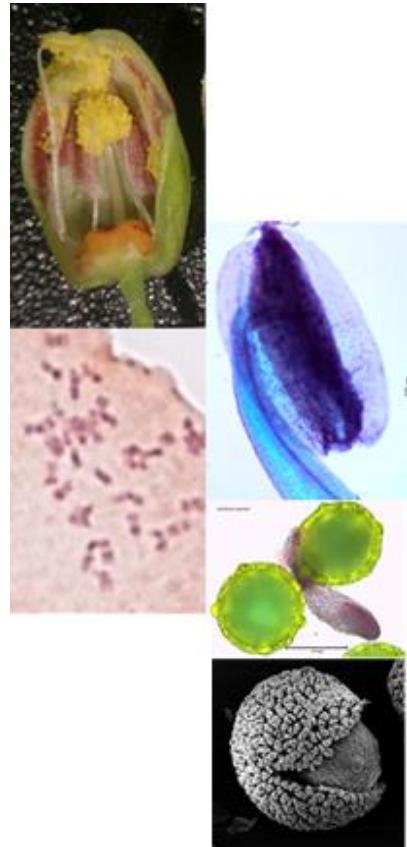


2017



“Estudios citogenéticos y de biología reproductiva en siete cultivares de Mandioca de la Provincia de Corrientes”.

Irina C. Malawka Henaín.

Asesora: Lic. Irene Caponio

Resolución N° 9.407 C.D.

Facultad de Ciencias Agrarias.
UNNE

Corrientes, Mayo 2017.



AGRADECIMIENTOS

Detrás de tanto esfuerzo y dedicación hay personas e instituciones que de alguna u otra forma colaboraron en este proyecto, como ser: INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), IBONE (Instituto Botánico del Nordeste) y Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE.

Al titular de la cátedra de Genética de la FCA, Ing. Agr. (Dr.) Guillermo Norrmann, que me permitió desarrollar las actividades en el laboratorio de la facultad; a la Lic. (Dra.) Cristina Salgado que me ayudó en el análisis de polen y a la Ing. Agr. (Mgter.) Griselda Bóveda que me orientó en los análisis estadísticos. Al Ing. Agr. (Dr.) Ricardo Medina, a la Ing. Agr. M.M. Hidalgo y todo el personal de la cátedra de Genética y Mejoramiento genético de FCA- UNNE.

Pero especialmente agradezco a mi asesora de Tesina, Lic. Irene Caponio, que además de cumplir su rol en el proyecto, me acompañó durante estos últimos años, formándome como profesional y como persona, encontrando en ella no solo una excelente profesora, sino también una amiga, que siempre me aconsejó y se preocupó como si fuese una de sus hijas.

A mis padres, que dedicaron gran parte de su vida en mi formación, dándome todo el apoyo y estímulo para seguir ante las adversidades que se me presentaron durante la carrera y festejando juntos cada uno de mis logros, sin ellos no podría haber llegado hasta aquí. A mis hermanos, a toda mi familia y amigos, que soportaron mis estados de ánimos, mi ausencia este último tiempo y que siempre estuvieron presentes empujándome hacia adelante en todo.

Y por último, el abrazo más grande va al cielo, para mi abuelo, el Ingeniero Agrónomo Antonio Henaín. Estoy completamente segura que Él fue el causante de todo esto, desde la elección de la carrera, dándome fuerzas para no aflojar durante la misma, en mi trabajo final de graduación, que sin querer terminé estudiando lo que a Él le llevó tantos años de estudio, investigación y dedicación. Y no me quedan dudas que estará presente en mi futuro profesional.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXO 1	35
ANEXO 2	36
ANEXO 3	37

RESUMEN

Manihot es un género perteneciente a la familia Euphorbiaceae originaria de la costa NE de Brasil; existen alrededor de 98 especies dentro del género. *Manihot esculenta* Crantz es la especie de raíces tuberosas más cultivada en los trópicos y subtrópicos, con importante valor alimenticio debido a su contenido de almidón. Existe una gran variación en esta especie respecto a los caracteres morfológicos, fisiológicos y productivos entre los diferentes cultivares. Según estudios citogenéticos, para algunos autores se trata de una especie diploide ($2n= 36$ cromosomas), mientras que otros autores la consideran como una especie allotetraploide. Respecto a la biología reproductiva es poca la información con la que se cuenta, sólo para algunos clones de Brasil. El objetivo de este trabajo fue verificar los números cromosómicos de los cultivares que posee la EEAA INTA- Corrientes, y de *Manihot grahamii* Hoock (especie nativa), estudiando algunos aspectos de su biología reproductiva, de aquellas plantas que florecieron en la campaña 2015/2016. Para los recuentos cromosómicos se utilizaron técnicas tradicionales de citogenética. Se determinó la fertilidad de polen por métodos colorimétricos, se determinó el número de granos de polen/antera y se analizaron caracteres morfológicos de los granos de polen en siete cultivares seleccionados. Se comprobó que todos los cultivares estudiados presentaron $2n= 36$ cromosomas. Los granos de polen de los cultivares estudiados presentaron variabilidad, la mayoría de las accesiones tienen buen porcentaje de viabilidad de polen, observándose valores de 51,4 % a 87,8%, a excepción de los cultivares Catiguá y Derqui que presentaron diferentes tipos de androesterilidad. Con distintos análisis estadísticos se compararon algunos caracteres de morfología polínica que se lograron separar por grupos, ya que estos caracteres eran específicos entre cultivares.

INTRODUCCIÓN

Manihot P. Miller es un género de la familia Euphorbiaceae, nativo de las regiones tropicales de América, con centros de diversidad en Brasil y México (Nassar, 2004). De las 98 especies dentro del género (Rogers & Appan, 1973), *M. esculenta* Crantz es la más importante y ampliamente cultivada en los trópicos y subtrópicos, por sus raíces tuberosas con valor alimenticio debido a su alto contenido en carbohidratos (Fukuda et al., 1996).

Las raíces se consumen frescas para la alimentación humana, pero a través de distintos procesos poscosecha se pueden elaborar productos alimenticios. En la alimentación animal las raíces pueden incorporarse frescas o ensiladas a la dieta de aves, cerdos, bovinos y peces. Mediante la deshidratación natural o artificial de raíces y follaje fresco se producen harinas que también son utilizadas en dietas animales por su aporte proteico y energético respectivamente (Buitrago, et al. 2001).

El cultivo de mandioca es una de las fuentes amiláceas que representan una buena alternativa para la producción de etanol, debido a que estas raíces constituyen una de las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales y dependiendo de la variedad se pueden obtener rendimientos de 140 a 170 litros de etanol por tonelada de raíces frescas (Castaño, 2008).

Según datos de la FAO, en 1965 Brasil se encontraba como primer país productor con 25.000.000 Tn., seguido por Indonesia con 12.000.000 Tn. y Nigeria con 7.300.000 Tn. (Henaín y Cenóz, 1971). En el año 2000 la producción mundial de mandioca alcanzó los 200.000.000 Tn., llegando en 2009 a una producción de 233.500.000 Tn. (FAO, 2015).

Actualmente, el principal productor del mundo es Nigeria (44.000.000 Tn.), seguido por Brasil (26.600.000 Tn.) y Tailandia (25.000.000 Tn.). (FAO, 2015). En América del sur, el primer país productor es Brasil, seguido por Paraguay, Colombia y Argentina. En estudios estadísticos del año 1968/69, la superficie plantada en Misiones era de 14.148 has., Corrientes 7.000 has., Chaco 2.900 has. y Formosa 2.400 has. (Henaín y Cenóz 1971). Al año 2006 la provincia de Misiones tenía una superficie plantada que rondaba las 40.000 has., Formosa 20.000 has., Corrientes 18.000 has. y Chaco, 2.000 has. (De Bernardis, 2011). Con lo que se puede observar que hubo un marcado incremento en relación a la superficie cultivada.

En *M. esculenta*, existe una gran variabilidad respecto a los caracteres morfológicos, fisiológicos y productivos entre los diferentes cultivares (Nassar, 2007; Fukuda 1996). Estudios de marcadores moleculares (RAPD) demostraron que la diversidad genética es grande y éstos tienden a estructurarse de acuerdo a las condiciones ecológicas (Costa et al., 2003).

La manera en que esta diversidad se distribuye en el continente americano, podría ser útil para la recolección y / o conservación de los recursos genéticos de la Mandioca, en los diferentes proyectos de conservación y mejoramiento del cultivo.

Esta diversidad genética observada entre etnocultivares de Colombia y Brasil (Colombo et al., 2000) sugieren que es importante estudiar y analizar otras comunidades campesinas del continente americano en todos los aspectos reproductivos de la especie.

En Argentina, son escasos los trabajos publicados respecto a la caracterización morfológica, citogenética y sobre biología reproductiva de los cultivares y etnocultivares de Mandioca presentes en el NEA. En 1972 se describió para Corrientes el cultivar (cv.) “Taraguí CAFPTA F.A.V.C.”, resultado de cruzamientos naturales entre cultivares presentes en el campo experimental de la FAVC, y se cita la existencia de otros cultivares en estudio en la facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNNE, a saber: “Catiguá guazú”, “Manteca”, “Azul”, “Carapé”, “Pombero Blanco”, “Blanca”, “Cambi” y “Guaxupe-I”. (Cenoz et al., 1972). También se describen en la misma publicación dos cultivares ornamentales cv. Jhogüe Morada 1 y cv. Jhogüe Morada 2, ambos procedentes de semillas enviadas desde la ciudad de Belén, Estado de Pará, Brasil, que habían sido originadas por autofecundación de plantas del cultivar “Inambu Roxa”. Recientemente INTA Cerro Azul, inscribió el cv Paraguaya CA, basado en descriptores solicitados por INASE para la inscripción de semilla (Domínguez, 2016).

A través del análisis de correspondencia múltiple (ACM) y análisis de conglomerados mediante UPGMA e índice de Gower, Bogado et al. (2016) reconocen 31 cultivares diferentes. de Mandioca pertenecientes a la colección de la EEA INTA – Corrientes y los agrupan en cuatro grupos principales, que se diferencian morfológicamente por el color de tallo inmaduro, textura de la superficie radical, forma del lóbulo central y color del pecíolo además de otros caracteres agronómicos.

Todas las especies del género *Manihot* analizadas citológicamente tienen $2n=36$ cromosomas (Nassar 1978, 2000; (De Carvalho y Guerra, 1999). Jennings (1959) comparando el número de cromosomas de diversos géneros de Euphorbiaceae sugiere que el género *Manihot* podría ser un allotetraploide derivado de un número básico de la familia de $x = 9$. Meióticamente todas las especies del género, incluso *M. esculenta*, se comportan como diploides. Magoon et al. (1969) reportaron la presencia de cromosomas duplicados en el estadio de paquitene, en diferentes cultivares; apoyando así su supuesta naturaleza tetraploide y sugiriendo que sus antepasados diploides deben haber sido cariotípicamente muy similares. La presencia de un solo par de sitios 5S de rADN en *M. esculenta* y *M. dicotoma* sean más probablemente debido a un proceso de diploidización, como se ha observado en otros poliploides (Leitch y Bennett, 1997).

A lo largo de las especies silvestres de *Manihot* y especialmente en *M. esculenta* según Nassar (1984, 1989) y Cenoz et al. (1972) ocurrieron hibridaciones naturales. Según Nassar (2002), las barreras reproductivas parecen ser débiles, indicando una reciente evolución del grupo y tres procesos principales habrían contribuido a la evolución del género *Manihot*: la hibridación interespecífica, la poliploidía y la apomixis.

A través de la hibridación interespecífica, se habrían originado poliploides por fertilización de gametos no reducidos (Nassar, 1991). Ogburia et al. (2002) observaron la formación de esporadas, diadas, tríadas y tétradas en cultivares poliploides de Mandioca.

La formación de microsporas no reducidas, aparentemente tuvo un papel muy importante en el origen de la poliploidía en *Manihot*, que puede ser responsable de la considerable variabilidad en este género, corroborando en *M. esculenta* cv Chioriquí de Costa Rica, evidencias de un proceso normal de meiosis y simultáneamente de la formación de díadas debido a núcleos de restitución en la meiosis y otras irregularidades dentro de una misma inflorescencia (Vásquez y Nassar, 1994). Lo mismo sucedería en híbridos interespecíficos de *M. glaziovii* con *M. esculenta*; por lo que la formación de gametos no reducidos sería la principal responsable de la poliploidización en *Manihot*. La poliploidía contribuyó al éxito y a la reproducción de híbridos interespecíficos estériles, haciéndolos fértiles.

Los antecedentes encontrados sobre biología reproductiva en *Manihot* son escasos. Etnovariedades de Mandioca de la región de Amazonia y de San Pablo, Brasil, fueron estudiadas en estructura floral, polinizadores, depredadores, viabilidad de polen y producción de semillas (Meireles da Silva et al., 2001).

El estudio de la morfología del grano de polen es útil en trabajos taxonómicos debido a que los caracteres que presentan son estables y distintivos, esta propiedad se conoce como especificidad. La exina está impregnada de esporopolenina, lo que le confiere dureza y resistencia al ataque de microorganismos y ácidos orgánicos. Esta propiedad permite el estudio de granos de polen en sedimentos fósiles, mieles, muestras antropológicas, etc. Trabajos recientes (Vieira et al., 2012; Nowicke, 1994) de morfología y viabilidad de polen de seis especies nativas de *Manihot* y del cv. Rosa de *M. esculenta*, afirmaron que todas las especies poseen granos de polen inaperturados, de estructura similar. Información sobre estos aspectos son de gran importancia principalmente en trabajos de mejoramiento genético y para la caracterización de clones.

En el marco del proyecto “Protección legal para la preservación Universal y pública de variedades de la tierra en el NEA” de INTA –AUDEAS -CONADEV, se colectaron diferentes cultivares de Corrientes, los que se mantienen en la EEA INTA- Corrientes. De un total de 37 accesiones, siete cultivares fueron seleccionadas para este trabajo.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo del proyecto es corroborar el número cromosómico de siete cultivares de la colección de *M. esculenta* de INTA, representativos de cada uno de los grupos propuestos por Bogado et al. (2016) en base a descriptores agro morfológicos y analizar algunos aspectos de la biología reproductiva (viabilidad de polen y cantidad de granos de polen por antera).

Objetivos operacionales

- Determinación del número cromosómicos de cada cultivar (cv.) de *Manihot esculenta* seleccionado.
- Análisis de viabilidad de polen, cantidad de granos /antera y morfología polínica de algunos de los cultivares seleccionados.
- Comparar estadísticamente los datos de los diferentes cultivares de *Manihot esculenta* Crantz con una especie nativa, *Manihot grahamii* Hoock.

MATERIALES Y MÉTODOS

De los 37 cultivares de Mandioca que posee INTA Corrientes, se realizaron recuentos cromosómicos en 31, y de aquellos que florecieron en la campaña 2015/2016 se aplicaron estudios sobre algunos aspectos de la biología reproductiva.

De este material, según el fenograma de distancia basado en el método UPGMA y el índice de Gower, para caracteres cualitativos y cuantitativos utilizados para la descripción de los cultivares de Mandioca de la provincia de Corrientes (Bogado et. al. 2016), se seleccionaron 7 cultivares para la realización de esta tesis, tratando de cubrir los cuatro grandes grupos propuestos (ver Anexo 1).

Los cultivares de *M. esculenta* utilizados fueron: Grupo 1: cv. **Catiguá**; Grupo 2: cv. **Rocha**, cv. **Derqui**; Grupo 3: cv. **Coloradita**, cv. **Campeona Chaco** y Grupo 4: cv. **Rama Seda**, cv. **Verde Santa Ana**. Se estudió una especie silvestre: *Manihot grahamii* Hoock.

Preparación de la población de cultivares

De las ramas de los cultivares recibidos en el mes de Agosto de 2015, tratadas con dimetoato, según el protocolo que utiliza la EEA INTA El Sombrerito; se realizaron entre 3 y 12 estacas con 4-5 nudos, de aproximadamente 15 cm de longitud (dependiendo del tamaño y calidad de las ramas). Las que se mantuvieron en invernáculo en condiciones ambientales controladas, con riego automatizado y controlado personalmente dos veces al día; hasta obtener la cantidad necesaria de raicillas para confirmar el número cromosómico.

Se evaluó el comportamiento de estacas en posición horizontal y vertical (Fig. 1), y en distintos sustratos, con el objeto de obtener buena calidad y cantidad de raicillas para su estudio. Los sustratos utilizados fueron: a) arena, b) mezcla de arena con tierra, c) turba y d) sustrato comercial levemente ácido de turba de Sphagnum, vermiculita, cal calcita, cal dolomita, agentes humectantes y fertilizantes (Fig.2).



Fig. 1. Estacas verticales en sustrato comercial para obtención de raicillas.



Fig. 2. Estacas enraizadas en diferentes sustratos. A) turba con vermiculita; B) sustrato comercial de turba de *Sphagnum*.

Preparados citológicos

Extracción de raicillas: La extracción de raicillas se realizó cuando éstas tenían aproximadamente 1 cm. de largo (mínimo) visible por fuera del sustrato (Fig.3). El horario de extracción variaba entre las 13.30 hs. a 15.00 hs. según los días se iban alargando o acortando variaba el horario en que se encontraban mayor cantidad de células en división.



Fig. 3. Tamaño y calidad óptima de raicillas para fijar.



Fig. 4. Estacas con tres semanas de plantadas; para transplante a campo.

Pre tratamiento de raicilla: Las raicillas extraídas, se introdujeron en tubos de ensayo con solución saturada de hexaclorociclohexano (Gamexane) durante 2.30 hs. a 3.00 hs. (Schwarzacher 1989);, sustancia que produce la ruptura de las fibras del huso y el acortamiento de los cromosomas, produciendo también una mayor dispersión de los cromosomas para una mejor visualización.

Fijación del material: La fijación del material es importante para preservar la morfología y la composición química de los tejidos y células. Dependiendo del estudio que se quiera realizar se utilizan distintos fijadores. Cumplido el tiempo establecido por el pre tratamiento, el mismo fue colocado en una mezcla fijadora de alcohol y ácido láctico, con una proporción 5 v: 1 v durante 24 hs. a temperatura ambiente (Fernandez 1973). Se conservó el material a -15°C hasta el momento de la realización del preparado.

Coloración: La coloración para la observación de los cromosomas se realizó utilizando la técnica de Feulgen; el fundamento de este método se basa en la identificación altamente específica de ácidos nucleicos del ADN a partir del reconocimiento de los grupos aldehídicos de la pentosa. Para esto se realizan 2 pasos fundamentales: 1) Hidrólisis ácida débil con ácido clorhídrico (HCl) 1 N a 57° C durante 10 minutos. 2) Tinción con Reactivo de Schiff, en oscuridad, durante 1 – 1,30 hs. El ácido clorhídrico es el reactivo más crítico del método, la coloración correcta dependerá también de la concentración del ácido, la temperatura, tiempo, tipo de tejido y fijador empleado, para lograr una tinción apropiada.

Preparados citológicos: La raicilla se colocó en un portaobjeto, y bajo la lupa se extrajo solamente el meristema radicular, eliminando el tejido de la calíptera. Debido a que las membranas celulares del meristema eran muy resistentes al aplastado y para lograr una mejor desintegración, se colocó encima del ápice de las raicillas coloreadas un mix de enzimas y se incubó a 37° C durante 10 a 15 minutos, luego sobre la raicilla libre de enzimas se reforzó la coloración con una gota de orceína acética.

Posteriormente se disagregó el ápice radicular, se cubrió con un cubrobjecto y se realizó el aplastado (squash). Con estas modificaciones de las técnicas tradicionales, se lograron buenos resultados.

Recuentos cromosómicos: Una vez obtenidos los preparados se observaron en un microscopio óptico LEICA DM 500 con cámara incluida LEICA ICC50, estudiando en promedio 15 células por preparado. Las fotografías se tomaron en este microscopio y se corrigieron resolución, brillo y contraste con programas de fotografía para la impresión.

Trasplante a campo: Una vez obtenidas las cantidades suficientes de raicillas, se llevaron a campo dos plantas de cada cultivar en el mes de Febrero de 2016, en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias, para la obtención del material necesario para estudios de fertilidad de polen. Se mantuvieron éstas hasta la finalización de los estudios.

Preparados de granos de polen

Viabilidad de polen

Durante el periodo de floración (de enero a marzo) se recolectaron flores masculinas frescas, minutos antes de que se produjera la dehiscencia de las anteras (entre las 11:00 hs. y 15:00 hs.), para la realización de los preparados con polen fresco.

Se probaron tres colorantes tradicionales para inferir la viabilidad de polen, Carmín glicerina, lugol (Iodo-yoduro de potasio) y colorante Alexander. Con lo que se pudo analizar el porcentaje de granos coloreados y no coloreados, y obtener datos sobre tamaño y forma de los mismos. Estas técnicas de coloración de polen, son métodos indirectos para estimar la viabilidad de los granos de polen, puesto solo se observa el estado del citoplasma (carmín glicerina), contenido de sustancias de reserva (lugol) y el colorante de Alexander es una coloración diferencial para membranas y citoplasma (Alexander 1980).

Morfología polínica

A partir de inflorescencias fijadas en FAA se extrajeron flores masculinas, de las cuales se obtuvieron los granos de polen que fueron procesados con la técnica de Erdtman (1960). Se realizaron preparados permanentes para su análisis con microscopio óptico (MO). Las mediciones de los granos se hicieron tanto en microscopio óptico como en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

Se realizaron preparados para su estudio con MEB, los granos de polen fueron montados en láminas de aluminio, posteriormente metalizados con una fina lámina de oro utilizando el equipo Denton Vaccun Desk II y observados con el equipo Jeol 5800 LV del Servicio de MEB de la SGC y T, UNNE. Se analizaron 20 granos de polen por cultivar, en los que se tomaron las siguientes medidas: diámetro del grano de polen, espesor de la exina, se contaron y se midieron número de cabezuelas de los anillos de exina; se midieron y contaron las aperturas (poros) de los granos.

Análisis estadísticos

Se aplicaron análisis estadísticos mediante el programa *InfoStat versión 2017* (Di Rienzo et al 2017) para la morfología y viabilidad de polen.

Análisis de componentes principales (PCA): es una técnica que permite representar ópticamente en un espacio de dimensión pequeña, observaciones de casos p-dimensional. Es uno de los pasos para identificar posibles variables latentes o no observadas que están generando una variabilidad de los datos.

Análisis de la varianza (ANOVA) y prueba a posteriori de medias, *test de Duncan*, $\alpha=(0,05)$, para detectar si existen diferencias en el tamaño de granos de polen entre los cultivares pertenecientes a *M. esculenta* y *M. grahamii*.

Gráfico de proporciones acumuladas: Para expresar la diferencia de viabilidad entre cultivares de *M. esculenta* y la especie *M. grahamii*.

RESULTADOS

Plantines: Los mejores resultados en cuanto a la calidad y cantidad de raicillas se obtuvieron en estacas verticales, por lo cual se optó por esta técnica, pese a que normalmente a campo se utilizan estacas horizontales, y que existen antecedentes de mejores rendimientos con estacas inclinadas entre 45° y 60° (Henaín y Cenoz 1969).

Después de haber evaluado el enraizamiento en distintos sustratos, se pudo observar que en suelo con alta proporción de arena se obtenían mayor cantidad de raíces en menor tiempo, pero muy delgadas, no presentaban buena cantidad de divisiones mitóticas para estudio. En turba no se obtuvieron buenas raíces y las estacas presentaron síntomas fúngicos, quizás debido a la gran retención de agua del sustrato. En el sustrato comercial levemente ácido se logró obtener el mejor enraizamiento, estado sanitario y calidad de raicillas para ser analizadas.

Enraizamiento: Las raicillas comenzaron aemerger del sustrato entre diez a treinta días después de plantadas las estacas; observándose que los cvs. (cultivares) Derqui y Catiguá fueron los que más tiempo necesitaron para enraizar (Tabla 1).

Tabla 1: Tiempo necesario (días) para la aparición de raicillas a través del sustrato, para obtención del material de estudio.

Cultivar	Nº de plantas estudiadas	Días / enraizar
Catiguá	3	25
Rocha	3	20
Derqui	5	30
Campeona Chaco	5	12
Coloradita	4	15
Verde Santa Ana	9	10
Rama Seda	12	10

Recuentos cromosómicos

En metafases mitóticas, todos los cultivares estudiados y *M.grahamii* Hoock presentaron 2n=36 cromosomas (Tabla 1, Anexo I). Todas las plantas presentaron cromosomas pequeños, midiendo desde 0,7 µm los más pequeños a 1,75 µm los más grandes; en cuanto a su morfología se observaron tanto cromosomas metacéntricos y submetacéntricos.

Entre los diferentes cultivares se observó un número variable de satélites (0 - 6) en metafases mitóticas, todos ellos ubicados en los brazos cortos de los cromosomas (Fig. 5 y 6). En el cv. Catiguá solo se observó 1 par de cromosomas grandes con satélites.

Los cvs. Rama Seda y Rocha presentaron 3 pares de cromosomas con satélites y se observó la presencia de cromosomas accesorios en los cvs. "Rama seda" y "Verde Santa Ana" (Fig. 6, F).

Para *Manihot grahamii* una especie silvestre de Argentina, este es el primer recuento cromosómico, confirmando $2n=36$ cromosomas y un par de cromosomas con satélites (Fig.5,B). En el Anexo II se detallan los números cromosómicos de 23 cultivares de la colección INTA.

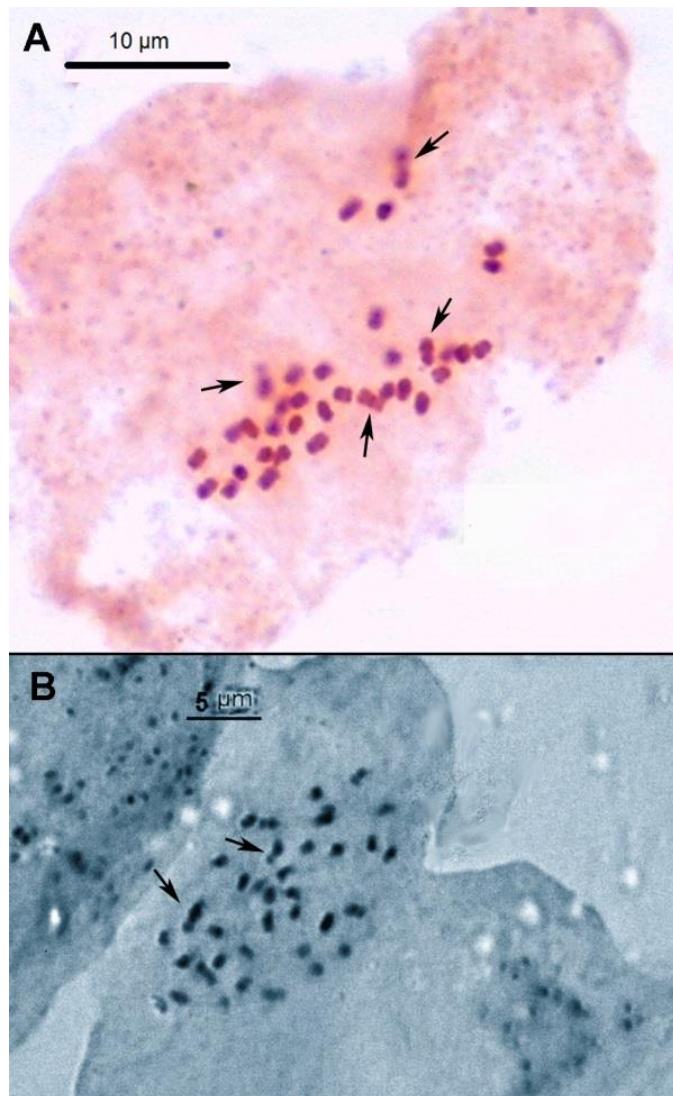


Fig 5. Metafases mitóticas. A) *Manihot esculenta* cv. Coloradita; B) *Manihot grahamii*. Flechas indican los cromosomas con satélites.

Tabla 2: Recuentos cromosómicos de siete cvs. de *M. esculenta* y *M. grahamii* indicando número de plantas estudiadas, número de células analizadas, cantidad de satélites y cromosomas accesorios observados.

Cultivar	Nº de plantas estudiadas	2 n=	Presencia de satélites y/o cromosomas b.	Nº Células estudiadas/ pl.
Catiguá	3	36	2	10
Rocha	3	36	6	15
Derqui	5	36		20
Campeona Chaco	5	36	2	15
Coloradita	4	36	4	15
Verde Santa Ana	9	36	2 cromosomas accesorios	20
Rama seda	12	36	6 satélites + 2 cromosomas accesorios	20
<i>Manihot grahamii</i>	2	36	2	15

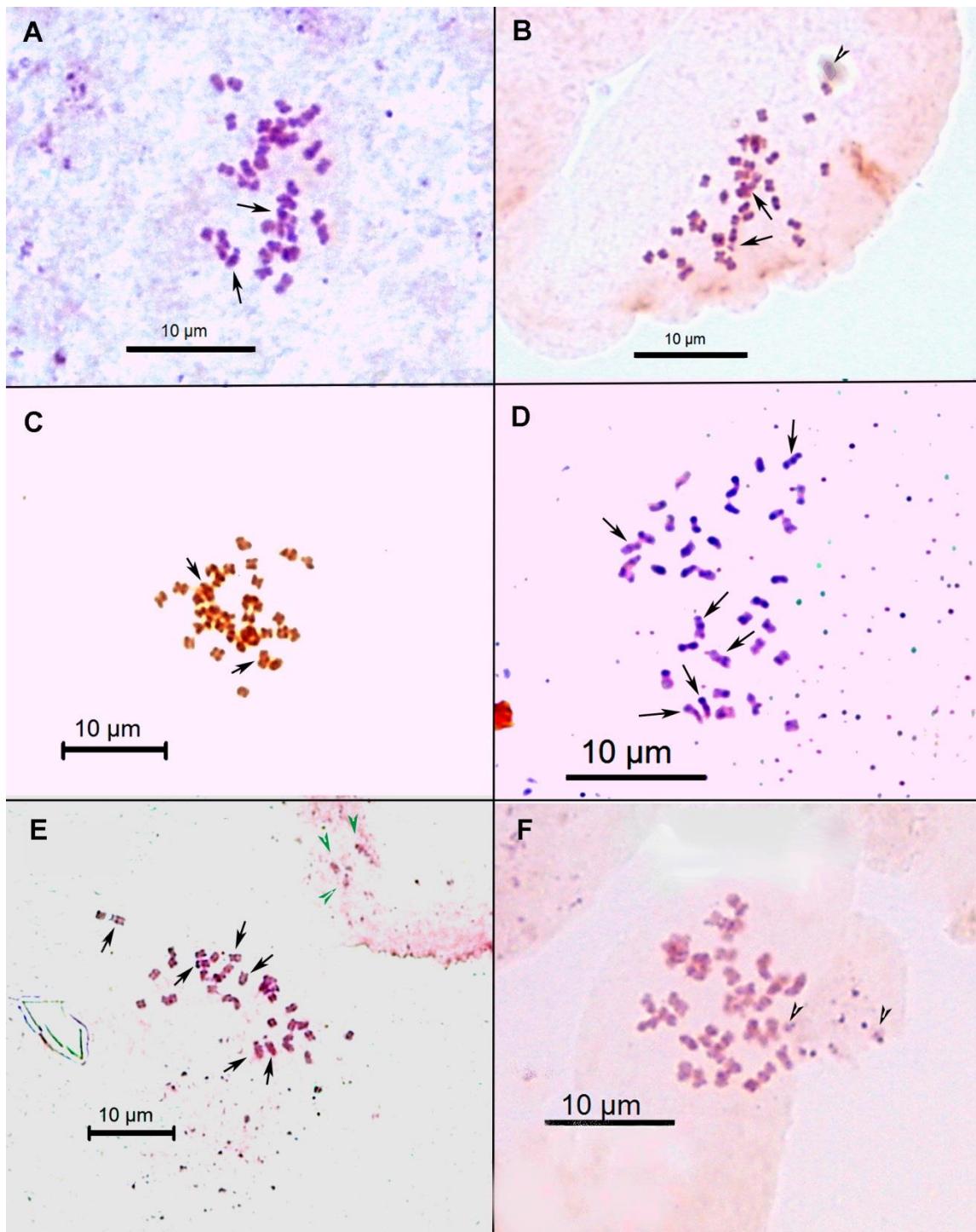


Fig. 6: Placas metafásicas de seis cultivares de mandioca. A) Catiguá, B) Campeona Chaco, C) Derqui, D) Rama seda, E) Rocha, F) Verde Santa Ana. Flechas indican cromosomas con satélites; puntas de flechas cromosomas fuera de foco y en (F) los cromosomas accesorios.

Granos de polen, morfología y viabilidad.

El número de granos de polen por antera se determinó disecando por preparado una antera de cada ciclo y coloreando con carmín acético. Repitiendo esta operación para 10 flores por planta (Tabla 3), observándose variabilidad entre los cultivares estudiados; viendo que el cv. Catiguá no formaba granos de polen (Fig.11 A - D).

Tabla 3: Promedios de números de granos de polen por antera, sin diferenciar los ciclos interno y externo del androceo.

Cultivar	Promedio granos/antera	Nº
Catiguá	0	
Rocha	130	
Derqui	80	
Campeona Chaco	162	
Coloradita	118	
Verde Santa Ana	120	
Rama Seda	126	



Fig.7: Anteras coloreadas con carmín glicerina.

Diez cultivares de los que se fijaron inflorescencias se estudiaron en MEB, correspondiendo cuatro de ellos a los abordados en este trabajo (Catiguá, Coloradita, Campeona Chaco y Verde Santa Ana).

Los granos de polen de *Manihot esculenta* son apolares, radiosimétricos, esferoidales, con medidas que varían desde 43,2 a 187,2 μm de diámetro según el cultivar. Son pantoporados, con 10 a 18 poros de 10,2 a 15,1 μm de diámetro, con opérculo (Tabla 4, Fig.7). Sin embargo en *M. grahamii* son inaperturados y más uniformes en tamaño, de 77,2 a 109,9 μm de diámetro (Tabla 4 y 5, Fig. 10 G-H).

Erdtman (1966) distingue morfológicamente la exina en dos capas, la nexina (interna y no estructurada) que es generalmente una capa lisa y homogénea, y sexina (exina estructurada) que es la parte de la exina que presenta estructuras dispuestas en forma radial.

En los cultivares de *M. esculenta* seleccionados para este trabajo, se observó que el espesor de la exina varía desde 8,7 μm a 13,5 μm , mientras que la nexina varía de 1,6 a 4 μm y la sexina entre 5,8 a 11,2 μm (Figs.8 y 9 C Tabla.4). Los granos de polen son intactados, con báculas libres, capitadas, suavemente ruguladas, cabezuelas de forma triangular de 4,9 a 9,6 μm y comprimidas lateralmente, variando entre 5 y 9 báculas dispuestas en anillos de exina, formando rosetas de 11,8 μm a 17,8 μm de diámetro y la membrana apertural con microgránulos (Fig.10 D). Se realizó el mismo estudio en cinco cultivares más (Anexo III).

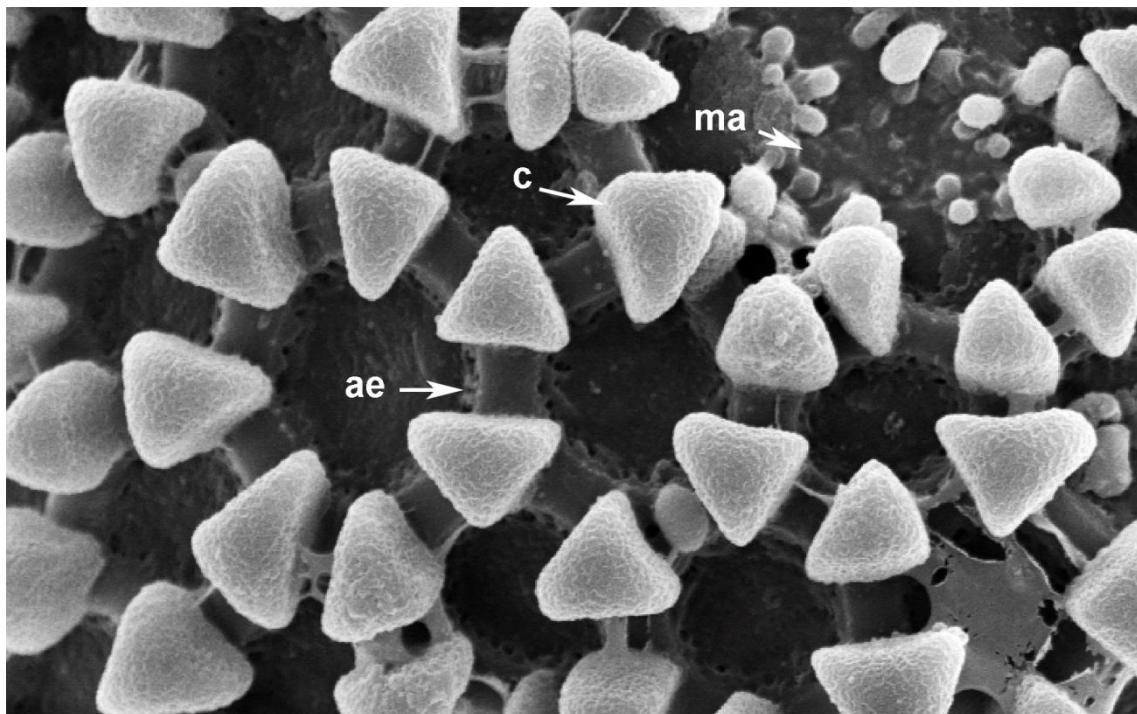


Fig. 8: Detalle de la estructura de la exina en *M. esculenta* donde se observan (ae) anillos de exina, (c) cabezuelas triangulares de báculas libres con textura rugulada y (ma) membrana apertural microgranulada.

Tabla 4: Promedios y valores máximos y mínimos de los caracteres analizados en microscopía electrónica de barrido.

Cultivar	Diámetro de poros (μm)	Nº de poros	Exina (μm)	Nexina (μm)	Sexina (μm)	Báculas	Diámetro de cabezuela de las báculas (μm)
Campeona Chaco	14,5 (13,3 - 15,1)	12 (10 - 14)	10,47 (9,1 - 11,6)	3,3 (3,2 - 4)	6,6 (5,8 - 7,6)	6 - 7	5,5 - 7,6
Coloradita	11,15 (10,2 - 12,5)	13 (10 - 16)	11,6 (8,7 - 13,5)	1,9 (1,6 - 2,2)	9,4 (7,1 - 11,2)	5 - 8	4,9 - 6,6
Verde Santa Ana	12,23 (10,5 - 13,3)	16 (14 - 18)	11,5 (9,1 - 13,1)	2,4 (2,2 - 3,0)	8,5 (6,9 - 10,1)	7 - 9	6,8 - 7,3

Especie	Diámetro de poros (μm)	Exina	Nexina	Sexina	Báculas	Diámetro de cabezuela de las báculas
<i>M. grahamii</i>	0	8,3 (10,2-6,4)	4,7 (6,3 - 2,8)	3,7 (3,9 - 3,6)	5 (4 - 6)	5,1 - 5,3

Análisis estadístico

Las variables que se utilizaron para el análisis de componentes principales fueron: diámetro de poro (DP), número de poros (NP), diámetro de grano de polen (DG), número de báculas (NC), diámetro de las cabezuelas de las báculas (DC) y espesor de la exina (E). A su vez los cultivares de *M. esculenta* evaluadas fueron: Coloradita, Campeona Chaco, Verde Santa Ana y *Manihot grahamii*.

La suma de las componentes CP1 93,1% y CP2 5,6 %, que es de 98,7% esta explicada por las variables estudiadas.

El análisis de correlaciones con las variables originales, mostró que las variables que están más correlacionadas son: número de poros (NP) y espesor de la exina (E), en menor grado de correlación están diámetro de poro (DP), diámetro de grano de polen (DG), y a su vez número de báculas y diámetro de cabezuela de báculas están altamente correlacionadas.

Las variables diámetro de cabezuela de las báculas y número de cabezuelas tiene correlación baja a nula con las variables DP y DG.

En el gráfico de biplot se observa que la especie *M. grahamii* se caracteriza por no poseer poros (NP- DP), por lo que se encuentra alejado del resto de los cuadrantes, pero tiene menor espesor de exina, menor diámetro de cabezuelas y número de cabezuelas. Dentro del grupo de *Manihot esculenta*, los cultivares que son similares en DP- DG -NP y E son Coloradita y Campeona Chaco, que tienen menor número de cabezuela y diámetro de cabezuelas. A diferencia del cultivar Verde Santa Ana, que se caracteriza por tener mayor DP, DG, NP, E y por poseer mayor número de cabezuela y diámetro de cabezuela.

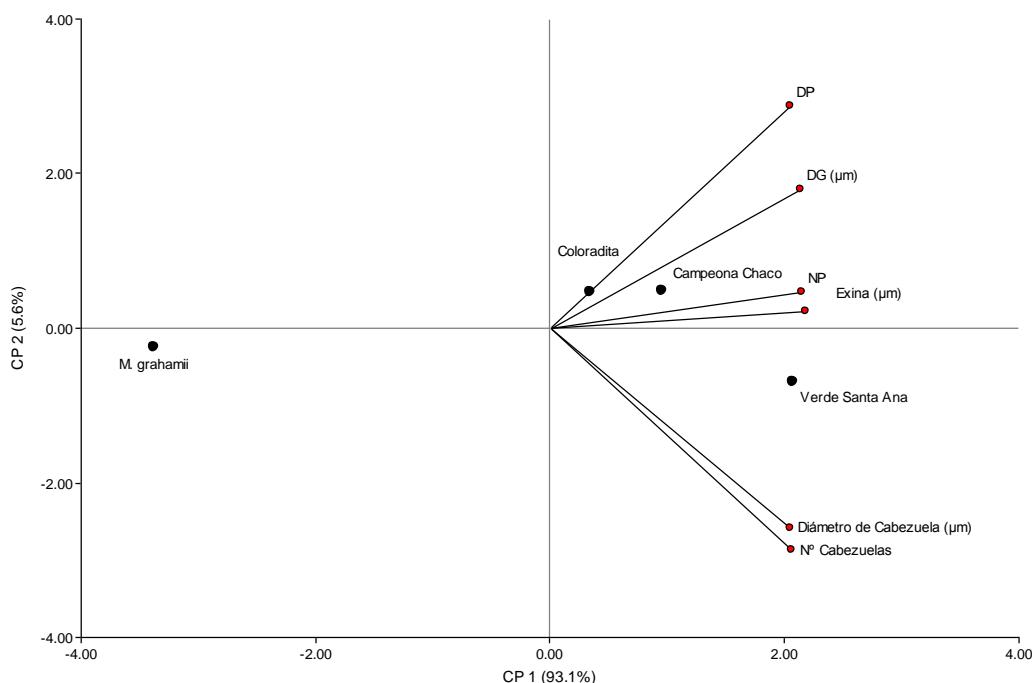


Grafico 1: Biplot del Análisis de los componentes principales. ANOVA.

Variables: DP = Diámetro de poro (μm), NP = Número de poros, E = Espesor de exina (μm),

NC = Número de cabezuelas (báculas), DC = Diámetro de las cabezuelas de las báculas (μm).

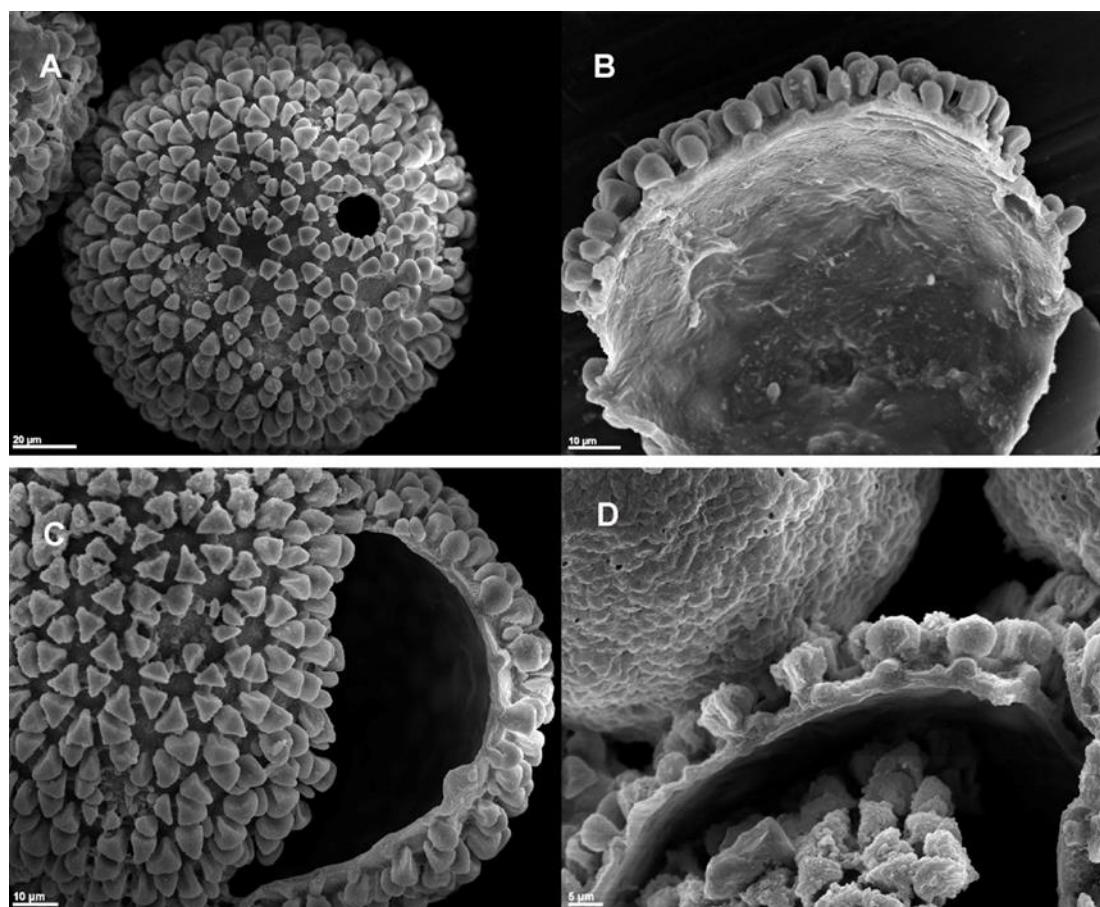


Fig.9: Grano de polen de *M .esculenta* en MEB. A) Grano de polen con poro sin membrana apertural. B- D: Cortes del grano de polen mostrando diferencias en estructura de la exina. B) cv. Campeona, C) cv. Coloradita. D) cv. Verde Santa Ana.

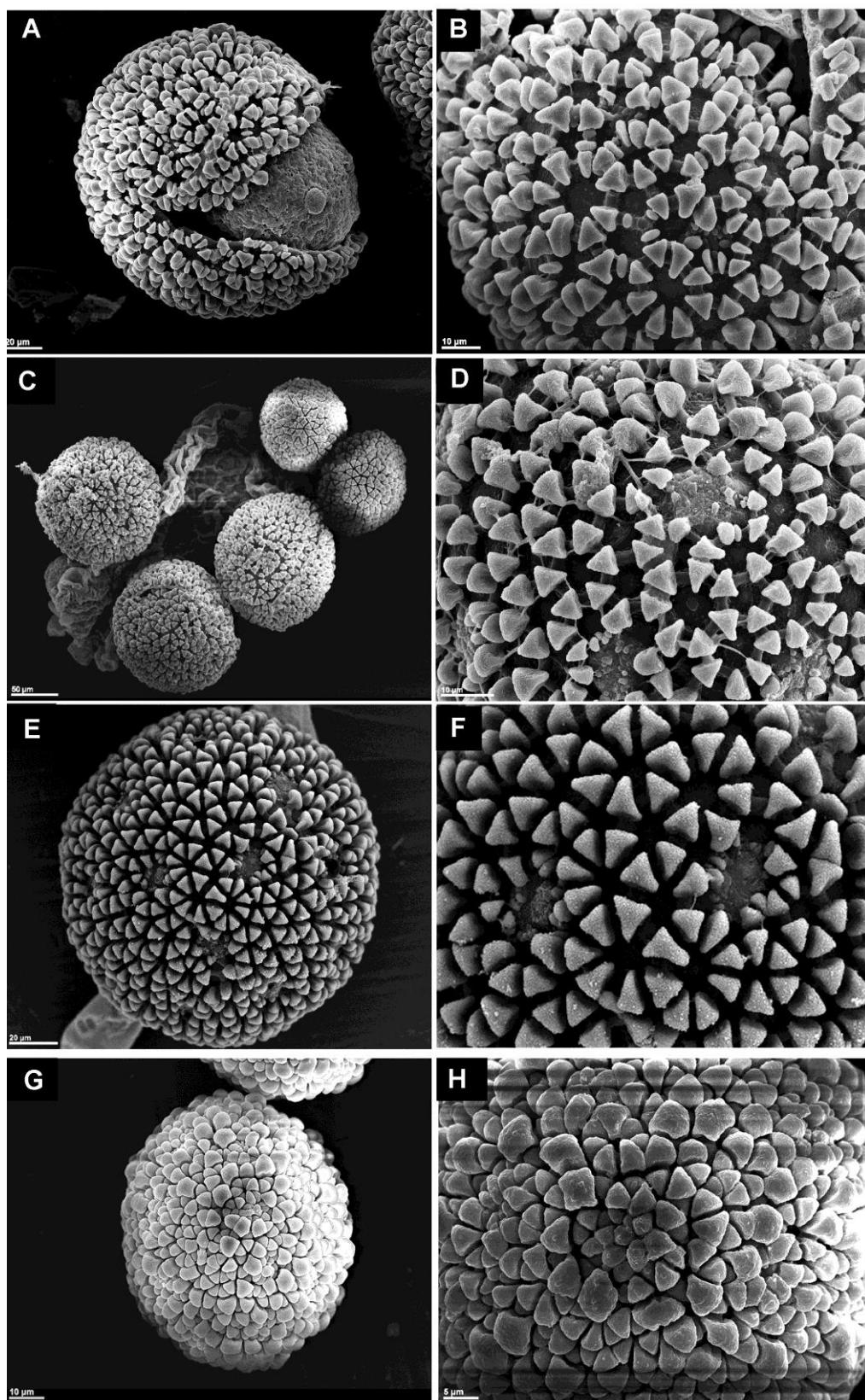


Fig.10: Granos de polen enteros y detalles de la exina. A-B) Campeona Chaco; C-D) Coloradita, E-F) Verde Santa Ana, G-H) *M. grahamii*.

Debido a la presencia de granos de polen de diversos tamaños en la mayoría de los cultivares, se los clasificó según Erdtman (1966) en: grandes (50-100 µm) y muy grandes (100-200 µm).

Tabla 5: Clasificación de los granos de polen de los cultivares de *M. esculenta* y *M. grahamii*, indicando promedio y variación.

Cultivar	Granos de polen Grandes 50-100 µm		Granos de Polen muy grandes 100-200 µm	
	Variación (Máx - min)	Tamaño Promedio	Variación (Máx - min)	Tamaño Promedio
Catiguá	----	----	----	----
Derqui	100 - 88,8	97,6	132,8 - 108,8	118,3
** Rocha	84,8-55,9	72,1	108,5	**----
Campeona Chaco	94,9 - 84,2	89,8	187,2 - 134,4	136,8
* Coloradita	69,3 - 43,2	57,9	173,6 - 103,1	144,7
Verde Santa Ana	79,4 - 50,9	63,2	171,7 - 123,9	152,4
Rama Seda	78 - 53,9	69,7	----	----

**Coloradita: Presenta una proporción muy baja (<0,1%) de granos de polen menores a 50µm.

**Rocha: Presenta una proporción muy baja (<0,1%) de granos de polen mayores a 100 µm.

Especie	Granos de polen Grandes 50-100 µm		Granos de Polen muy grandes 100 -200 µm	
	Variación (Máx - min)	Tamaño X	Variación (Máx - min)	Tamaño X
<i>M. grahamii</i>	77,2 – 91,9	74,5	101,2 – 109,9	106

Para detectar las diferencias entre los cultivares pertenecientes a *M. esculenta*, se procedió a un análisis de la varianza (ANOVA) y prueba a posteriori de medias $\alpha = (0,05)$ para el tamaño de granos de polen: Grandes (50 – 100 μm) y Muy Grandes (100 – 200 μm). (Grafico 2 y 3).

En cuanto a los granos de polen grandes, los cultivares: Derqui y Campeona Chaco estadísticamente son iguales siendo los que presentan mayor tamaño y se diferencian con los cultivares. A su vez, Rocha, Rama Seda y Verde Santa Ana, son iguales entre ellos. El cv. Coloradita es diferente con respecto a los grupos anteriores, ya que en promedio es la que presenta medidas más heterogéneas en los granos de polen grandes. *M. grahamii* es igual a los cultivares Derqui y Campeona Chaco en cuanto al tamaño de granos de polen grandes.

Al analizar los granos de polen muy grandes se obtuvieron diferencias significativas p-valor < 0,001 (Gráfico 3). Los cultivares Coloradita, Campeona Chaco y Verde Santa Ana son estadísticamente iguales, mientras que el cv. Coloradita es diferente a Derqui y Rocha, pero a su vez entre ellos son iguales.

Los granos de polen muy grandes de *M. grahamii* son estadísticamente iguales a los cultivares Derqui y Rocha.

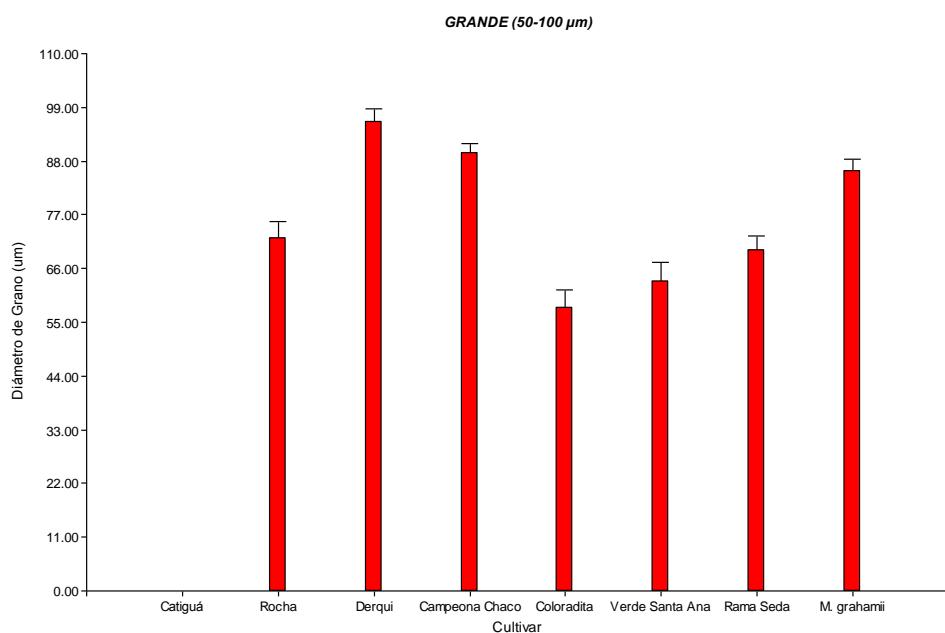


Gráfico 2: Gráfico de barras de Medias y prueba a posteriori, test de Duncan, tamaños de granos de polen Grandes (50–100 μm).

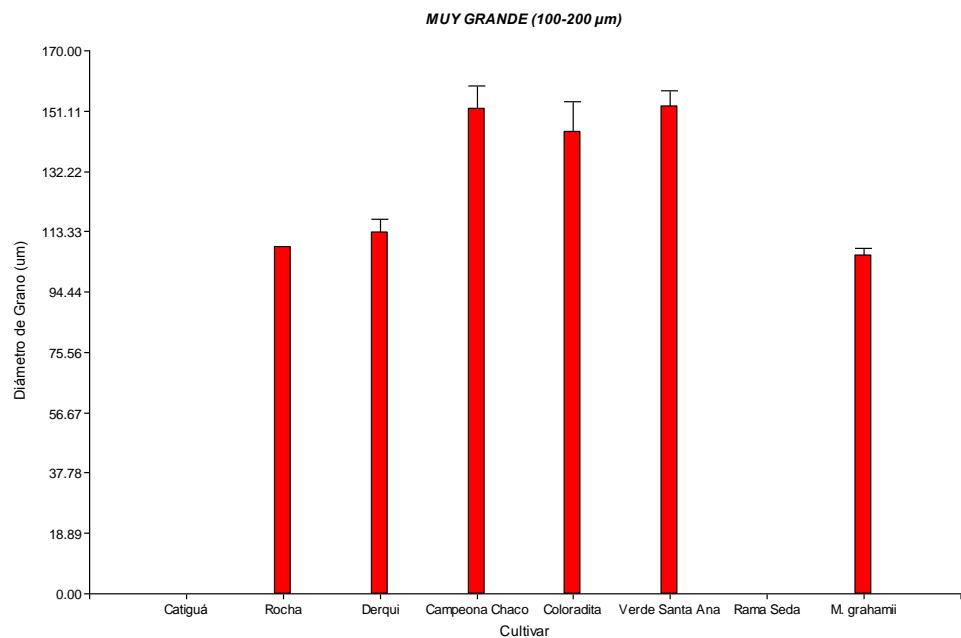


Gráfico3: Gráfico de barras de Medias y prueba a posteriori, test de Duncan, granos de polen muy grandes (100 – 200 µm).

Viabilidad de Polen

Las mejores tinciones para esta especie se obtuvieron al colorear los granos de polen fresco con carmín glicerina, el colorante de Alexander y el lugol colorearon muy intensamente los granos de polen, impidiendo una buena diferenciación.

Lo más notable se observó en el cv. Catiguá, cuyas anteras al momento de la antesis no poseían granos de polen maduros; al microscopio óptico, sólo se diferenció el tejido epidérmico (exotecio) de las tecas y el tejido conectivo (Fig.11 A). Se analizaron 30 anteras en distintos estadios de desarrollo; en estadios anteriores a la antesis en MEB se observaron estructuras, aparentemente granos de polen inmaduros, (Fig.11 D) mientras que al momento de la antesis las anteras se observaron totalmente colapsadas (Fig.11 B y 12 B), en ningún caso se observaron microsporocitos maduros bien desarrollados en este cultivar.

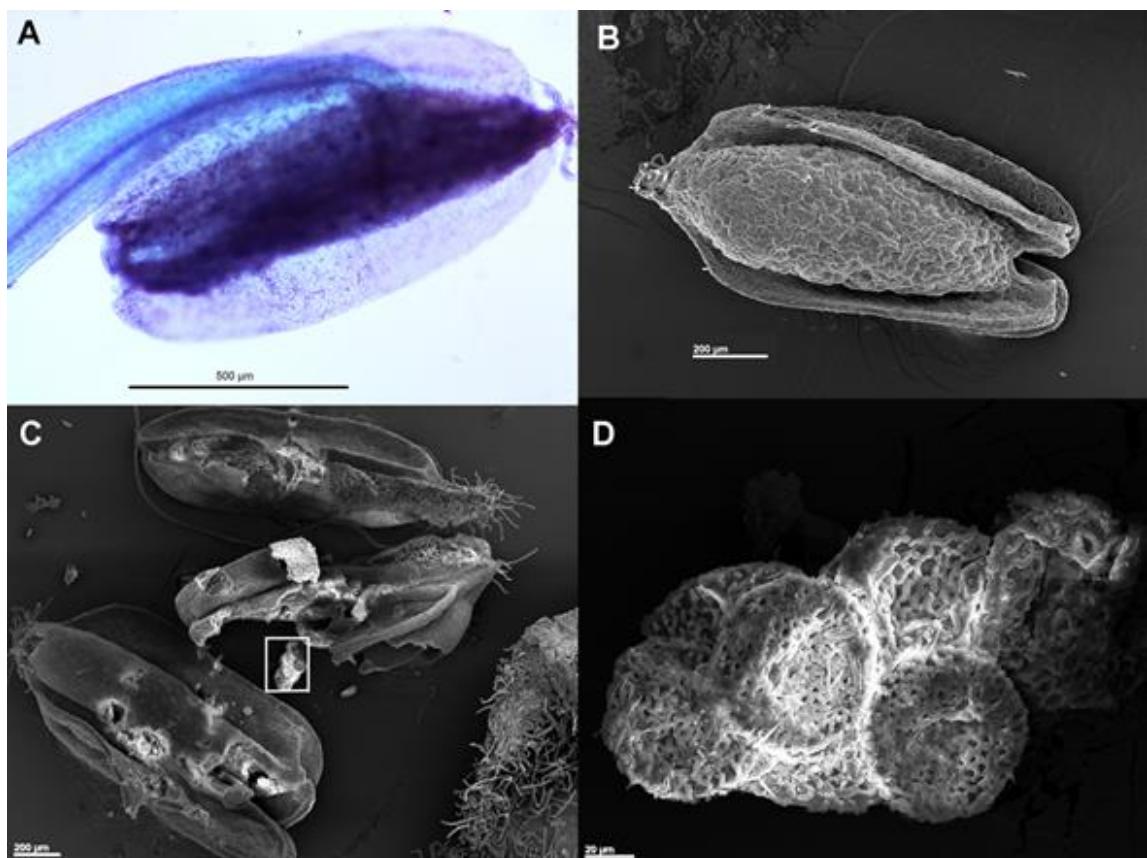


Fig 11: Anteras del cv. Catiguá. A) antera completa al momento de la antesis, en microscopio óptico y coloreada con Alexander. B) Antera al momento de la antesis en MEB. C) Antera inmadura, anterior a la antesis. D) Detalle del recuadro de la foto C, donde se observan los microsporocitos inmaduros.

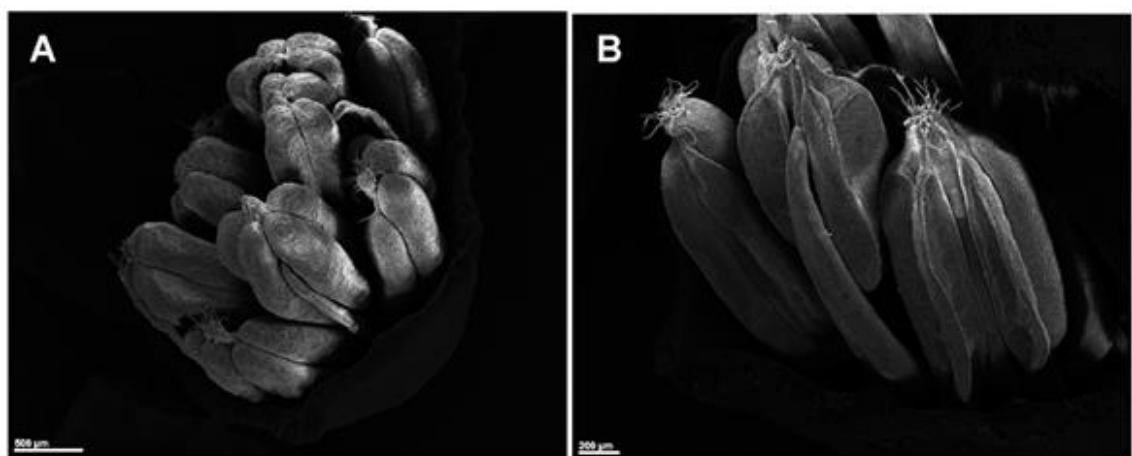


Fig. 12: Flores masculinas desprovista de los tépalos. A) cv, Campeona Chaco, flor masculina fértil; B) cv, Catiguá flor androestéril.

Tabla 6: Porcentajes de granos de polen coloreados/ no coloreados en siete cultivares de *M. esculenta* y número de granos observados () en los siete cultivares y en *M. grahamii*.

Cultivar	% Granos de polen grandes 50-100 µm		% Granos de polen muy grandes 100-200 µm		% Total acumulado coloreados	Total de granos de polen observados
	No coloreados	Coloreados	No coloreados	Coloreados		
Catiguá	-	-	-	-	-	-
* Rocha	16,0 (100)	83,9 (524)	----	----	83,9%	624
Derqui	73,0 (176)	0 (0)	26,9 (65)	0 (0)	0 %	241
Campeona Chaco	10,4 (306)	23,3 (93)	0,3 (266)	65,9 (514)	51,4%	1179
*Coloradita	80,3 (487)	19,6 (119)	2,7 (30)	97,2 (1052)	69,3%	1688
Verde Santa Ana	23,5 (171)	20,3 (148)	0,1 (1)	55,9 (407)	76,3%	727
Rama Seda	12,3 (65)	87,8 (461)	--	--	87,8%	526
<i>Manihot grahamii</i>	15,4 (133)	45,9 (395)	8,8 (76)	29,7 (256)	75,7 % (651)	860

En el análisis de porcentaje acumulado de granos de polen coloreados y no coloreados se observó que el cv. Rama Seda presentó el mayor valor (87,8 %), seguido por cv. Rocha (83,9%), Verde Santa Ana (76,3 %), Coloradita (69,3 %), Campeona Chaco (51,4 %). En el cv. Derqui no se observaron granos de polen coloreados y en el cv. Catiguá no hubieron granos de polen.

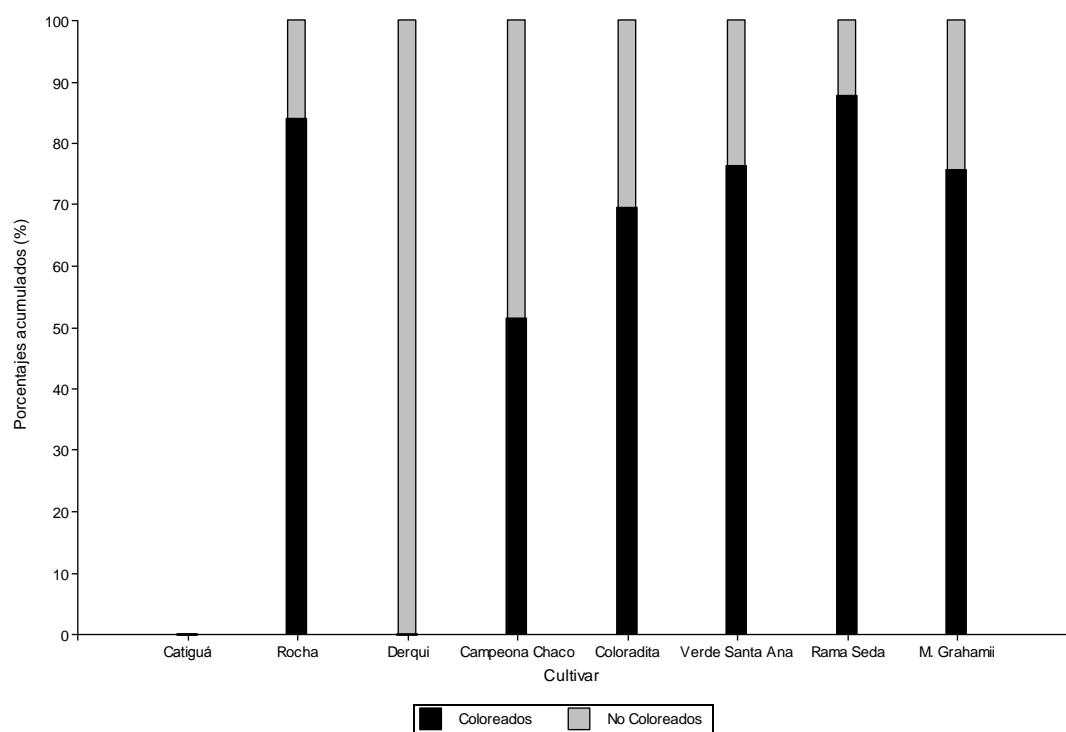


Gráfico 4: Gráfico de proporciones de granos de polen coloreados / no coloreados en los diferentes cultivares de *M. esculenta* y *M. grahamii*.

El cv. Derqui tuvo una floración tardía hacia el final de la temporada y se logró cosechar una sola inflorescencia, observándose un alto grado de aborto de las flores masculinas; solo una flor masculina presentaba tres anteras, de las que se pudieron contar 241 granos de polen, 176 granos grandes, y de éstos el 15,26% presentaban forma irregular casi piriforme (Fig.13 F). Los 65 granos restantes eran muy grandes con medidas entre 132,8 μm a 108,8 μm , y los de forma irregular o piriforme con un promedio de 114.9 μm de largo x 109,9 μm de ancho.

La mayoría de los granos de polen grandes fueron esféricos y con medidas entre 100,1 μm - 88,8 μm de diámetro; de las que se pudo observar que ningún grano de polen presentaba citoplasma normal y bien coloreado (Fig.13 F).

Si bien el cv. Rocha presentó un porcentaje de granos de polen muy elevado, 83.9% (Fig.13 D), el 16,02% fueron estériles, similar a lo que ocurre en el cv. Rama Seda, lo cual se puede apreciar en el análisis estadístico que agrupa estos cultivares.

El cv. Campeona Chaco es el que presenta menor porcentaje de viabilidad de los granos de polen (51,4%) en comparación a los otros cultivares.

El cv. Coloradita presentó un porcentaje acumulado del 63,9 % de granos de polen coloreados, a pesar de haberse observado la mayor variabilidad en cuanto al tamaño de los granos de polen. En los cultivares Verde Santa Ana, y Rama Seda, los valores de fertilidad de polen fueron 76.3% y 87.8% respectivamente; de estos, Rama Seda presentó mayor uniformidad en el tamaño de los granos de polen.

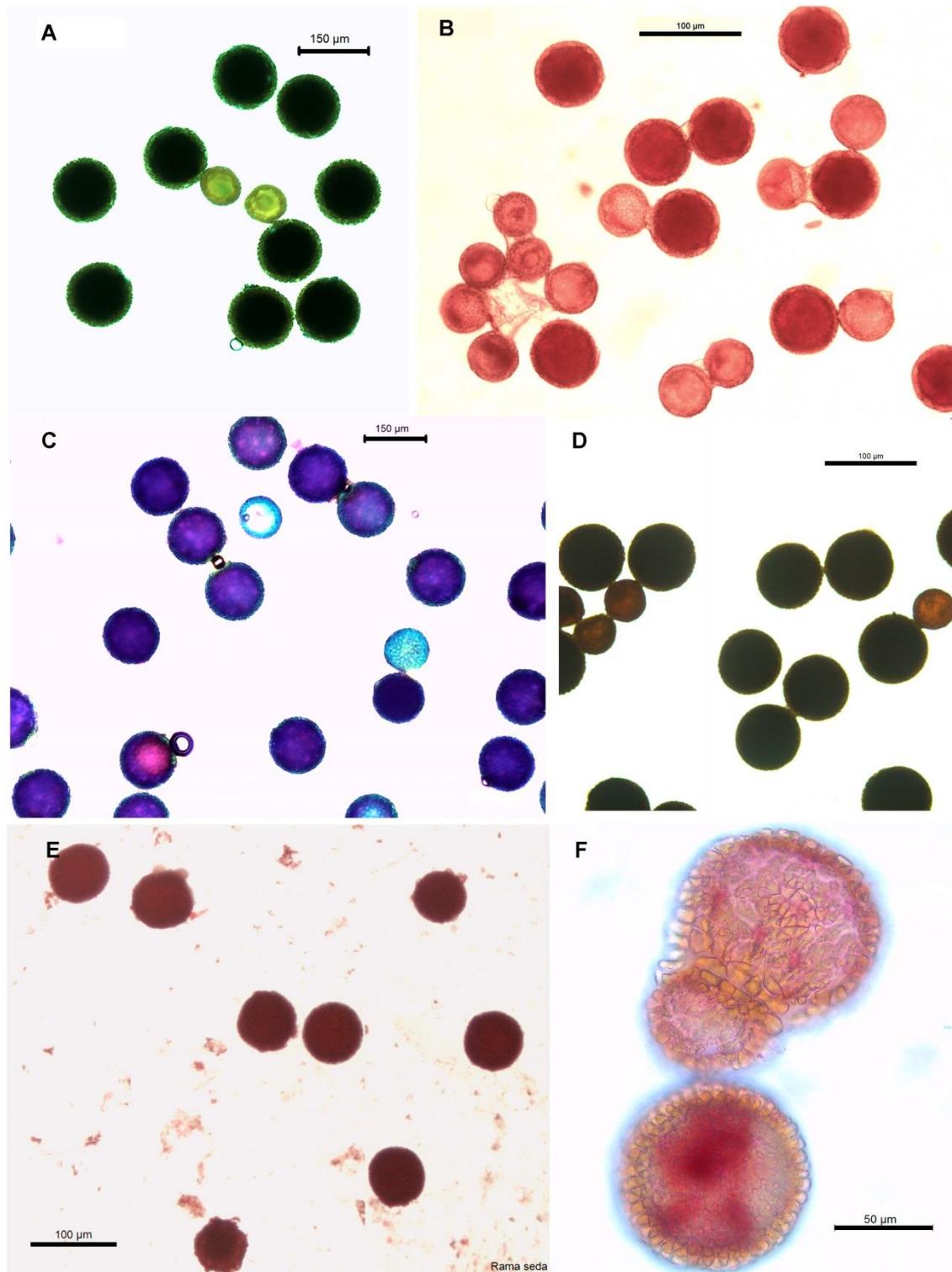


Fig.13: Viabilidad de granos de polen con diferentes técnicas de coloración. A) cv. Verde Santa Ana. B) cv. Coloradita (carmín glicerina. C) cv. Campeona Chaco D) cv. Rocha E) cv. Rama Seda, F) cv. Derqui.

DISCUSIÓN

Todas los cultivares de *M. esculenta* y *M.grahamii* presentaron 2n=36 cromosomas, coincidiendo con trabajos anteriores realizados por Nassar (1978) y De Carvalho y Guerra (1999) para diversos cultivares y especies nativas de Brasil. Comparando el número de cromosomas de diversos géneros de Euphorbiaceae, Jennings (1963) sugiere que el género *Manihot* podría ser un allotetraploide derivado de un número básico de la familia de x = 9.

Meióticamente todas las especies del género, incluso *M. esculenta*, se comportan como diploides. Magoon et al. (1969) propusieron un origen allotetraploide sugiriendo que sus antepasados diploides deben haber sido cariotípicamente muy similares. En otras oportunidades se indicaron probables hibridaciones naturales en *Manihot esculenta* (Nasar 1984, 1989, Cenóz et al 1972). Se observaron en los distintos cultivares la presencia de diferente número de satélites, que varían de 0-6; coincidiendo con Nassar (1978, 2000) y Carvalho y Guerra (1999) para cultivares de Brazil; con estudios más detallado de la morfología de los cromosomas podrían ser utilizados en futuros estudios evolutivos de esta especie, principalmente con técnicas de marcadores moleculares, debido al tamaño de los cromosomas.

La producción de polen viable es un carácter relevante a tener en cuenta en programas de mejoramiento genético de mandioca, porque afectaría el flujo génico en los cultivares y es indispensable al momento del almacenamiento del mismo, debido a la floración asincrónica que presenta esta especie. Estos datos son importantes cuando el objetivo es seleccionar plantas parentales para hibridaciones inter / intraespecíficas. Los datos obtenidos en cuanto al número de granos de polen /antera y viabilidad de los mismos coinciden con los de etnovariedades de Brasil estudiados por Meireles da Silva (2001).

La mayoría de los cultivares presentan diferencias en el comportamiento reproductivo. La esterilidad en los cultivares Catiguá y Derqui pueden ser debidas a la acumulación de mutaciones a través del tiempo, de domesticación y propagación vegetativa del cultivo. En el cv. Catiguá, con las observaciones realizadas en el MEB se comprobó la presencia de microsporas inmaduras, en anteras jóvenes (antes de la antesis); el desarrollo de las anteras puede ser normal y la microsporogénesis puede detenerse durante o poco después de la meiosis, lo que produciría con posterioridad el proceso de desintegración de microsporas jóvenes, puesto que no se observan microsporas maduras con desarrollo completo de la exina, proceso que está relacionado al funcionamiento del tapete. Casos similares han sido descriptos en *Nicotiana tabacum* y en diversas especies de *Brassica* (Kofer et al. 1991, 1992 and Makarof 1995). Por lo general, en estos casos el tapete sufre degradación celular durante la meiosis, seguido poco después por la muerte de las microsporas inmaduras (Kaul 1988). Balk y Leaver (2001) han demostrado que en el girasol existen genotipos androestériles, debido a un proceso de muerte celular programada asociados a componentes mitocondriales, específicamente a la liberación de citocromo C durante el desarrollo de la antera.

Las diferencias de tamaños en los granos de polen fueron observados por Nassar (2000) en híbridos triploides obtenidos, con baja fertilidad y viabilidad del mismo. Sin embargo, solo los cultivares Rocha y Rama Seda presentan gran uniformidad en cuanto al tamaño. Mientras los demás cultivares tienen gran variabilidad, similar a lo observado en híbridos naturales e interespecíficos (Nassar 1980, 1984, 1991); Ogburia et al. (2002), observaron micronúcleos en esporadas; diádes, tríades y tétrades en cultivares poliploides.

CONCLUSIONES

Todos los clones estudiados presentan $2n = 36$ cromosomas, observándose únicamente diferencias en el número de satélites y presencia o no de cromosomas accesorios.

Este es el primer recuento cromosómico para *M. grahamii*, una especie nativa de Argentina, Sudeste de Brasil, Paraguay y Uruguay.

Los cultivares Catiguá y Derqui presentaron androesterilidad, la misma puede deberse a diferentes causas. El cv. Catiguá directamente no presentó evidencias en la formación de granos de polen maduro, por lo que puede tratarse de un tipo de androesterilidad citoplasmática. En cambio, en el cv. Derqui la androesterilidad podría ser génica debido a que hay formación de granos de polen pero estos no son fértiles.

En estudios de morfología polínica en MEB y a través del análisis de los componentes principales, los cultivares Coloradita y Campeona Chaco se diferencian del cv. Verde Santa Ana que pertenecería a otro grupo, coincidiendo con lo propuesto por Bogado et al. (2016).

Los cultivares que presentaron mayor homogeneidad en el tamaño de granos de polen, cv. Rocha y cv. Rama Seda, fueron los que presentaron mayor porcentaje de viabilidad ($>80\%$). Mientras que los restantes presentaron valores intermedios de viabilidad.

El número de granos de polen observado por antera es bajo, por lo que es un carácter a tener en cuenta para programas de mejoramiento genético, a través de cruzamientos, al momento de obtención y conservación.

Se pudo comprobar que si bien el género *Manihot* presenta granos de polen inaperturados, como *Manihot grahamii*, la especie *Manihot esculenta* tiene granos de polen pantoporados y aperturados.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55 (1): 13-18 pp.
- Balk, J. & C. J. Leaver. 2001. The PET1-CMS Mitochondrial Mutation in Sunflower Is Associated with Premature Programmed Cell Death and Cytochrome. *The Plant Cel* 13: 1803–1818 pp.
- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A & Robledo C.W. 2008. *Infostat. Manual del Usuario*. Córdoba, Argentina. Editorial Brujas. 335pp.
- Bogado, F., I. Malawka Henaín, J. Bertollo, F. Paredes, I. Caponio, y G. Norrmann y R. Medina. Evaluación de descriptores agromorfológicos del germoplasma de Mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) cultivado en EEA INTA Corrientes. Jornada SAG. FACENA. UNNE., Corrientes., 2016.
- Buitrago, J.; J. L. Gil Llanos & B.Ospina Patiño. 2001. *La Yuca en la alimentación avícola*. Cuadernos Avícolas. 14. Edit. E. Meek Muñoz; H. Aldana Navarrete. Consorcio Latinoamericano y del Caribe de apoyo a la Investigación y al Desarrollo de la Yuca. Bogotá, D.C Colombia. 48 pp.
- Castaño Peláez , H.I.. 2008. La yuca como alternativa para la producción de alcohol carburante. *Revista Politécnica* 4 (6): 25 - 37 pp.
- Cenoz, H. M, A. E Henaín, y D. Perucca B. Mandioca "Taragui CAFPTA" F.A.V.C. Publicación del Departamento de Producción Vegetal. FAcultad de Agronomía y Veterinaria (UNNE), nº 15 (1972): 1-17.
- Colombo, C, & A. Charrier. 2000. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetic Molecular Biology* 23: 189–199 pp.
- Costa, M. R, E. Ramos & M. Cardoso. 2003. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*manihot esculenta*) por meio de marcadores rapd. *Ciênciencia agrotecnica*. 27(1);: 158 - 164 .
- De Bernardis, L. *alimentosargentinos.gob.ar*. 2011. Editado por Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación.
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/51/productos/r51_09_Mandioca.pdf.
- De Carvalho, R. & M. Guerra. 2002. Cytogenetic of *Manihot esculenta Crantz* (Cassava) and eight related species. *Hereditas*. 136: 159 - 168 pp.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M.& Robledo C.W. «InfoStat versión 2017.Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.»

Di Rienzo, J.A, M.G.Casanovas Balzarini, y Di Rienzo, J.A., Díaz, M. P., González, L. A., Robledo, C. W. & Tablada. F. 2005. *Estadística para las ciencias agropecuarias*. 6: 329pp. Córdoba: Brujas.

Dominguez, Martín.. 2016.« <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=35507>.».

Erdtman, G. 1966. *Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms (An Introduction to Palynology.I)*. Leiden. E.J Brill. 557 pp.

FAO., Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Perspectivas alimentarias Resúmenes de mercado. Octubre de 2015. <http://www.fao.org.worldfoods situation>.

Fernandez, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 15(2-3): 287 - 290.

Fukuda W.M.G, I.R.S Costa; A.D Vilarinhos & R.P, Oliveira.1996. Diversidade Genetica e Manejo de Germoplasma de Mandioca. Banco de Germoplasma de Mandioca:Manejo, Conservação e Caracterização. *EMBRAPA-CNPMF, Cruz das Almas*. 68: 10 - 32.

Gonzalez, A.M., Solís,S; B. Angulo, E. Kovalski, & C. Salgado. *Técnicas Histológicas*. Corrientes: IBONE, CONICET-UNNE, Facultad de Ciencias Agrarias, 2013.

Henaín, A.E, & H.M. Cenoz. 1971. La Mandioca (Manihot esculenta, Crantz). *Publicación del Departamento de Producción Vegetal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNNE*. 12: 9 - 11.

Htun, T. T. 2011. Pollen Morphology of Four Species in Family Euphorbiaceae. *Universities Research Journal* 4(1): 211-223.

Jennings, D.L. 1959. *Manihot melanobasis* Muell. Arg. A useful parent for cassava breeding. *Euphytica* 8: 157 - 162 .

Kaul, M. 1988. *Male Sterility in Higher Plant*. 10. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Kofer, W., K. Glimelius, & H. T. Bonnett. 1992. Fusion of male-sterile tobacco causes modifications of mtDNA leading to changes in floral morphology and restoration of fertility in cybrid plants. *Physiologia Plantarum* 85 (2): 334-338.

Kofer, W., K. Glimelius & H. T. Bonnett. 1991. Modifications of Mitochondrial DNA Cause Changes in Floral Development in Homeotic-like Mutants of Tobacco. *The Plant Cell* 3 (8): 759-769 .

Leicht, I.J, & M.D. Bennett. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2: 470 - 476.

Magoon, M.L, R. Krishnan & K. Vijaya Bai. 1969. Morphology of the Pachytene Chromosomes and Meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia* 34 (4): 612 - 626.

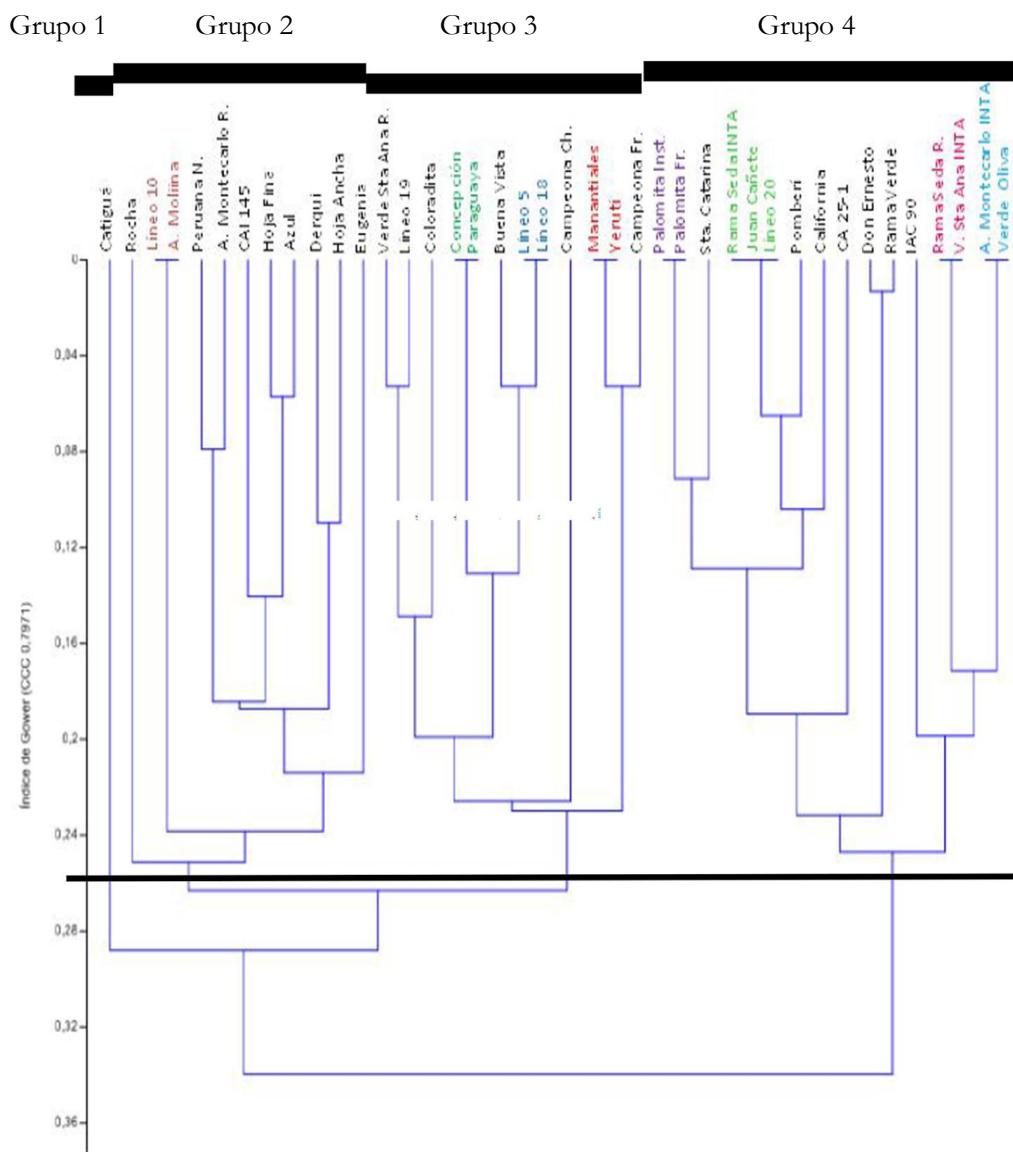
- Makaroff, C. 1995. Cytoplasmic male sterility in *Brassica* species. En *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*, 515–555 Edit.C. Levings I and I.K. Vasil. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Meireles da Silva, R, G. Bandel, M.I. Fernandez Faraldo & P. Sodero Martins. 2001. Biología Reproductiva de Etnovariedades de Mandioca. *Scientia Agrícola* 58 (1):101 - 107.
- Nassar, N.M.A. 1978. «Genetic resources of Cassava: Chromosome behavior in some *Manihot* species.» *Indian Journal of Genetic* 38: 135-137.
- Nassar, N.M.A. 1980. Attempts to hybridize wild *Manihot* species with cassava. *Economic Botany* 34: 13-15.
- Nassar, N.M.A. 1984. Natural hybrids between *Manihot* *reptans* Pax and *Manihot* *alutacea* Rogers and Appan. *Canadian. Journal of Plant Science* 64: 423-425.
- Nassar, N.M.A. 1989. Broadening the genetic base of cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by interspecific hybridization. *Canadian. Journal of Plant Science* (69): 1071-1073 pp.
- Nassar, N.M.A. 1992. Production of triploid cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by hybrid diploid gametes. *Field Crop Research* 13: 173-182.
- Nassar, N.M.A. 2000. Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genetics and Molecular Biology* 23 (4): 1003-1014.
- Nassar NMA 2002. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: origin of the crop, its evolution and relationships with wild relatives. *Genetic and Molecular Research* 1:298-305.
- Nassar, N. M. A. 2004. Cassava: Some considerations on its ecology and improvement. *WFL Publisher. Science and Technology. Journal of Food, Agriculture & Environment.* (2): 167 - 173.
- Nassar, N. M. A. 2007. Wild Cassavas, *Manihot* spp. to improve the crop. *Departamento de Genética e Morfologia Universidade de Brasília*. Brasília, Brazil. 13 pp.
- Nowicke, Joan W. 1994. A Palynological Study of Crotonoideae (Euphorbiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81 (2): 245-269.
- Ogburia, M. N., T. Yabuya, T. Adachi. 2002. A cytogenetic study of bilateral sexual polyploidization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Breeding* 121 (3): 278–280.
- Rogers, D.J., y S.G. Appan. 1782. *Manihot and Manihotoides (Euphorbiaceae)*. New York, NY, USA.: Hafner Press.
- Saenz, C. 1997. *Polen y Esporas. Introducción a la palinología y vocabulario palinológico*. Madrid: H. Blume Ediciones 219pp.
- Schwarzacher T., Leitch, A.R., Bennett, M.D., and Heslop-Harrison, J.S. 1989. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany* 64: 315–324.

Vásquez, N, y N. M. A Nassar. 1994. Unreduced microspores in Cassava, *Manihot esculenta* clones. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding*. 54: 436 - 441

Vieira, L. J, Soares T. L., M.L. Lanzoni Rossi, y Cunha Alves. A. A. 2012. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 26 (2): 350-356.

ANEXO I

Fenograma de distancia basado en el método UPGMA y el índice de Gower para 40 accesiones de mandioca cultivadas en EEA INTA Corrientes, Argentina. (Tomado de: Bogado et al. 2016).



ANEXO II

Recuentos cromosómicos realizado en los cultivares de la colección EEA-INTA Corrientes.

	Cultivar	Cantidad de plantas estudiadas	Nº células estudiadas	2 n =
1	Amarilla Molina	6	10	36
2	Amarilla M.C	8	10	36
3	Buena vista	5	10	36
4	C.A 25 - 1	4	10	36
5	Campeona	10	10	36
6	CEA -145	4	10	36
7	Concepción	4	10	36
8	Don Ernesto	4	10	36
9	Eugenia	5	10	36
10	Hoja ancha	6	10	36
11	Hoja fina	3	10	36
12	IAC 90	3	10	36
13	Líneo 19	3	10	36
14	Líneo 20	5	10	36
15	Manantiales	4	10	36
16	Palomita	5	10	36
17	Palomita instituto	5	10	36
18	Palomita San luís	4	10	36
19	Pomberí	5	10	36
20	Rama Seda Rudy	3	10	36
21	Roja	4	10	36
22	Santa Catalina	8	10	36
23	Verde Oliva	9	10	36+ 2 crom. accesorios

Cultivares que no pudieron ser estudiados:

Del material recibido de la colección EEA – INTA El Sombrero – Corrientes, los cultivares: Campeona frontera Caá catí (2 plantas), Francisco 1 (4 plantas), Palomita Frontera Caá catí (3 plantas), Paraguay Frontera Caá Catí (3 plantas), Rama verde (4 plantas) y Peruana Norte (4 plantas) no prosperaron para estudio, ya que las estacas no fueron conservadas adecuadamente, algunas presentaron síntomas de podredumbre y otras inicialmente estaban secas.

El cv. Verde Santa Ana Rudy (3 plantas) logró enraizar, pero las plantas eran susceptibles a bacteriosis y no pudieron ser estudiadas.

ANEXO III

Datos de morfología y viabilidad de granos de polen en otros cultivares.

A) Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Cultivar	Diámetro de poros (μm)	Nº de poros	Exina (μm)	Nexina (μm)	Sexina (μm)	Báculas (μm)	Diámetro de cabezuela de báculas (μm)
Líneo 10 INTA	13,3	16	11,35	3,63	7,72	7	8,3 – 9,6
Amarilla Montecarlo	16,13	16	12,45	3,07	9,38	6	6,6 – 7,8
Amarilla Molina Rudy	10,71	14	12,95	5	7,95	6 - 7	5,7 – 7,7
Buena Vista	11,2	18	13,55	4,44	9,11	6 - 7	5,9 – 6,8
Verde Oliva	13,34	12	13	4	9	7 - 7	6,2 – 8,7

B) Tamaños de granos de polen

Cultivar	Granos de polen Muy Grandes (50 – 100 μm)		Granos de polen Grandes (100 – 200 μm)	
	Variación (Máx - min) (μ)	Tamaño x (μ)	Variación (Máx - min) (μ)	Tamaño x (μ)
Amarilla Montecarlo INTA	171,2 - 154,2	163,96	75,74 - 50,53	66,56
Amarilla Molina Rudy	165,2 - 137,21	150,63	87,93 - 79,75	83,89
Buena Vista	134,42 - 98,64	123,09	93,87 - 87,68	90,29

C) Viabilidad en granos de polen

Cultivares	Nº plantas estudiadas	% Viabilidad de polen (Nº Granos estudiados)	Promedio de Nº granos de polen/ antera
Amarilla Montecarlo INTA	6	99,06 (2085)	130
Amarilla Molina Rudy	8	96,09 (1923)	126
Buena vista	5	86,66 (1305)	118