



INDUCCIÓN *in vitro* DE MÚLTIPLES VÁSTAGOS MEDIANTE EL USO DE CITOCININAS EN CINCO GENOTIPOS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Zahner, Marisa¹, R.D. Medina² (*ex aequo*), N.R. Dolce² y L.A. Mroginski².

¹Ing. Agr., alumna de la Maestría en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), ²Dr., FCA-UNNE, Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET). Sargento Cabral 2131 (3400), Corrientes, Argentina.

Tema: Mejoramiento Genético y Biotecnología

Resumen

Este trabajo consistió en evaluar el efecto de diferentes citocininas adicionadas al medio de cultivo sobre la regeneración *in vitro* de múltiples vástagos (MV) en 5 genotipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Se cultivaron *in vitro* segmentos uninodales de los cultivares Ramada Paso y Catiguá (*landraces* argentinos), MPar 75 (*landrace* paraguayo), IAC 12.829 y Surubim-41 (*landraces* brasileros) en el medio de Murashige y Skoog (1962) - MS, como control y MS suplementado con 0,5, 1, 5, 10 y 15 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) o tidiazurón (TDZ) e incubado en cuarto climatizado 27±2°C con 14 hs de fotoperíodo (116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A los 40 días de cultivo se evaluó el porcentaje de regeneración de MV. Los medios adicionados con BAP y CIN, en determinadas concentraciones, (0,5 a 5 mg/l para BAP y de 5 a 15 mg/l para CIN) estimularon un mayor porcentaje de MV. Así también el genotipo afectó significativamente la proliferación de MV, siendo más efectiva en *landraces* brasileros. Los vástagos derivados de MV que fueron separados y repicados a medio de micropropagación (Cavallero *et al.*, 2012) para determinar su capacidad de enraizamiento, en general, enraizaron en un porcentaje elevado, independientemente de su medio de origen y cultivar.

Palabras clave: inducción *in vitro* de múltiples vástagos, citocininas, genotipos.

Introducción

La micropropagación de mandioca mediante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales ha sido reportada por muchos autores (Bhagwat *et al.*, 1996; Konan *et al.*, 1994; Cavallero *et al.*, 2012), sin embargo sigue siendo necesario el establecimiento de protocolos que optimicen la eficiencia de la multiplicación y que sean preferentemente genotipo-independientes. La mandioca tiene una muy fuerte dominancia apical por lo que la micropropagación vía explantes nodales debería contemplar métodos que promuevan la proliferación de múltiples vástagos y así mejorar la eficiencia (Konan *et al.*, 1994). En relación a esto, existen trabajos que prueban la adición de citocininas al medio de cultivo restringiéndose a escasos genotipos (Smith *et al.*, 1986; Cabral *et al.*, 1993; Cavallero, 2010), por lo que aunque se reporten resultados alentadores la aplicación de estos procedimientos a veces no resulta igualmente efectivo cuando se prueba sobre distintos materiales genéticos. Por ello, es necesario proseguir con las investigaciones tendientes a la optimización de la propagación *in vitro* de mandioca vía inducción de múltiples vástagos que pueda emplearse exitosamente en materiales de interés para la agricultura del Nordeste Argentino (NEA).

Métodos y Materiales

Los cultivares de mandioca utilizados fueron los siguientes: Catiguá, Ramada Paso (*landraces* argentinos), Mandioca Paraguaya 75, en adelante MPar 75 (*landrace* paraguayo), Instituto Agronômico de Campinas 12.829 en adelante IAC 12.829 y Surubim-41, en adelante Surubim (*landraces* brasileros).

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron vástagos de plantas madres en maceta, los cuales fueron defoliados y desinfectados. Se extrajeron segmentos uninodales, los cuales



fueron cultivados asépticamente, en medio basal de MS suplementado con 0,01 mg/l de ácido 1-naftalenacético (ANA), 0,01 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de ácido giberélico (AG₃) (Cavallero *et al.*, 2012) e incubados en ambiente climatizado 27±2°C con 14 hs de fotoperíodo (116 μmol.m⁻².s⁻¹). Luego de lograr la etapa de establecimiento, se multiplicaron segmentos uninodales hasta obtener la cantidad necesaria de material para evaluar la propagación vía inducción de múltiples vástagos. En el experimento se utilizaron segmentos uninodales de plantas de 3 meses de edad.

El experimento de multiplicación consistió en evaluar el efecto de 3 citocininas, (BAP; 6-bencil aminopurina; CIN; cinetina; TDZ; tidiazurón) en distintas concentraciones; 0,5 1, 5, 10 y 15 mg/l cada una y un medio control MS (Murashige y Skoog, 1962) sobre la inducción de múltiples vástagos (MV) en cinco cultivares de mandioca.

A los 40 días del cultivo, se evaluó el porcentaje de explantes con MV. Posteriormente, se evaluó la capacidad rizogénica de los vástagos derivados de MV provenientes de los distintos medios de cultivo y distintas concentraciones de citocininas transferidos al medio de micropropagación de rutina (Cavallero *et al.*, 2012).

El diseño experimental para este trabajo fue completamente aleatorizado, con 4 repeticiones de 8 explantes cada una, para cada tratamiento.

A los datos obtenidos, se los sometió a un análisis de la varianza, utilizando el programa estadístico InfoStat versión 1.1. Cuando detectaron diferencias significativas con el ANOVA, se compararon los valores medios de las variables evaluadas mediante el test de comparaciones múltiples de Duncan (P≤0,05).

Resultados y discusión

En el cultivar Ramada Paso se observó que los medios con mayor porcentaje de inducción de MV fueron los adicionados con BAP, 0,5 y 1 mg/l, obteniendo con el BAP 1 mg/l más del 70 % de explantes con MV (Figura 1.1.). En los medios adicionados con CIN en dosis de 5 y 10 mg/l se promovió la regeneración de MV pero en una menor proporción. En los medios adicionados con TDZ no se observaron MV.

Para el cultivar MPar 75, los mayores porcentajes de inducción de MV se obtuvieron con la adición de CIN en sus dosis más altas (5, 10 y 15 mg/l), superando el 50 % de explantes con MV con la dosis más alta (Figura 1.2.). La menor concentración de BAP (0,5 mg/l) fue la que promovió los mayores valores de regeneración de MV (más de 30 %) en relación a las demás concentraciones de la misma citocinina. Los medios suplementados con TDZ en determinadas concentraciones indujeron la formación de MV aunque presentaban un aspecto arrosetado con escasos nudos rodeado de un callo de grandes dimensiones.

En el cultivar Catiguá, los medios adicionados con BAP 0,5 y 1 mg/l presentaron más de 30 y 40% de explantes con MV respectivamente, observándose que a mayores concentraciones de este regulador se produce una disminución de la regeneración de MV (Figura 1.3.). Los mayores valores de explantes con MV en medios suplementados con CIN se evidenciaron en dosis de 5, 10 y 15 mg/l. Se observó la regeneración de MV con las concentraciones más bajas de TDZ (0,5 y 1 mg/l), pero también eran de aspecto arrosetado y escasos nudos, los cuales no enraizaron al ser transferidos a la etapa de enraizamiento.

Para el cultivar IAC 12.829 se logró la inducción de MV en todos los medios adicionados con BAP, siendo 5 mg/l la dosis en la que se obtuvo más del 70% de explantes con MV. (Figura 1.4.) Así también, la CIN en las dosis más altas promovió la inducción de MV, siendo 5 y 10 mg/l donde se observaron los mayores porcentajes, llegando a ser mayor al 60%. TDZ en sus menores concentraciones promovieron explantes con MV, pero con porcentajes insignificantes en comparación con BAP y CIN. Incluso, se registró explantes con MV en medio MS libre de reguladores de crecimiento.

En el cultivar Surubim, la inducción de MV fue muy alta en los medios adicionados con distintas concentraciones de BAP; superando en algunos casos 87%. (Figura 1.5.) Así también 10 y 15 mg/l de CIN indujeron la regeneración de MV en valores mayores al 40%. El TDZ promovió la formación de MV, aunque en porcentajes bajos que no alcanzan el 20 %.



Los medios adicionados con BAP y CIN, en determinadas concentraciones, son los que estimularon un mayor porcentaje de explantes con MV, coincidiendo con Smith *et al.* (1986) y Cavallero (2010), quienes trabajaron con otros genotipos. Cabral *et al.* (1993) también informaron la inducción de MV a partir de segmentos uninodales adicionando el medio de cultivo con altas concentraciones de BAP en un clon colombiano de mandioca.

En la Tabla 1 se pueden apreciar los resultados obtenidos del enraizamiento de los vástagos derivados de MV. Independientemente del medio del que provenían, la mayoría de los vástagos derivados de MV enraizaron con porcentajes promedios de al menos 50%, excepto los vástagos derivados de MV del medio con 15 mg/l de BAP, en el cultivar Catiguá.

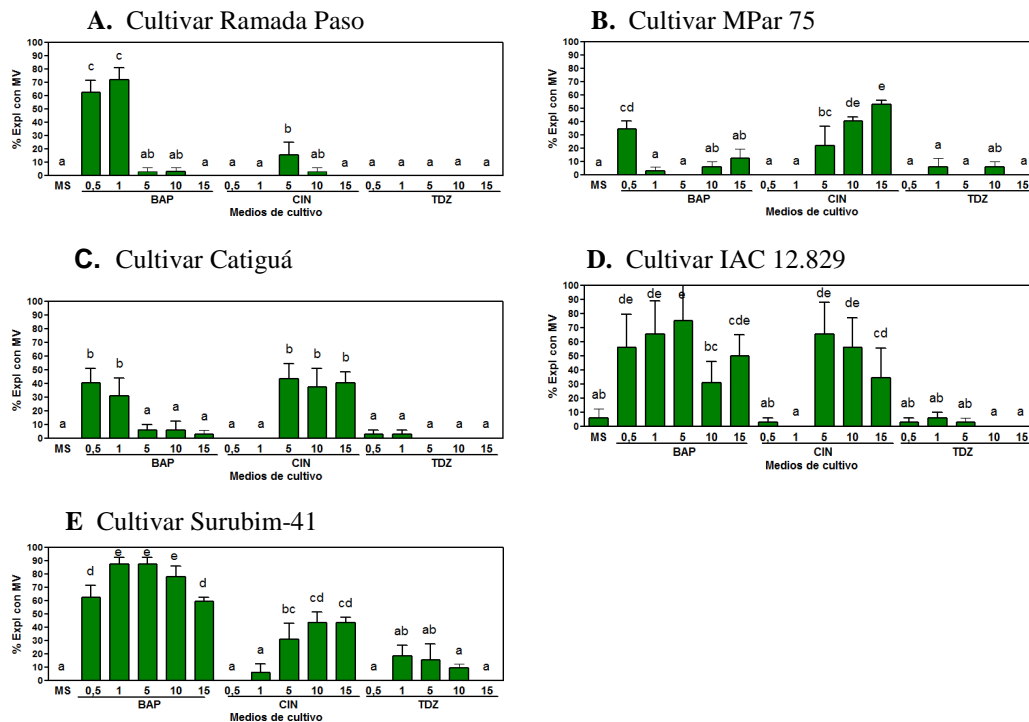


Figura 1. Regeneración de múltiples vástagos por cultivo *in vitro* de segmentos uninodales de 5 cultivares de mandioca (A: Ramada Paso; B: MPar 75; C: Catiguá; D: IAC 12.829; E: Surubim) en distintas dosis de citocininas (BAP, CIN y TDZ) a los 40 días de cultivo.

Medio de origen	Ramada Paso	M Par 75	Catiguá	IAC 12.829	Surubim- 41
MS*				100±0,0	
BAP 0,5	86,8±5,2**	93,7±6,2	75±10,2	96,9±3,1	78,5±8,5
BAP 1	82,6±5,3	50,0±0,0	77,8±14,7	90,6±6,0	85,7±4,5
BAP 5			70,0±20,0	92,6±4,1	87,3±7,8
BAP 10			91,7±8,3	93,1±6,9	97,9±2
BAP 15		75,0±25,0	0,0±0,0	100±0	96,1±2,0
CIN 0,5	50,0±0,0	50,0±50,0			
CIN 1					75,0±0,0
CIN 5	83,3±0,0	91,7±8,3	88,9±5,6	100±0,0	95,9±4,2
CIN 10	100,0±0,0	93,7±3,9	89,6±10,4	96,4±2,2	100,0±0,0
CIN 15	75,0±0,0	95,8±4,2	81,7±1,7	100±0,0	90,7±4,9
TDZ 0,5			50,0±0,0	100±0,0	50,0±0,0
TDZ 1			50,0±0,0	50,0±50,0	66,7±8,3
TDZ 5					50,0±0,0
TDZ 10	50,0±0,0				66,7±33,3
TDZ 15					

* La concentración de los reguladores de crecimiento está expresada en mg/l.

** Se presentan medias aritméticas más sus errores estándar

Tabla 1. Porcentaje de vástagos enraizados de 5 cultivares de mandioca en el medio de micropropagación (Cavallero *et al.* 2012) derivados de múltiples vástagos inducidos en medios con distintas dosis de citocininas (BAP, CIN y TDZ) a los 30 días de cultivo.



Conclusión

Fue factible la propagación *in vitro* de cinco cultivares de mandioca vía inducción de múltiples vástagos con la adición de diferentes citocininas y en diferentes concentraciones.

El porcentaje de explantes con múltiples vástagos varió con el medio de cultivo, presentándose los mayores valores en los medios adicionados con BAP y CIN.

El genotipo influyó significativamente en la inducción, siendo los *landraces* brasileños los que mostraron un mayor porcentaje de inducción a la regeneración de múltiples vástagos en los distintos medios de cultivo.

En general, el enraizamiento de los vástagos derivados de MV fue elevado, independientemente del medio de origen.

Agradecimientos

A la SGCyT-UNNE y ANPCyT (PICT 2309/2012) por el financiamiento del presente trabajo.

Bibliografía

BHAGWAT, B., L. VIEIRA, y L. ERICKSON. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 46: 1-7. 1996.

CABRAL, G., F. ARAGAO, K. MATSUMOTO, D. MONTE-NESHICH y L. RECH. Cassava tissue culture: multiple shoots and somatic embryogenesis. En: Roca, W. y A. Thro (Eds.), Proc. 1st Int. Sci. Meeting, **Cassava Biotechnology Network** 123: 180-184. 1993.

CAVALLERO, M., R. MEDINA (*ex aequo*), R. HOYOS, P. CENÓZ y L. MROGINSKI. Biotechnology applied to cassava propagation in Argentina. En: C. Pace (Ed.), Cassava: Farming, Uses, and Economic Impact. **Nova Sci Publishers**, EE.UU. pp. 55-77. 2012.

CAVALLERO, M. Micropropagación de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de interés para Argentina. Tesis de Magister en Producción Vegetal, FCA-UNNE. 121p. 2010.

FAO. Cassava for food and energy security. Food and Agriculture Organization Roma, Italia. <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000899/index.html> [Consulta: 4/09/13]. 2008.

KARTHA, K., O. GAMBORG, F. CONSTABEL y J. SHYLUK. Regeneration of cassava plants from shot apical meristem. **Plant Science Letters** 2: 107-113. 1974.

KONAN, N., R. SANGWAN y B. SANGWAN-NORREEL. Efficient *in vitro* shoot regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Breeding** 113:227-236. 1994.

MEDINA, R., S. SCHALLER y L. MROGINSKI. Determinación de la tasa de multiplicación *in vitro*: una herramienta indispensable para la organización de un programa de propagación de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **XXXV Congreso Argentino de Horticultura**, Corrientes, Argentina. p. 201. 2012.

MROGINSKI, L. y W. ROCA. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: ROCA, W. y L. MROGINSKI (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia, pp. 19-40. 1993.

MURASHIGE, T. Y F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497. 1962.

PUONTI-KAERLAS, J. Cassava Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 15: 329-364. 1998.

SMITH, M., B. BIGGS y K. SCOTT. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 6: 221-228 1986.