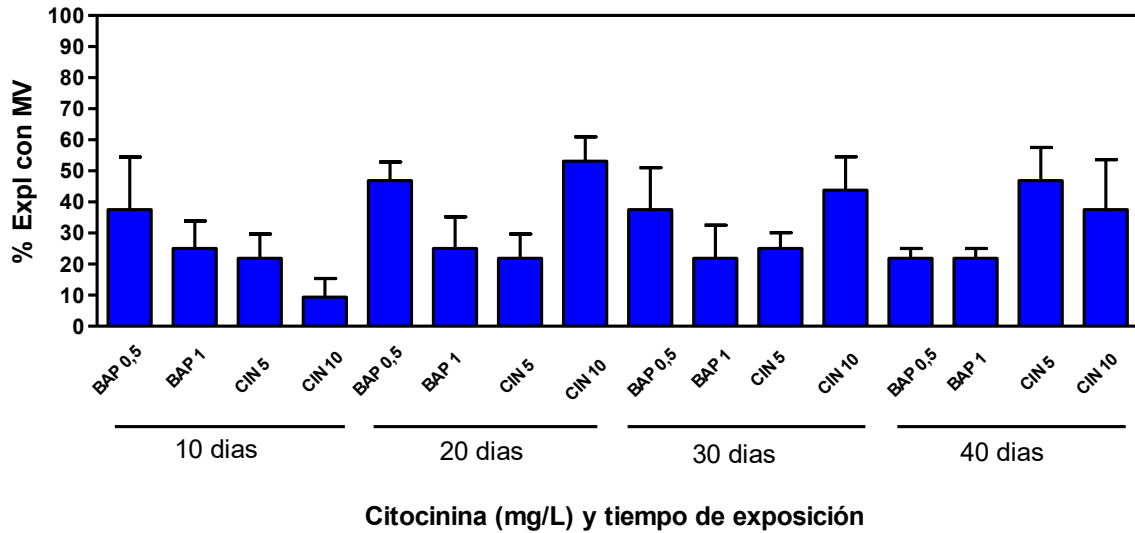
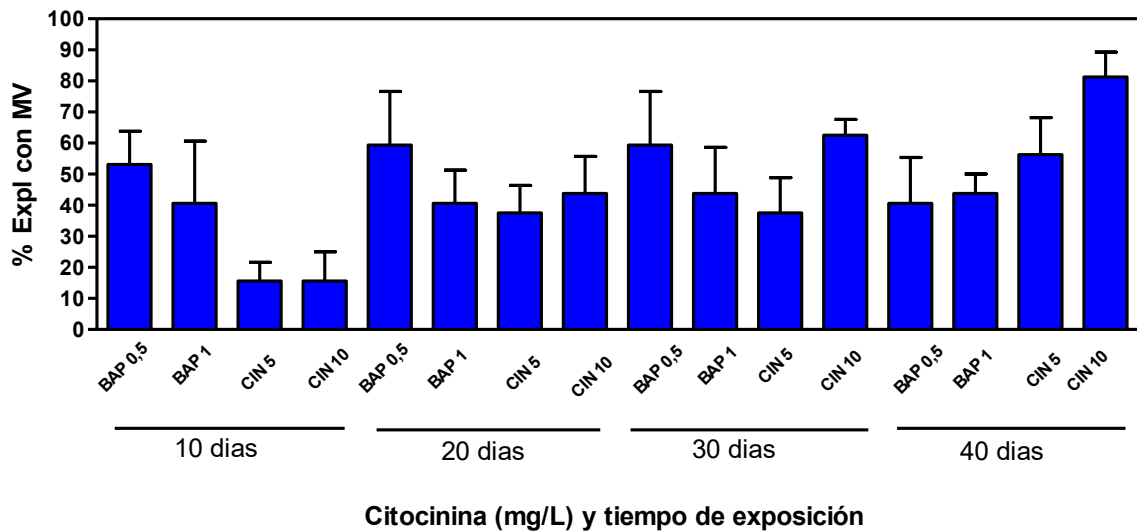


Figura 3.49: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC12.829' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).



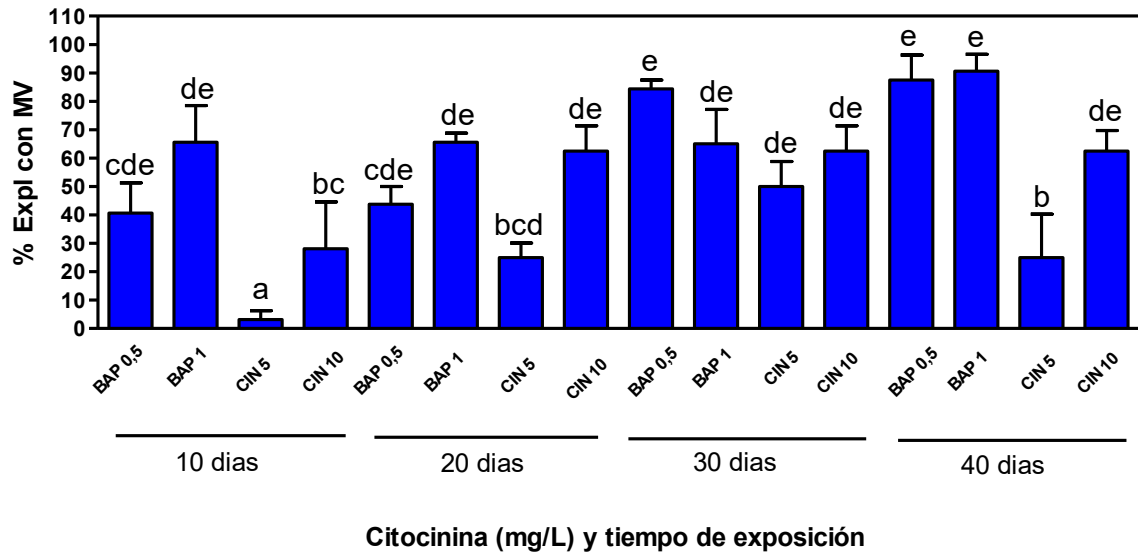
En cuanto al cv. 'Surubim-41' (Figura 3.50), tanto el factor medio de cultivo ($P < 0,0001$), tiempos de exposición a las citocininas ($P = 0,0001$) y su interacción ($P = 0,019$) generaron diferencias estadísticas significativas en la inducción de la regeneración de MV. El medio adicionado con 5 mg/L de CIN produjo la menor inducción de la regeneración de MV. Referido al efecto simple de los tiempos de exposición, tal como se mencionó para los cvs. 'IAC 12829' y 'MPar 75', 20 días de cultivo en los medios inductivos evaluados ya es suficiente para alcanzar porcentajes altos de explantes con MV. Cabe destacar que en este caso se evidenciaron diferencias significativas en relación a la interacción de factores, observándose que la incubación de los explantes por más tiempo en los medios adicionados con BAP consolida la respuesta a la regeneración de MV. Por lo menos en este cultivar, se podría considerar exponer a los explantes por más tiempo al medio inductivo para optimizar su capacidad de regeneración vía MV.

De acuerdo a lo registrado con el cv. 'Santa Catarina', (Figura 3.51) para los distintos medios de cultivo, tiempos de exposición a las citocininas y su interacción ($P = 0,2326$) no se produjeron diferencias significativas. Si bien no se detectaron diferencias estadísticas, se puede observar que hay una propensión a que los explantes respondan mejor, en relación a la regeneración de MV, en medios adicionados con BAP.

Cuando se evaluó el cv. 'Rocha' (Figura 3.52), tampoco se detectaron diferencias estadísticas con respecto al efecto de los medios de cultivo y los tiempos de exposición ensayados, ni a su interacción ($P = 0,8963$) sobre la regeneración de MV. En la Figura 3.52 se observa que, con excepción del medio adicionado con 1 mg/L de BAP, en los restantes medios aumenta la regeneración de MV en función del tiempo de exposición aunque la diferencia no reviste significancia estadística.

Cuando se examinaron los resultados obtenidos con el cv. 'Amarilla' (Figura 3.53), no se evidenciaron diferencias estadísticas en la regeneración de MV debidas a los efectos simples del medio de cultivo ($P \leq 0,7065$), el tiempo de exposición a las citocininas ($P \leq 0,1565$), ni a su interacción ($P \leq 0,1880$).

Figura 3.50: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Surubim-41' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Figura 3.51: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Santa Catarina' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).

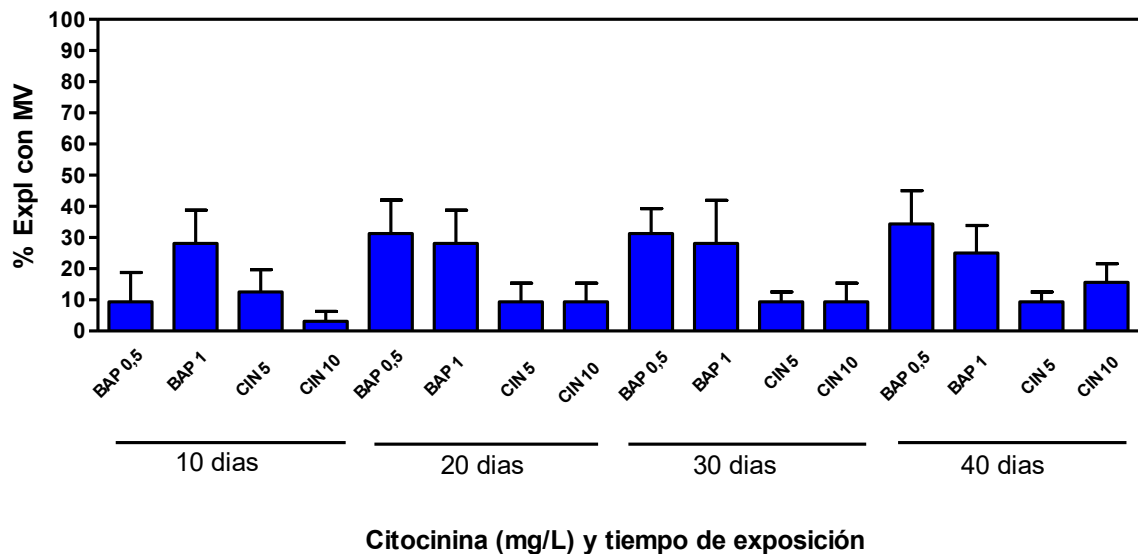


Figura 3.52: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' obtenida en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).

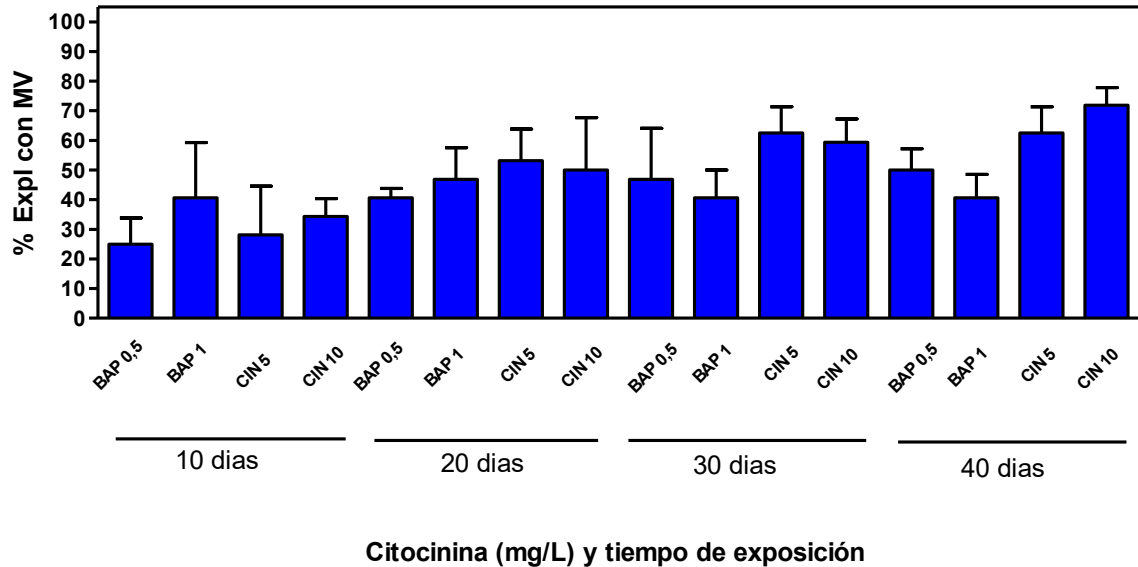
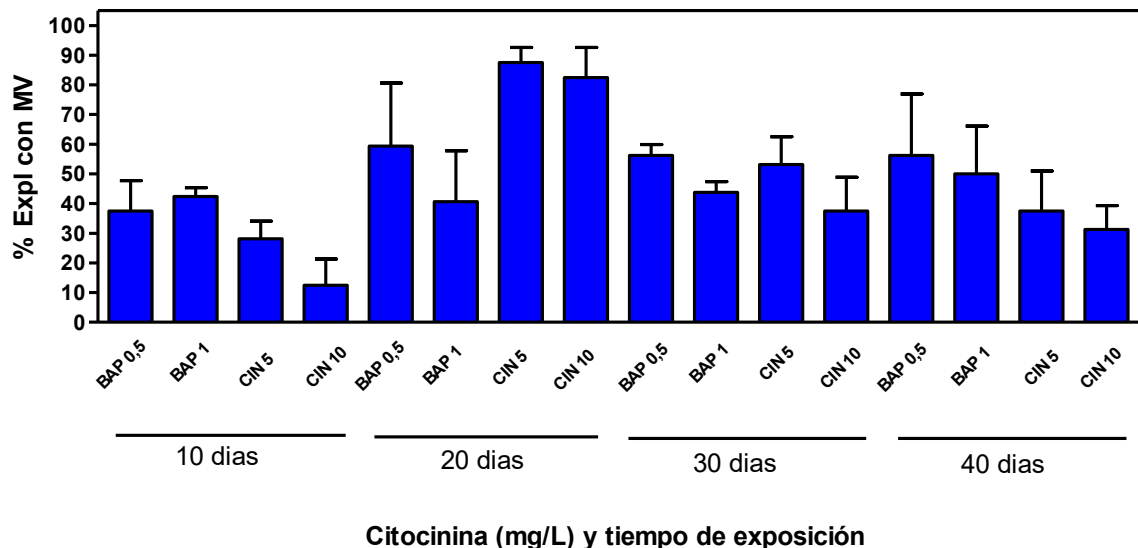


Figura 3.53: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Amarilla' en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).



En el cv. 'Palomita', el único factor que arrojó diferencias significativas en relación al porcentaje de explantes con MV fue el tiempo de exposición a las citocininas contenidas en los medios de cultivo ($P=0,0007$) (Figura 3.54). A los 20 días de cultivo se produjo un aumento significativo de la regeneración de MV, lo cual se mantuvo independientemente de la prolongación del tiempo de exposición.

Similar a las respuestas de regeneración de MV observadas en los cvs. 'IAC 12.829' y 'Palomita', ocurrió en el cv. 'MCol 1505' (Figura 3.55). El único factor que generó diferencias estadísticas fue el tiempo de exposición ($P=0,0042$). Como en los demás cultivares, 20 días de inducción fueron suficientes para lograr el mayor porcentaje de regeneración de MV, ya que mayores tiempos de exposición no promovieron un aumento significativo en el porcentaje de explantes con MV.

Figura 3.54: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfológicas anteriormente descritas).

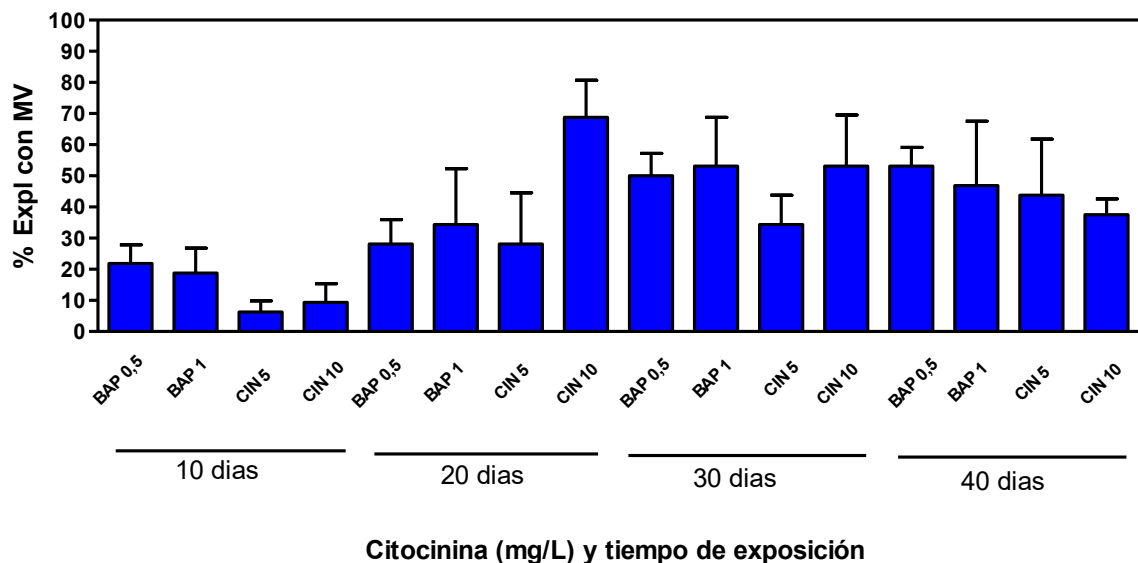
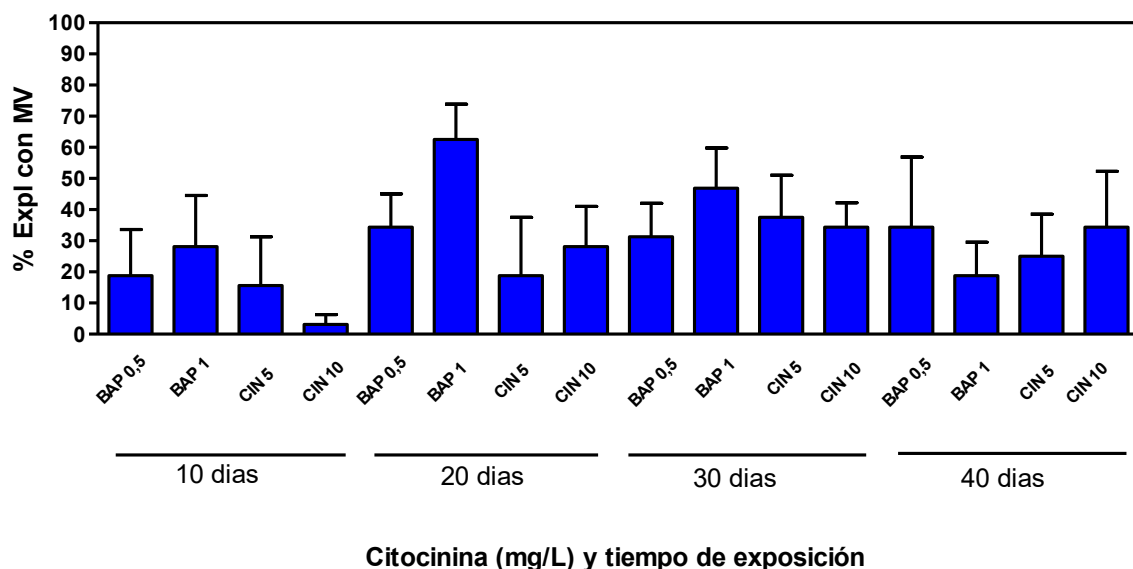


Figura 3.55: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' en distintos medios (MS más citocininas) y tiempos de inducción a los 40 días de cultivo. % Expl con MV= Porcentaje de explantes con múltiples vástagos (independientemente de las variaciones morfogénicas anteriormente descritas).



En resumen, el 50% de los cultivares de mandioca evaluados presentaron mayores porcentajes de explantes con MV cuando los mismos permanecieron en el medio inductivo al menos por 20 días. El resto de los cultivares no evidenciaron diferencias significativas en relación a ninguno de los factores estudiados. Sólo en dos cultivares (*i.e.* Surubim-41 y Ramada Paso) se manifestaron mayores porcentajes de regeneración de MV mediante el uso de medios de cultivo determinados, destacándose el empleo de BAP como citocinina promotora de la multiplicación vía MV.

Cuando se analizó en forma integral el porcentaje de explantes con MV considerando los medios de cultivo, el tiempo de exposición a las citocininas, los cultivares y sus interacciones se hallaron diferencias significativas casi en todos los casos con excepción de la interacción triple ($P=0,1648$). En correlación a lo observado en el análisis por cultivares, el tiempo de inducción mínimo favorable resultó ser de 20 días ($P<0,0001$). Los medios adicionados con BAP (0,5 y 1 mg/L) fueron los que propiciaron las mejores respuestas de regeneración de MV,

seguido del medio con 10 mg/L de CIN ($P=0,0084$). El factor cultivar produjo profundas diferencias en la diferenciación de MV definiendo tres grupos de acuerdo a su prolificidad ($P<0,0001$), uno de alta (Surubim-41, Rocha, IAC 12829 y Amarilla), media (Palomita y Catiguá) y baja capacidad de regeneración de MV (MCol 1505, MPar 75, Santa Catarina y Ramada Paso). Las interacciones dobles cultivar vs. medio de cultivo, cultivar vs. tiempo de exposición y medio de cultivo vs. tiempo de exposición arrojaron diferencias significativas. Los cultivares de baja capacidad de regeneración de MV en general optimizan su respuesta cuando se los incuba en medios con BAP ($P<0,0001$). Es de destacar que en algunos cultivares es notable el mejoramiento de la respuesta de regeneración de MV cuando se los somete a un mayor tiempo de exposición ($P=0,0198$). El cultivo en medio con CIN por 10 días fue la combinación que generó la respuesta más baja de regeneración de MV, sugiriendo que sería lo más recomendado el empleo de BAP y preferentemente por al menos 20 días de exposición ($P<0,0001$). Fue evidente que 10 días en el medio de cultivo no resultó suficiente para lograr valores destacables en cuanto a regeneración de explantes con MV, siendo necesario incubar los explantes en medios con citocininas un tiempo más prolongado, aunque al no hallarse diferencias estadísticas entre 20, 30 y 40 días de exposición, resultaría conveniente optar por 20 días de inducción como mínimo.

Referido al número de nudos promedio por explante, en general, se puede decir que los mayores valores para VS se corresponden con los menores tiempos de exposición a las diferentes citocininas y concentraciones ensayadas. Tal es así que en el 60 % de los cultivares se obtuvo el mayor número de nudos por VS cuando los explantes fueron incubados por 10 días. En cuanto al número de nudos promedio por VS entre medios de cultivo y tiempos de exposición, el medio adicionado con 0,5 mg/L de BAP por 10 días, fue el que propició el mayor valor (5,93 nudos por VS; $P<0,0001$). Así mismo, el cv. Surubim-41 fue el que evidenció el mayor número de nudos por VS (6,54) y MPar 75 el que manifestó el menor número de nudos por VS (4,42) ($P<0,0001$) (Tabla 3.7).

Si consideramos el número de nudos promedio por explante derivados de MV, en el 90 % de cultivares los valores obtenidos fueron más del doble respecto de los derivados de VS. De todos modos, en el cv. Palomita el número de nudos promedio por explante derivados de MV fue casi el doble respecto de los contabilizados en VS.

Si se consideran los cultivares y los medios de cultivo juntos con respecto al tiempo de exposición, se observa una tendencia general a aumentar el número de nudos por MV a mayor tiempo de inducción, aunque la misma no resultó significativa ($P=0,1300$). El mayor número de nudos promedio por explante derivados de MV también se registró en el cv. Surubim-41 y el menor valor se halló en el cv. Ramada Paso ($P<0,0001$) (Tabla 3.8) correspondiéndose con lo observado al evaluar el porcentaje de explantes con MV. Es decir, estos cultivares serían los más contrastantes en relación a la respuesta a la regeneración de MV y su capacidad de multiplicación.

Tabla 3.7: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios durante distintos tiempos de exposición.

| Medio \ Cultivar | Tiempo | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|--------|-------------|-------------|----------|-----------|------------|----------------|-----------|----------|----------|-----------|-----------------------------|
| BAP 0,5 * | 10 | 4,01**ab*** | 6,2 abcdef | 5,44 a | 5,25 ab | 6,97 a | 6,39 abcde | 5,54 ab | 5,22 abc | 7,13 ab | 7,11 abcd | 5,93 |
| BAP 1 | | 5,1 abc | 5,21 abcde | 5,36 a | 4,36 ab | 6,13 a | 5,9 abcd | 6,96 abcd | 5,35 abc | 6,81 ab | 5,85 abc | 5,7 |
| CIN 5 | | 4,61 abc | 6,35 abcdef | 6,1 abc | 7,07 b | 6,34 a | 4,53 ab | 6,71 abcd | 5,55 abc | 7,11 ab | 5,6 abc | 6 |
| CIN 10 | | 3,98 ab | 4,48 ab | 6,36 abc | 5,96 ab | 6,34 a | 5,23 ab | 5,62 ab | 5,46 abc | 6,84 ab | 6,16 abc | 5,64 |
| BAP 0,5 | 20 | 5,67 abcd | 3,86 ab | 4,71 a | 6,13 ab | 7,2 a | 6,41 abcde | 4,5 ab | 4,56 ab | 5,47 a | 6,3 abc | 5,48 |
| BAP 1 | | 4,51 ab | 3,55 a | 3,51 a | 3,81 a | 5,5 a | 4,35 a | 4,98 ab | 3,17 a | 5,6 a | 4,88 ab | 4,39 |
| CIN 5 | | 5,06 abc | 4,5 ab | 4,88 a | 6,17 ab | 7,7 a | 5,72 abc | 5,98 abc | 4,92 ab | 5,86 a | 5,4 abc | 5,62 |
| CIN 10 | | 3,73 ab | 3,9 ab | 4,29 a | 4,92 ab | 7,29 a | 4,67 ab | 6,13 abc | 3,88 ab | 5,33 a | 5,6 abc | 4,97 |
| BAP 0,5 | 30 | 4,05 ab | 4,68 abc | 4,41 a | 5,03 ab | 7,0 a | 4,83 ab | 5,04 ab | 4,73 ab | 5,59 a | 5,49 abc | 5,09 |
| BAP 1 | | 3,86 ab | 3,17 a | 3,68 a | 5,15 ab | 5,47 a | 4,0 a | 4,71 ab | 3,82 ab | 4,42 a | 5,83 abc | 4,41 |
| CIN 5 | | 4,63 abc | 4,82 abcd | 5,62 ab | 4,33 ab | 6,89 a | 5,66 abc | 4,86 ab | 5,35 abc | 6,63 ab | 6,24 abc | 5,5 |
| CIN 10 | | 4,25 ab | 3,42 a | 5,63 ab | 4,1 ab | 6,42 a | 4,53 ab | 5,21 ab | 3,33 ab | 6,89 ab | 3,98 a | 4,78 |
| BAP 0,5 | 40 | 5,79 abcd | 3,96 ab | 3,27 a | 4,9 ab | 7,44 a | 5,88 abcd | 4,42 ab | 4,25 ab | 5,95 a | 7 abcd | 5,29 |
| BAP 1 | | 4,21 ab | 3,52 a | 3,79 a | 3,79 a | 5,75 a | 3,94 a | 3,76 a | 4,11 ab | 4,98 a | 6,41 abc | 4,43 |
| CIN 5 | | 4,7 abc | 4,72 ab | 5,7 ab | 5,21 ab | 6,14 a | 5,37 ab | 3,58 a | 5,08 abc | 7,19 ab | 6,45 abc | 5,41 |
| CIN 10 | | 3,28 a | 4,43 ab | 4,5 a | 5,22 ab | 6,0 a | 3,78 a | 4,63 ab | 5,06 abc | 6,14 a | 5,43 abc | 4,85 |
| Promedio por cultivar | | 4,47 | 4,42 | 4,83 | 5,09 | 6,54 | 5,07 | 5,16 | 4,62 | 6,12 | 5,86 | |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan medias aritméticas.

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P\leq 0,05$).

Tabla 3.8: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios durante distintos tiempos de exposición.

| Medio \ Cultivar | Tiempo | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|--------|----------------|-------------|----------|-----------|------------|----------------|-------------|------------|----------|--------------|-----------------------------|
| BAP 0,5 * | 10 | 9,5** defgh*** | 14,42 hi | 15 e | 10,81 cd | 11,67 b | 8,67 bcdefgh | 12,11 efghi | 10,8 efg | 11,1 cd | 10,9 abcdefg | 11,50 |
| BAP 1 | | 11,78 ghi | 10,1 fgh | 15,15 e | 11,78 cde | 15,48 bcd | 11,93 ghij | 11,96 efghi | 11,23 efgh | 10,28 cd | 17,67 gh | 12,74 |
| CIN 5 | | 8 bcdefg | 13,25 ghi | 14,6 de | 14,17 e | 8,0 a | 7,5 abcdef | 8,11 bcde | 12,08 efgh | 11 cd | 10,4 abcdef | 10,71 |
| CIN 10 | | 8 bcdefg | 11,5 ghi | 15,5 e | 13,67 de | 13,08 bc | 12 ghij | 10,98 efgh | 11,83 efgh | 10,5 cd | 7 abc | 11,41 |
| BAP 0,5 | 20 | 12,93 hi | 12,7 ghi | 12,73 de | 11,77 cde | 14,75 bcd | 12,56 hij | 14,5 ghi | 12,15 efgh | 10,39 cd | 12,3 efg | 12,68 |
| BAP 1 | | 10,83 efghi | 8,5 bcdefg | 10 bcd | 9,95 c | 15,83 cd | 12,94 ij | 10,5 defg | 7 bcd | 10,45 cd | 14,01 cdefgh | 11 |
| CIN 5 | | 8,83 defgh | 10,6 fghi | 12,87 de | 14,02 e | 13,17 bc | 10 defghi | 13,19 fghi | 12,44 fgh | 11,67 cd | 15,17 efg | 12,2 |
| CIN 10 | | 7,5 abcdef | 10 fgh | 11,82 de | 13,6 de | 15,91 cd | 12,5 hij | 11,96 efghi | 16,65i | 13,26 d | 17,08 fgh | 13,03 |
| BAP 0,5 | 30 | 10,94 efghi | 8,71 bcdefg | 10,21 cd | 12,58 cde | 17,53 d | 9,92 defghi | 12,56 fghi | 11,1 efg | 9,53 bc | 10 abcdef | 11,31 |
| BAP 1 | | 10,11 efghi | 9,88 efgh | 12,08 de | 11,09 cde | 17,61 d | 11,56 fghij | 9,67 cdef | 8,64 cde | 9,47 bc | 18,48 h | 11,86 |
| CIN 5 | | 12,33 hi | 12,19 ghi | 13,33 de | 11,55 cde | 13,7 bcd | 13 ij | 12,11 efghi | 13,73 ghi | 12,75 d | 13,46 defgh | 13,02 |
| CIN 10 | | 10 efghi | 11,71 ghi | 15,71 e | 11,03 cde | 14,13 bcd | 8 abcdefg | 14,98 hi | 12,65 fgh | 11,64 cd | 9,99 abcde | 11,98 |
| BAP 0,5 | 40 | 10,78 efghi | 9,33 cdefg | 13,13 de | 13,38 de | 15,33 bcd | 13,53 ij | 14,29 ghi | 12,85 fgh | 12,71 d | 17,79 gh | 13,31 |
| BAP 1 | | 11,67 fghi | 9,5 defg | 6,33 abc | 13,69 de | 16,17 cd | 12,75 hij | 11,73 efghi | 9,77 def | 12,64 d | 14,3 efgh | 12,58 |
| CIN 5 | | 13,75 i | 12,13 ghi | 14,25 de | 12,92 cde | 14,64 bcd | 10,33 efghi | 13,36 fghi | 14,1 ghi | 11,25 cd | 17,37 ghi | 13,41 |
| CIN 10 | | 7,25 abcde | 15,31 i | 11,33 de | 12,89 cde | 14,35 bcd | 9,67 cdefghi | 15,66 i | 14,52 hi | 10,59 cd | 11,44 bcdefg | 12,3 |
| Promedio por cultivar | | 10,26 | 11,24 | 12,75 | 12,43 | 14,46 | 11,18 | 12,35 | 11,97 | 11,20 | 13,58 | |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan medias aritméticas

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Tabla 3.9: Longitud promedio de vástagos derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en diferentes medios durante distintos tiempos de exposición.

| Medio \ Cultivar | Tiempo | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio y tiempo |
|-----------------------|--------|-------------|---------|---------|-----------|------------|----------------|-------|----------|----------|-----------|-----------------------------|
| BAP 0,5 * | 10 | 4,1 ** | 15,1 | 15,4 | 12,6 | 43,7 d *** | 3,9 | 13,9 | 7,2 | 10,7 | 10,8 | 11,2 |
| BAP 1 | | 3,8 | 11,8 | 11,0 | 6,9 | 22,3 bc | 10,9 | 10,3 | 6,2 | 7,4 | 18,7 | 9,7 |
| CIN 5 | | 0,5 | 12,8 | 16,7 | 16,3 | 3,1 a | 0,5 | 7,7 | 14,6 | 8,8 | 6,5 | 9,4 |
| CIN 10 | | 1,4 | 12,1 | 15,4 | 14,8 | 17,8 abc | 3,0 | 13,6 | 9,3 | 4,9 | 1,9 | 8,5 |
| BAP 0,5 | 20 | 5,0 | 8,9 | 8,0 | 10,6 | 29,2 bcd | 7,4 | 11,3 | 4,5 | 10,9 | 14,5 | 9,0 |
| BAP 1 | | 5,4 | 4,8 | 6,1 | 9,2 | 20,8 bc | 5,8 | 9,1 | 4,6 | 11,7 | 11,8 | 7,6 |
| CIN 5 | | 2,9 | 15,8 | 13,8 | 14,9 | 32,9 cd | 1,4 | 12,0 | 9,0 | 10,6 | 6,5 | 9,7 |
| CIN 10 | | 1,3 | 12,0 | 9,4 | 14,9 | 26,7 bc | 3,7 | 11,8 | 6,4 | 9,9 | 5,5 | 8,3 |
| BAP 0,5 | 30 | 4,6 | 6,2 | 8,6 | 11,1 | 14,6 ab | 3,1 | 10,0 | 5,4 | 10,5 | 4,4 | 7,1 |
| BAP 1 | | 3,8 | 8,0 | 5,2 | 7,3 | 18,3 abc | 3,8 | 6,8 | 3,4 | 8,2 | 12,0 | 6,5 |
| CIN 5 | | 4,8 | 12,2 | 13,6 | 12,4 | 23,3 bc | 2,1 | 9,9 | 7,4 | 14,2 | 24,0 | 11,2 |
| CIN 10 | | 1,2 | 6,7 | 9,7 | 8,4 | 25,0 bc | 0,9 | 7,8 | 5,8 | 11,5 | 6,0 | 6,5 |
| BAP 0,5 | 40 | 6,2 | 5,3 | 6,7 | 7,0 | 18,1 abc | 8,1 | 11,0 | 4,7 | 8,7 | 11,5 | 7,7 |
| BAP 1 | | 4,6 | 1,6 | 3,6 | 8,6 | 12,6 ab | 4,9 | 6,9 | 4,0 | 9,2 | 5,5 | 5,4 |
| CIN 5 | | 7,4 | 8,9 | 8,4 | 9,9 | 13,2 ab | 7,1 | 11,6 | 5,0 | 10,8 | 14,3 | 9,3 |
| CIN 10 | | 0,5 | 7,7 | 6,8 | 6,9 | 19,4 abc | 4,0 | 7,9 | 3,4 | 7,0 | 9,5 | 6,0 |
| Promedio por cultivar | | 3,6 | 9,4 | 9,9 | 10,7 | 21,3 | 4,4 | 10,1 | 6,3 | 9,7 | 10,2 | |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan medias aritméticas

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Los valores de longitud promedio de vástagos derivados de MV de 10 cultivares de mandioca sometidos a diferentes medios con citocininas durante distintos tiempos se pueden observar en la Tabla 3.9. Cuando se realizaron los análisis estadísticos por cultivar, en el único que se evidenció diferencias significativas en la interacción medio de cultivo vs. tiempo de exposición fue en el cv. Surubím-41. Cuando se compararon todos los cultivares, los medios de cultivo y el tiempo de exposición a las citocininas juntos respecto de la longitud promedio de vástagos derivados de MV se hallaron diferencias estadísticas en los factores simples y sus interacciones.

El factor cultivar arrojó diferencias altamente significativas ($P < 0,0001$), siendo el cv. Surubím-41 el que presentó los vástagos más altos y los cvs. Ramada Paso, Santa Catarina y Amarilla los vástagos más pequeños. El factor medio de cultivo exhibió diferencias significativas en favor de los medios adicionados con las menores concentraciones de las citocininas evaluadas (MS más 0,5 mg/L de BAP y MS más 5 mg/ de CIN) ($P = 0,0031$), los cuales promovieron la formación de vástagos más altos que el resto de los medios de inducción de MV. El tiempo de exposición a los medios adicionados con citocininas generó diferencias significativas ($P = 0,0004$), propiciando la producción de MV más altos cuando los explantes fueron inducidos a multiplicar por un término más corto (10 y 20 días). En general, explantes sometidos a tiempos de exposición más largos (30 y 40 días) si bien formaron MV evidenciaron longitudes pequeñas en diferentes cultivares. En la Figura 3.56 se puede observar, a modo de ejemplo, el aspecto de los MV derivados de explantes cultivados en medios con citocininas durante 10, 20, 30 y 40 días de los cvs. Surubím-41 (Fig. 3.56 a-d) y MPar 75 (Fig. 3.56 e-h). Con respecto al efecto de la interacción entre medio de cultivo vs. cultivar, se puede decir que si bien Surubím-41 presentó las mayores longitudes de vástagos derivados de MV regenerados en cualquiera de los medios ensayados, al menos 7 cultivares (Surubím-41; IAC 12829; Catiguá; MCol 1505; MPar 75; Rocha y Palomita) formaron vástagos más altos en los medios adicionados con las concentraciones más bajas de ambas citocininas evaluadas ($P < 0,0079$).

La interacción cultivar vs. tiempo de exposición también manifestó diferencias significativas en la longitud de vástagos derivados de MV ($P < 0,0078$). En este sentido, se evidenciaron una serie de comportamientos con respecto al tiempo dependientes del genotipo. El cv. Surubím si bien presentó variaciones debidas al tiempo de exposición en todos los casos presentó las longitudes más altas; en el otro extremo los cvs. Ramada Paso y Santa Catarina que independientemente del tiempo que hayan sido inducidos, exhibieron las longitudes más pequeñas. El resto de los cultivares demostraron una tendencia a aumentar la longitud de los vástagos derivados de MV conforme era menor el tiempo de exposición a las citocininas.

En relación al medio de cultivo y el tiempo de exposición se denota que existe una interacción significativa ($P = 0,0034$). Los medios adicionados con las menores concentraciones de citocininas probadas y los menores tiempos de exposición promueven la elongación de los vástagos derivados de MV; las mayores concentraciones de citocininas y tiempos de inducción la limitan.

Lo mismo que surgió del análisis de las interacciones dobles, la que involucró los tres factores simples estudiados, demostró que hubo cultivares que forman los vástagos de mayor longitud (cvs. Surubím y MCol 1505) y otros de menor longitud (cvs. Ramada Paso y Santa Catarina) independientemente del medio y tiempo de exposición empleados, y el resto presentaron variaciones con una tendencia al aumento de la longitud cuando el medio se encontraba suplementado con las concentraciones de citocininas más bajas y tiempos de inducción más cortos ($P = 0,0225$), con predominio de medios adicionados con CIN.

Figura 3.56: Aspecto de MV obtenidos por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. Surubím-41 (a-d) y cv. MPar 75 (e-h), en MS + 1 mg/L BAP por diferentes tiempos.



Referencias: a-d: MV del cv. Surubím-41; e-h: MV del cv. MPar 75. Sólo los MV de 40 días permanecieron todo ese tiempo en el mismo medio de inducción. Los explantes de los restantes tratamientos una vez transcurridos los días de exposición indicados fueron transferidos a MS desprovisto de reguladores de crecimiento hasta completar los 40 días de cultivo. Barras = 1 cm.

El estudio de los factores intrínsecos y extrínsecos y su interacción que afectan a un proceso fisiológico puede generar conocimientos que permitan la comprensión del mismo y su regulación. Si bien los segmentos uninodales de mandioca fueron capaces de responder positivamente a la regeneración de MV habiendo sido sometidos a diversos factores, tales como el cultivar, el medio de cultivo adicionado con citocininas y el tiempo de exposición a las mismas, se encontraron determinadas diferencias que podrían ser consideradas si se quisiera optimizar la metodología de propagación basada con esta vía organogénica.

En cuanto al efecto del cultivar se evidenciaron diferencias significativas en la eficiencia de la regeneración vía MV, lo que concuerda con lo expresado por múltiples autores (Roca, 1984; Pedroso de Olivera *et al.*, 2000; Cavallero, 2010; Faye *et al.*, 2015; Sukmadjaja y Widhiastuti, 2011). Referido a la prolificidad de los cultivares en la regeneración vía MV se manifestaron algunas correspondencias con el agrupamiento propuesto por Medina *et al.*, (2017) donde se avizora una mayor capacidad de multiplicación para cultivares de mandioca de procedencia tropical.

La metodología de multiplicación *in vitro* de mandioca de rutina contempla el cultivo de segmentos uninodales en medio de micropropagación (Cavallero *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2017) que contiene ANA, BAP y AG₃ y en el cual permanecen entre 3 y 4 meses hasta un nuevo cultivo. En este experimento no sólo se demuestra la efectividad de los medios selectos en inducir la regeneración de MV y el aumento de la producción de nudos por explante como resultado del primer experimento (principalmente de aquellos adicionados con 0,5 y 1 mg/L de BAP y del medio con 10 mg/L de CIN), sino que se confirma que el sólo uso de una citocinina es capaz de estimular la multiplicación vía organogénica incluso con exposiciones de menor duración, completando la expresión del proceso morfogénico en medios de cultivo desprovistos de reguladores de crecimiento, tal como mencionara Guo *et al.* (2011). Evidentemente también resulta fundamental determinar el efecto del tiempo de exposición sobre la regeneración ligado a un determinado regulador de crecimiento o sus combinaciones, ya que la respuesta dependerá fuertemente de su naturaleza y su concentración.

En este sentido, en este experimento se observó que el tiempo de exposición a las citocininas influye en la eficiencia de la inducción de la diferenciación de MV. En general, se evidenció que 10 días de exposición en medios adicionados con BAP o CIN, no fueron suficientes para lograr una inducción eficiente de la regeneración de MV. Estos resultados no coinciden con los reportados por Bhagwat *et al.* (1996), quienes promovieron la regeneración de MV a través del cultivo de segmentos uninodales por 6 a 8 días en medios líquidos con 0,025–0,05 mg/L de

TDZ y su transferencia a un medio con 0,5 mg/L de BAP y 0,6 mg/L de AG₃. El TDZ, en general, posee una potente actividad morfogénica y es considerada mucho más fuerte en relación a la actividad de las purinas sustituidas por lo que es normal que se empleen menores concentraciones y menores tiempos de exposición para obtener buenos resultados (Faisal *et al.*, 2005; Husain *et al.*, 2007; Ahmad y Anis, 2007; Ahmad y Anis, 2012). Según Fernandez de Andrade *et al.* (2006), trabajando con segmentos nodales de *Eucalyptus grandis*, observaron que el tiempo de exposición de los explantes a distintas concentraciones de BAP, tuvieron una influencia directa en su multiplicación *in vitro*. Cabe destacar que en este caso se han evaluado medios con elevadísimas concentraciones de BAP (200, 400 y 600 mg/L) y sólo horas de exposición (1, 2 y 3 horas) y de igual modo se han encontrado diferencias significativas en la regeneración de vástagos.

En el presente experimento, como resultado del análisis conjunto del factor medio de cultivo vs. tiempo de exposición se pudo establecer que es conveniente el empleo de medios con BAP y que los explantes sean incubados en los mismos al menos por 20 días para obtener mayores porcentajes de regeneración de MV.

Faye *et al.* (2015) evidenciaron que la adición de citocininas al medio de inducción de MV afectaba la longitud de los vástagos regenerados. Se observó una disminución mayor de la longitud de los vástagos con el aumento de la concentración de BAP y un aumento de la misma con el aumento de la concentración de CIN. De igual modo en la mayoría de los genotipos evaluados, la adición de citocininas disminuyó la longitud de los vástagos con respecto al control libre de reguladores de crecimiento. Estos autores también determinaron que hay genotipos de mandioca más afectados por las citocininas que otros con respecto a la restricción en el crecimiento en longitud. En resumen, Faye *et al.* (2015) concluyen que el BAP favorece la formación de más vástagos (por lo tanto mayor cantidad de nudos) aunque restringe mayormente el crecimiento en longitud mientras que la CIN no es tan eficaz en producir más vástagos pero si mejora su elongación.

La longitud de vástagos derivados de MV es una característica también a considerar para la propagación de la especie, dado que cuanto más separados estén los nudos formados se tendrá una mayor eficiencia de multiplicación. Sin embargo, hay algunos cultivares que presentaron MV con vástagos de longitudes pequeñas y por lo tanto nudos muy próximos, difíciles de separar si se quisiera escalar su propagación, por lo que amerita seguir estudiando el modo de optimizar la elongación de vástagos sin perjuicio de la regeneración de MV y de un mayor número de vástagos por explante.

Habiendo determinado la duración mínima del tratamiento de inducción con medios adicionados con 0,5 y 1 mg/ L de BAP ó 10 mg/L de CIN para alcanzar porcentajes de regeneración de MV adecuados, se decidió probar el efecto de diferentes tratamientos lumínicos sobre la regeneración *in vitro* de múltiples vástagos y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca.

3.3. Efecto del medio de cultivo y la exposición a distintos tratamientos lumínicos sobre la regeneración *in vitro* de MV y la elongación de los vástagos derivados de MV de diferentes cultivares de mandioca.

Al analizar el cv. 'Ramada Paso' no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la inducción de MV a partir de los explantes cultivados en los 3 medios seleccionados y sometidos a distintos tratamientos lumínicos ($P=0,7548$) (Figura 3.57). En general, se registraron mayores valores de regeneración de MV cuando se usó MS adicionado con 1 mg/L de BAP, independientemente de las condiciones lumínicas evaluadas, con un valor promedio de 37,5% de explantes con MV cuando se realizó la incubación en oscuridad y luz roja.

En el cv. 'MPar 75' no se observaron diferencias significativas en cuanto a la inducción de MV a partir de explantes expuestos a las diferentes condiciones de cultivo ensayadas ($P=0,5077$) (Figura 3.58). Si bien sobresale el porcentaje de explantes con MV obtenido a partir de segmentos uninodales cultivados en MS adicionado con 0,5 mg/L de BAP e incubados en luz azul, el mismo no demuestra una superioridad significativa.

Figura 3.57: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Ramada Paso' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.

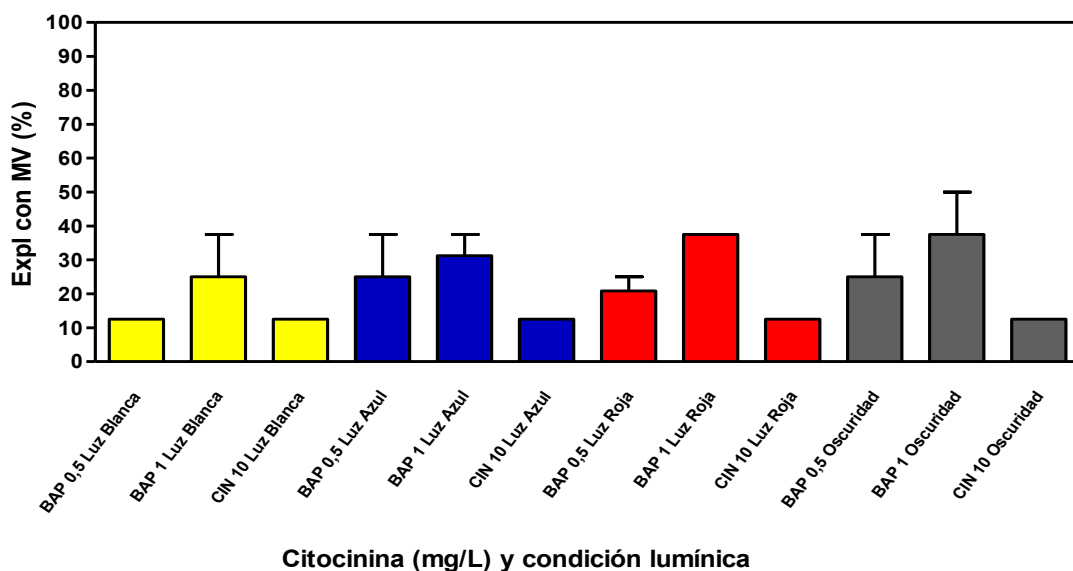
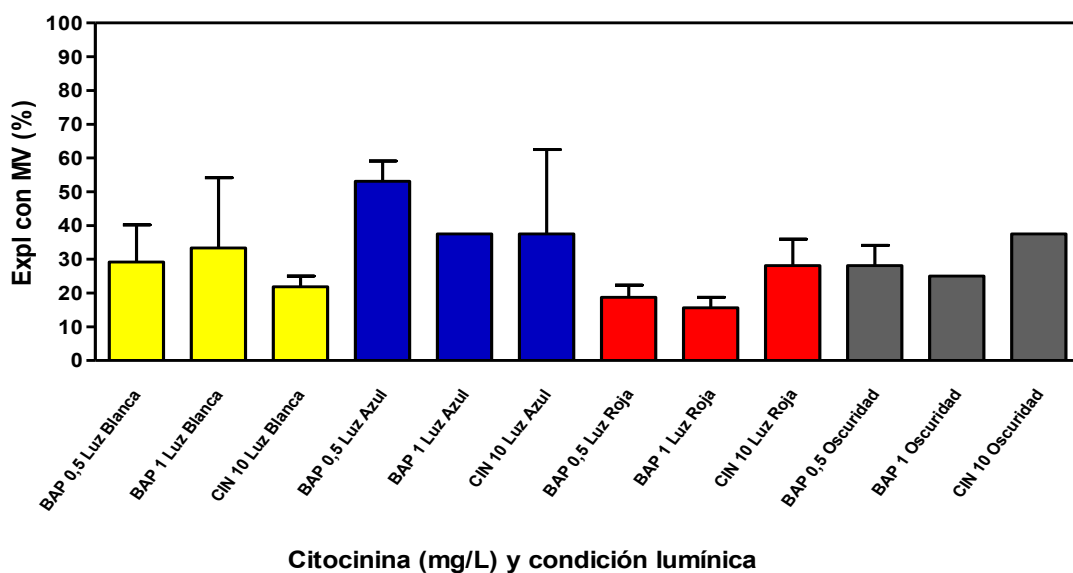
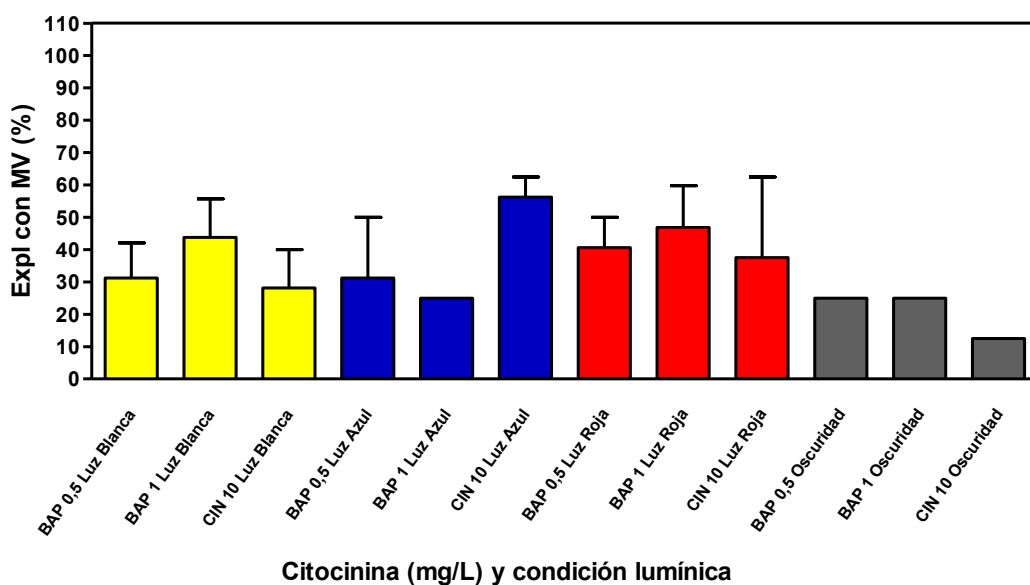


Figura 3.58: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MPar 75' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



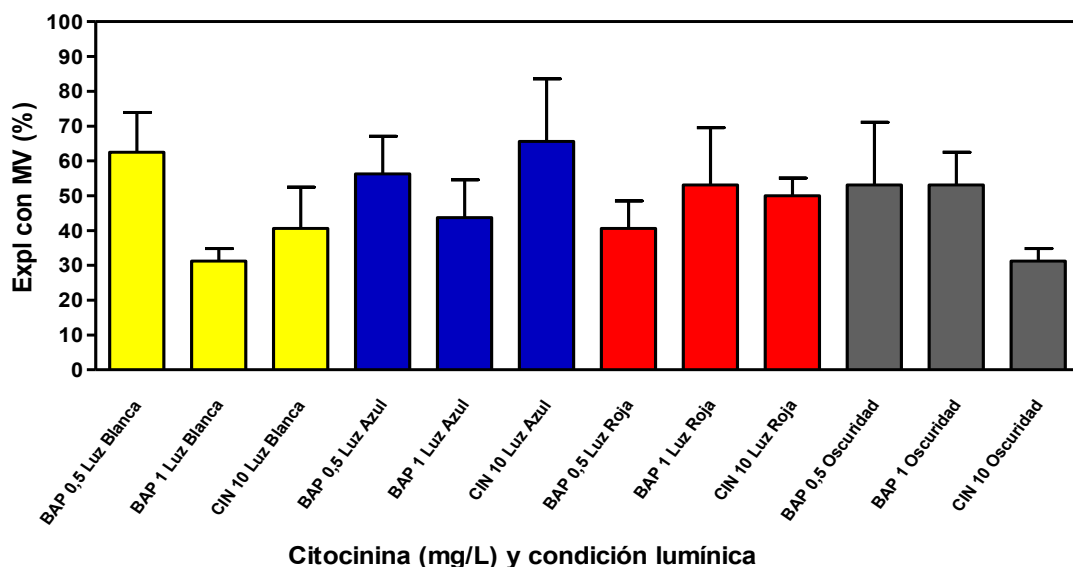
Cuando se evaluó el cv. 'Catiguá' (Figura 3.59), no se evidenciaron diferencias estadísticas respecto a la interacción entre los medios de cultivo y el tratamiento lumínico ($P=0,7296$). En este caso, el mayor porcentaje de explantes con MV se registró en el medio adicionado con 10 mg/L de CIN, incubado en luz azul, y el menor porcentaje de explantes con MV se observó en el medio adicionado con 10 mg/L de CIN en oscuridad, aunque sin establecerse diferencias estadísticas con respecto a los demás medios ni condiciones de incubación.

Figura 3.59: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Catiguá' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



Examinando los resultados obtenidos para el cv. 'IAC 12829' (Figura 3.60) se observó que la regeneración de MV no presentó diferencias significativas debidas a los medios de cultivo y condiciones lumínicas evaluadas ($P=0,7723$). En todos los tratamientos se logró un porcentaje considerable de explantes con MV, con valores que variaron entre 31,3 y 65,6%.

Figura 3.60: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'IAC 12829' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



En cuanto al cv. 'Surubim-41' (Figura 3.61), el porcentaje de explantes con MV presentó diferencias significativas entre medios de cultivo y tratamientos lumínicos ($P=0,0042$). Los mayores valores de porcentaje de MV fueron los evidenciados en MS con 0,5 mg/L de BAP y oscuridad y en MS con 10 mg/L de CIN y luz roja (con porcentajes de inducción de 80 y 75%, respectivamente), los que se diferenciaron estadísticamente de los tratamientos que combinaron el medio adicionado con 10 mg/L de CIN e incubación en luz blanca y el medio adicionado con 1 mg/L de BAP y luz roja.

En el cv. 'Santa Catarina' (Figura 3.62), al igual que en el cv. 'Surubim-41', también se obtuvieron diferencias significativas entre medios de cultivo y condiciones lumínicas ($P=0,0007$), pero en este caso fue el tratamiento con 0,5 mg/L de BAP e incubación en luz blanca el que se destacó por su capacidad para inducir la regeneración de MV (con 62,5% de explantes con MV), seguido por los tratamientos con 1 mg/L de BAP en luz azul u oscuridad (con 46,9% y 40% de explantes con MV, respectivamente).

Figura 3.61: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Surubim 41’ en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.

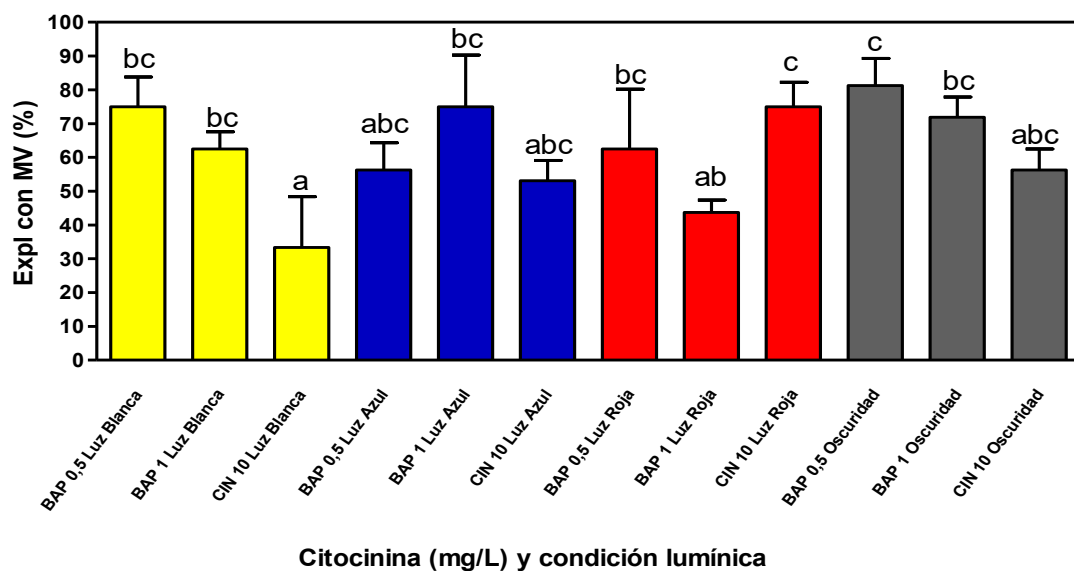
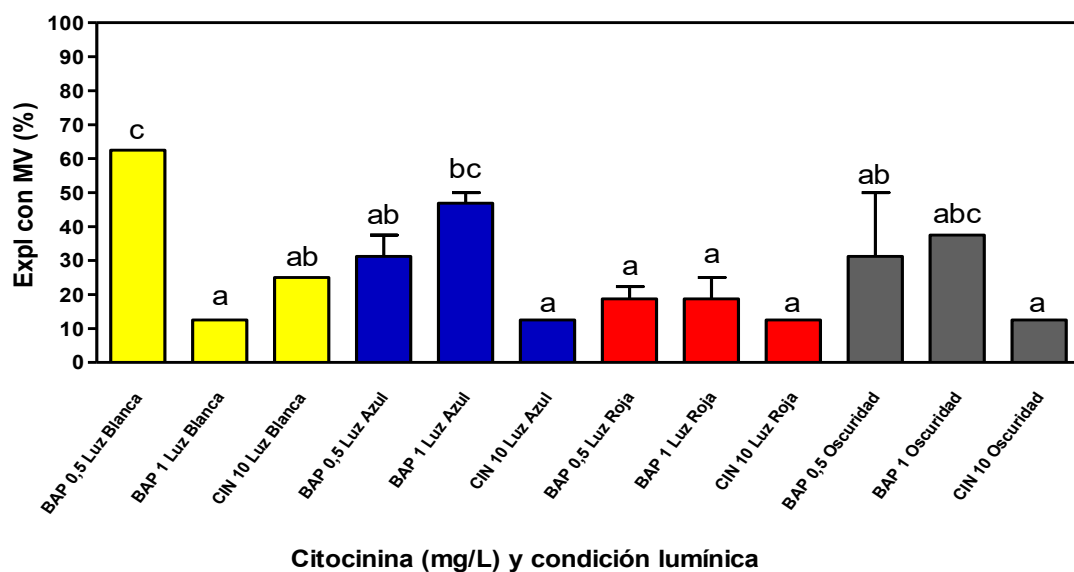


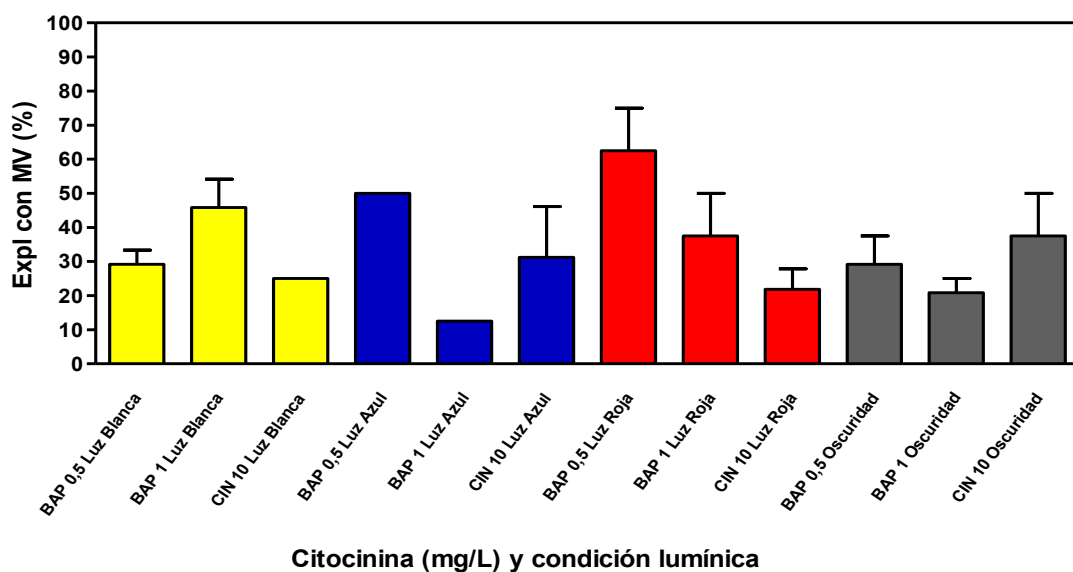
Figura 3.62: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. ‘Santa Catarina’ en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Cuando se evaluó la regeneración de MV en el cv. 'Rocha' (Figura 3.63), si bien en la mayoría de los tratamientos lumínicos pareciera que se destacan los valores alcanzados en algunos medios inductivos, no se detectaron diferencias estadísticas ($P=0,3920$). En general, los mayores porcentajes de explantes con MV se obtuvieron en los tratamientos con BAP e incubación en luz blanca, azul o roja, que oscilaron entre 45,8 y 62,5%.

Figura 3.63: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Rocha' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



De acuerdo a lo registrado con el cv. 'Amarilla' (Figura 3.64) para los distintos medios de cultivo y condiciones lumínicas evaluadas, no se produjeron diferencias significativas en cuanto a la inducción de MV ($P=0,1352$), presentando porcentajes de regeneración que oscilaron entre 12,5 y 41,7%.

En cuanto al cv. 'Palomita' (Figura 3.65), el porcentaje de explantes con MV presentó diferencias significativas entre los medios de cultivo y condiciones lumínicas ensayadas ($P=0,0002$). Los tratamientos que combinaron el medio adicionado con 1 mg/L de BAP o 10 mg/L de CIN e incubación en luz blanca, así como 10 mg/L de CIN y oscuridad fueron los que produjeron una inducción de la regeneración de MV significativamente menor. El resto de los tratamientos no se diferenciaron significativamente entre ellos, presentando ~40 y 60% de explantes con MV.

Figura 3.64: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Amarilla' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.

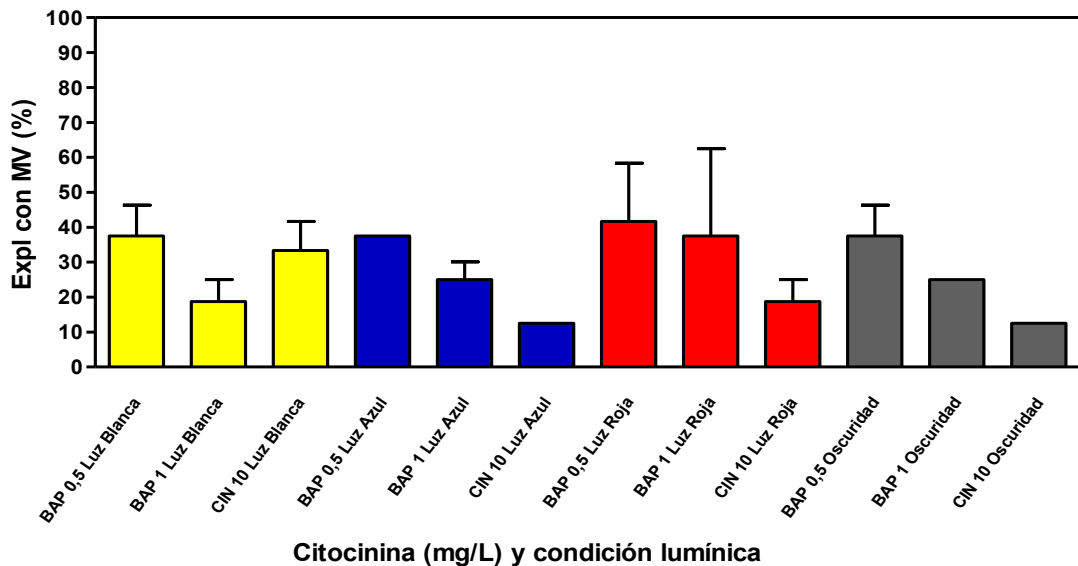
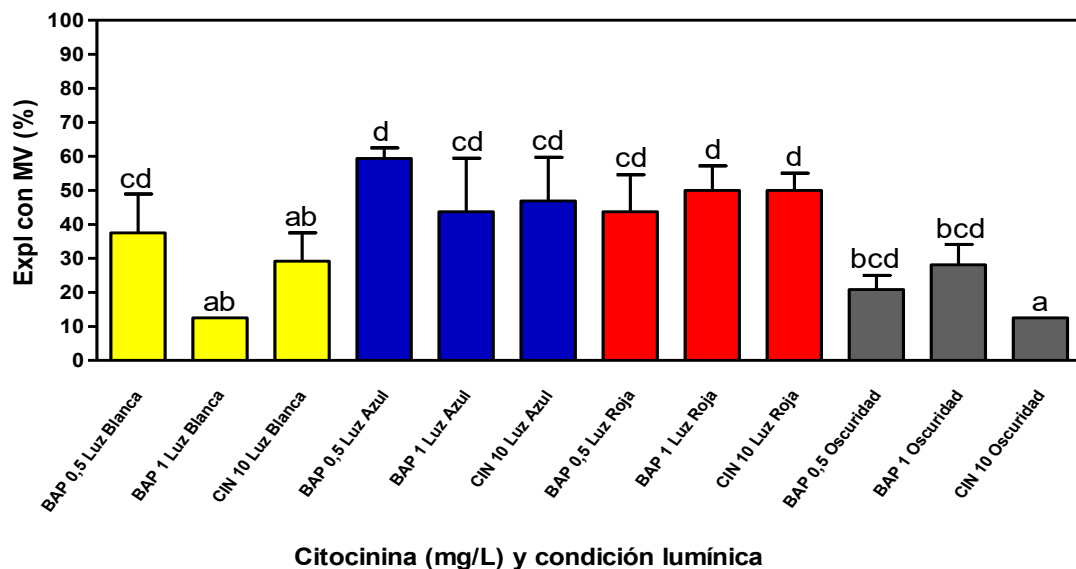


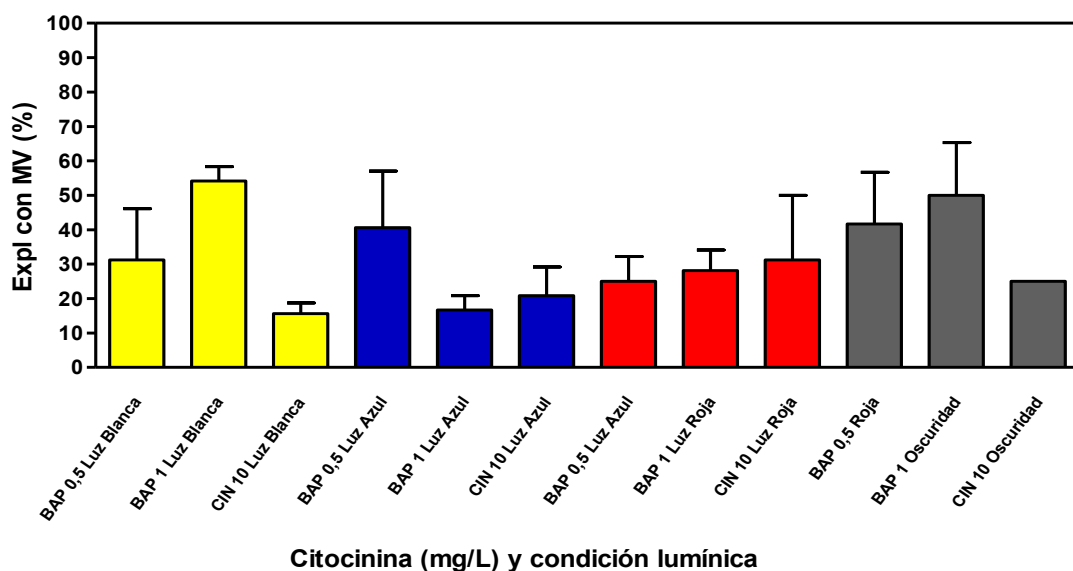
Figura 3.65: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'Palomita' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



Referencia: Letras distintas indican diferencias estadísticas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

En cuanto al cv. MCol 1505, al considerar su capacidad en la regeneración de MV en los distintos medios de cultivo y tratamientos lumínicos ensayados, no se registraron diferencias estadísticas significativas ($P=0,4456$) (Fig. 3.66), si bien se destacaron los valores obtenidos a partir de explantes cultivados en alguno de los medios suplementados con BAP e incubados tanto en luz blanca, luz azul como en oscuridad.

Figura 3.66: Regeneración de MV a partir del cultivo de segmentos uninodales de mandioca cv. 'MCol 1505' en medios suplementados con distintos tipos y concentraciones de citocininas y sometidos a diferentes condiciones lumínicas de incubación.



En resumen, teniendo en cuenta los análisis estadísticos del porcentaje de explantes con MV de los cultivares por separado, sólo en 3 de ellos se evidenciaron diferencias significativas en función de los tratamientos. En la inducción de la regeneración de MV se destacó el medio adicionado con alguna o ambas concentraciones de BAP dependiendo del cultivar. Por el contrario, debido a la gran variabilidad genotípica observada en la respuesta respecto de las condiciones lumínicas de incubación, no se pudo establecer como favorable un tratamiento lumínico en particular.

Cuando se realizó el análisis de variancia del porcentaje de explantes con MV considerando los 10 cultivares en forma conjunta, se evidenció que los 3 factores evaluados generaron diferencias significativas, así como la interacción entre cultivar vs. tratamiento lumínico.

Considerando en adelante el análisis de la varianza de los 10 cultivares juntos, el factor simple cultivar evidenció diferencias entre los materiales ($P < 0,0001$),

discriminándose 3 grupos de cultivares respecto de su capacidad para producir MV: baja (cvs. 'Ramada Paso' y 'Santa Catarina'), intermedia (cvs. 'Rocha', 'Amarilla', 'Catiguá', 'MPar 75', 'MCol 1505' y 'Palomita') y alta producción (cvs. 'IAC 12929' y 'Surubím-41'), tal como previamente se sugiere en los experimentos anteriores a esta tesis y en otros trabajos de propagación *in vitro* de mandioca (Medina *et al.*, 2017).

Respecto al factor simple medio de cultivo, se obtuvieron mayores porcentajes de explantes con MV cuando se empleó MS suplementado con BAP y, en particular, cuando se usó una concentración de 0,5 mg/L ($P < 0,0001$).

Por su parte, los tratamientos lumínicos ejercieron un efecto significativo sobre la capacidad de los explantes para formar MV ($P = 0,0117$). Cuando los segmentos uninodales fueron incubados en oscuridad disminuyó significativamente el porcentaje de explantes con MV. Sin embargo, el resto de los tratamientos lumínicos estudiados no ejercieron variaciones significativas sobre esta variable. Si bien la interacción entre el cultivar y el tratamiento lumínico manifestó un efecto significativo sobre la formación de MV, la misma sigue demostrando un fuerte efecto del genotipo como también se observó analizando los cultivares por separado. Producto de esa interacción doble se evidenciaron los mismos grupos de cultivares contrastantes mencionados anteriormente en combinación con diferentes tratamientos lumínicos ($P = 0,0153$).

Referido al número de nudos promedio por explante regenerados en diferentes medios de cultivo y sometidos a distintos tratamientos lumínicos por cultivar, se evidenciaron diferencias significativas en los cvs. 'MPar 75' y 'Santa Catarina' en el caso de VS y sólo en el cv. 'Catiguá' en el caso de MV (Tabla 3.10 y Tabla 3.11 respectivamente). En el número de nudos promedio por explante derivados de VS de los cvs. 'MPar 75' y 'Santa Catarina', si bien la mayoría de las combinaciones de medio de cultivo y tratamiento lumínico resultaron igualmente efectivos, hubo algunas que se destacaron y fueron aquellas que involucraron la adición de BAP (Tabla 13.10). En el número de nudos por explante derivados de MV del cv. 'Catiguá', si bien sobresalieron algunas combinaciones de medios y condiciones

lumínicas, sólo dos de ellas presentaron una producción de nudos significativamente más baja involucrando incubación en luz roja u oscuridad (Tabla 3.11; Figura 3.67 c y d, respectivamente).

En términos generales, se puede decir que la mayor producción de nudos en VS se obtuvo en el medio adicionado con 0,5 mg/L de BAP, independientemente del tratamiento lumínico (Tabla 3.10). En cuanto al número de nudos promedio por MV resultante de la combinación entre el medio de cultivo y el tratamiento lumínico, los medios adicionados con 0,5 mg/L de BAP o 10 mg/L de CIN e incubación en luz blanca fueron los que propiciaron los mayores valores (12,06 y 12,15 nudos, respectivamente) (Tabla 3.10). En lo que se refiere al efecto simple del tratamiento lumínico sobre la producción nudos por explante, se manifestaron los mayores valores cuando la incubación se realizó en luz blanca, tanto en VS como en MV (Tablas 3.10 y 3.11; Figura 3.67 a).

Si consideramos el número de nudos promedio por explante derivados de MV, en todos los cultivares los valores obtenidos fueron más del doble respecto de los derivados de VS. El mayor número de nudos promedio por explante derivados de MV se registró en los cv. 'Surubim-41' (12,78 nudos por MV) y el menor valor se halló en el cv. 'Ramada Paso' (8,15 nudos por MV) (Tabla 3.11), coincidiendo con lo observado en el experimento anterior en donde se estudió el efecto del medio de cultivo y el tiempo de exposición a la citocinina (Tabla 3.8).

Tabla 3.10: Número de nudos promedio por explante derivados de VS de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) regenerados en diferentes medios de cultivo y sometidos a distintos tratamientos lumínicos.

| Medio \ Cultivar | Tratamiento lumínico | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio y trat. lum. |
|-----------------------|----------------------|-------------|------------|---------|-----------|------------|----------------|-------|----------|----------|-----------|---------------------------------|
| BAP 0,5 * | Luz Blanca | 4,63 ** | 4,95 b *** | 3,92 | 5,75 | 4,18 | 3,63 abc | 4,18 | 3,70 | 5,28 | 6,53 | 4,79 |
| BAP 1 | | 4,13 | 3,60 ab | 3,03 | 5,75 | 4,72 | 3,43 abc | 4,73 | 2,70 | 3,60 | 4,83 | 4,18 |
| CIN 10 | | 3,53 | 4,65 b | 4,54 | 4,60 | 4,71 | 3,80 bc | 4,73 | 4,25 | 5,50 | 5,28 | 4,64 |
| BAP 0,5 | Luz Azul | 2,95 | 2,88 a | 3,58 | 3,68 | 3,25 | 4,25 bc | 3,30 | 3,20 | 4,33 | 4,25 | 3,57 |
| BAP 1 | | 3,00 | 3,48 ab | 3,13 | 2,90 | 3,24 | 4,13 bc | 3,28 | 2,67 | 3,25 | 3,73 | 3,15 |
| CIN 10 | | 3,75 | 3,60 ab | 3,94 | 2,85 | 3,50 | 2,00 a | 3,53 | 2,78 | 2,93 | 2,90 | 3,27 |
| BAP 0,5 | Luz Roja | 2,98 | 3,60 ab | 3,43 | 5,13 | 2,70 | 4,35 c | 2,70 | 3,00 | 4,13 | 4,10 | 3,52 |
| BAP 1 | | 3,00 | 3,15 a | 2,86 | 4,00 | 3,65 | 3,67 ab | 3,65 | 2,83 | 4,00 | 2,93 | 3,36 |
| CIN 10 | | 2,38 | 3,83 ab | 3,75 | 3,33 | 3,67 | 2,50 abc | 3,68 | 2,68 | 3,67 | 2,78 | 3,24 |
| BAP 0,5 | Oscuridad | 2,57 | 2,95 a | 2,43 | 3,20 | 2,86 | 2,78 abc | 2,85 | 2,77 | 3,35 | 2,63 | 2,83 |
| BAP 1 | | 2,35 | 4,93 b | 2,00 | 4,08 | 2,71 | 3,23 abc | 2,70 | 2,50 | 2,90 | 2,58 | 2,73 |
| CIN 10 | | 2,50 | 3,08 a | 2,25 | 3,00 | 2,67 | 4,25 bc | 2,65 | 2,65 | 2,58 | 2,88 | 2,65 |
| Promedio por cultivar | | 3,01 | 3,73 | 3,24 | 4,02 | 3,49 | 3,45 | 3,50 | 2,98 | 3,79 | 3,78 | |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan medias aritméticas.

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Tabla 3.11: Número de nudos promedio por explante derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) regenerados en diferentes medios de cultivo y sometidos a distintos tratamientos lumínicos.

| Medio \ Cultivar | Tratamiento lumínico | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio y trat. lum. |
|-----------------------|----------------------|-------------|---------|------------|-----------|------------|----------------|-------|----------|----------|-----------|---------------------------------|
| BAP 0,5 * | Luz Blanca | 9,65 ** | 14,50 | 12,00 b*** | 12,68 | 16,18 | 12,00 | 9,65 | 10,18 | 8,10 | 13,18 | 12,06 |
| BAP 1 | | 8,73 | 9,90 | 9,33 ab | 10,48 | 16,30 | 9,67 | 8,73 | 8,58 | 11,67 | 13,33 | 10,82 |
| CIN 10 | | 12,10 | 12,63 | 9,85 b | 17,05 | 10,43 | 11,50 | 12,10 | 11,60 | 10,70 | 11,25 | 12,15 |
| BAP 0,5 | Luz Azul | 8,70 | 8,50 | 8,68 b | 11,78 | 14,95 | 11,35 | 8,70 | 11,00 | 8,20 | 8,60 | 10,20 |
| BAP 1 | | 7,75 | 6,25 | 9,60 b | 10,00 | 14,25 | 10,70 | 7,75 | 8,40 | 7,75 | 10,00 | 9,21 |
| CIN 10 | | 10,50 | 8,45 | 10,90 ab | 13,73 | 12,30 | 7,00 | 10,50 | 7,00 | 9,15 | 7,90 | 9,61 |
| BAP 0,5 | Luz Roja | 7,30 | 7,53 | 10,34 ab | 10,33 | 15,25 | 8,13 | 7,30 | 7,85 | 7,35 | 10,38 | 9,04 |
| BAP 1 | | 5,00 | 8,00 | 6,50 a | 11,00 | 14,38 | 12,17 | 5,00 | 6,93 | 8,58 | 14,67 | 9,52 |
| CIN 10 | | 7,90 | 12,23 | 19,20 ab | 14,33 | 12,93 | 7,00 | 7,90 | 7,50 | 9,55 | 10,23 | 9,95 |
| BAP 0,5 | Oscuridad | 7,00 | 7,10 | 10,17 ab | 6,65 | 9,45 | 7,75 | 7,00 | 8,20 | 5,00 | 8,87 | 7,45 |
| BAP 1 | | 6,33 | 13,50 | 14,00 b | 9,50 | 9,65 | 8,70 | 6,33 | 11,00 | 7,93 | 6,40 | 8,82 |
| CIN 10 | | 8,30 | 10,70 | 7,00 a | 8,25 | 7,30 | 7,00 | 8,30 | 7,00 | 5,00 | 7,50 | 7,71 |
| Promedio por cultivar | | 8,15 | 9,94 | 10,63 | 11,31 | 12,78 | 9,41 | 8,27 | 8,77 | 8,25 | 10,19 | |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan medias aritméticas

*** Letras distintas indican diferencias estadísticas en la columna para cada cultivar según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Cuando se realizó el análisis de variancia del número de nudos promedio por explante considerando los 10 cultivares juntos, se observó que los 3 factores simples evaluados generaron diferencias significativas, así como la interacción entre cultivar vs. tratamiento lumínico. Es importante mencionar que los valores promedio de las variable que se mencionan a continuación, muestran pequeñas variaciones respecto de los presentados en las Tablas 3.10 y 3.11, lo cual se debe a la naturaleza del cálculo que contempla todos los factores en forma integral, manifestando tendencias similares.

El número de nudos por explante, derivados tanto de VS como de MV, fue afectado por el cultivar ($P < 0,0001$). En el caso del número de nudos derivados de VS se destacaron los cvs. 'MPar 75', 'MCol 1505' y 'Palomita' (3,72-3,79 nudos por VS), en contraste, los cvs. 'Amarilla', 'Catiguá' y 'Ramada Paso' presentaron los menores valores (2,98-3,24 nudos por VS), demostrando una tasa de multiplicación promedio similar a lo informado por Medina *et al.* (2017). Referido a los nudos derivados de MV por explante, en los cvs. 'Surubím-41' e 'IAC 12829' (13,38 y 11,84 nudos por MV) se registraron en mayor número y en menor cantidad en el cv. 'Ramada Paso' (8,8 nudos por MV), obteniéndose en promedio 9,4 nudos por MV en el resto de cultivares. Cabe destacar que los medios y el tiempo de exposición empleados en este experimento resultaron seleccionados como los que propiciaban una mayor multiplicación vía MV, y eso probablemente hizo que la diferencia entre nudos formados en VS y MV se maximizara lográndose una duplicación del número de nudos por explante en todos los cultivares, incluso llegando a ser más del triple en los cvs. 'Catiguá' y 'Surubim-41'.

Con respecto al efecto del medio de cultivo, la adición de BAP demostró la mayor habilidad para promover una mayor producción de nudos derivados de MV por explante, independientemente de la concentración utilizada ($P = 0,0006$). No se evidenciaron diferencias en la producción de nudos derivados de VS por explante debidas al medio de cultivo ($P = 0,1047$). La interacción cultivar vs. medio de cultivo resultó estadísticamente significativa tanto para el número de nudos derivados de VS ($P = 0,0292$) como de MV ($P = 0,0206$). Si bien se destacaron algunas

combinaciones de cultivar y medio de cultivo, en la mayoría de los cultivares resultó indistinto el empleo de medios adicionados con BAP ó CIN en la promoción de la formación de nudos por explante derivados de VS o MV, observándose de nuevo la supremacía de algunos cultivares (*i.e.* 'Surubím-41' e 'IAC 12829').

Los tratamientos lumínicos que resultaron estadísticamente contrastantes respecto a la formación de nudos derivados de VS y MV, fueron la exposición a luz blanca y a la oscuridad ($P < 0,0001$). La luz blanca promovió el mayor número de nudos derivados de VS (4,4 nudos) y de MV por explante (11,6 nudos); sin embargo, la oscuridad resultó depresiva, disminuyendo la formación de nudos tanto en explantes que diferenciaron VS (2,7 nudos) como MV (8,5 nudos). Por su parte, la incubación de los explantes en luz blanca y en luz azul resultó en un número de nudos promedio derivados de MV estadísticamente similares, no hallándose diferencias significativas entre estos tratamientos (Figura 3.67 a y b, respectivamente). Respecto de los nudos derivados de VS por explante, la interacción medio de cultivo vs. tratamiento lumínico muestra que la luz blanca primó en su efecto promotor de la multiplicación, independientemente de la citocinina adicionada al medio nutritivo ($P = 0,0296$).

Los valores de longitud promedio de vástagos derivados de MV de 10 cultivares de mandioca sometidos a diferentes medios de cultivo y condiciones lumínicas durante la incubación se pueden observar en la Tabla 3.12.

Cuando se realizaron los análisis estadísticos por cultivar, en ninguno de los casos se hallaron diferencias significativas en la longitud promedio de vástagos derivados de MV.

Tabla 3.12: Longitud promedio de vástagos derivados de MV de 10 cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) regenerados en diferentes medios de cultivo y sometidos a distintos tratamientos lumínicos.

| Medio \ Cultivar | Tratamiento lumínico | Ramada Paso | MPar 75 | Catiguá | IAC 12829 | Surubim-41 | Santa Catarina | Rocha | Amarilla | Palomita | MCol 1505 | Promedio por medio y trat. lum. |
|-----------------------|----------------------|-------------|---------|---------|-----------|------------|----------------|-------|----------|----------|-----------|---------------------------------|
| BAP 0,5 * | Luz Blanca | 1,93 ** | 3,50 | 1,81 | 2,95 | 5,55 | 1,54 | 1,61 | 1,50 | 1,58 | 2,82 | 2,54 |
| BAP 1 | | 1,85 | 1,48 | 1,23 | 2,52 | 6,39 | 1,43 | 1,51 | 1,01 | 2,17 | 1,70 | 2,13 |
| CIN 10 | | 1,15 | 2,34 | 1,53 | 3,62 | 2,50 | 1,40 | 2,39 | 1,89 | 2,04 | 1,45 | 2,03 |
| BAP 0,5 | Luz Azul | 1,68 | 1,19 | 1,54 | 2,46 | 6,54 | 2,18 | 1,08 | 1,17 | 1,56 | 2,39 | 2,18 |
| BAP 1 | | 0,74 | 1,33 | 0,85 | 2,30 | 4,78 | 1,66 | 0,60 | 1,09 | 1,60 | 2,08 | 1,70 |
| CIN 10 | | 1,30 | 2,47 | 3,50 | 3,75 | 4,60 | 0,56 | 1,87 | 1,05 | 2,04 | 1,33 | 2,25 |
| BAP 0,5 | Luz Roja | 0,70 | 2,31 | 1,71 | 6,29 | 13,85 | 1,48 | 2,50 | 5,08 | 2,33 | 4,19 | 4,04 |
| BAP 1 | | 1,33 | 1,05 | 1,50 | 4,82 | 8,45 | 1,78 | 1,38 | 1,18 | 1,68 | 1,75 | 2,49 |
| CIN 10 | | 0,60 | 1,59 | 1,72 | 5,54 | 4,82 | 0,70 | 1,82 | 0,83 | 1,93 | 1,02 | 2,06 |
| BAP 0,5 | Oscuridad | 2,38 | 2,80 | 2,60 | 2,69 | 11,99 | 1,49 | 2,70 | 2,28 | 2,57 | 1,59 | 3,31 |
| BAP 1 | | 1,28 | 6,45 | 2,50 | 3,38 | 9,10 | 3,17 | 2,43 | 5,65 | 2,60 | 1,40 | 3,79 |
| CIN 10 | | 0,90 | 2,53 | 0,90 | 3,10 | 3,17 | 0,70 | 1,35 | 0,90 | 1,20 | 0,80 | 1,56 |
| Promedio por cultivar | | 1,26 | 2,42 | 1,78 | 3,62 | 6,81 | 1,51 | 1,77 | 1,97 | 1,94 | 1,88 | |

* La concentración de los reguladores de crecimiento están expresadas en mg/L.

** Se presentan medias aritméticas

Cuando se compararon todos los cultivares juntos en relación a los medios de cultivo y condiciones lumínicas de incubación evaluadas se hallaron diferencias en los factores simples y sus interacciones.

La longitud de vástagos derivados de MV demostró variaciones muy significativas debidas al genotipo ($P < 0,0001$), destacándose por su mayor altura, los vástagos de los cvs. 'Surubím-41' e 'IAC 12829' y por su menor altura principalmente los del cv. 'Ramada Paso'. Además, los vástagos derivados de MV fueron más altos cuando procedieron de medios adicionados con BAP a una concentración de 0,5 mg/L ($P < 0,0001$), como se observa también si se considera la interacción cultivar vs. medio de cultivo ($P = 0,0009$).

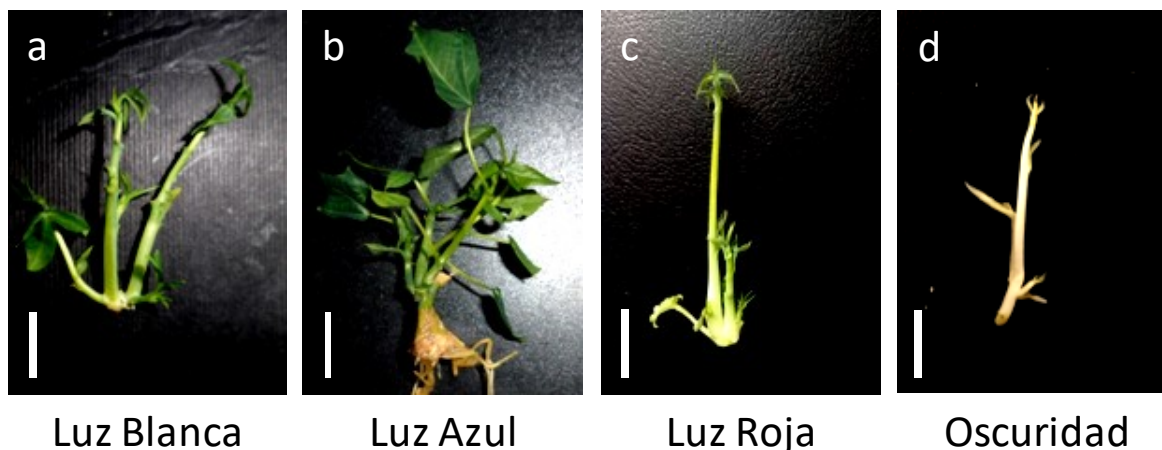
El tratamiento lumínico empleado durante la incubación de los explantes no influyó significativamente en la elongación de los vástagos derivados de MV ($P = 0,0645$). Al cotejar el efecto del medio de cultivo vs. tratamiento lumínico en la longitud de vástagos derivados de MV se registraron diferencias significativas ($P < 0,0001$). Las duplas constituidas por un medio adicionado con BAP e incubación en luz roja fue la más beneficiosa para la elongación de los vástagos provenientes de MV, si bien

resultó auspicioso también la posibilidad de cultivar en un medio con BAP e incubar en oscuridad (Figura 3.67 c y d, respectivamente).

La interacción entre cultivar, medio de cultivo y tratamiento lumínico no evidenció diferencias significativas cuando se evaluó la longitud de vástagos derivados de MV ($P=0,8227$).

En la Figura 3.67 a-d se ilustra, el aspecto de los MV derivados de explantes cultivados en un medio de inducción adicionado con 0,5 mg/L de BAP y que fueron sometidos a diferentes condiciones lumínicas. Si bien las fotografías corresponden a diferentes cultivares de mandioca, la intención es mostrar a modo de ejemplo la apariencia que adquirirían los vástagos en relación a la promoción o inhibición de la diferenciación de MV o de la formación de nudos y sobre la elongación de los vástagos en respuesta al tratamiento lumínico. Nótese que el explante sometido a oscuridad, aparte de regenerar un vástago etiolado y blanquecino, presenta brotes denotando la ruptura de la dominancia apical (Figura 3.66 d), pero no como se observa en los explantes sometidos al resto de los tratamientos lumínicos que forman MV típicos (Figura 3.67 a, b y c).

Figura 3.67: Aspecto de MV obtenidos por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) en MS + 0,5 mg/L BAP incubados en diferentes condiciones lumínicas.



Referencias: Múltiples vástagos obtenidos en medio adicionado con MS + 0,5 mg/L de BAP, incubados bajo diferentes condiciones lumínicas: luz blanca (a), luz azul (b), luz roja (c) y oscuridad (d). Barras = 1 cm.

La regeneración de vástagos, como ya se ha mencionado anteriormente, es un proceso fisiológico que está determinado por factores intrínsecos y extrínsecos, entre ellos la composición de los medios nutritivos, incluida la adición de reguladores de crecimiento, las condiciones lumínicas de incubación y su interacción (Rikiishi *et al.*, 2003, 2008, 2015).

En esta parte de la tesis, evaluando de modo conjunto los 10 cultivares de mandioca, se volvió a evidenciar una fuerte influencia del genotipo sobre la regeneración de MV. Respecto al factor medio de cultivo, se confirma que resulta muy favorable para la inducción de MV, el empleo de MS suplementado con BAP, en particular a una concentración de 0,5 mg/L. Si bien la interacción entre el cultivar y el tratamiento lumínico reveló un efecto significativo sobre la formación de MV, se evidencia una fuerte dependencia del genotipo como se observara examinando los cultivares por separado. Si bien se sigue denotando una fuerte influencia genotípica sobre la producción de nudos por explante, en todos los

cultivares se duplicó y hasta se triplicó, cuando se compararon VS y MV. Si bien el efecto de la interacción cultivar vs. medio de cultivo arrojó diferencias significativas, las mismas se relacionaron estrechamente a la capacidad intrínseca de los genotipos en multiplicarse. Cuando sólo se considera el efecto simple del medio de cultivo resultó más claro que la adición de BAP favorece una mayor producción de nudos derivados de MV por explante respecto de CIN, independientemente de la concentración evaluada. Referente a la longitud de vástagos derivados de MV la misma también evidenció variaciones debidas al genotipo. La altura de los vástagos derivados de MV fue superior cuando la inducción fue efectuada en un medio adicionado con 0,5 mg/L de BAP, como demostrara el análisis del factor medio de cultivo como el de su interacción con el genotipo.

La eficiencia de la regeneración de vástagos o brotes se ha demostrado que presenta una gran variación genotípica, incluso entre cultivares de una especie (Zhang *et al.*, 1999; Rikiishi *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2017). Es un proceso que está controlado por múltiples genes (Mano *et al.*, 1996; Rikiishi *et al.*, 2003), razón por la cual la variabilidad genotípica observada podría estar relacionada a pequeñas variaciones en genes constitutivos o reguladores relacionados.

Por otra parte, análisis genómicos también revelaron que varios genes y factores clave, relacionados con la señal hormonal en la vía de transducción, están involucrados en la regulación de la regeneración de vástagos en *Arabidopsis* (Cary *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2002; Che *et al.*, 2007). De hecho, se han asociado QTL (Quantitative Trait Loci) que controlan la regeneración de vástagos en monocotiledóneas (Takeuchi *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2005; Ben *et al.*, 1997; Mano y Komatsuda, 2002; Tyagi *et al.*, 2010) y dicotiledóneas (Trujillo-Moya *et al.*, 2011; Holme *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2000). Los reguladores de crecimiento vegetal (incluidas las fitohormonas y sus análogos sintéticos) tienen un papel fundamental para promover determinadas respuestas morfogénicas, entre estas la proliferación de MV, incrementando el potencial de propagación de la especie. Las citocininas (C) son un grupo de reguladores de crecimiento, derivados de purinas o de la urea, caracterizado por su fuerte

potencial en estimular divisiones celulares y que dependiendo de la proporción que se encuentre en relación al grupo de las auxinas (A) son capaces de promover o inhibir diferentes procesos como ser la multiplicación de vástagos (C/A muy alta), diferenciación de yemas axilares y formación de yemas adventicias (C/A alta), formación de callos (C=A) o rizogénesis adventicia (C/A baja) (Kamenetsky y Okubo, 2013). En relación a la regeneración de MV en mandioca, Faye *et al.* (2015) determinó que el agregado de BAP y CIN, al medio de cultivo, en un rango de 0,1 a 1 mg/L resultan eficaces en la inducción para diferentes cultivares. Esto coincide en parte con los resultados de esta tesis, ya que para promover eficazmente la regeneración de MV, las concentraciones más promisorias de BAP son coincidentes, sin embargo las de CIN son entre diez y cien veces menores. Por otra parte, Abd All *et al.* (2013) obtuvieron el máximo número de vástagos por explante en mandioca con MS más 1 mg/L de BAP y 0,05 mg/L ANA al cual lo denominaron medio de proliferación (C/A muy alta). Sukmadjaja y Widhiastuti (2011) también registraron una interacción entre cultivar y medio de cultivo, ya que tanto para el número de vástagos por explante y el número de nudos por explante observaron que cada cultivar evaluado presentaba un medio de multiplicación adecuado consistente en la adición de BAP (0,1, 1 y 5 mg/L) sólo o combinado con TDZ (0,1 y 1 mg/L). Smith *et al.*, (1986) reportaron el mayor porcentaje de explantes con MV empleando MS adicionado con 0,25 o 0,5 mg/L de BAP más 0,05 mg/L de ANA (C/A alta a muy alta), sin embargo la mayor eficiencia de multiplicación la registraron cuando la concentración de BAP fue de 0,25 mg/L y la mayor altura de vástagos derivados de MV usando MS con 0,125 mg/L de BAP más 0,05 mg/L de ANA aunque muy baja regeneración de MV (menor al 10%). En *Myrtus communis*, Cioć *et al.* (2018) informaron que la regeneración de vástagos fue similar en medios que contenían BAP en concentraciones de 0,25, 0,5 y 1 mg/L, pero fueron más altos en medios con 0,25 y 0,5 mg/L de BAP, y producían una mayor cantidad de hojas (y por extensión de nudos) con un mayor peso si provenían de un medio con 1 mg/L de BAP.

Para los vegetales, la luz es un factor morfogénico fundamental. Es así que todas sus propiedades (intensidad, duración y calidad) pueden influenciar el crecimiento y el desarrollo de las plantas a través de la movilización de mecanismos anabólicos o catabólicos o el transporte de reguladores de crecimiento endógenos o aplicados exógenamente.

De acuerdo al tratamiento lumínico o a la composición espectral empleada, se estimulan o inhiben en el vegetal diferentes procesos fisiológicos. Las necesidades básicas de luz de las plantas residen en tres rangos los cuales son responsables de la fotosíntesis, el fototropismo y la fotomorfogénesis, respectivamente (Toledo Velásquez, 2004). La fotosíntesis requiere luz en la vecindad de los picos de absorción de las clorofilas a y b (662 nm y 642 nm, respectivamente), las cuales son los pigmentos fotosintéticos más importantes. Los procesos fototrópicos, que controlan el movimiento de los órganos en respuesta a la luz y aseguran la optimización de las reacciones biofísicas y bioquímicas, son desencadenados por la luz con longitudes de onda de 400-500 nm. Finalmente, la fotomorfogénesis que abarca desde procesos de síntesis de pigmentos hasta fenómenos de desarrollo vegetal, depende de la radiación rojo lejano en el rango de 730-735 nm.

Cabe mencionar que en la mayoría de los trabajos de propagación *in vitro* de mandioca, se han utilizado condiciones ambientales similares y que responden a los empleados rutinariamente en la especie consistente en el uso de luz blanca fría provista por lámparas fluorescentes con diferentes fotoperiodos de 13 a 24 hs de iluminación y temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, por lo que para el desarrollo de esta tesis se creyó necesario investigar al menos un factor ambiental como ser las condiciones lumínicas de incubación y su interacción con el medio de cultivo en relación a la reacción de diferentes cultivares sobre parámetros de multiplicación y, en particular, sobre la elongación de vástagos, tal como se ha estudiado en otras especies y escasamente en mandioca.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la oscuridad resultó depresiva para la diferenciación de MV en mandioca, no manifestándose diferencias significativas sobre la misma cuando los explantes fueron incubados

en luz blanca, azul o roja. La misma acción inhibitoria de la oscuridad sobre la diferenciación de MV se observó sobre la formación de nudos por explante. Existen referencias de que la oscuridad y la luz roja inhiben el crecimiento de yemas adventicias derivadas de callos, aunque promueven la inducción y la proliferación de callos con capacidades morfogénicas (Hvoslef-Eide y Munster 1999; Bach y Krol, 2001). También se observó que el tipo de luz puede interactuar con el balance de los diferentes carbohidratos en el medio nutritivo y así afectar la diferenciación y el crecimiento de vástagos adventicios. En relación a esto dependiendo de la naturaleza de la fuente carbonada del medio de cultivo, la luz roja y la oscuridad afectarían negativa o positivamente la formación de yemas, habiéndose demostrado que la sacarosa en interacción con sendas condiciones lumínicas de incubación la inhibieron (Bach *et al.*, 1992). Por otra parte, en la revisión de Leduc *et al.* (2014) citan que, en muchas especies, el crecimiento de los brotes está modulado por la intensidad de la luz. Por ejemplo, en especies herbáceas se ha informado que la luz de baja intensidad causa disminución de la producción de múltiples tallos o macollos y, por el contrario, la luz de alta intensidad estimula la ramificación en varios arbustos y árboles. Incluso en *Rosa sp.* se ha citado que la oscuridad inhibe por completo la actividad organogénica del meristema apical caulinar y la expansión de las hojas preformadas (Girault *et al.*, 2008).

Con relación al efecto del tratamiento lumínico sobre la producción de nudos de mandioca se notó que la incubación de los explantes en luz blanca y en luz azul resultó en la promoción de un número similar de nudos promedio derivados de MV. En forma particular, se sabe que la luz azul estimula el crecimiento de yemas adventicias y de vástagos a partir de meristemas preexistentes y propicia su multiplicación en *Hyacinthus* (Bach y Swiderski, 2000), sin embargo, en *Myrtus communis* mejora su crecimiento pero disminuye su tasa de multiplicación (Cioć *et al.*, 2018). Es de destacar que tanto los valores de la tasa de multiplicación, la longitud y el crecimiento de vástagos de *Myrtus communis* fueron similares estadísticamente cuando la incubación se realizó con luz azul o luz blanca control

(Cioć *et al.*, 2018). Congruente con esto, la luz blanca empleada como control en los experimentos realizados en esta tesis fue la denominada luz día y por lo tanto, considerando que cuanto más blanca es la luz, mayor es el componente del azul que contiene, se podría esperar que ambos tratamientos (luz día y luz azul) afecten los procesos morfogénicos de forma similar. En Wilson *et al.* (1993) se sugiere que el uso de lámparas fluorescentes de amplio espectro (es decir luz blanca) puede aportar longitudes de onda en el rango del azul en forma significativa.

El efecto simple del tratamiento lumínico no ejerció una influencia significativa sobre la elongación de vástagos a diferencia del efecto que demostró la interacción entre medio de cultivo y el tratamiento lumínico. En este caso, el cultivo de explantes en medio con BAP e incubados en luz roja o en oscuridad favorecieron la elongación de los vástagos. Hunter y Burrit (2003) han sugerido que la calidad espectral puede afectar el metabolismo de citocininas, es decir que su aplicación exógena en combinación con determinadas condiciones lumínicas podría causar respuestas morfogénicas diferenciadas. Acerca de la elongación de vástagos, los resultados de la presente tesis evidenciaron que si bien los tratamientos lumínicos fueron indistintos, cuando se los analizó en interacción con el medio de cultivo se halló que la adición de BAP favoreció la misma cuando los explantes se incubaron en luz roja u oscuridad. Medina (2010) trabajando con mandioca, observó que la incubación en oscuridad y luz roja produce un aumento significativo de la longitud de vástagos comparado con la incubación en luz blanca o azul, siempre que los explantes fueran cultivados en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento. La mencionada diferencia no fue significativa cuando los explantes fueron cultivados en medios con BAP y ANA.

Existen trabajos sobre la multiplicación, morfogénesis y crecimiento del vástago en especies vegetales que han considerado la acción de numerosos factores tales como el efecto de la calidad espectral y distintos fotoperiodos en la incubación, el genotipo, el tipo de explante, los medios de cultivo y sus interacciones.

En un esfuerzo por mejorar la micropropagación de un híbrido de *Vitis*, Chée *et al.* (1989) investigaron la multiplicación y la rizogénesis de vástagos en respuesta al tipo de explante y las condiciones de incubación. Los tratamientos lumínicos considerados fueron luz blanca de diversas distribuciones de irradiancia espectral, luz azul, luz roja, en dos fotoperíodos (10 y 16 horas de luz) y explantes con hojas y/o ápices del explante o desprovisto de ellos. En luz blanca y días cortos, la remoción de hojas y/o ápices no afectó la multiplicación de vástagos; sin embargo, se produjeron más vástagos de al menos tres nudos cada uno cuando se retuvieron las hojas. La multiplicación de vástagos fue significativamente mayor en azul que en rojo. Las diferencias en la multiplicación de vástagos en luces blancas de varias distribuciones de irradiación espectral se atribuyeron a las diferencias en las relaciones entre azul y rojo. La multiplicación de vástagos fue mayor con relaciones de 0,6 a 0,9 que con relaciones más bajas y más altas.

Wilson *et al.* (1993) demostraron para todos los cultivares de *Solanum tuberosum* evaluados que las longitudes de vástagos después de 4 semanas de cultivo en medio MS, fueron más largos cuando fueron mantenidos bajo lámparas de sodio a baja presión (que son deficientes en luz azul), seguido de luz roja, la combinación de sodio de baja presión más lámparas fluorescentes de color blanco frío, luz blanca control y luz azul (en ese orden descendente). En relación a la elongación de vástagos, la luz blanca control empleada en ese experimento produjo prácticamente los mismos efectos de la luz azul. Estudios microscópicos revelaron que las células de los vástagos derivados de ambientes con luz azul o luz blanca control fueron más cortas, y en ambientes con luz roja o lámparas de sodio de baja presión fueron más largas. El número de vástagos axilares más alto se obtuvo con lámparas de sodio de baja presión o la combinación de sodio de baja presión más lámparas fluorescentes de color blanco frío, mientras que el número más bajo ocurrió con luz azul. Los resultados sugieren que la morfología y el crecimiento *in vitro* de los vástagos de papa puede controlarse modificando la calidad espectral irradiante.

Moon *et al.* (2006) observaron en vástagos de *Tripterospermum japonicum* que la elongación se estimuló cuando la incubación se realizó en luz roja y se inhibió cuando se la llevó a cabo con luz azul en relación al control luz blanca.

Según Heo *et al.* (2006), la elongación *in vitro* de vástagos de un híbrido interespecífico de *Vitis* cultivado en MS libre de reguladores de crecimiento, fue significativamente estimulada por luz roja e inhibida fuertemente por la combinación de luz roja y azul (50% de cada una) en relación a la luz blanca y azul monocromática, sin modificar significativamente el número de nudos por explante. El mayor peso seco de vástagos obtenidos *in vitro* se obtuvo cuando la incubación se realizó en luz blanca.

Poudel *et al.*, (2008), estudiando un híbrido de *Vitis* evidenció que cuando los explantes eran cultivados bajo luz roja y medio MS libre de reguladores de crecimiento, producían vástagos más largos con entrenudos más largos para todos los genotipos estudiados. Además reportaron que el número de vástagos por explante regenerados era similar en todos los tratamientos lumínicos (luz blanca, roja y azul).

Werbrouck *et al.* (2012) observaron que en *Ficus benjamina* la presencia de luz azul en el espectro, en general, estimuló el incremento en el número de nudos, pero redujo la longitud de los vástagos. Bajo luz roja, los explantes produjeron menor número de vástagos pero más elongados. El rojo lejano tuvo un efecto negativo sobre la producción de biomasa con reducción del número de vástagos y peso de los MV.

Cioć *et al.* (2018) estudiaron la influencia de la calidad de la luz en la incubación y la adición de citocininas incorporadas al medio de cultivo sobre la multiplicación y el crecimiento *in vitro*, fotosíntesis y composición química de vástagos de *Myrtus communis*. Para ello diseñaron, un experimento en donde combinaron diferentes tratamientos lumínicos (100% luz azul, una mezcla de 70% luz roja y 30% luz azul y 100% luz roja) comparando con luz blanca provista con lámpara fluorescente tradicional a modo de control y distintos medios de cultivo (MS adicionado con 0,25, 0,5 1 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de ANA). La incubación en luz roja y medio con 1 mg/L de BAP resultó en la mayor tasa de multiplicación. Los vástagos más

altos se obtuvieron incubando los explantes con luz roja y una baja concentración de BAP (0,25 mg/L). El peso fresco de los vástagos fue mayor cuando la iluminación contenía luz azul (*i.e.* azul sólo o en combinación con luz roja).

Estos ejemplos, muestran que aún existen dificultades para identificar la importancia relativa de cada tratamiento lumínico y el hecho de que la calidad de luz y el tiempo de exposición a la misma sean inductores de las respuestas de propagación vegetativa observadas es sujeto de numerosas discusiones y debate. No obstante, los resultados presentados en esta tesis, sugieren que la incubación en el tratamiento con oscuridad provocó una menor diferenciación de MV en mandioca y, así como la exposición a luz roja, en general no se destacaron en favorecer la producción de nudos por explante vía MV, aunque ambas revelen un aumento de la longitud de vástagos en medios con BAP, no serían de elección si se quisiera mejorar la propagación de la especie por esta vía organogénica.

Si se tuviera que recomendar una condición lumínica, en términos de inducción y multiplicación vía MV, consistiría en continuar empleando la luz blanca usada de rutina para la incubación de los cultivos, sin descartar el uso de la luz azul.

Será necesario entonces seguir explorando otras alternativas para optimizar la elongación, sin perjuicio de la eficiencia de la propagación.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones generales:

Mediante el desarrollo de esta tesis se generó información valiosa y novedosa sobre la capacidad organogénica de diferentes cultivares de mandioca vía múltiples vástagos. Para ello, se sometieron segmentos uninodales a diferentes medios de cultivo, adicionados con distintas fuentes y concentraciones de citocininas y en tiempos de inducción variables, así como a diferentes condiciones lumínicas de incubación.

Se acepta la hipótesis donde se plantea que la multiplicación *in vitro* de mandioca puede optimizarse con la regulación de factores intrínsecos y extrínsecos para obtener un sistema de micropropagación masiva de plantas, vía inducción de múltiples vástagos.

Esta afirmación se basa en las siguientes conclusiones por experimento.

Se determinaron las condiciones óptimas necesarias para la propagación in vitro de mandioca, utilizando la vía de regeneración organogénica directa por inducción de MV, aplicable a diferentes genotipos de interés para la agricultura del NEA.

- Teniendo en cuenta la eficacia de los medios con citocininas en inducir la ruptura de la dominancia apical y diferenciar MV expresado como porcentaje de explantes con MV, los resultados obtenidos en el Experimento 1 demuestran que los medios adicionados con una citocinina, ya sea 0,5 o 1 mg/L de BAP o bien 5 o 10 mg/L de CIN, fueron los que permitieron que el 100% de los cultivares respondan positivamente. En particular, los porcentajes de explante con MV más altos se obtuvieron cuando se emplearon medios con BAP. Asimismo, los vástagos derivados de MV regenerados en los medios de inducción mencionados, demostraron una adecuada capacidad de enraizamiento y crecimiento.

- La regeneración de VS fue factible en todos los medios evaluados, por lo tanto, hubo producción de nudos por explante en todos los casos, sin embargo, la

posibilidad de diferenciar MV aunque sea en un determinado porcentaje siempre mejoró la cantidad de nudos por explante, sobre todo en algunos medios de cultivo. A los 40 días de cultivo, teniendo en cuenta los valores promedio por cultivar, el 100% de los cultivares al menos duplicó el número de nudos por explante cuando se compararon los MV respecto de los VS.

- Si bien una de las respuestas morfogénicas más comunes fue la diferenciación de callos en la parte basal de los segmentos uninodales empleados como explantes, en todos los cultivares de mandioca y en todos los medios suplementados con citocininas, su producción al no estar relacionada directamente a la formación del VS o de los MV, no constituye en sí mismo un peligro de inestabilidad genética en la progenie clonal.

- El peso seco de plantas completas fue afectado por el medio de cultivo del cual provenían en 8 de los 10 cultivares estudiados, obteniéndose diferencias estadísticas en favor de los medios de inducción de MV que contemplaron la adición de 0,5 y 1 mg/L de BAP. Los vástagos derivados de medios adicionados con 5, 10 y 15 mg/ de CIN y puestos a enraizar también presentaron pesos secos similares a los registrados en los provenientes de BAP aunque más sujetos al efecto genotípico. La mayoría de vástagos enraizados provenientes de MV obtenidos en medios con TDZ demostraron una baja capacidad de crecimiento presentando pesos muy bajos.

Se evaluó el efecto de diferentes factores que afectan la propagación in vitro mediante la promoción de la regeneración de MV.

- Como resultado del Experimento 2, cuando se analizó de manera integral el porcentaje de explantes con MV considerando los medios de cultivo, el tiempo de exposición a las citocininas, los cultivares y sus interacciones, los medios adicionados con BAP (0,5 y 1 mg/L) fueron los que demostraron las mejores respuestas de regeneración de MV, seguido del medio con 10 mg/L de CIN. El tiempo de inducción mínimo favorable resultó ser de 20 días, aunque persistieron las diferencias en la regeneración de MV debidas al genotipo. Asimismo, los

cultivares de baja capacidad de regeneración de MV, en general, optimizaron su respuesta al ser cultivados en medios con BAP. De la interacción entre el medio de cultivo y el tiempo de exposición se destacó el empleo de BAP por 20 días de inducción como mínimo. Esta recomendación derivó de descartar una inducción de 10 días por resultar insuficiente y no hallarse diferencias estadísticas entre 20, 30 y 40 días de exposición a las citocininas.

- En cuanto al número de nudos promedio por explante derivados de MV, en 9 de los 10 cultivares evaluados los valores obtenidos fueron más del doble respecto de los contabilizados en VS y casi el doble en el cv. Palomita. Contemplando los cultivares y los medios de cultivo en relación al tiempo de exposición a las citocininas no se hallaron diferencias estadísticas en el número de nudos promedio por explante derivados de MV. Sólo el genotipo imprimió su efecto significativo sobre la producción de nudos por explante, vislumbrándose una mayor capacidad de multiplicación para cultivares de procedencia tropical.

- Referido a la longitud de vástagos derivados de MV, se hallaron diferencias estadísticas en todos los factores simples evaluados y sus interacciones. El factor cultivar arrojó diferencias altamente significativas. El medio de cultivo exhibió diferencias significativas en favor de los medios adicionados con las menores concentraciones de las citocininas evaluadas, los cuales promovieron la formación de vástagos más altos. El tiempo de exposición a los medios adicionados con citocininas generó diferencias significativas, propiciando la producción de MV más altos cuando los explantes fueron inducidos a multiplicar por un término más corto (10 y 20 días). Con respecto al efecto de la interacción entre medio de cultivo vs. cultivar, al menos 7 cultivares (Surubím-41; IAC 12829; Catiguá; MCol 1505; MPar 75; Rocha y Palomita) formaron vástagos más altos en los medios adicionados con las concentraciones más bajas de ambas citocininas evaluadas. En relación a la interacción cultivar vs. tiempo de exposición la mayoría de los cultivares demostraron una tendencia a aumentar la longitud de los vástagos derivados de MV, conforme era menor el tiempo de exposición a las citocininas. En relación al medio de cultivo y el tiempo de exposición se denotó que existió una interacción significativa, los medios adicionados con las menores concentraciones de

citocininas probadas y los menores tiempos de exposición promovieron una mayor elongación de los vástagos derivados de MV, por el contrario la limitaron. La interacción triple demostró que hubieron cultivares que formaban los vástagos más altos (cv. Surubím y MCol 1505) y otros los más bajos (cvs. Ramada Paso y Santa Catarina) independientemente del medio y tiempo de exposición empleados, y un tercer grupo que presentaba variaciones con una tendencia al aumento de la longitud cuando el medio se encontraba suplementado con las concentraciones de citocininas más bajas y tiempos de inducción más cortos.

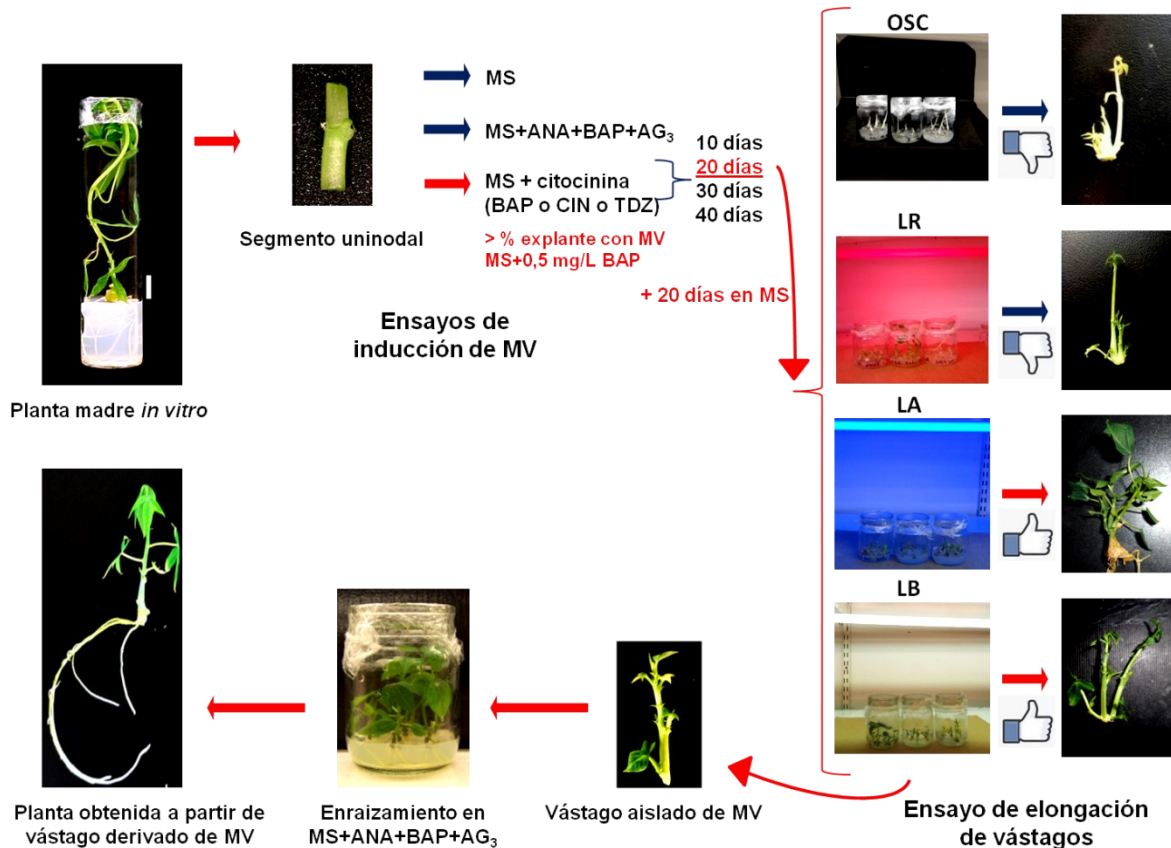
- En las 3 variables evaluadas en el Experimento 3, el porcentaje de explantes con MV (diferenciación de MV), número de nudos promedio por explante (producción de nudos) y longitud de vástagos derivados de MV (elongación de vástagos) se observó una fuerte influencia del genotipo. El medio con BAP promovió una mayor diferenciación de MV y producción de nudos, favoreciendo su elongación, en particular, cuando se empleó una concentración de 0,5 mg/L. La oscuridad deprimió la diferenciación de MV y la producción de nudos. No se observaron variaciones significativas en la diferenciación de MV cuando los explantes fueron sometidos a luz blanca, azul o roja. La incubación en luz blanca o azul ejerció efectos similares sobre la producción de nudos. Si bien el tratamiento lumínico por sí solo no produjo diferencias significativas sobre la longitud, si lo demostró cuando se consideró la interacción con el medio de cultivo. Así, la incubación en luz roja u oscuridad de cultivos en medio con BAP estimularon la elongación de vástagos, aunque no se destacaron en promover la diferenciación de MV y la producción de nudos.

Si se tuviera que recomendar una condición lumínica, en términos de inducción y multiplicación vía MV, sería conveniente continuar empleando la luz blanca usada de rutina para la incubación de los cultivos, sin descartar el empleo de la luz azul.

Será necesario entonces seguir explorando otras alternativas para optimizar la elongación sin perjuicio de la eficiencia de la propagación.

A continuación, se bosqueja un protocolo de multiplicación *in vitro* de mandioca vía múltiples vástagos aplicable a genotipos diferentes, a partir de los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados en esta tesis (Figura 4.1). En este esquema las flechas rojas indican el circuito de la secuencia recomendada partiendo de una planta madre regenerada *in vitro* de la cual se extraen los segmentos uninodales para ser cultivados en el medio que propició los mejores resultados en términos de inducción de MV (MS más 0,5 mg/L de BAP) por 20 días y posteriormente transferidos a MS libre de reguladores de crecimiento por 20 días, transcurriendo este tiempo de 40 días totales en un cuarto iluminado con lámparas Philips TL-D Reflex Blanco Frío ó Luz azul (Yarlux 36W) y climatizado a 27±2 °C. Diferenciados los MV, se aíslan los vástagos resultantes para ser enraizados en medio de multiplicación (MS + 0,01 mg/L de ANA + 0,01 mg/L de BAP + 0,1 mg/L de AG₃) según Cavallero *et al.* (2012) hasta obtener plantas completas.

Figura 4.1: Protocolo de regeneración de MV de mandioca a partir del cultivo *in vitro* de segmentos uninodales, resultante de diferentes ensayos de inducción (considerando distintos medios de cultivo y tiempos de exposición a las citocininas BAP o CIN) y de elongación de vástagos (contemplando diferentes condiciones lumínicas de incubación durante la inducción y expresión de MV).



Referencias: MS: medio basal según Murashige y Skoog (1962); MS+ANA+BAP+AG₃: medio de multiplicación según Cavallero *et al.* (2012), también usado para el enraizamiento de vástagos; MV: múltiples vástagos; condiciones lumínicas de incubación: oscuridad – OSC; luz roja – LR; luz azul – LA; luz blanca – LB; ícono unlike: significa que el tratamiento disminuye la diferenciación de MV ó la formación de nudos; ícono like: significa que el tratamiento favorece la diferenciación de MV y la formación de nudos; flechas rojas: circuito de la secuencia recomendada; flechas negras: otras opciones probadas en los experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- **Abd Alla, N.A., Ragab, M.E., El-Miniawy, S.M. y H.S Taha. 2013.** *In vitro* studies on cassava plant micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Journal of Applied Sciences Research 9 (1): 811-820.
- 2- **Ahmad, N., y M. Anis. 2007.** Rapid clonal multiplication of a woody tree, *Vitex negundo* L. through axillary shoots proliferation. Agroforestry System 71: 195–200.
- 3- **Ahmad, M.R. y M. Anis. 2012.** Role of TDZ in the quick regeneration of multiple shoots from nodal explant of *Vitex trifolia* L. an important medicinal plant. Applied Biochemistry and Biotechnology 168: 957-966.
- 4- **Albarrán, J., F. Fuenmayor, y M. Fuchs. 2003.** Propagación clonal rápida de variedades comerciales de yuca mediante técnicas biotecnológicas. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela. N° 3.
- 5- **Allem, A. C. 2002.** The origins and taxonomy of cassava. En: Hillocks R.J, J.M. Thresh y A.C. Bellotti (Eds.), Cassava: Biology, production and utilization. CABI Publishing. New York, USA. 1-16 p.
- 6- **Alves, A.A.C. 2002.** Cassava Botany and Physiology. En: Hillocks, R.J., J.M. Thresh y A.C. Bellotti (Eds.), Cassava Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, New York, USA. 67-89 p.
- 7- **Aristizábal, J. y F. Calle. 2015.** Producción, procesamiento, usos y comercialización de mandioca. Cuaderno tecnológico N° 22. 41 p.
- 8- **Bach, A., y A. Krol. 2001.** Effect of light quality on somatic embryogenesis in *Hyacinthus orientalis* L. 'Delft's Blue'. Biological Bulletin of Poznan 38:103-107.
- 9- **Bach, A., Pawlowska, B., y K. Pulczynska. 1992.** Utilization of soluble carbohydrates in shoot and bulb regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro*. Acta Horticulturae 325: 487-491.
- 10- **Bach, A. y A. Swiderski. 2000.** The effect of light quality on organogenesis of *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro*. Acta Biologica Cracoviensia, series Botanica 42 (1):115-120.
- 11- **Ben, A.I.M., V. Korzun, A.J. Worland y A. Börner. 1997.** Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major gens and RFPL markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 1047–1052.
- 12- **Bhagwat, B., L.G.E. Vieira y L.R. Erickson. 1996.** Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and giberelic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 1-7.
- 13- **Burgos, A.M., M. Porta, C.M. Hack y M.E. Castelan. 2019.** Aptitud forrajera de hojas de mandioca (*Manihot esculenta*) y su aporte nutricional a microsilos de caña de azúcar. Revista Veterinaria. 30 (2) 73-81.

- 14- **Carvalho, L.J.C.B., J.V. Anderson, S. Chen, Ch. Mba y M. Dođramaci. 2018.** Domestication syndrome in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): assessing morphological traits and differentially expressed genes associated with genetic diversity of storage root. En: Waisundara, V. (Ed.), Cassava. InTech. Rijeka, Croatia. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71348>.
- 15- **Cary, A.J., P. Che y S.H. Howell. 2002.** Developmental events and shoot apical meristem gene expression patterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 32: 867–877.
- 16- **Cavallero, M.I. 2010.** Micropropagación de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de interés para Argentina. Tesis para optar al grado de Magister en Producción Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. 121 p.
- 17- **Cavallero, M.I., R.D. Medina (ex aequo), R.E. Hoyos, P.J. Cenóz y L.A. Mroginski. 2012.** Chapter 3: Biotechnology applied to cassava propagation in Argentina. En: Colleen M. Pace (Ed.), Cassava: Farming, Uses, and Economic Impact. Nova Science Publishers, New York, EE.UU. p. 55-77.
- 18- **Ceballos, H. y G.A. De la Cruz. 2002.** Taxonomía y morfología de la yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (Eds.), La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. p. 16-32.
- 19- **Ceballos, H, Z. Lentini, J.C. Pérez y M. Fregene. 2004.** Introduction of inbreeding in cassava through the productions of doubled haploids. En: Zuñiga, C.S. (Ed.), Proceedings of the Six International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Abstract. 8- 14 March 2004, CIAT. Cali, Colombia. p. 125.
- 20- **Cereda, M.P. 2002.** Processamento da mandioca como mecanismo de detoxificação. En: Cereda, M.P. (Coord.), Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Fundação Cargill, São Paulo, p. 47-80.
- 21- **Che, P., D.J. Gingerrich, S. Lall y S.F. Howell. 2002.** Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. Plant Cell 14: 2771–2785.
- 22- **Che, P., S. Lall y S.H. Howell. 2007.** Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. Planta 226: 1183–1194.
- 23- **Chée, R. y R.M. Pool. 1989.** Morphogenic response to propagule trimming, spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. Journal of the American Society for Horticultural Science 114: 350-354.
- 24- **Cioć, M., A. Szewczyk, M. Zupnik, A. Kalisz y B. Pawlowska. 2018.** Led lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 132: 433-447.
- 25- **Cock, J.H. 1989.** La yuca, nuevo potencial para un cultivo tradicional. CIAT, Cali, Colombia, 240 p.

- 26- **Demeke, Y., W. Tefera, N. Dechassa y B. Abebie. 2014.** Effects of plant growth regulators on *in vitro* cultured nodal explants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clones. African Journal of Biotechnology 13 (28): 2830-2839.
- 27- **Domínguez, C.E., L.F. Ceballos y C. Fuentes. 1983.** Morfología de la Planta de Yuca. En: Domínguez, C. E. (Eds.) Yuca: investigación, producción y utilización. Documento N° 50, Programa Yuca. CIAT. Cali, Colombia. p. 29-49.
- 28- **El-Sharkawy, M. A. 2003.** Cassava biology and physiology. Plant Molecular Biology 53: 621-641.
- 29- **El-Sharkawy, M.A. 2004.** Cassava biology and physiology. Plant Molecular Biology 56: 481-501.
- 30- **Eskes, A.B., A. Varga, G. Staritsky y J. Bruinsma. 1974.** Callus growth and rooting of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) stem segments cultured *in vitro*. Acta Botanica Neerlandica 23: 315-320.
- 31- **FAOSTAT. 2020.** Statistical Division of the Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consulta: 7/07/2020.
- 32- **Faisal, M., N. Ahmad y M.F. Anis, M.F. 2005.** Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80 (2): 87-190.
- 33- **Faye, A., M. Sagna, P.D Kane y D. Sane. 2015.** Effects of different hormones on organogenesis *in vitro* of some varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown in Senegal. African Journal of Plant Science 9 (8): 305-312.
- 34- **Fernandez de Andrade, W., M. De Almeida y A.N. Goncalves. 2006.** Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo con benzilaminopurina. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41 (12): 1715-1719.
- 35- **Flores, B.E., L. Gentzbittel, H. Kayyal, G. Alibert y A. Sarrafi. 2000.** AFLP mapping of QTLs for *in vitro* organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and Applied Genetics 101: 1299-1306.
- 36- **Fukuda, W.M.G., C.L. Guevara, R. Kawuki y M.E. Ferguson. 2010.** Selected morphological and agronomic descriptors for the characterization of cassava. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria. 19 p.
- 37- **Garsaball, J.A.L. y M.C.S. Cuevas. 2006.** Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "Queresa Rosada" con hipoclorito de sodio. Revista UDO Agrícola 6: 60-66.
- 38- **Girault, T., V. Bergougnoux, D. Combes, J.D. Viemont y N. Leduc. 2008.** Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp. Plant Cell Environment 31: 1534-1544.
- 39- **Guo, B., B.H. Abassi, A. Zeb, L.L. Xu y Y.H. Wei. 2011.** Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology 10 (45): 8984-9000.

- 40- **Hankoua, B.B., S.Y.C. Ng, I. Fawole, J. Puonti-Kaerlas, M. Pillay y A.G.O. Dixon. 2005.** Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 221-231.
- 41- **Henry, G. y C. Hershey. 1991.** Cassava in South America and the Caribbean. En: Hillocks R.J, J.M. Thresh y A.C. Bellotti (Eds.), *Cassava: Biology, production and utilization*. CABI Publishing. New York, USA. p. 17-40.
- 42- **Heo, J.W., K.S. Shin, S.K. Kim y K.Y. Paek. 2006.** Light quality affects *in vitro* growth of grape. Teleki 5BB7. *Journal of Plant Biology* 49: 276-280.
- 43- **Holme, I.B. , A.M. Torp, L.N. Hansen y S.B. Andersen. 2004.** Quantitative trait loci affecting plant regeneration from protoplasts of *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1513-1520.
- 44- **Hunter, D.C., y D.J. Burrit. 2003.** Light quality: A tool to manipulate plant growth and development *in vitro*. *Research Signpost* 37 (661):1-14.
- 45- **Husain, M.K., M. Anis y A. Shahzad. 2007.** *In vitro* propagation of Indian kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43(1): 59-64.
- 46- **Hutchinson, M.J., R., Onamu, L. Kipkosgei y D. Obukosia. 2014.** Effect of thidiazuron, NAA and BAP on *in vitro* propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Rosita' from shoot tip explants. *Journal of Agriculture Science and Tecnology* 12 (2): 60-69.
- 47- **Hvoslef-Eide, A.K. y C. Munster. 1999.** Light quality effect on somatic embryogenesis of *Cyclamen pericum* Mill. in bioreactors. En: H.G. Schwenkel (Ed.), *Reproduction of Cyclamen persicum* Mill. through somatic embryogenesis using suspensor culture systems. A report of the working group 2, COST 882, European cooperation in the field of scientific and technical research. European Commission: Bruselas, Bélgica. p. 79-84.
- 48- **Kamenetsky, R. y H. Okubo, 2013.** Ornamental geophytes. From basic science to sustainable production. 1st. Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. 598 p.
- 49- **Kartha, K.K., O.L. Gamborg, F. Constabel y J.P. Shyluk, 1974.** . Regeneration of cassava plants from shot apical meristem. *Plant Science Letters* 2: 107-113.
- 50- **Kartha, K.K. y W. Roca. 1993.** Role of plant biotechnology in crop improvement. En: Roca, W.M. y A.M. Thro (Eds.), *Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*. Cartagena, Colombia. p. 466-476.
- 51- **Konan, N.K., R.S., Sangwan y B.S. Sangwan-Norrell. 1995.** Nodal axillary meristem as target tissue for shoot production and genetic transformation in cassava (*Manihot esculenta* Cranz). En: Roca, W.M. y A.M. Thro (Eds.),

Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, 22-26 August 1994, Bogor, Indonesia. CIAT, Cali, Colombia, p. 276-288.

52- **Konan, N.K., C. Schöpke, R. Carcamo, R.N Beachy y C. Fauquet. 1997.** An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta Crantz*) based on nodal explants and axillary-bud derived meristems. *Plant Cell Reports* 16: 444-449.

53- **Krikorian, A.D. 1995** Hormones in tissue culture and micropropagation. En P.J., Davies. (Eds) *Plant Hormones*. Springer, Dordrecht. p. 774-796.

54- **Krikorian, A. D. y D. L. Berquam. 1969.** Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *The Botanical Review* 35 (1). 59-67.

55- **Kwon, Y.S., K.M. Kim, M.Y. Eun y J.K. Sohn. 2001.** Quantitative trait loci mapping associated with plant regeneration ability from seed derived calli in rice (*Oryza sativa L.*). *Molecular Cells* 11 (1): 64-67.

56- **Le, B.V., B.L .Anh, K. Soyong, N.D. Danh y L.T. Anh Hong. 2007.** Plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) plants. *Journal of Agricultural Technology* 3 (1): 121-127.

57- **Leduc, N., H. Roman, F.F. Barbier, T. Péron, L. Huché-Thélier, J. Lothier, S. Demotes-Mainard y S. Sakr. 2014.** Light signaling in bud outgrowth and branching in plants. *Plants* 3: 223-250.

58- **Li, H.Q., J.Y. Guo, Y.W. Huang, C.Y. Liang, H.X. Liu, I. Potrykus y J. Puonti-Kaerlas, 1998.** Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 410-414.

59- **Llorente, B.E. 2002.** Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad Nacional de La Plata. 201 p.

60- **López, J. 2002.** Semilla vegetativa de yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (Eds.), *La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT, Cali, Colombia. p. 49-75.

61- **Mano, Y., H. Takahashi, K. Sato y K. Takeda. 1996.** Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Breeding Science* 46(2): 137–142.

62- **Mano, Y. y T. Komatsuda. 2002.** Identification of QTLs controlling tissue-culture traits in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 708-715.

63- **Mapayi, E.F., D.K. Ojo, O.A. Oduwaye y J.B.O. Porbeni. 2013.** Optimization of *in vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) genotypes. *Journal of Agricultural Science* 5 (3): 261-269.

64- **Margara, J. 1988.** Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa libros. Madrid. España. 232 p.

- 65- **Marín, A., J.G. Albarrán, F. Fuentemayor y D. Perdomo, 2009.** Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). Revista UDO Agrícola 9(3): 556-562.
- 66- **Mathews, H., C. Schöpke, R. Carcamo, P. Chavarriaga, C. Fauquet y R.N. Beachy. 1993.** Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Reports 12: 328-333.
- 67- **Medina, R.D., M.M. Faloci, V. Solis Neffa y L.A. Mroginski, 2003.** Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) de cultivares de interés para Argentina. Revista de Investigaciones Agropecuarias 32 (3): 143-160.
- 68- **Medina, R.D., M.M. Faloci, A.M. Gonzalez y L.A. Mroginski. 2007.** *In vitro* cultured primary roots derived from stem segments of Cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. Annals of Botany 99 (3): 409-423.
- 69- **Medina, R.D., Schaller, S.C., Dolce, N.R. y L.A. Mroginski. 2017.** Determinación de la eficiencia de la micropropagación de genotipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) de interés para el Nordeste argentino. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 52 (3): 497-505.
- 70- **Medina, R.D. 2010.** Tesis para optar al grado de Doctor en Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. 239 p.
- 71- **Mejía de Tafur, M.S. 2002.** Fisiología de la Yuca (*Manihot esculenta Crantz*). En: B. Ospina y H. Ceballos (Eds.), La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT. Cali. Colombia. p. 34-45.
- 72- **Moon, H.K., S.Y. Park, Y.W. Kim y C.S. Kim. 2006.** Growth of tsuru-rindo (*Tripterospermum japonicum*) cultured *in vitro* under various sources of light-emitting diode (LED) irradiation. Journal of Plant Biology. 49:174-179.
- 73- **Morandi, J. y E. Pirker. 2012.** La cadena de mandioca para industria en Misiones. En: R. Bongiovanni, J. Morandi, L. Troilo. (Eds). Competitividad y calidad de los cultivos industriales: caña de azúcar, mandioca, maní, tabaco, té y yerba mate. Ediciones INTA. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. 1era ed. Manfredi, Córdoba. p. 51-64.
- 74- **Mroginski, L.A., P. Sansberro y E. Flaschland. 2011.** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Echenique, V., C. Rubinstein, y L.A. Mroginski. (Eds). Biotecnología y mejoramiento Vegetal II. Argenbio. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p. 16-26.
- 75- **Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991.** Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds.), Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Capítulo 2. CIAT, Cali, Colombia. 19-40 p.

- 76- **Murashige, T. y F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473-497.
- 77- **Mussio, I., M.H. Chaput, I. Serraf, G. Ducreux y D. Sihachakr. 1998.** Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 205-211.
- 78- **Nishimura, A., M. Ashikari, S.Y. Lin, T. Takashi, E.R. Angeles y T. Yamamoto. 2005.** Isolation of rice regeneration quantitative loci gene and its application to transformation systems. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 102 (33): 11940–11944.
- 79- **Olsen, K.M. y B.A. Schaal. 1999.** Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: (10): 5586-5591.
- 80- **Onuoch, C.I y N.I.C. Onwubiku, 2007.** Micropropagation of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) using different concentration of benzyaminopurina (BAP). *Journal of Engineering and Applied Science* 2 (7): 1229-1231.
- 81- **Pedroso de Oliveira, R., T. Da Silva Gomes y A. Duarte Vilarinhos. 2000.** Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35: 2329-2334.
- 82- **Pletsch, R. 2004.** Mandioca. Serie técnica N° 1 de pequeños productores- Año I numero 1. Proyecto regional de Pequeños Productores. Estación Experimental Aropecuaria Corrientes. Ediciones INTA, Argentina. 31 p.
- 83- **Pletsch, R. y Uset. O. A. 2013.** Mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). Manejo y conservación de ramas con destino a semilla. Ediciones INTA, Argentina. 32 p.
- 84- **Poudel, P.R., I. Kataoka y R. Mochioka. 2008.** Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92: 147-153.
- 85- **Puonti-Kaerlas, J. 1998.** Cassava Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15: 329-364.
- 86- **Raemakers, C.J.J.M., E. Jacobsen y R.G.F. Visser, 1997.** Micropropagation of *Manihot esculenta* Crantz (cassava). En: Y.P.S. Bajaj. (Ed.) *High-Tech and Micropropagation V. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Berlin, Heidelberg. Vol 39 p. 77-98.
- 87- **Rikiishi, K., T. Matsuura, M. Maekawa, K. Noda y K. Takeda. 2003.** Barley lines showing prominent high green shoot regeneration in cultures derived from immature embryos. *Plant Breeding* 122: 105–111.
- 88- **Rikiishi, K., M. Matsuura, M. Maekawa y K. Takeda. 2008.** Light control of shoot regeneration in callus cultures derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) immature embryos. *Breeding Science* 58: 129-135.

- 89- **Rikiishi, K., Matsuura, T., Ikeda, Y. y M. Maekawa. 2015.** Light inhibition of shoot regeneration is regulated by endogenous abscisic acid level in calli derived from immature barley embryos. PLoS ONE 10(12): e0145242.
- 90- **Roca, W. y U. Jayasinghe. 1982.** El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. CIAT. Serie 04SC-02.05. Cali, Colombia. 47 p.
- 91- **Roca, W.M. 1984.** Cassava. En: W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato y Y. Yamada (Eds.), Handbook of Plant Cell Culture. Vol 2: Crop Species. MacMillan Publishing, New York, USA. p. 269-301.
- 92- **Roca, W., B. Nolt, G. Mafla, J. Roa y J. Reyes. 1991.** Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: Roca, W. y L.A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia, p. 403-420.
- 93- **Roca, W. y L.A. Mroginski. 1993.** Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En Roca, W. y L.A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia, p. 1-17.
- 94- **Salisbury, F. y C.W. Ross, 1994.** Fisiología Vegetal. Cuarta Edición. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. Mexico D.F. 759 p.
- 95- **Simmonds, N. E. 1976.** Evolution of crop plants. 3a. Edición. Longman, Londres, Reino Unido y Nueva York. 339 p.
- 96- **Smith, M.K., B.J. Biggs y K.J. Scott. 1986.** *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6: 221-228.
- 97- **Suárez Guerra, L. y V. Mederos Vega. 2011.** Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. Cultivos Tropicales. 32:(3) 27-35.
- 98- **Sukmadjaja, D. y H. Widhiastuti. 2011.** Effects of plant growth regulators on shoot multiplication and root induction of cassava varieties culture *in vitro*. Biotropia Journal 18(1): 50-60.
- 99- **Takeuchi, Y., T. Abe, y T. Sasahara. 2000.** RFLP mapping of QTLs influencing shoot regeneration from mature seed-derived calli in rice. Crop Science 40: 245-247.
- 100- **Thro, A.M., W.M. Roca, J. Restrepo, H. Caballero, S. Poats, R. Escobar, G. Mafla y C. Hernández. 1999.** Can *in vitro* biology have farmer-level impact for small-scale cassava farmers in Latin America? *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 35: 382-387.
- 101- **Toledo Velásquez, A.C. 2004.** Efecto de tres longitudes de onda, sobre la organogénesis y crecimiento *in vitro* de: dalia (*Dahlia* spp), papa (*Solanum tuberosum* L.), begonia (*Begonia rex* Putz.), murta (*Ugni molinae* T.), copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pav) y helecho arbóreo (*Dicksonia berteriana* (Colla) Hook.). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo de la Facultad

de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile. 89 p.

102- **Trujillo-Moya, C., C. Gisbert, S. Vilanova y F. Nuez, F. 2011.** Location of QTLs for *in vitro* plant regeneration in tomato. BMC Plant Biology 11:140. doi: 10.1186/1471-2229-11-140.

103- **Tyagi, N., L.S. Dahleen y P. Bregitzer. 2010.** Candidate genes within tissue culture regeneration QTL revisited with a linkage map based on transcript-derived markers. Crop Science 50: 1697-1707.

104- **Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe. 1993.** Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca, W. y L.A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia, p. 127-141.

105- **Werbrouck, S. y H. Buyle. 2012.** Effect of Red-, Far-Red- and Blue-light-emitting diodes on *in vitro* growth of *Ficus benjamina*. Acta Horticulturae 961: 533-536.

106- **Wilson, D.A., R.C. Weigel, R.M. Wheeler y J.C. Sager. 1993.** Light spectral quality effects on the growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) nodal cuttings *in vitro*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 29: 5-8.

107- **Zhang, S., M.J. Cho, T. Koprek, R. Yun, P. Bregitzer y P.G. Lemaux. 1999.** Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. Plant Cell Reports 18: 959-966.