



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**EFFECTO DE LA REGULACIÓN HORMONAL Y EDAD FISIOLÓGICA DEL EXPLANTE
SOBRE LA CAPACIDAD DE REGENERACIÓN DE MANÍ "FLORMAN INTA"**

Paola Carmen Faustinelli

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Magister en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 09 de Noviembre de 2005

**EFFECTO DE LA REGULACIÓN HORMONAL Y EDAD FISIOLÓGICA DEL EXPLANTE
SOBRE LA CAPACIDAD DE REGENERACIÓN DE MANÍ "FLORMAN INTA"**

Paola C. Faustinelli

Comisión Asesora de Tesis

Director: Ing. Agr. Roberto W. Racca

Asesores: Ing. Agr. (Ph.D.) Daniel J. Collino (Codirector)

Ing. Agr. (M.Sc.) Alicia de L. Avila

Tribunal Examinador de Tesis

Ing. Agr. (M.Sc.) Alicia de L. Avila

Dr. Cristiano Casini

Dra. Paula Bima

Presentación formal académica: 09 de Noviembre de 2005
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

Es mi deseo expresar el más profundo agradecimiento a todos quienes han contribuido a que lograra este objetivo, tan caro a mi vocación científica.

Directores, colegas, compañeros, amigos, familia, no quiero olvidar a nadie, todos me han apoyado haciendo de esta experiencia algo enriquecedor e inolvidable.

A todos quienes me ayudaran a potenciar mis conocimientos, a fortalecerme, constituyéndose en mi soporte espiritual y emocional, muchas gracias.

A ustedes debo el haber hecho de esta parte de mi vida, una realidad perdurable llena de auténticos momentos que siempre recordare.

He sumado vivencias, tristes y difíciles, como aquellas en las que dijimos adiós a un amigo y compañero; felices y positivas, como las de compartir momentos especiales con amigos, que formaran sus familias con amor, que alegraran sus hogares con nuevos retoños, que traen fe y esperanza de un mundo mejor.

Por ello, por lo vivido y por lo que viviremos, por ayudarme a hacer realidad este esfuerzo, reciban todo mi reconocimiento. Gracias de todo corazón.

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a Dios.

Porque El es quien me ha dado

unos padres ejemplares,

un esposo incondicional,

y dos hijos, Josefina y Marcial, que son mi razón de vivir.

Gracias Dios por toda esta vida llena de felicidad!

RESUMEN

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es uno de los principales cultivos de leguminosas y es globalmente valorado por su contenido de proteínas y la calidad de su aceite. El principal objetivo de esta investigación fue determinar la concentración de auxinas y citocininas óptima para cada una de las cuatro etapas del proceso de regeneración organogénica de maní var. Florman INTA. Las concentraciones de auxinas y citocininas que resultaron óptimas para cada una de las etapas fueron las siguientes: (i) Establecimiento: El medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1 mg l^{-1} de ANA y 3 mg l^{-1} de BA optimizó la producción de yemas y brotes a partir de gémulas del embrión con un tamaño entre 3 a 5 mm, obtenidas de semillas de 3 a 5 días de pre-germinadas; (ii) Elongación: Medio MS suplementado con 0.01 mg l^{-1} de ANA y en ausencia de BA promovió una eficiente elongación de los brotes, con una mínima formación de callos; (iii) Enraizamiento: Medio MS con la adición de 3 mg l^{-1} de ANA optimizó la formación de raíces clasificadas morfológicamente del tipo “engrosadas” y (iv) Rusticación: el sistema radicular obtenido en el medio suplementado con 3 mg l^{-1} de ANA permitió una alta supervivencia de las plántulas al trasplante. La eficiencia general del sistema resultó ser de un 15%. Las plantas transplantadas a suelo fueron totalmente normales y capaces de producir semillas.

El segundo objetivo de esta tesis fue evaluar, a partir de gémulas extraídas de semillas pre-germinadas, la relación entre la edad fisiológica de las semillas y su capacidad para formar yemas adventicias. La edad fisiológica de la semilla donante del explante se evaluó en base a su deterioro bajo dos condiciones de almacenamiento: ambiente (22.5°C promedio) y heladera (4°C). Mensualmente y durante un año, se determinó la capacidad regenerativa de estos explantes cultivándolos en un medio suplementado con 1 mg l^{-1} NAA y 3 mg l^{-1} BA. No pudimos corroborar la existencia de una relación entre la edad fisiológica de la semilla donante del explante, evaluada a través de su deterioro, y la capacidad de ese explante de regenerar brotes. Las semillas conservadas en heladera por un período de doce meses, mantuvieron sus cualidades endógenas más constantes otorgándole al explante donado mayor integridad a nivel de membranas y tejidos.

Palabras Claves: *Arachis hypogaea* L., cultivo *in vitro*, regeneración, organogénesis, conservación semilla.

ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of the most important leguminous crops. It is a rich source of proteins and oil. Tissue culture has been used for genetic modification of peanut to improve the agronomical and nutritional attributes of this crop. The main objective of this research was to determine the optimum concentration of auxins and cytokinins in the basal media needed during the organogenesis process of the peanut var. Florman INTA. The first two leaves (2-5 mm in length) removed from aseptically germinated seeds were cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 16 combinations of naphthaleneacetic acid (NAA) (0.01 and 1 mg l⁻¹) and benzyladenine (BA) or Kinetin (KIN) (1 to 10 mg l⁻¹) during the Initiation stage. Bud regeneration occurred in all hormone combinations, but the maximum number of buds was regenerated at a concentration of 1 mg l⁻¹ NAA with 3 mg l⁻¹ BA. Development of buds into shoots was readily achieved by transferring regenerated buds into fresh medium containing 0.01 mg l⁻¹ NAA (without BA). Broadened roots were induced to grow when shoots were transferred to medium with 3 mg l⁻¹ of NAA added. This root system allowed for a high survival rate of the plantlets after transplanting. The overall efficiency of the system was of 15%. Plants transplanted into soil were completely normal and capable of producing seeds.

Our secondary objective was to assess the relationship of physiological age of seeds and the formation of adventitious buds. The physiological age of the explants donor seed was assessed based on its rate of deterioration at two storage temperatures: 22.5°C and 4°C. Every month during one year, we tested the regeneration capacity of these explants culturing them in 1 mg l⁻¹ NAA with 3 mg l⁻¹ BA media. We could not find any correlation between seed age and the regeneration capacity of the seeds. However, seeds refrigerated during twelve month, maintained most of their endogenous qualities and gave the donor explants more wholeness at the membrane and tissue level compared to those donated from seeds kept at room temperature.

Keywords: *Arachis hypogaea*, *in vitro* culture, regeneration, organogenesis, seed conservation.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VII
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	VIII
CAPÍTULO INTRODUCTORIO	1
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	8
CAPÍTULO I "REGENERACIÓN ORGANOGÉNICA DE MANÍ"	9
INTRODUCCION.....	9
ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	12
Materiales y Métodos	12
Resultados.....	14
Discusión	21
ETAPA DE ELONGACION.....	22
Materiales y Métodos	22
Resultados.....	24
Discusión	28
ETAPAS DE ENRAIZAMIENTO Y RUSTICACION	30
Materiales y Métodos	30
Resultados.....	33
Discusión	38
CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPÍTULO I.....	40
BIBLIOGRAFIA CAPÍTULO I.....	43
CAPÍTULO II "RELACION ENTRE LA EDAD DE LA SEMILLA DONANTE DEL EXPLANTE Y LA CAPACIDAD DE REGENERACION DEL MISMO"	47
INTRODUCCION.....	47
MATERIALES Y METODOS	49
RESULTADOS	51
DISCUSION.....	58
CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPÍTULO II.....	61
BIBLIOGRAFIA CAPÍTULO II.....	62
CONCLUSIONES GENERALES	64

Lista de Tablas y Figuras

TABLA 1.1.....	13
FIGURA 1.2	15
TABLA 1.3.....	16
FIGURA 1.4	17
FIGURA 1.5	17
FIGURA 1.6	19
FIGURA 1.7	20
TABLA 1.8.....	22
FIGURA 1.9	24
FIGURA 1.10	27
TABLA 1.11.....	31
TABLA 1.12.....	31
TABLA 1.13.....	34
FIGURA 1.14	36
FIGURA 1.15	37
FIGURA 2.1	51
FIGURA 2.2	52
FIGURA 2.3	52
FIGURA 2.4	53
FIGURA 2.5	54
FIGURA 2.6	55
FIGURA 2.7	56
ESQUEMA 3.1.....	65

Lista de símbolos y abreviaturas

- √ **MS0**: medio basal Murashige and Skoog (1962)
- √ **ANA**: ácido α -naftalenacético
- √ **BA**: 6-bencilaminopurina
- √ **KIN**: 6-Furfurylaminopurina
- √ **TDZ**: thidiazuron
- √ **2.4 D**: ácido 2,4-diclorofenoxyacético
- √ **Picloram**: ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
- √ **RFA**: Radiación Fotosintéticamente Activa

CAPÍTULO INTRODUCTORIO

El género *Arachis* de la familia Leguminosae, originario de Sudamérica, cuenta con más de 40 especies entre las que se destaca la *hypogaea*, el maní (Roca y Mroginski, 1993). Esta especie es uno de los principales cultivos de leguminosas globalmente valorada por su contenido de proteínas y la calidad de su aceite (McKently *et al.*, 1990).

La producción de maní en Argentina, se destina casi exclusivamente al consumo humano directo. El 98% del área sembrada se ubica en la zona semiárida centro-sur de la Provincia de Córdoba (Gorgas *et al.*, 1997). La superficie sembrada promedio del periodo 2001/02 fue de 217.000 has., con un rendimiento de 1.630 kg/ha (Agencias Zonales, SAGPyA 2004). La variedad Florman INTA, liberada al mercado nacional en el año 1985, representa en la actualidad, mas del 85% del área de siembra (Georgalos, 1999).

El maní de "Origen Argentino" aparece bien posicionado en el mercado internacional tanto por la cantidad que se exporta como por su calidad. Argentina es el segundo exportador mundial con perspectivas muy favorables para incrementar su participación en los mercados internacionales. El principal destino de este producto es el continente Europeo, donde sobresale Holanda como principal comprador. Otros mercados de importancia son Estados Unidos, Canadá y México. Sin embargo según Pedelini (1998), es necesario consolidar este liderazgo mediante el desarrollo de tecnologías que permitan superar importantes limitaciones que posee el cultivo. Entre ellas, ha adquirido especial relevancia la obtención de variedades transgénicas que tengan incorporados caracteres que le otorguen una mayor conservación post-cosecha del grano y que permitan un menor uso de agroquímicos mediante la resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas (Roca y Mroginski, 1993).

El mejoramiento de cultivos ha sido practicado mediante métodos de entrecruzamiento convencional, donde los cruzamientos entre dos líneas paternas con caracteres deseables son seguidos por generaciones de autocruzamiento y selección de estas especies naturalmente endogámicas. Muchos de los esfuerzos de cruzamiento están

focalizados en mejorar la resistencia a enfermedades, particularmente del tipo fúngicas y virales. La fuente de genes para incorporar caracteres deseados en el idiotipo de maní son limitados en el pool de genes de *A. hypogaea*. Sin embargo, se pueden encontrar en especies relacionadas, lo cual incurre en la difícil práctica de transferir los mismos por medio de la hibridación sexual debido a incompatibilidades y barreras poliploideas. A esto se le suma que los mejoradores asocian y focalizan sus genes a marcadores estándares que requieren de una arquitectura de planta y de fruto muy bien definida. Estas cualidades varían primariamente según el tipo botánico del cultivar con el que se este trabajando. Idealmente, la introducción de cualidades deseables debería realizarse sin alterar las características del marcador específico del genotipo deseable, lo cual no siempre es factible. De allí que, la Ingeniería Genética ofrece una oportunidad inigualable para introducir genes previamente inaccesibles dentro de variedades existentes que poseen un potencial de producción sobresaliente (Ozias-Akins and Gill, 2001). Actualmente, debido a la relevancia que ha adquirido la obtención de variedades transgénicas que tengan incorporados caracteres que le otorguen al maní una mayor conservación post-cosecha del grano y que permitan un menor uso de agroquímicos mediante la resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas (Roca y Mroginski, 1993), la manipulación genética se convierte en una herramienta valiosa y eficaz para la introducción de esta clase de genes (Ozias-Akins and Gill, 2001). No obstante, para lograr plantas transformadas de una variedad con buenas características agronómicas, es necesario contar con metodologías eficientes para regenerar plantas completas a partir de un explante y transferir una porción de genoma foráneo a ese explante (Baker and Wetzstein, 1992; Ozias-Akins *et al.*, 1992).

Respecto a la capacidad de regenerar, el científico austriaco Haberlandt, propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen capacidad para formar plantas completas, es decir, que son totipotentes pudiéndose dividir y diferenciar en cualquier otro tipo celular (Litz and Jarret, 1993). Esta hipótesis pudo demostrarse por diferentes grupos de investigación. Esto dio lugar a una nueva alternativa de propagación, la del cultivo de tejidos *in vitro*, que comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido u órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química

definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La regeneración de plantas *in vitro* puede darse directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la embriogénesis somática o de la organogénesis (Litz and Jarret, 1993).

La embriogénesis permite la inducción de embriones somáticos a partir de callos. Se ha definido como embriones somáticos, asexuales o adventicios a los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Estos embriones son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales (Litz and Jarret, 1993).

La organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callo. El término organogénesis *de novo* en el cultivo de tejidos, se refiere a la diferenciación dentro del explante (Thorpe, 1980).

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática ha tenido ciertas ventajas por sobre la organogénesis, debido a que en ésta, los embriones poseen ambos meristemas, el radicular y el foliar. Aun así, los protocolos de embriogénesis somática son a menudo poco usados para la propagación clonal y programas de mejoramiento de cultivos debido a la limitada recuperación de las plantas (Ozias-Akins, 1989). La frecuencia de conversión a plantas de la mayoría de los sistemas de regeneración embriogénica es baja y a menudo requieren de unos siete a ocho pasos adicionales, lo cual convierte a esta vía de cultivo en una labor intensa, con el requerimiento de más tiempo que el necesario para los sistemas de regeneración organogénica (Ponsamuel *et al.*, 1998).

Para el desarrollo de embriones somáticos es necesario en primera instancia inducir la formación de callo a partir del explante original. Este hecho, según Pittman *et al.* (1983) y Roca y Mroginski (1993), suele limitar el uso de la embriogénesis como un sistema de regeneración debido a las alteraciones genéticas que se pueden presentar durante esta etapa, lo cual le da inestabilidad genética al cultivo. Para estimular la embriogénesis usualmente se cultiva al explante en un medio inicial con 2,4 D o picloram, y en oscuridad (Baker and

Wetzstein, 1995). El incremento en la concentración auxínica, dentro de los rangos fisiológicos, aumenta el número de embriones formados por explante (McKently, 1991; Baker and Wetzstein, 1994). Sin embargo, McKently (1991) ha citado que la probabilidad de que los embriones sean normales, decrece a medida que ésta concentración se incrementa. (Roca & Mroginski, 1993; Eapen and George, 1993).

Con respecto a la organogénesis somática, el éxito en la formación de un órgano se logra con la elección de un explante adecuado, con la apropiada definición del medio de cultivo y con el control de las condiciones ambientales. Esto se debe adicionalmente definir para cada especie objeto de estudio, estas condiciones de cultivo por medio del manipuleo del tipo y concentración de diferentes reguladores del crecimiento (Thorpe and Biondi, 1981). Otro factor crítico es la edad del explante. En muchos casos se ha visto por ejemplo, que hojas maduras cultivadas bajo condiciones idénticas, fallan en la formación de plantas (Mroginski *et al.*, 1981). La edad fisiológica del explante interfiere en el uso continuo de un protocolo de regeneración y si factores como este no se mantienen constantes, la organogénesis se ve afectada (Thorpe and Biondi, 1981).

En maní, plantas enteras pueden regenerarse por cultivo de tejidos vía organogénesis a partir de explantes obtenidos de cotiledones, hojas inmaduras y otros (McKently *et al.*, 1990 y 1991; Cheng *et al.*, 1992), o vía embriogénesis somática desde embriones zigóticos generados a partir de idénticos explantes (Hazra *et al.*, 1989; Ozias-Akins *et al.*, 1989; Baker & Wetzstein, 1992).

La idea de que los protocolos de embriogénesis somática son poco usados debido a la limitada recuperación de las plantas se pudo corroborar en maní, ya que en literatura específica se describe una baja frecuencia de conversión de los embriones somáticos de maní a plantas y su supervivencia en suelo (Hazra *et al.* 1989, Ozias-Akins 1989, McKently 1991, 1995). Esta baja frecuencia es usualmente atribuida a anomalías morfológicas o inmadurez de los embriones somáticos (Ammirato, 1987). Un ejemplo de ello son los resultados publicados por Chengalrayan *et al.* (1997) quienes obtuvieron solo 1 planta de maní normal de 170 embriones convertidos.

La respuesta en la regeneración vía organogénesis está condicionada por un número importante de factores altamente relacionados, entre los que pueden citarse la especie, el cultivar, el tipo de auxinas y citocininas empleadas, el balance entre ellas, el tipo y condición fisiológica de los explantes, fotoperíodo y temperatura (Roca y Mroginski, 1993).

Diferentes genotipos de maní han mostrado ser competentes para la regeneración *in vitro* variando principalmente en los requerimientos óptimos de cultivo (Ozias-Akins *et al.*, 1992). Los protocolos de regeneración citados para una determinada especie, no son de aplicación universal en la misma, sino que varían de un cultivar a otro, siendo necesario en todos los casos ajustar las condiciones para cada una de las líneas genéticas que se han de utilizar (Walden and Wingender, 1995) especialmente para aquellas adaptadas a la región de interés (Ozias-Akins and Gill, 2001).

En maní se pueden inducir diversas respuestas organogénicas con el manipuleo de los reguladores del crecimiento utilizados en el medio de cultivo. Esto es muy importante si el objetivo perseguido es por ejemplo, el estudio de la fisiología, genética o bioquímica de la planta. Chengalayan *et al.* (1995) reportó diferentes métodos para inducir organogénesis, caulogénesis directa y hasta floración *in vitro* a partir de hojas derivadas de embriones maduros de maní. Sus resultados le permitieron describir algo único referido a las diferentes respuestas morfogénicas obtenidas a partir de un mismo explante debido a cambios en la composición hormonal del medio.

La elección de un explante eficiente para regenerar una especie es crucial al momento de plantearse un protocolo en cultivo *in vitro*. Mroginski *et al.* (1980 y 1981) evaluaron la eficiencia de regeneración organogénica en maní a partir de gémulas de semillas maduras, en los cultivares nacionales Blanco y Colorado. Estos explantes fueron aptos para regenerar plantas completas en todos los germoplasmas ensayados, aunque mostraron diferentes respuestas según los medios hormonales en los que fueron cultivados. El estado de desarrollo de las gémulas fue el otro factor crítico para la regeneración de yemas que analizaron. Las hojuelas pequeñas, de 2 a 5 mm de largo, fueron las mas

adecuadas mostrando ser útiles para todos los cultivares ensayados. Por su lado, McKently *et al.* (1991) evaluaron la capacidad regenerativa vía organogénesis a partir del cultivo de hojas inmaduras de diferentes cultivares de maní de los tipos Virginia, Runner, Spanish y Valencia. Las gémulas fueron cultivadas en medio Murashige and Skoog suplementado con 1 mg l^{-1} de ANA y diferentes concentraciones de BA. La aparición de yemas adventicias ocurrió en todas las concentraciones de BA siguiendo una curva de respuesta polinómica cuadrática, con un máximo en los $6,81 \text{ mg l}^{-1}$.

La edad fisiológica del explante es otro factor importante a definir pues se sabe que afecta en relación inversa su potencial organogénico (Alleweldt & Radler, 1962). Este fenómeno parece estar asociado con alteraciones en los niveles endógenos de fitohormonas (Litz and Jarret, 1993) lo cual hace necesario cambiar las concentraciones de los reguladores exógenos a medida que la fuente de explantes envejece (Roca y Mroginski, 1993). Raju and Mann (1970), demostraron que tejidos inmaduros, parcialmente maduros y maduros provenientes de discos de hojas de *Echeveria elegans*, producían raíces, raíces o yemas y yemas respectivamente. La edad ontogénica del explante, en plantas herbáceas como el maní, limita la regeneración de plantas a partir de hojas al empleo de explantes jóvenes (Mroginski *et al.*, 1981).

La conservación del órgano donador del explante es crucial en el caso de la semilla, al momento de controlar la mayor cantidad de variables externas dentro de un diseño experimental. El estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído también pueden afectar notablemente su potencial organogenético (Murashige, 1974).

Bajo condiciones recomendadas de almacenamiento, las semillas muestran signos de deterioro en el largo tiempo y las consecuencias se ven manifestadas en una viabilidad reducida expresada en los test de germinación. El contenido de humedad, temperatura y oxígeno son considerados factores importantes en la determinación de la viabilidad de la semilla almacenada. El envejecimiento de las semillas se puede testear bajo condiciones estándares en donde las mismas son usualmente secadas a un contenido de humedad bajo

(8-9%) y almacenadas a baja temperatura. Un envejecimiento natural puede ser evaluado bajo estas condiciones estándares o bien, a temperatura ambiente bajo un rango de humedades (Benson, 1990).

Usberti, 1982 pudo constatar que semillas de maní almacenadas a una temperatura constante (23.7°C) reducían el porcentaje de viabilidad a lo largo del tiempo, en valores que iban desde un 91% a los 2 meses hasta un 39% a los 14 meses. Gavrielit-Gelmond, 1971 observaron que las semillas de maní variedad Virginia conservadas a 4°C mantenían casi invariable su viabilidad, con pérdidas de solo 1% en el periodo de 36 meses, mientras que a 9.5°C la pérdida era de un 8% en períodos de 27 meses de almacenamiento.

Como se citó al comienzo en la Introducción, el maní Florman INTA se ha adaptado exitosamente a la región manicera de la provincia de Córdoba convirtiéndose para muchos productores en la variedad ideal de cultivo. El maní, a pesar de ser considerado una especie recalcitrante (Birch, 1997), se ha logrado regenerar y transformar en condiciones definidas con diferentes porcentajes de eficiencia. También queda comprobado, que todos esos protocolos diseñados para esas especies en particular, no son de aplicación universal y por ende, no pueden emplearse directamente a la especie Florman INTA. En base a estos antecedentes se planteó la necesidad de investigar cuales serían las condiciones óptimas para la regeneración de la variedad de maní Florman INTA a través de la vía organogenética, elegida principalmente porque los brotes producidos son normales con un mínimo porcentaje de variación somaclonal y una alta eficiencia de conversión a planta completa. Este paso se lo considera crucial e indispensable si se desea mejorar la variedad Florman INTA, con el uso de la biología molecular para otorgarle cualidades o condiciones de cultivo superiores a la variedad original como por ejemplo, granos con cualidades físicas, químicas y organolépticas aptas para la exportación, tolerancia a estrés biótico originadas principalmente de enfermedades causadas por hongos del suelo, tolerancia a sequía, entre otras.

El desarrollo de un protocolo de regeneración que permita la producción de brotes y su conversión a plantas fértiles constituye un aporte valioso para los futuros estudios de

transformación de maní, principalmente si se trata de una de las variedades tipo Runner mas producidas en nuestro país, como lo es la Florman INTA. Es importante también, que el protocolo de regeneración organogenético obtenido tenga la característica de ser un sistema estable en donde las causas de variación afecten la respuesta medida de forma tal, que no impidan que el sistema sea predecible.

En base a estos antecedentes se proponen las siguientes hipótesis:

Hipótesis

- 1.-La relación de concentración entre auxinas y citocininas es específica para cada etapa del proceso de regeneración de maní variedad Florman INTA.
- 2.-La capacidad de formación de yemas adventicias, a partir de gémulas extraídas de semillas pre-germinadas, es inversa a su edad fisiológica.

Objetivos

- 1.-Establecer las relaciones entre auxinas y citocininas que permiten optimizar la capacidad de regeneración organogénica de maní cv. Florman INTA, a partir de gémulas de semillas maduras.
 - 1.1.- Establecer la relación entre auxinas y citocininas que permite optimizar la producción de brotes en el medio de establecimiento.
 - 1.2.-Establecer la relación entre auxinas y citocininas que posibiliten optimizar el crecimiento de los brotes en el medio de elongación.
 - 1.3.- Establecer la dosis de auxina que permita optimizar la capacidad de formación de raíces adventicias en el medio de enraizamiento.
 - 1.4.- Evaluar la supervivencia de las plantas obtenidas cuando se las transfiere a suelo.
- 2.- Establecer la relación que existe entre la edad de la semilla donadora del explante y la capacidad de ese explante de regenerar yemas en un medio de Establecimiento óptimo, en el período de un año.

CAPITULO I

REGENERACIÓN ORGANOGÉNICA DE MANÍ

INTRODUCCION

El cultivo de tejidos es el arte de hacer crecer y desarrollar células, tejidos u órganos aislados de la planta sobre un medio nutritivo artificial (Dr. Michael Renfroe).

El tejido u organismo que es removido de una planta y puesto en un medio de cultivo es llamado “explante”. La elección del explante es uno de los factores a definir (Dr. Michael Renfroe). Muchos de los órganos de la planta se han utilizado como explantes para la regeneración de maní (Ozias-Akins, 1989); no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener mas plasticidad *in vitro* (Litz and Jarret, 1993). Los explantes que se han utilizado exitosamente en la regeneración de maní son los cotiledones inmaduros (Ozias-Akins, 1989), ejes de embriones inmaduros (Hazra *et al.*, 1989), embriones inmaduros completos (Sellars *et al.*, 1990) y gémulas de semillas maduras (Mroginski *et al.*, 1980 y 1981). Las hojuelas pequeñas, de 2-5 mm de largo, según Mroginski *et al.* (1980 y 1981) fueron las más adecuadas, demostrando ser útiles para todos los cultivares ensayados.

Los medios de cultivo de tejidos son soluciones líquidas o sólidas nutritivas donde se coloca al explante para su desarrollo. Hay distintas formulaciones disponibles en la comunidad científica y la elección de una en particular depende en gran medida de la especie de planta y tejido seleccionado (Dr. Michael Renfroe). Uno de los medios más empleados en estudios que se relacionan con la organogénesis para cualquier tipo de planta es el de Murashige and Skoog (1962) conocido con la simple abreviatura de Medio MS. Este medio basal contiene los macro y micronutrientes, vitaminas, azúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos y otras moléculas orgánicas necesarias para permitir la regeneración (Litz and Jarret, 1993).

Las fitohormonas o reguladores del crecimiento que pueden ser adicionados al medio para estimular el desarrollo y crecimiento del explante se clasifican en cinco tipos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Las auxinas, generadoras de la iniciación radicular, y las citocininas, promotoras del desarrollo de yemas vegetales, son las más comúnmente utilizadas en los medios de cultivo de tejido vegetal (Dr. Michael Renfro). El medio para la proliferación de callos, diferenciación de yemas o diferenciación de raíces requiere de composiciones diferentes que depende principalmente de la relación auxina/citocinina. La definición del tipo y concentración de reguladores del crecimiento a utilizar depende exclusivamente de la respuesta organogénica deseada (Litz and Jarret, 1993). Sharma *et al.* (1990) obtuvieron respuestas diferentes al comparar el efecto de cuatro citocininas (BA, Zeatina, 2-ip y KIN) en semillas de *Brassica juncea* (L.) Czern. Ellos observaron que si bien estos reguladores inducían brotes, lo hacían en diferentes frecuencias y que el BA, en una concentración de 5.0 μM , era la citocinina más efectiva. McKently *et al.* (1991) evaluaron la capacidad regenerativa vía organogénesis de diferentes cultivares de maní en un medio MS suplementado con 1 mg l⁻¹ de ANA y diferentes concentraciones de la citocinina BA. La aparición de yemas adventicias ocurrió en todas las concentraciones de BA siguiendo una curva de respuesta polinómica cuadrática, con un máximo en los 6,81 mg l⁻¹.

Hay otros factores a definir como la luz, la temperatura, la consistencia del medio y el pH. La luz es un factor crítico para la iniciación de yemas ya que incrementa la acumulación de almidón en los tejidos, necesario para la formación de los primordios. El fotoperíodo también puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento. Usualmente se fija un fotoperíodo de 12 a 16 horas de luz que cubre lo necesario para inducir la organogénesis. Los cultivos de tejidos se mantienen generalmente a 25°C (Thorpe, 1980); sin embargo, las temperaturas que estén dentro de los 18 y 28°C son también efectivas para estimular organogénesis. La forma física del medio tiene una profunda influencia en las respuestas morfogénicas (Litz and Jarret, 1993). Medios con altas concentraciones de agar crean un medio ambiente con mucho estrés, lo cual reduce la formación de meristemoides (Brown *et al.*, 1979) pero puede estimular la producción de yemas foliares y florales (Margara and Bouniols, 1967). El pH designado en los medios de

cultivo está en el rango de 5,7 y 5,8. Este rango de pH mantiene a los iones en un estado cargado, lo que les permite ser absorbidos por las células de las plantas (Dr. Michael Renfroe). La mayoría de los estudios sobre regeneración de maní vía organogénesis se basan en condiciones físicas estándares, como el uso de cámaras de crecimiento con temperaturas de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodos de 16 horas luz:8 horas oscuridad y una media en la intensidad lumínica de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de RFA. En general se utilizan medios solidificados con agar mantenidos con un pH que se encuentre dentro del rango de los 5,7 y 5,8 (Ozias-Akins, com. pers.). Esta revisión bibliográfica permitió determinar las condiciones de cultivo que se mantendrían constantes en todos los ensayos realizados en esta investigación.

La regeneración de yemas comienza en fases tempranas del cultivo de tejidos. Es necesario diseñar un experimento que secuencie los estados básicos de la regeneración organogénica directa *in vitro*. En el presente trabajo, se dividió al proceso en cuatro etapas de acuerdo a lo establecido por Mroginski *et al.* (1981): (i) **Establecimiento**, período en el cual el explante se adapta al medio artificial y se induce la formación de yemas a partir de los explantes de hojas inmaduras; (ii) **Elongación**, tiempo en el cual cada yema es estimulada a crecer en altura para individualizarse en un brote; (iii) **Enraizamiento**, etapa durante la cual se induce la formación de raíces en los brotes para obtener una planta completa; y (iv) **Rusticación**, en donde se busca adaptar estas plantas obtenidas *in vitro* al ambiente en el que finalmente crecerán.

ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

Objetivo específico 1.1: "Establecer la relación entre auxinas y citocininas que permite optimizar la producción de brotes en el medio de establecimiento".

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección y cultivo de la semilla

Se usaron semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) de la variedad Florman INTA. La desinfección de las semillas se realizó con inmersiones en etanol 70% durante 3 minutos y en hipoclorito de sodio 40% durante 20 minutos (producto comercial con 55 g l⁻¹ de cloro activo). Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. A continuación, las semillas sin tegumento, se colocaron a germinar en magentas plásticas, sobre papel de filtro embebido en agua destilada estéril. Se colocaron para su crecimiento dentro de cámaras a 25±2°C y en oscuridad. En los casos en que las semillas presentaban contaminación bacteriana, se procedió a quitarles el tegumento y se las sumergió durante 1 hora, en una solución de Agrimicina al 0,2%.

Obtención y tratamiento del explante

Se utilizaron como explante, gémulas del embrión con un tamaño entre 3 y 5 mm, obtenidas de semillas de 3-5 días de pre-germinación a 25±2°C y en oscuridad. La elección del explante y su forma de obtención se basaron en los resultados obtenidos por Mroginski *et al.* (1981). Las gémulas se extrajeron solamente de aquellas semillas que mostraron signos de hidratación y/o emisión de raíz, utilizando un microscopio estereoscópico, en condiciones de esterilidad. Se sembraron 15-25 explantes por caja de Petri, conteniendo 25 ml de medio sólido en una proporción del 31%, respecto del volumen total del recipiente. El medio de cultivo estuvo constituido por las sales y vitaminas de Murashige and Skoog (1962), 3% sacarosa y 8 g l⁻¹ de agar. A este medio basal (MS0) se le adicionó ANA en combinación con diferentes concentraciones de BA o KIN, quedando establecidos 17 tratamientos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Combinaciones entre auxinas y citocininas (tratamientos), evaluadas en la etapa de establecimiento.

Tratamiento	COMBINACIÓN HORMONAL (mg l ⁻¹)		
	ANA	BA	KIN
1	0	0	0
2	0.1	1	0
3	0.1	3	0
4	0.1	5	0
5	0.1	10	0
6	0.1	0	1
7	0.1	0	3
8	0.1	0	5
9	0.1	0	10
10	1	1	0
11	1	3	0
12	1	5	0
13	1	10	0
14	1	0	1
15	1	0	3
16	1	0	5
17	1	0	10

Los explantes se cultivaron en cámaras de crecimiento a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad lumínica de $49,5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de RFA.

Diseño experimental y análisis de los resultados

El diseño del ensayo fue en bloques al azar con tres repeticiones. La unidad experimental en todos los casos, estuvo constituida por una caja de Petri. Las cajas de cada repetición se distribuyeron en la cámara de cultivo en forma completamente aleatorizada al no existir ninguna causa de restricción. A los 30 días de cultivo, se evaluaron los tratamientos cuantificando y calificando las siguientes variables: *i*) tipo de desarrollo obtenido (yema, callo, raíz) (Fig. 1.6), *ii*) el número de yemas por explante prosperado y *iii*) el estado de crecimiento de la yema (yemas múltiples, brote) (Fig. 1.7). A partir de estos datos se estableció la probabilidad de éxito del tratamiento tanto para el tipo de desarrollo

obtenido, como para el estado de crecimiento de la yema. Para el tipo de desarrollo obtenido (i) se consideró como “éxito” al desarrollo de yemas y “fracaso” al desarrollo de callos y/o raíces (Fig. 1.6). Para el estado de crecimiento de la yema (iii), se evaluó como “éxito” a la formación de brotes y “fracaso” a la formación de yemas múltiples (Fig. 1.7). La probabilidad de éxito del tratamiento para el tipo de desarrollo obtenido (i), se estableció ajustando una regresión logística con un modelo que incluyó los efectos de tratamiento y bloques. La probabilidad de éxito del tratamiento para el estado de crecimiento de la yema (iii), se estableció ajustando una regresión log-lineal, incluyendo también los efectos de tratamiento y bloques. Se calculó además los cocientes de chances para aquellos tratamientos más exitosos (Agresti, 1990). Para la variable número de yemas por explante prosperado, se realizó un análisis de varianza (incluyendo efectos de tratamiento y bloques) y prueba LSD, previa transformación logarítmica de la respuesta. En todos los contrastes de hipótesis se utilizó un nivel de significación $\alpha=0.05$. Los análisis fueron realizados con el sistema de análisis estadístico SAS versión 6.12 (SAS Inst., 1996). Se utilizaron pruebas Chi-cuadrado para comparar proporciones de éxitos entre tratamientos.

Para evaluar la eficiencia de la etapa (%), se utilizó la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = \frac{NBr}{NExpS} * 100$$

donde NBr es el número de brotes obtenidos a los 30 días desde la siembra y NExpS, es el número de explantes sembrados.

RESULTADOS

Respecto a la variable “tipo de desarrollo obtenido”, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Fueron exitosos en cuanto a la producción de yemas (Fig. 1.6), estadísticamente distintos de cero, los siguientes tratamientos: 3 (p=0,0092), 4 (p=0,0265), 7 (p=0,0001), 8 (p=0,0029), 11 (p=0,0001), 12 (p=0,0001), 13 (p=0,0001), 14 (p=0,0001) y 15 (p=0,0001). Los contrastes planteados entre diferentes combinaciones de tratamientos sugieren que aquellos que incluyeron dosis

altas de auxinas (1 mg l^{-1}) son estadísticamente diferentes ($p=0,0001$), respecto de aquellos con dosis bajas ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$). También existen diferencias entre aquellos que usan como citocinina al BA (mejor resultado), respecto a los que incluyen KIN ($p=0,0001$). Sin embargo, los tratamientos 3 y 4, con dosis baja de ANA, mostraron una alta probabilidad de desarrollar yemas, al igual que los tratamientos 11, 12 y 13 con la dosis más alta de ANA (Fig. 1.2).

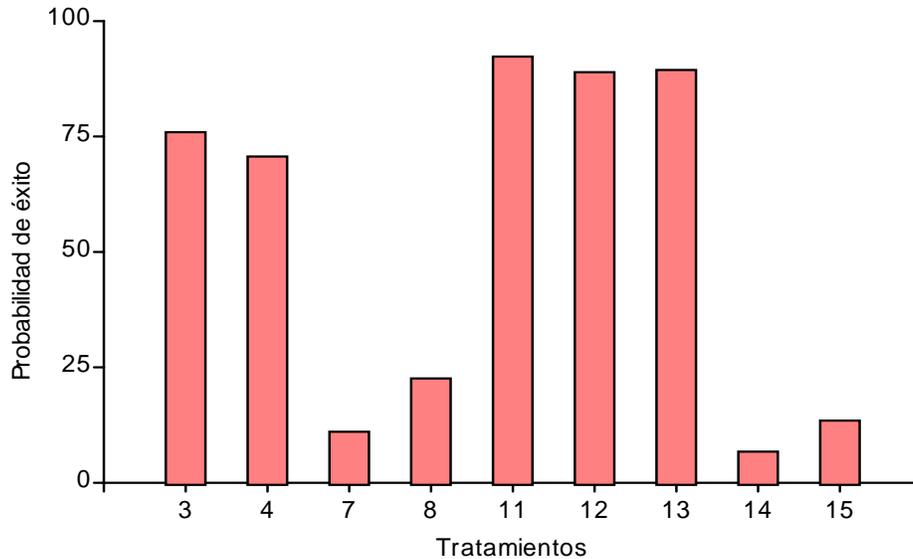


Fig. 1.2. Probabilidad de éxito en el desarrollo de yemas, para los tratamientos cuya producción de yemas fue estadísticamente distinta de cero. Tratamiento **3**: $0,1\text{ANA}:3\text{BA}$; **4**: $0,1\text{ANA}:5\text{BA}$; **7**: $0,1\text{ANA}:3\text{KIN}$; **8**: $0,1\text{ANA}:5\text{KIN}$; **11**: $1\text{ANA}:3\text{BA}$; **12**: $1\text{ANA}:5\text{BA}$; **13**: $1\text{ANA}:10\text{BA}$; **14**: $1\text{ANA}:1\text{KIN}$; **15**: $1\text{ANA}:3\text{KIN}$.

Para la variable “número de yemas por explante” se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En la Tabla 1.3 se presentan los valores promedios del número de yemas por explante y se muestran sus diferencias. Puede observarse que solo el tratamiento 11, difiere en forma significativa con el tratamiento 7. A pesar de no detectarse diferencias estadísticamente significativas entre la mayoría de los tratamientos involucrados, es importante notar que la combinación hormonal de 1 mg l^{-1} de ANA con 3 mg l^{-1} de BA fue la que mostró el promedio muestral más alto.

Tabla 1.3. Número de yemas por explante prosperado para los tratamientos cuya producción de yemas fue estadísticamente distinta de cero. (*) LSD, Prueba de Comparaciones Múltiples. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tratamiento	Media	LSD*	
11 (1ANA:3BA)	1.2033	a	
3 (0,1ANA:3BA)	1.1600	a	b
12 (1ANA:5BA)	1.1133	a	b
13 (1ANA:10 BA)	1.0567	a	b
14 (1ANA:1KIN)	1.0000	a	b
15 (1ANA:3KIN)	1.0000	a	b
4 (0,1ANA:5BA)	1.0000	a	b
8 (0,1ANA:5KIN)	1.0000	a	b
7 (0,1ANA:3KIN)	0.6667	b	

La estimación del cociente de chance para la tabla de contingencia que involucra ambos tratamientos 3 y 11, fue de 0,819 y significativamente distinto de cero. Es decir que se puede interpretar que el cambio de dosis de auxina de 0,1 a 1 mg l⁻¹ implica un 18% de incremento en las chances de obtener explantes que desarrollen yemas.

Para la variable “estado de crecimiento de la yema” (*iii*), los resultados sugieren que solo para los tratamientos 3 y 11 se debe esperar un número de brotes (Fig. 1.7) significativamente distinto de cero ($p=0,0266$ y $p=0,0190$, respectivamente) (Fig. 1.4).

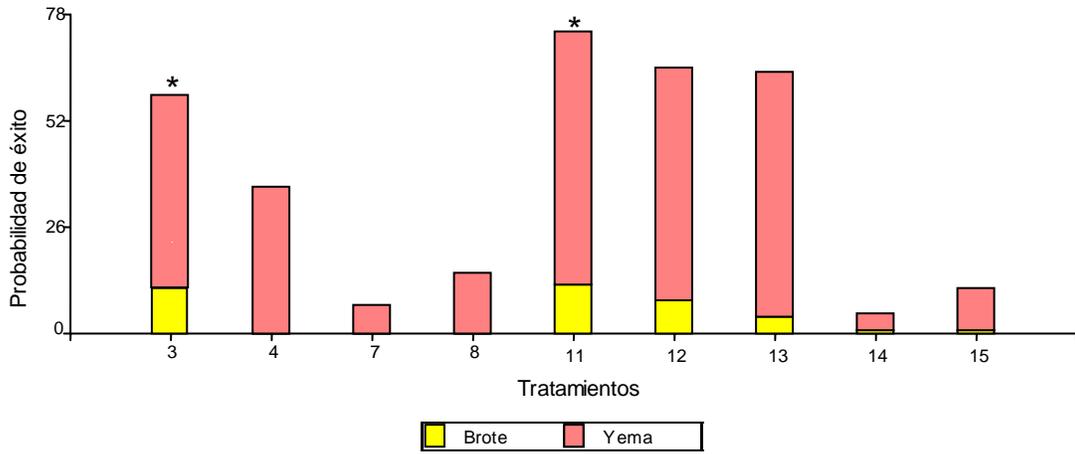


Fig. 1.4. Probabilidad de éxito en el desarrollo de brotes para los tratamientos cuya producción de yemas fue estadísticamente distinta de cero. Tratamiento **3**: 0,1ANA:3BA; **4**: 0,1ANA:5BA; **7**: 0,1ANA:3KIN; **8**: 0,1ANA:5KIN; **11**: 1ANA:3BA; **12**: 1ANA:5BA; **13**: 1ANA:10BA; **14**: 1ANA:1KIN; **15**: 1ANA:3KIN. (*) Tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas para la variable brote ($p > 0.05$).

Dichos tratamientos (3 y 11) que fueron los que produjeron mayor probabilidad de éxito en el desarrollo de brotes (19,3 y 16,2% respectivamente), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p = 0,8348$) (Fig. 1.5).

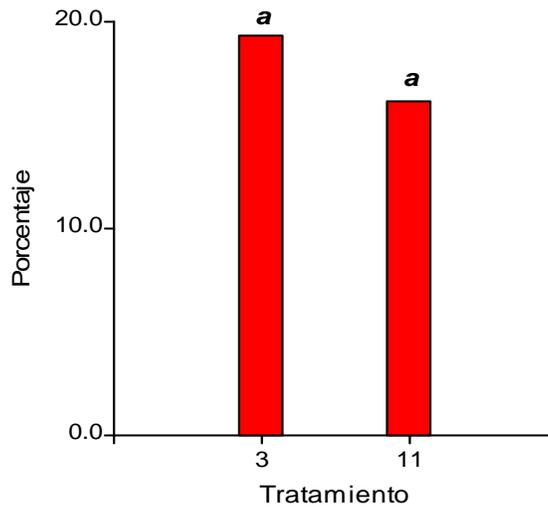


Fig. 1.5. Probabilidad de éxito en el desarrollo de brotes para los tratamientos 3 (0,1ANA:3BA) y 11 (1ANA:3BA). Prueba de la Mínima Diferencia Significativa: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

La eficiencia para las combinaciones hormonales de 0.1 y 1 mg l⁻¹ de ANA con 3 mg l⁻¹ de BA resultó ser de un 17,9 %, la cual es baja si se considera que esta metodología se la está ajustando para ser utilizada en procesos de transformación en los cuales, a su vez, la eficiencia se volverá a ver reducida.

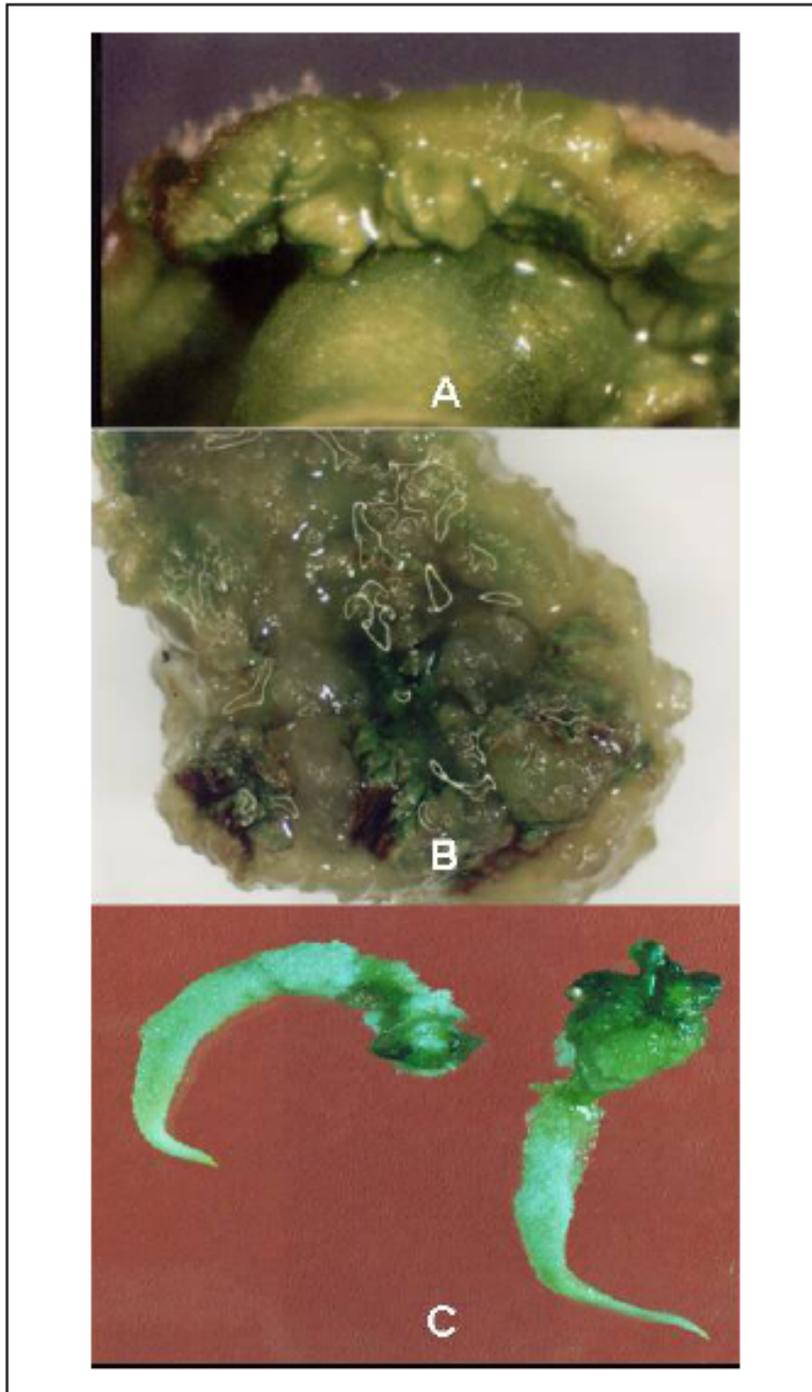


Fig. 1.6. Regeneración Organogénica. Etapa de Establecimiento. Diferenciación del tipo de desarrollo obtenido por cultivo *in vitro* de explantes foliares de *Arachis hypogaea* L. var. Florman INTA.- **A.** Yema (“éxito”). **B.** Callo (“fracaso”). **C.** Raíz (“fracaso”).

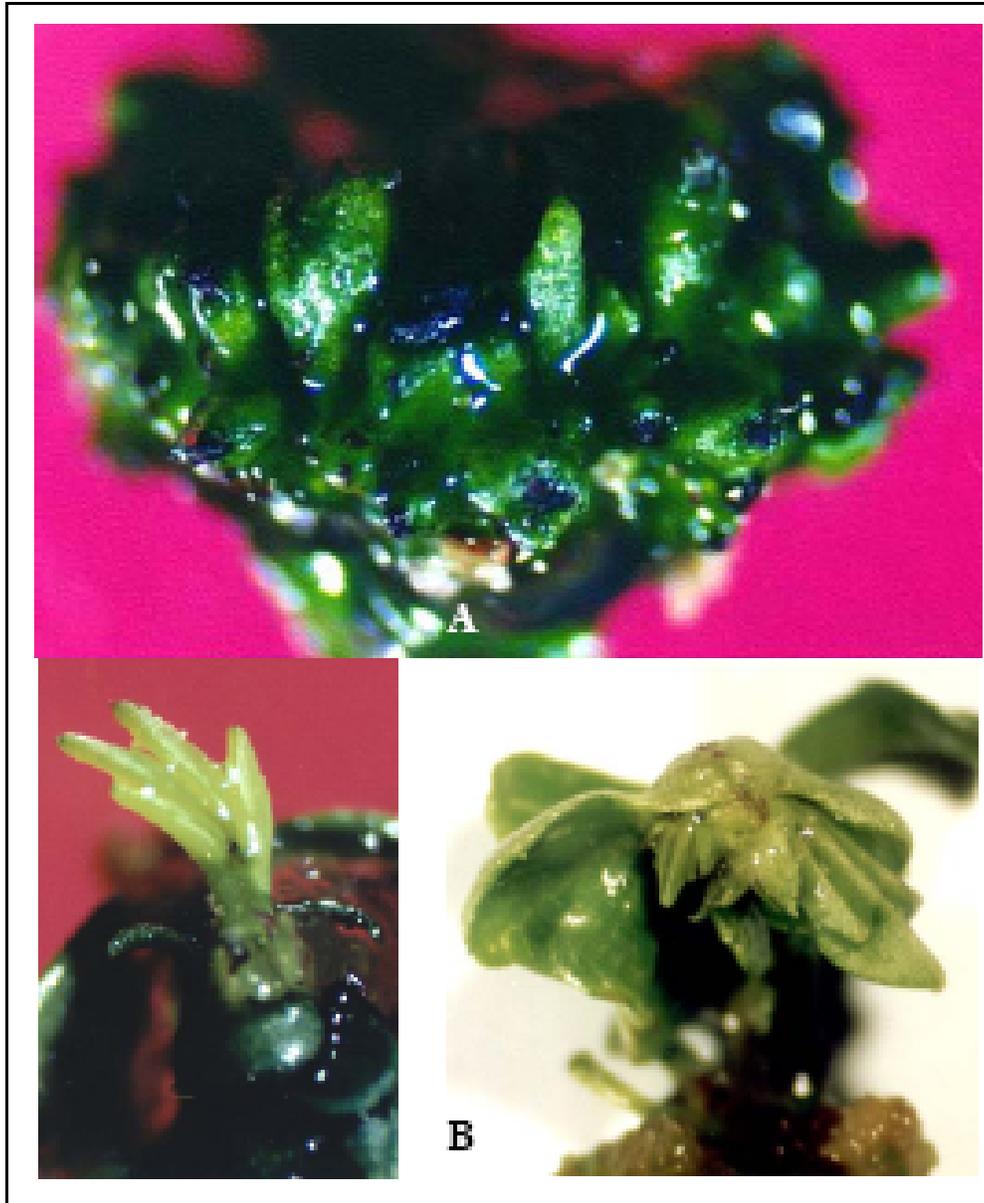


Fig. 1.7. Regeneración Organogenética. Etapa de Establecimiento. Diferenciación de los estados de Crecimiento, obtenidos por cultivo *in vitro* de explantes foliares de *Arachis hypogaea* L.-. **A.** Yemas múltiples (“fracaso”). **B.** Brote (“éxito”).

DISCUSIÓN

En la etapa de Establecimiento se examinó el comportamiento de los explantes frente a diferentes combinaciones de auxinas y citocininas a fin de establecer la combinación que optimice la producción de brotes. Para esto se tuvo en cuenta el tipo de desarrollo obtenido considerando como “éxito” a la producción de yemas y como “fracaso” a la formación de callos y/o raíces (Fig. 1.6). Todas las combinaciones hormonales con dosis extremas de citocininas (1 y 10 mg) produjeron callos y/o raíces. Esto acuerda con los resultados obtenidos por Ozias-Akins (1989) quien observó que la adición de dosis elevadas de BAP o KIN al medio de cultivo incrementa la producción de callos friables, lo cual va en detrimento de la producción de yemas. Los resultados muestran que ambas concentraciones de ANA combinadas con 3 y 5 mg de BA o KIN, tienden a producir yemas. Se puede observar (fig.1.4) que las combinaciones de ANA (0.1 y 1 mg) con 3 mg de BA han producido con éxito mas brotes, que las mismas con KIN. Según Sharma K. K. *et al.* (1990) pudieron obtener respuestas diferentes al comparar el efecto de cuatro citocininas (BA, Zeatina, 2-*ip* y KIN) en semillas de *Brassica juncea* (L.) Czern. Ellos observaron que si bien estos reguladores inducían brotes, lo hacían en diferentes frecuencias. El nivel óptimo para BA y 2-*ip* fue 5.0 μM y para la KIN y Zeatina fue de 10.0 μM . Esto les permitió concluir que el BA es la citocinina más efectiva tanto en términos de número de explantes que producen brotes como en el número de brotes por explantes. Con respecto a la concentración de ANA, los resultados muestran que 1 mg l^{-1} estimula la producción de yemas en un 18% más con respecto a la concentración 0.1 mg l^{-1} tendiendo a un número de yemas por explante prosperado mayor a la media obtenida por el resto de los tratamientos (Fig.1.5). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Mroginski *et al.* (1981) quienes reportaron que bajas concentraciones de ANA (0.01 y 0.1 mg l^{-1}) producen una regeneración pobre y errática de yemas, y que en altas concentraciones (3 y 4 mg l^{-1}) se estimula la formación de raíces reduciendo la eficiencia de regeneración. Por lo expuesto podemos concluir que en la etapa de Establecimiento, para el proceso de regeneración organogenético planteado para la variedad de maní Florman INTA, la relación de 1 mg l^{-1} de ANA y 3 mg l^{-1} de BA optimiza la producción de yemas y brotes.

ETAPA DE ELONGACIÓN

Objetivo específico 1.2: "Establecer la relación entre auxinas y citocininas que permite optimizar el crecimiento de los brotes en el medio de elongación".

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y metodología de cultivo

Se utilizaron los brotes obtenidos en el medio 1 ANA : 3 BA (tratamiento 11) de la etapa de Establecimiento . Los brotes se transfirieron a un tubo de 20 mm de diámetro por 110 de alto, conteniendo medio basal de cultivo (MS0), en un 22% del volumen disponible. En esta etapa se probaron dos concentraciones de ANA, consideradas como “baja” a la de 0.01 mg l⁻¹ y como “alta” a la de 1 mg l⁻¹ y tres concentraciones ascendentes de BA de 1, 3 y 5 mg l⁻¹, con sus respectivos controles. Cada una de las combinaciones descritas en la Tabla 1.8 constituyó un tratamiento.

Tabla 1.8. Combinaciones entre auxinas y citocininas (tratamientos), evaluadas en la etapa de Elongación.

Tratamiento	COMBINACIÓN HORMONAL (mg l ⁻¹)	
	ANA	BA
1	0	0
2	0	1
3	0	3
4	0	5
5	0.01	0
6	0,01	1
7	0,01	3
8	0,01	5
9	1	0
10	1	1
11	1	3
12	1	5

Los brotes se elongaron en cámaras de crecimiento a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad lumínica de $49,5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de RFA.

Diseño experimental y análisis de los resultados:

El diseño usado fue completamente aleatorizado con distinto número de repeticiones por tratamiento (entre 6 y 40). Cada tubo, representó la unidad experimental. A los 30 días, se evaluaron las siguientes variables: *i*) la evolución del brote (elongado, no elongado e involucionado a callo) (Fig. 1.10) y *ii*) altura de los brotes elongados (diferencia entre la altura inicial y final). A partir de estos datos se estableció la probabilidad de éxito del tratamiento considerando como “éxito” a la elongación de los brotes y como “fracaso” a la no elongación o involución a callo. Se utilizaron pruebas Chi-cuadrado para comparar proporciones de éxitos entre tratamientos.

Para la variable respuesta “crecimiento en altura” de los brotes, se realizó un análisis de varianza a una vía de clasificación (tratamientos) usando el procedimiento de mínimos cuadrados generalizados debido a la falta de homogeneidad de varianzas observada bajo los distintos tratamientos (Conover *et al.*, 1981). Las diferencias de medias se evaluaron mediante la prueba LSD ($p < 0.05$).

Para evaluar la eficiencia de la etapa (%), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{NBrEl}}{\text{NBrS}} * 100$$

donde NBrEl es el número de brotes elongados obtenidos a los 30 días desde la siembra y NBrS, es el número de brotes sembrados.

RESULTADOS

Los tratamientos fueron evaluados en primera instancia, de acuerdo a la evolución del brote es decir, de aquellos que presentaron una diferencia de crecimiento entre la altura inicial y la final (elongación). Estadísticamente, los tratamientos no resultaron ser diferentes ($p=0.1161$) y de todos ellos, los que en la inducción de elongación, arrojaron una probabilidad de éxito mayor o igual al 80% fueron los números 1, 3, 5, 9 y 12 (Fig. 1.9).

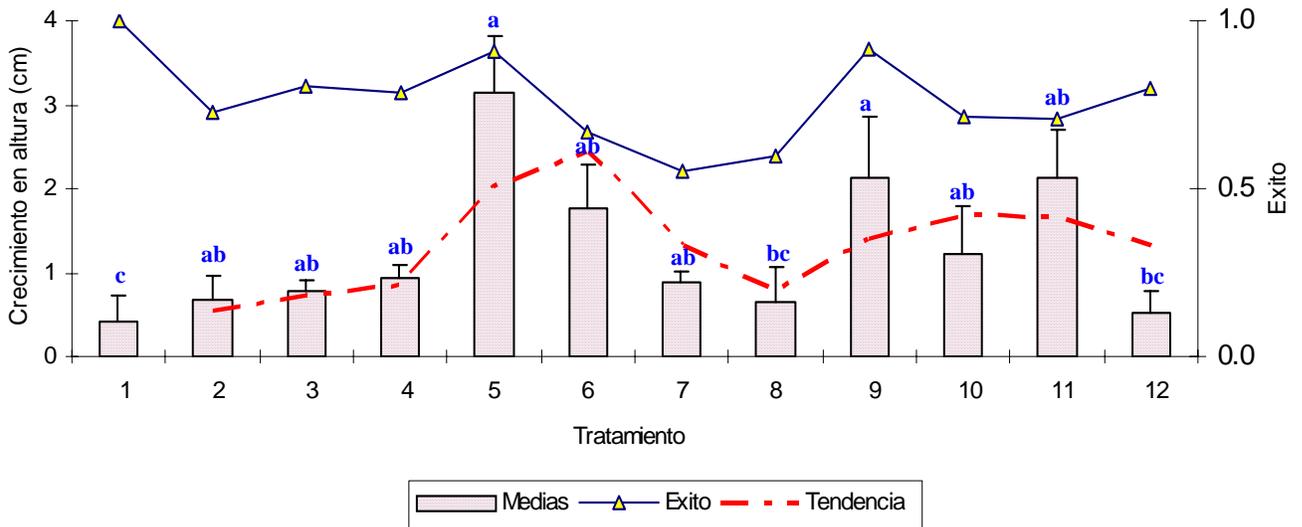


Fig. 1.9. Probabilidad de éxito, crecimiento en altura (medias \pm error estándar) y tendencia móvil de las medias para los brotes evaluados bajo los distintos tratamientos en la etapa de Elongación. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Con respecto a la variable “crecimiento en altura” de los brotes elongados, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.0008$) (Fig.1.9).

Un contraste, que es definido estadísticamente como una combinación lineal de los parámetros de un modelo, permite hacer comparaciones entre las medias pudiéndose especificar la significancia y las tendencias de una respuesta debido a los niveles del factor tratamiento (Montgomery, 1991). De los contrastes realizados para analizar si la adición de una citocinina al medio de cultivo, carente de auxina, tenía un efecto favorable sobre el

crecimiento del brote, i.e. comparación de crecimiento promedio en medios sin y con diferentes dosis de citocinina (tratamientos 1, 2, 3 y 4), los resultados no fueron estadísticamente significativos ($p=0.0851$). Sin embargo, al contrastar el efecto auxínico, i.e. comparación del crecimiento promedio en medios sin y con diferentes dosis de auxina (tratamientos 1, 5 y 9), las diferencias fueron significativas ($p=0.0001$). Los contrastes entre las diferentes dosis de auxina incorporadas al medio de cultivo, i.e. comparación del crecimiento en altura promedio en medios con dosis baja vs. alta de auxina (tratamientos 5 y 9), no arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.7957$). Otro de los contrastes realizados fue el de las dosis baja de auxina y el de las dosis alta de auxina combinadas con concentraciones crecientes de citocinina (tratamientos 5, 6, 7 y 8 y tratamientos 9, 10, 11 y 12 respectivamente), y en estos casos, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos con dosis baja ($p=0.0084$) y no así, para los tratamientos con dosis alta ($p=0.3303$).

La presencia de una auxina en el medio de Elongación produjo un estímulo significativamente diferente si se lo compara con el medio basal (tratamientos 1, 5 y 9) ($p=0.0001$) (Fig. 1.10 E). El incluir ANA en esta etapa produjo el efecto esperado que es el de inducir alargamiento celular. En dosis bajas de ANA y concentraciones crecientes de BA (tratamientos 6, 7 y 8) la tendencia en el crecimiento fue negativa observándose en los medios con la adición de 5 mg l^{-1} de BA, una reducción de un 77% de la altura promedio de los brotes. Sin embargo, esas mismas concentraciones crecientes de BA combinadas con la dosis alta de ANA (tratamientos 10, 11 y 12), mostraron una tendencia negativa aunque no tan marcada (Fig. 1.9). Quizás eso responde a una compensación en los efectos que ambos reguladores del crecimiento producen al brote. Según observaciones realizadas en estos tratamientos, es notable ver que cuando la relación auxina:citocinina es de 1:1 y 1:3, el crecimiento del brote se ve afectado, favoreciendo la multiplicación del mismo (datos no mostrados) (Fig. 1.10 B y E).

La proporción de brotes elongados (Fig. 1.10) no fue estadísticamente diferente entre los tratamiento 5 y 9 ($p=0.1272$). Mediante el estadístico Chi-cuadrado de Pearson, se

obtuvo un valor p de 0.949 ($\alpha=0.05$) el cual no nos da evidencias suficientes como para rechazar la hipótesis nula de independencia entre ambas concentraciones de ANA.

La eficiencia de la etapa para los medios MS + 0.01 mg l⁻¹ de ANA (tratamiento 5) y MS + 1 mg l⁻¹ ANA (tratamiento 9), resultaron ser de un 90,9 y 91,7% respectivamente, valores aceptables para el proceso de regeneración planteado.

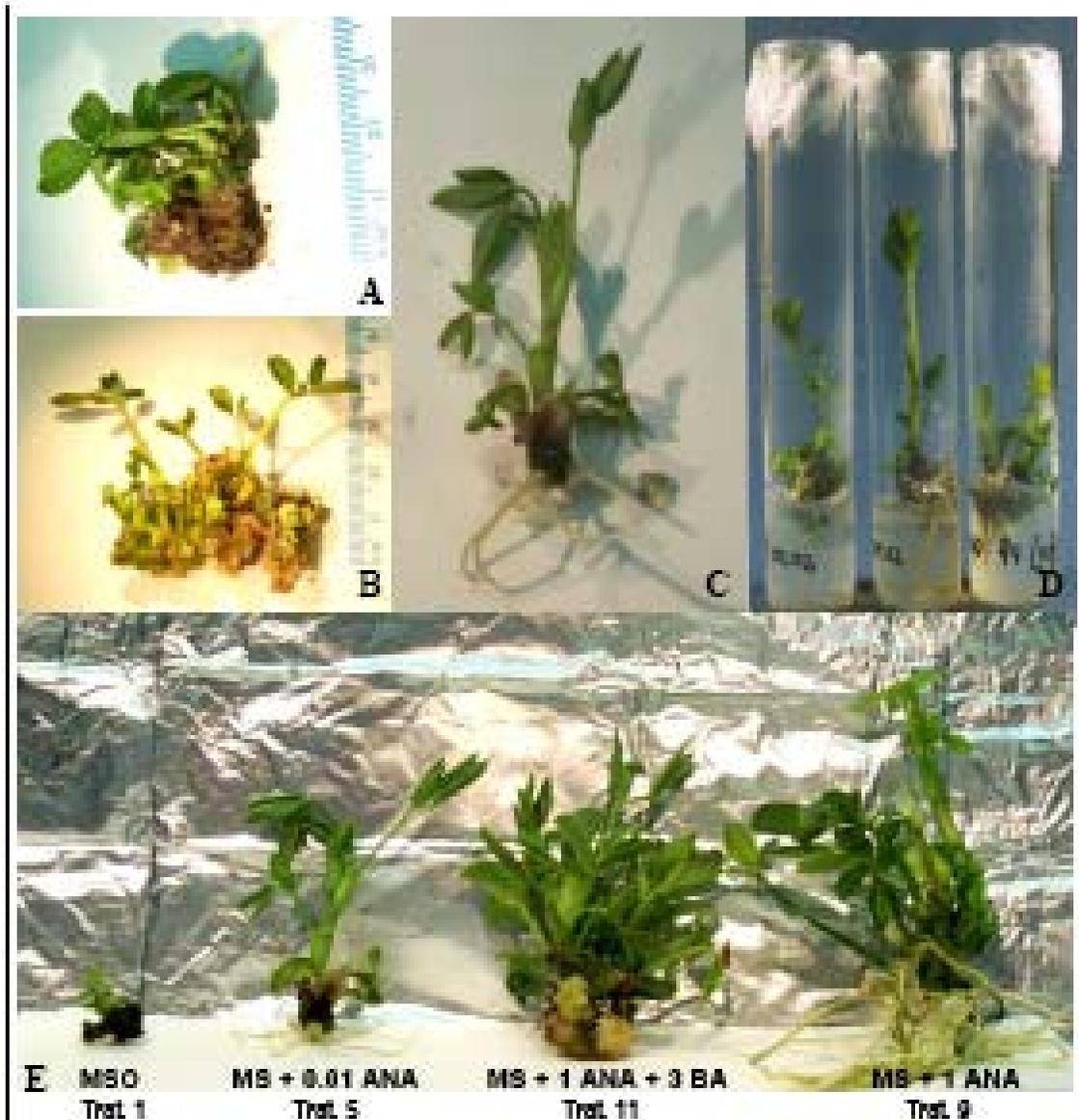


Fig. 1.10. Regeneración Organogenética. Etapa de Elongación. Evolución del brote de *Arachis hypogaea* L. **A.** Brote no elongado e involucionado a callo (“fracaso”). **B.** Brote no elongado y multiplicado (“fracaso”). **C.** Brote elongado (“éxito”). **D.** Brotes en tubos de crecimiento. **E.** Comparación efecto auxinas y/o citocininas en el crecimiento de los brotes.

DISCUSIÓN

En la etapa de Elongación se observó como una fuente exógena de auxinas y/o citocininas puede influir en el crecimiento en altura de los brotes. Se valuó la evolución del brote considerando como “éxito” a los elongados, es decir, aquellos que presentaron una diferencia de crecimiento entre la altura inicial y la final (Fig. 1.10). La presencia de una auxina en el medio de elongación, en nuestro caso ANA, produjo el efecto esperado de alargamiento celular. No encontramos diferencias significativas entre las dos concentraciones de auxina evaluadas (0.01 y 1 mg l^{-1}) tanto en el porcentaje de brotes elongados como en el crecimiento en altura obtenido. Se pudo observar que una pequeña dosis de 0.01 mg l^{-1} de ANA fue suficiente para estimular que casi un 91% de los brotes se alarguen. Esto concordaría con Krikorian (1995) quien sugiere que el suplemento de auxinas a veces no es necesario o lo es en mínimas dosis debido a las cantidades endógenas de esa misma hormona en el sistema. Nosotros podríamos insinuar que la concentración de ANA utilizada en el medio de Establecimiento eleva los niveles endógenos de esta auxina, haciéndola necesaria en inapreciables dosis en la etapa posterior de Elongación. Esto coincide también con los resultados de Murthy *et al.* (1995) quienes chequearon la concentración endógena de diferentes reguladores del crecimiento permitiéndoles afirmar que estos niveles influyen directamente en la composición y finalidad de los medios de cultivo. Con respecto a la adición de una citocinina como el BA al medio de Elongación no creó un ambiente favorable para el crecimiento en altura de los brotes. Sin embargo, los brotes se ven estimulados a la multiplicación siempre que se encuentre bajo la presencia de una auxina (datos no mostrados) (Fig. 1.10 E). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Gagliardi *et al.* (2000) quienes demostraron que el uso de BA puede inducir la formación de múltiples brotes favoreciendo las bajas frecuencias de regeneración. Hazra *et al.* (2001) observaron también que la presencia de bajas concentraciones de BA estimula que los brotes auxiliares del prosófilo formen centros múltiples del crecimiento, de los cuales se diferenciaran múltiples brotes. El agregado en nuestros ensayos de altas concentraciones de BA (3 y 5 mg l^{-1}) inhibió la elongación de los brotes, con tendencias negativas más abruptas en aquellos tratamientos combinados con dosis bajas de auxina (Fig. 1.9). La concentración de 1 mg l^{-1} de ANA permite un equilibrio y una estimulación

dirigida en presencia de BA tanto al crecimiento como a la multiplicación. Chengalrayan and Gallo-Meagher (2001) quienes evaluaron los efectos de varios reguladores de crecimiento en la regeneración de caña de azúcar, coincidieron en que la elongación de los brotes decrece a medida que se incrementa la concentración de BA pero a diferencia de nuestros resultados, la adición de ANA les resultó inhibitoria de la elongación. En base a los resultados obtenidos y al no encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones de ANA evaluadas (tratamientos 5 y 9), se considerará como medio de Elongación óptimo para este proceso de regeneración organogénico, al medio MS + 0.01 mg l⁻¹ de ANA, ya que permite que un 90.9% de los brotes crezcan 3.13 cm en promedio por mes. En base a lo expuesto, podemos concluir que en la variedad de maní Florman INTA, el medio suplementado con 0.01 mg l⁻¹ de ANA y en ausencia de BA promueve una eficiente elongación de los brotes, con una mínima formación de callos.

ETAPAS DE ENRAIZAMIENTO y RUSTICACIÓN

Objetivo específico 1.3: "Establecer la dosis de auxina que permita optimizar la capacidad de formación de raíces adventicias en el medio de enraizamiento".

Objetivo específico 1.4: "Evaluar la supervivencia de las plantas obtenidas cuando se las transfiere a suelo".

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y metodología de cultivo

Se utilizaron los brotes elongados de la etapa de Elongación y para homogeneizarlos se los mantuvo durante un mes en MSO para evitar cualquier exceso hormonal que pudieren poseer. Cada uno de los brotes fue cortado por debajo del primer nudo para limpiarlo de toda raíz y/o callosidad preformada. Después fueron transferidos a frascos de vidrio y/o magentas, conteniendo medio basal de cultivo (MSO) en un 25% del volumen disponible (Fig.1.14 D). A este medio se le adicionaron diferentes concentraciones de auxina (ANA) descritas en la Tabla 1.11. Cada una de ellas constituyó un tratamiento y cada frasco y/o magenta, la unidad experimental. A los 30 días se evaluaron las siguientes variables: *i*) evolución del brote elongado (enraizado, no enraizado y no enraizado con producción de callo) (Fig. 1.14 A, B y C), *ii*) caracterización del sistema radicular de los brotes que enraizaron en normal, engrosado, anormal o anormal achaparrado (Fig. 1.14 E), *iii*) longitud de raíz y *iv*) número de raíces formadas. A partir de estos datos se estableció la probabilidad de éxito del tratamiento considerando como "éxito" a los brotes enraizados y como "fracaso" a los que no enraizaron con o sin producción de callo. Se utilizaron pruebas Chi-cuadrado para comparar proporciones de éxitos entre tratamientos.

Tabla 1.11. Concentraciones de auxinas evaluadas en la etapa de Enraizamiento (tratamientos).

Tratamiento	CONCENTRACION HORMONAL (mg l ⁻¹)
	ANA
1	0
2	1
3	3
4	5
5	10

Los brotes destinados al enraizamiento se mantuvieron en cámaras de crecimiento a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad y una intensidad lumínica de $49,5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de RFA.

En la etapa de Rusticación, se utilizó para el repique a suelo, los brotes con raíces obtenidos y clasificados de acuerdo al tratamiento del cual provenían de la etapa de Enraizamiento quedando constituidos los tratamientos. Cada uno constituyó un tratamiento y cada maceta, la unidad experimental (Tabla 1.12). A los 30 días, se evaluó la variable supervivencia de las plántulas de acuerdo a la emisión de hojas nuevas.

Tabla 1.12. Tratamientos evaluados en la etapa de Rusticación, constituidos en base al tratamiento de la etapa de Enraizamiento del cual provenían.

Tratamiento Rusticación	Medio de Enraizamiento del cual provenían
1	1 (MSO)
2	2 (MS + 1 mg l ⁻¹ ANA)
3	3 (MS + 3 mg l ⁻¹ ANA)
4	4 (MS + 5 mg l ⁻¹ ANA)
5	5 (MS + 10 mg l ⁻¹ ANA)

Las plántulas fueron repicadas en macetas rellenas con una mezcla de turba, vermiculita y perlita en una relación volumétrica 1:2:1. Inmediatamente después del trasplante, las plantas se cubrieron con frascos o vasitos descartables invertidos durante 1 semana, para favorecer un ambiente con elevada humedad relativa (Fig. 1.15 A y B). Después de ese tiempo, esos frascos o vasitos fueron retirados paulatinamente por tiempos crecientes para permitir una disminución gradual de la humedad ambiente y para favorecer una mejor adaptación a las condiciones de invernadero. Simultáneamente con esta rusticación, se comenzó con la fertilización regando el material con solución mineral de Hoagland.

Diseño experimental y análisis de los resultados

En la etapa de Enraizamiento, el diseño utilizado fue completamente aleatorizado con distinto número de repeticiones por tratamiento (entre 22 y 64). Cada repetición fue codificada como “éxito” (brote enraizado) o “fracaso” (brote no enraizado con o sin producción de callo) y se utilizaron pruebas Chi-cuadrado para comparar proporciones de éxitos entre tratamientos.

Para la variable “longitud de raíz”, se realizó un análisis de varianza utilizando el procedimiento de Mínimos Cuadrados Generalizados debido a la falta de homogeneidad de las varianzas observadas bajo los distintos tratamientos. Para el “número de raíces”, se realizó un Análisis de Varianza no Paramétrico, Prueba de Wilcoxon (Conover, 1999).

Para evaluar la eficiencia de la etapa de Enraizamiento (%), se utilizó la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = \frac{NBrEn}{NBrEIS} * 100$$

donde NBrEn es el número de brotes enraizados obtenidos a los 30 días desde la siembra y NBrEIS es el número de brotes elongados sembrados.

En la etapa de Rusticación, se analizó la supervivencia de cada uno de los brotes enraizados, clasificándolos de acuerdo al medio de Enraizamiento del cual provenían. El número de repeticiones por tratamiento estuvo entre 17 de mínima y 34 de máxima. Se consideró como “éxito” al brote que emitió una hoja nueva y “fracaso” al brote que murió o que se mantuvo verde sin mostrar ningún síntoma de crecimiento (Fig. 1.15 A). Se utilizaron pruebas Chi-cuadrado para comparar proporciones de éxitos.

Para evaluar la eficiencia de la etapa de Rusticación (%), se utilizó la siguiente fórmula:

$$Eficiencia = \frac{NPILo}{NBrEnTr} * 100$$

donde NPILo es el número de plantas logradas en maceta a los 30 días desde la siembra y NBrEnTr, es el número de brotes enraizados transplantados.

RESULTADOS

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de brotes exitosos (con raíces) entre los tratamientos planteados ($p=0,0001$) (Tabla 1.13). En los tratamientos 1 y 2, el porcentaje de brotes que no enraizaron o que involucionaron a callo fue alto, correspondiéndoles un 46.87 y un 56.82% respectivamente.

Se clasificó morfológicamente al sistema radicular obtenido (Fig. 1.14 E). Los tratamientos 1 y 2 desarrollaron un sistema radicular “normal”, presentando raíces principales finas y largas al estilo cabellos, con un buen porcentaje de raíces secundarias y pelos absorbentes. En el tratamiento 3, se indujo un sistema “engrosado” caracterizado por raíces primarias levemente ensanchadas, con un menor número de raíces secundarias, pelos absorbentes y de longitud comparados con un sistema tipo normal. El tratamiento 4 presentó un sistema radicular “anormal” con raíces primarias cortas y engrosadas, sin presentar crecimiento secundario ni pelos absorbentes. El tratamiento 5 exhibió un sistema “anormal achaparrado” donde las raíces principales engrosadas crecen desorganizadamente

en presencia de callo y en completa ausencia de raíces secundarias. Aunque esta morfología nos da una idea de lo normal del sistema radicular desarrollado, no nos permite confirmar si el mismo es funcional o no, dato crucial al momento de la rusticación de estas plantas enraizadas.

Analizando los brotes enraizados, se detectaron diferencias estadísticamente significativas para la variable “número de raíces” ($p=0,0001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p=0.9856$), ni entre los tratamientos 3, 4 y 5 respectivamente ($p=0.7813$, $p=0.9403$, $p=0.9970$) (Tabla 1.13).

Tabla 1.13. Efecto de las diferentes concentraciones de ANA sobre la inducción de raíces y su posterior supervivencia al trasplante a suelo. (*)LSD, Prueba de la Mínima Diferencia Significativa. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Tratamiento	n° Brotes tratados	n° Brotes enraizados	% Enraizamiento	n° de Raíces*	Largo de Raíz*	n° de Plantas transferidas a suelo	n° de plantas c/hojas nuevas a los 30 días	% de plantas c/hojas nuevas a los 30 días*
1 (MSO)	64	34	53.13 b	2.74 b	2.65 b	34	30	88.23 a
2 (1 ANA)	44	17	38.64 b	3.82 b	2.15 c	17	16	94.12 a
3 (3 ANA)	28	27	96.43 a	14.56 a	4.06 a	27	25	92.59 a
4 (5 ANA)	24	23	95.83 a	16.74 a	2.76 b	23	8	34.78 b
5 (10 ANA)	22	21	95.45 a	14.62 a	1.68 c	21	0	0.00 c

Teniendo en cuenta los brotes enraizados, también se divisaron diferencias estadísticamente significativas para la variable “longitud de raíz” ($p=0.0001$). Los tratamientos 1 y 4 ($p=0.9930$) y los tratamientos 2 y 5 ($p=0.8773$) no mostraron diferencias significativas (Tabla 1.13).

Complementariamente, se observó desde el punto de vista morfológico que la adición de 3, 5 y 10 mg l⁻¹ de ANA incrementa significativamente el número de raíces producidas. En cuanto al largo de raíz, el aumento en la concentración de la auxina no mostró un comportamiento consistente pero la tendencia general fue negativa a medida que se incrementaba la dosis. Esto nos permite conjugar los resultados obtenidos para cada

variable y visualizar que el medio con diferencias estadísticamente significativas tanto para el número como para el largo de raíz fue el tratamiento número 3.

La eficiencia de la etapa de Enraizamiento para el medio MS + 3 mg l⁻¹ de ANA resultó ser de un 96.43% valor aceptable para el proceso de regeneración planteado.

En la etapa de Rusticación, se analizó la proporción de plantas que resistieron al trasplante (“éxitos”) de acuerdo al medio de Enraizamiento del cual provenían resultando ser estadísticamente diferentes ($p=0.0001$) (Tabla 1.13). Las comparaciones de a pares sugirieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos 1 y 4 ($p=0.0007$), 1 y 5 ($p=0.0004$), 2 y 4 ($p=0.0007$), 2 y 5 ($p=0.0004$), 3 y 4 ($p=0.0002$) y 3 y 5 ($p=0.0001$) respecto a la supervivencia de las plantas transplantadas.

Las plantas tratadas sin el agregado de auxina y con 1 ó 3 mg l⁻¹ de ANA en la etapa de Enraizamiento no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la adaptación a suelo ($p=0.9329$), pero si se diferenciaron con los tratamientos 4 y 5. Para la elección del medio óptimo de enraizamiento se tuvo en cuenta el éxito de las plantas al trasplante durante la etapa de Rusticación. Este análisis correlacionado se hizo como una forma de evaluar si el sistema radicular desarrollado en la etapa de Enraizamiento era lo normal y funcional necesario como para permitir que las plantas subsistan al estrés producido durante la etapa posterior de Rusticación. Si bien, la evaluación de las variables número y largo de raíz arrojaron que el medio con la adición de 3 mg l⁻¹ de ANA fue el más eficiente, se pudo corroborar en el trasplante que el sistema radicular formado con dicho tratamiento fue eficiente pues permitió una alta supervivencia de las plantas. Esto nos permite confirmar que la elección del tratamiento 3 (MS + 3 mg l⁻¹ de ANA) para la etapa de Enraizamiento es el más conveniente para la etapa de Rusticación, ya que permite que un 92.59% de las plantas sobrevivan el período inicial de adaptación al suelo de 30 días, desarrollándose exitosamente a la madurez, sin observar ningún tipo de variación fenotípica.

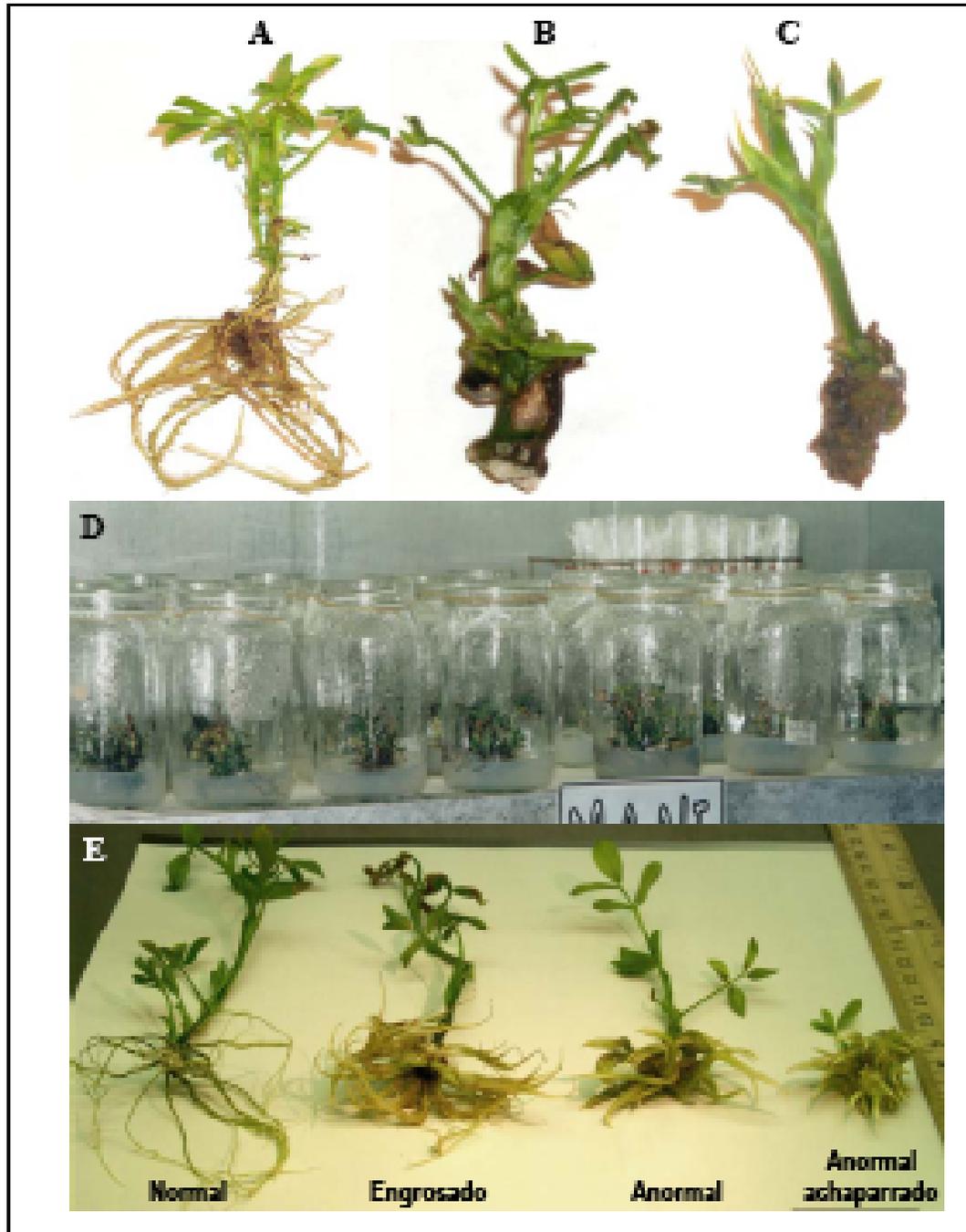


Fig. 1.14. Regeneración Organogenética. Etapa de Enraizamiento. Evolución del brote elongado de *Arachis hypogaea* L. **A.** Brote enraizado (“éxito”). **B.** Brote no enraizado (“fracaso”). **C.** Brote no enraizado con producción de callo (“fracaso”). **D.** Brotes enraizados en magenta. **E.** Caracterización del sistema radicular de los brotes que enraizaron.

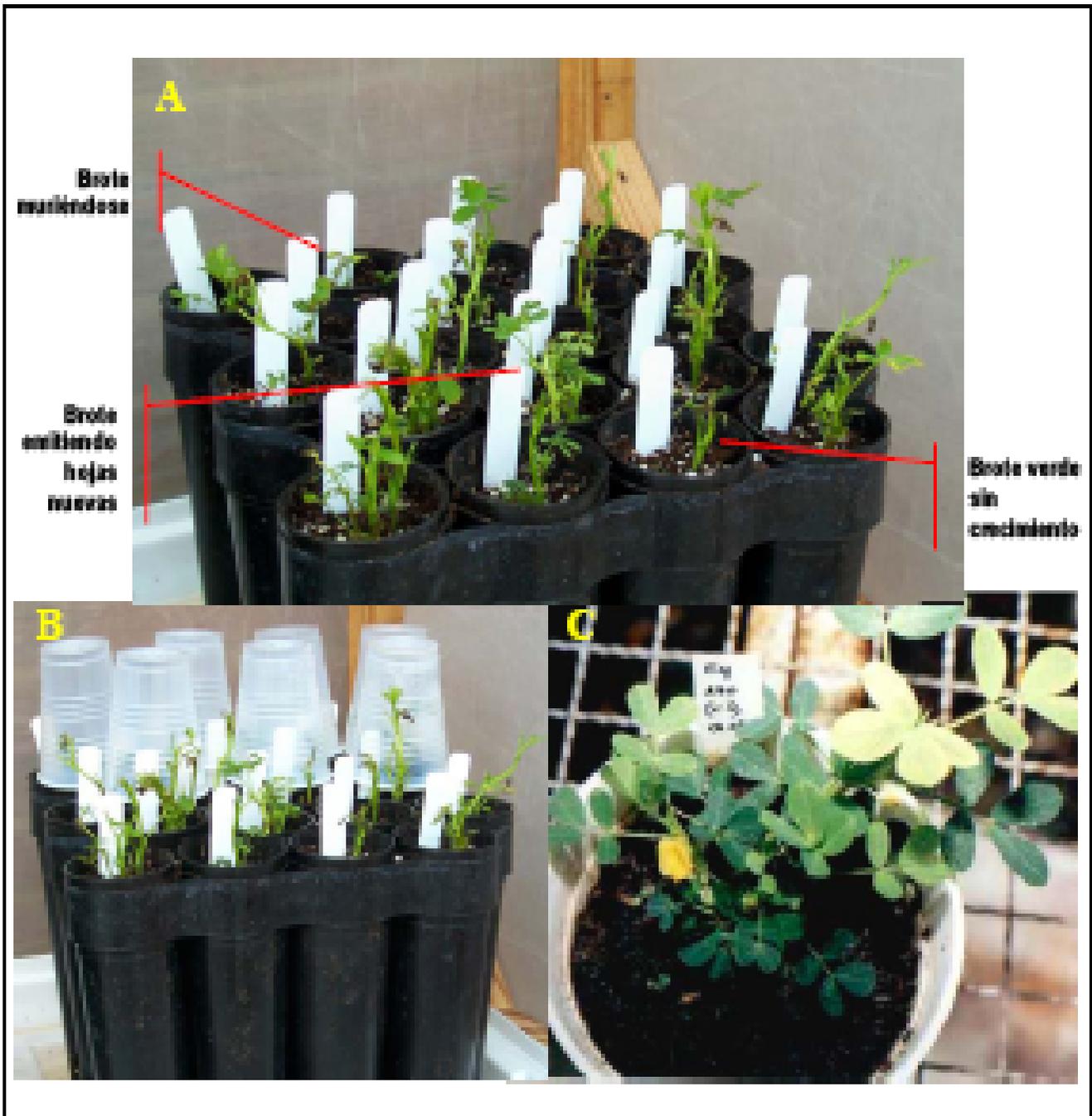


Fig. 1.15. Regeneración Organogenética. Etapa de Rusticación. Evolución del brote enraizado de *Arachis hypogaea* L. en macetas rellenas con 1 turba: 2 vermiculita: 1 perlita. **A.** Brotes emitiendo hojas nuevas (“éxito”). Brote verde sin crecimiento. Brote muriéndose. **B.** Adaptación de los brotes a las condiciones de invernadero. **C.** Planta regenerada y adaptada a suelo floreciendo y fructificando.

DISCUSIÓN

En la etapa de Enraizamiento se evaluó el efecto de una auxina (ANA) en brotes elongados de la etapa anterior sobre la emisión de raíces funcionales y morfológicamente normales (Fig. 1.14 E). El incremento en la concentración de ANA estimuló la inducción de raíces hasta una concentración de 3 mg l^{-1} pero a dosis mayores, la tendencia fue a inhibirlo. Estos resultados concuerdan con los de Venkatachalam *et al.* (1999), quienes obtuvieron una formación de raíces del 20-30% en medios sin auxinas y de un 86.2% en medios suplementados con $5.37 \text{ }\mu\text{M}$ de ANA. Ellos observaron también y en concordancia con nuestros resultados, que la producción de raíces decrece a medida que la concentración de auxina adicionada al medio se incrementaba. En nuestros ensayos, concentraciones ascendentes de ANA aumentaron significativamente el número de raíces producidas aunque no mostró un comportamiento consistente con la variable “largo de raíz” a pesar de que su tendencia fue negativa a medida que se aumentó la dosis añadida. Esto coincide con las observaciones de Krikorian (1995) quien dice que existe una tendencia con el incremento de ANA a producir un mayor número de raíces pero de una longitud menor, muy probablemente debido a que las auxinas promueven la iniciación radicular pero luego, la presencia de las mismas inhibe el crecimiento de las raíces. Morfológicamente, el sistema radicular que hemos obtenido en los tratamientos 1 y 2 fue del tipo “normal” y en los restantes la tendencia fue a presentar modificaciones cada vez más acentuadas a medida que la dosis de auxina se incrementaba (Fig. 1.14 E). Karhu (1997) observó también que en presencia de auxinas, las raíces son cortas y se favorece la formación de tejido calloso en la base de las microcortaduras. Aunque este análisis morfológico nos da una idea de lo “normal” del sistema radicular desarrollado, no nos permitió confirmar si el mismo era funcional, lo cual es determinante al momento de la adaptación de estas plántulas al suelo. Karhu (1997) también considera que un factor importante a tener en cuenta es que la producción de un alto número de raíces formadas *in vitro* no está estrictamente asociada con un alto porcentaje de supervivencia *ex vitro*. Este punto es el que hace decisivo la elección de un medio óptimo de enraizamiento ya que lo importante no siempre es producir un gran número de raíces sino de que éstas sean funcionales.

En la etapa de Rusticación se analizó la proporción de plántulas que resistieron al trasplante teniendo en cuenta el medio de Enraizamiento de procedencia. Se consideró como “éxito” al brote que emitió una hoja nueva y “fracaso” al brote que murió o que se mantuvo verde sin mostrar ningún síntoma de crecimiento (Fig. 1.15 A). Los brotes tratados sin el agregado de auxina y con 1 ó 3 mg l⁻¹ de ANA en la etapa de Enraizamiento se adecuaron exitosamente al suelo mientras que aquellos tratados con 5 o 10 mg l⁻¹ a pesar de producir un mayor número de raíces en la etapa anterior no lograron adaptarse a las condiciones de invernadero (Tabla 1.13). El sistema radicular desarrollado en los tratamientos 1, 2 y 3 durante la etapa de Enraizamiento fue funcional ya que permitieron cumplir con la función de absorción de agua y nutrientes necesarios para ayudar a la plántula a formar más rápidamente nuevas hojas y raíces, de modo que se active la fotosíntesis y la absorción de nutrientes desde el suelo, ya en condiciones de invernadero. Esto coincide parcialmente con los resultados obtenidos por Karhu (1997) quien evaluó el enraizamiento de brotes de *Lonicera* spp. Ellos observaron que el número y largo de raíces primarias formado en los brotes provenientes de medios enriquecidos con auxinas les permitió una adaptación *ex vitro* exitosa y superior comparado con aquellos que procedían de medios libres de auxinas.

En base a los resultados obtenidos y al análisis combinado de ambas etapas de Enraizamiento y Rusticación, se consideró como medio óptimo de Enraizamiento para la variedad de maní Florman INTA, al suplementado con 3 mg l⁻¹ de ANA, ya que produjo que un 96.43% de los brotes enraizaran, con un promedio de 14.56 raíces y 4.06 cm de largo. Estas plántulas si bien mostraron un engrosamiento de las raíces y un menor número de raíces secundarias y pelos absorbentes, tuvo una eficiencia en la etapa de Rusticación de un 92.56% lo cual se consideró eficaz para el proceso de regeneración planteado. La eficiencia lograda en estas etapas fue alta pues generalmente en maní el porcentaje de formación de raíces es bajo (20-30%) en desmedro de la adaptación a suelo (Daimon and Mii, 1991). En base a lo expuesto podemos establecer que la dosis de auxina de 3 mg l⁻¹ de ANA optimiza la formación de raíces en brotes elongados de la etapa anterior y una supervivencia de las plántulas enraizadas al trasplante a suelo evaluadas como eficiente.

CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPITULO I

En el presente capítulo, se desarrolló un protocolo de regeneración que permitió la producción de brotes y su conversión a plantas fértiles, lo cual constituye un aporte valioso para futuros estudios de transformación de maní, principalmente si se trata de una de las variedades tipo Runner más producidas en nuestro país, como lo es la Florman INTA.

En base a los objetivos planteados se dividió al proceso de regeneración del maní variedad Florman INTA en cuatro etapas de acuerdo a lo establecido por Mroginski *et al.*, 1981: (i) **Establecimiento**, periodo en el cual el explante se adapta al medio artificial y se induce la formación de yemas a partir de los explantes de hojas inmaduras; (ii) **Elongación**, tiempo en el cual cada yema es estimulada a crecer en altura para individualizarse en un brote; (iii) **Enraizamiento**, etapa durante la cual se induce la formación de raíces en los brotes para obtener una planta completa; y (iv) **Rusticación**, en donde se busca adaptar estas plantas obtenidas *in vitro* al ambiente en el que finalmente crecerán.

En la etapa de Establecimiento, medios suplementados con 1 mg l^{-1} de ANA estimularon la producción de yemas en un 18 % tendiendo a un número de yemas por explante prosperado mayor que la media obtenida por el resto de los tratamientos. Esta concentración auxínica combinada con 3 mg l^{-1} de BA permitió optimizar la producción de brotes, con lo cual, el tratamiento 11 (1ANA:3BA), cumplió con los objetivos propuestos para esta etapa dentro del proceso de regeneración de la variedad de maní Florman INTA.

En la etapa de Elongación, se pudo observar que una pequeña dosis de ANA de solo 0.01 mg l^{-1} fue suficiente para producir el alargamiento celular esperado. El agregado de una citocinina (BA) estimuló la formación de múltiples brotes, y de esta manera se compensó la baja frecuencia de regeneración. Este resultado se debería tener en cuenta pues podría constituir una importante herramienta adicional para la regeneración, ya que maximiza el número de plantas que pueden ser producidas a partir del explante sembrado. En esta etapa, el tratamiento 5, suplementado con 0.01 mg l^{-1} de ANA y en ausencia de

citocininas, fue el seleccionado pues logró promover que un 90.9% de los brotes crezcan con un promedio mensual de 3.13 cm. valor aceptable para el proceso de regeneración planteado.

En la etapa de Enraizamiento, la presencia de ANA produjo una respuesta significativamente diferente entre los tratamientos. El medio desprovisto de auxinas no favoreció la inducción de raíces como lo hicieron en general los medio con auxinas. El incremento de la concentración de ANA estimuló la producción de un mayor número de raíces pero de una longitud menor, probablemente debido a que estas altas concentraciones inhibieron el crecimiento de las mismas.

En la etapa de Rusticación, la eficiencia resultó ser en promedio de un 91.6% para aquellos medios sin auxina o con la adición de 1 ó 3 mg l⁻¹ de ANA. Esto nos permitió inferir en que, el sistema radicular desarrollado en la etapa de Enraizamiento es completamente funcional ya que fue capaz de cumplir con la función de absorber el agua y los nutrientes necesarios para ayudar a la planta a formar más rápidamente nuevas hojas y raíces, condiciones necesarias para una exitosa adaptación a suelo.

Basados en los resultados obtenidos y al análisis combinado de ambas etapas de Enraizamiento y Rusticación, se consideró como medio óptimo de Enraizamiento al tratamiento 3, suplementado con 3 mg l⁻¹ de ANA, ya que produjo que un 96.43% de los brotes enraizaran, con un promedio de 14.56 raíces y 4.06 cm de largo. Estas plántulas desarrollaron un sistema radicular lo suficientemente funcional como para lograr que un 92.56% de las mismas sobrevivan al transplante. Estas eficiencias logradas fueron aceptables para el proceso de regeneración planteado.

La eficiencia general del sistema resultó ser de un **14.52%** es decir, que de cada 25 explantes sembrados se obtienen 3.6 plantas logradas en maceta. Las plantas transplantadas a suelo fueron totalmente normales y capaces de producir semillas sin ningún inconveniente.

La etapa que limita la eficiencia general de este protocolo de Regeneración es la de Establecimiento. En esta etapa es donde deben realizarse los ajustes de procedimiento para poder así mejorar la eficiencia general del sistema.

El protocolo establecido para la variedad de maní Florman asegura que los brotes inducidos tienen una alta probabilidad de convertirse en planta. La habilidad de muchos genotipos de maní de producir embriones, yemas o brotes a frecuencias razonables usando un protocolo sencillo, no son necesariamente aquellos que dan un alto porcentaje de conversión a planta (Ozias-Akins *et al.*, 1992). De modo que, para la variedad de maní Florman INTA, el sistema de regeneración organogénico planteado logró una eficiencia general aceptable.

BIBLIOGRAFIA CAPITULO I

1. Agencias Zonales, SAGPyA. 2004. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina. Córdoba. Informe Productivo.
2. Agresti, A. 1990. Categorical Data Analysis. John Wiley & Sons.
3. Alleveltdt, G. and F. Radler. 1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 37: 376-379.
4. Ammirato, P. V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green C. D., Somer, D. A., Hackett, W. P., Biesboes, D. D. (ed) *Plant tissue and cell culture*. Liss, New York, pp 57-81.
5. Baker, C. M. and H. Y. Wetzstein. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Cell Reports* 11: 71-75.
6. Baker, C. M. and H. Y. Wetzstein. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 361-368.
7. Baker, C. M. and H. Y. Wetzstein. 1995. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 249-254.
8. Benson, E. E. 1990. Free radical damage in stored plant germplasm. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 128 pp.
9. Birch, R. G. 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48: 297-326.
10. Brown, D. C. W., D. W. M. Leung and T. A. Torpe. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant* 46: 36-41.
11. Cheng, M., D. C. H. Hsi and G. C. Phillips. 1992. *In vitro* regeneration of Valencia-type Peanut (*Arachis hypogaea* L.) from Cultured Petiolules, Epicotyl Sections and Other Seedling Explants." *Peanut Science* 19: 82-87.
12. Chengalrayan, K. and M. Gallo-Meagher. 2001. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37: 434-439.
13. Chengalrayan, K., Mhaske, V. B. and S. Hazra. 1995. *In vitro* regulation of morphogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Plant Science* 110: 259-268.
14. Chengalrayan, K., Mhaske, V. B. and S. Hazra. 1997. High frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16: 783-786.

15. Conover, W. J. 1999. Practical Nonparametric Statistics. John Wiley & Sons, Inc., New York.
16. Conover, W. J., Johnson, M. E., and M. M. Johnson. 1981. A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. *Technometrics*, 23:351-361.
17. Daimon, H. and M. Mii. 1991. Multiple shoot formation and plantlet regeneration from cotyledonary node in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Japan J. Breed.* 41: 461-466.
18. Dr. Michael Renfroe. <http://www.jmu.edu/biology/faculty/renfroe/renfroe.shtml>.
19. Eapen, S. L. and L. George. 1993. Plant regeneration from leaf discs of peanut and pigeonpea: Influence of benzyladenine, indoleacetic acid and indoleacetic acid-amino acid conjugates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 223-227.
20. Gagliardi, R. F., Pacheco, G. P., Coculilo, S. P., Valls, J. F. M. and E. Mansur. 2000. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation* 9: 943-951.
21. Gavrielit-Gelmond H. 1971. Moisture content and storage of peanut seed (*Arachis hypogaea* L.). *Proceedings of International Seed Testing Association* 36: 159-171.
22. Georgalos, A. H. 1999. *Georgalos Peanut World*. Vol 3: 18-99.
23. Gorgas, J. A.; E. Lovera, J. Dardanelli, E. A. Bosnero, A. Grimoldi y H. P. Salas. 1997. Aptitud edáfica y agroclimática de Córdoba para el cultivo del maní. EEA INTA Manfredi. Pág.11.
24. Hazra, S., Dinesh C. Agrawal, Anjan K. Banerjee, Kaza V. Krishnamurthy and Satish M. Nalawade. 2001. Induction of multiple shoots and plant regeneration from "accessory buds" of nodal segments from field-grown mature cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 830-834.
25. Hazra, S., S. S. Sathaye and A. F. Mascarenhas 1989. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). *Bio/Technology* 7: 949-951.
26. Karhu, S. T. 1997. Rooting of blue honeysuckle microshoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 153-159.
27. Krikorian A. D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. En: *Plant Hormones*. Davies P. J. (ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. Pp. 774-796.
28. Litz, R. E. and R. L. Jarret. 1993. "Regeneración de plantas en el Cultivo de Tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis". En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Capítulo 7. Pág.143-172.

29. Margara, J. and A. Bouniols. 1967. Comparison *in vitro* de l'influence du milieu liquide ou gelose, sur l'imitation florale chez *Cichorium intybus* L. C. R. Acad. Sci. Ser. D. 264:1166-1168.
30. McKently, A. H. 1991. Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. *In vitro* Cell Dev. Biol. 27P: 197-200.
31. McKently, A. H. 1995. Effect of genotype on somatic embryogenesis form axes of mature peanut embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 251-254.
32. McKently, A. H., Moore, G. A. and F. P. Gardner. 1990. *In vitro* plant regeneration of peanut from seed explants. *Crop Sci.* 30: 192-196.
33. McKently, A. H., Moore, G. A. and F. P. Gardner. 1991. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop Sci.* 31:833-837
34. Mroginski, L. A., Kartha, K. K. and J. P. Shyluk. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Canadian Journal of Botany* 59(5): 826-830.
35. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
36. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
37. Murthy, N. S., Murch, S. J. and P. K. Saxena. 1995. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiologia Plantarum* 94: 268-276.
38. Ozias-Akins P. 1989. Plant regeneration from immature embryos of peanut. *Plant Cell Reports* 8: 217-218.
39. Ozias-Akins, P. and R. Gill. 2001. Progress in the development of tissue culture and transformation methods applicable to the production of transgenic peanut. *Peanut Science* 28: 123-131.
40. Ozias-Akins, P., Anderson W. F. and C. C. Holbrook. 1992. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. *Plant Science*, 83: 103-111.
41. Pedelini, R. 1998. Producción Mundial y Argentina de maní. En Pedelini, R. y Casini, C. Ed. INTA. 3^{ra} Edición. pág.3-4
42. Pittman, R. N., Banks, D. J., Kirby, J. S., Mitchell, E. D., and P. E. Richardson. 1983. *In vitro* culture of immature peanut (*Arachis* spp.) leaves: morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Science* 10: 21-25.

43. Ponsamuel, J., Huhman, D. V., Cassidy, B. G. and D. Post-Beittenmiller. 1998. *In vitro* regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumular explants of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv Okrun). Plant Cell Reports 17: 373-378.
44. Raju, M. V. S. and H. E. Mann. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*: Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. Can. J. Bot. 48: 1887-1891.
45. Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. p. xii, 970.
46. SAS Institute Inc. 1996. User's Guide: Statistic. Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
47. Sellars, R. M, G. M. Southward and G. C. Phillips. 1990. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. Crop. Sci. 30:408-414.
48. Sharma, K. K., Bhojwani, S. S. and T. A. Thorpe. 1990. Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. Plant Science 66: 247-253.
49. Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. International review of cytology, Supplement 11A. Academic Press, Nueva York. p.71-111.
50. Thorpe, T. A. and S. Biondi. 1981. Regulation of plant organogenesis. Advances in cell culture, Vol. 1 Canada.
51. Usberti R. 1982. Accelerated aging test, seed storability and seed size relationships on peanut seed lots. Revista Brasileira de Sementes 4:32-44.
52. Venkatachalam, P., Geetha, N., Sankara Rao, K., Jayabalan, N. and S. Saravanababu. 1999. BAP-regulated direct shoot organogenesis from cultured seedling explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Indian Journal of Experimental Biology Vol.37, pp. 807-812.
53. Walden, R. and R. Wingender. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. Tibtech 13: 324-331.

CAPITULO II

RELACION ENTRE LA EDAD DE LA SEMILLA DONANTE DEL EXPLANTE Y LA CAPACIDAD DE REGENERACION DEL MISMO

Objetivo Específico 2: "Establecer la relación que existe entre la edad de la semilla donante del explante y la capacidad de ese explante de regenerar yemas en un medio de Establecimiento óptimo, en el período de un año".

INTRODUCCION

El estado fisiológico de la semilla donadora de los explantes es un factor crítico en la regulación de la regeneración *in vitro* (Murashige, 1974).

La capacidad del explante de diferenciarse y crecer en órganos depende de numerosos factores entre los cuales se encuentra la edad de la semilla donadora del explante (Bhatia *et al.*, 2004). El-Farash *et al.* (1993) encontró en tomate, una importante interacción entre el genotipo, tipo de explante y edad de la planta donadora del explante sobre el porcentaje de regeneración y el número de brotes producidos por explante. En estos ensayos, ellos pudieron observar que explantes provenientes de semillas de 6 días regeneraban un menor número de brotes por explante que aquellos procedentes de semillas de 12, 18 y 24 días.

Murthy *et al.* (1995) para evaluar el efecto de la edad de las plántulas sobre la producción de embriones somáticos inducidos con TDZ, germinó semillas de maní y las mantuvo en medio basal por períodos de 6, 9, 12, 15 y 18 días antes de transferirlas a medios con hormonas. Un alto número de embriones somáticos fueron observados cuando las plántulas de 6 días de maní fueron tratadas. El potencial morfogenético de estas plántulas fue reducido con la edad. Aunque un incremento en la frecuencia de embriones

somáticos pudo ser observado con un incremento en la concentración de TDZ, a medida que las plántulas se tornaban mas viejas (12-18 días) ese efecto fue minimizado, y ya en plántulas de 21 días, la producción de embriones era casi nula. Goldfarb *et al.* (1991) trabajaron con Douglas-fir clasificando a los cotiledones en cuatro estados morfológicos debido a la no sincronización de las germinaciones, lo cual les sirvió como indicadores de la edad de la semilla donante. Ellos observaron una considerable influencia de la edad en la regeneración donde explantes provenientes de cotiledones totalmente expandidos (viejos) eran menos regenerativos comparados con aquellos provenientes de cotiledones apenas expuestos (jóvenes). Resultados semejantes encontró Ozias-Akins *et al.* (1992) en ensayos donde la formación de embriones somáticos en maní era reducida si provenían de explantes cotiledonales morfológicamente maduros.

Es bien conocido que las semillas almacenadas en condiciones no controladas muestran signos de deterioro y las consecuencias se ven manifestadas en una viabilidad reducida (Benson, 1990). Cuatro son los factores ha ser considerados en el almacenamiento de semillas: temperatura, humedad relativa (contenido de humedad de la semilla), oxígeno y tiempo. Todos son importantes pero al momento de pretender preservar la viabilidad en forma prolongada, la temperatura de almacenado toma un lugar especial (Roos, 1980). A su vez, la temperatura en forma conjunta con el porcentaje de humedad de la semilla modifican los niveles de ácidos grasos insaturados que dirigen la producción de radicales orgánicos libres. Los cambios en estos radicales se relacionan directamente con el envejecimiento de la semilla (Buchvarov & Gantcheff, 1984).

En maní, Usberti and Gomes (1998) pudieron constatar que semillas almacenadas a una temperatura constante (23.7°C) reducían el porcentaje de viabilidad a lo largo del tiempo, en valores que iban desde un 91% a los 2 meses hasta un 39% a los 14 meses. Gavrielit-Gelmond (1971) observaron que las semillas de maní variedad Virginia conservadas a 4°C mantenían casi invariable su viabilidad, con pérdidas de solo un 1% en el período de 36 meses, mientras que a 9.5°C la pérdida era de un 8% en períodos de 27 meses de almacenamiento.

El objetivo de este capítulo fue evaluar si existe alguna relación entre el deterioro de la semilla donadora de los explantes a lo largo de su almacenamiento bajo condiciones de temperatura ambiente y a 4°C (heladera), y la capacidad regenerativa de ese explante extraído de la misma. Estos resultados se tornan importantes al momento de querer diseñar un protocolo de regeneración de maní variedad Florman INTA, en donde la variable tiempo no se considere dentro del tipo de las impredecibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y metodología de cultivo

Se usaron semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) de la variedad Florman INTA. Se realizaron ensayos consecutivos con frecuencia mensual, considerando como tiempo cero, la edad de la semilla posterior a la cosecha (mayo 2000) cuando ésta alcanzó un contenido de humedad del 9% en condiciones de secado natural. Las semillas fueron conservadas en oscuridad, bajo dos condiciones de almacenamiento: a temperatura Ambiente (22.5°C promedio) y a temperatura de Heladera (4°C) constituyendo cada uno de ellos un tratamiento. Se utilizó para el test de regeneración, el mismo sistema de cultivo e igual forma de obtención de los explantes descritos en los ensayos realizados en el capítulo I. Los explantes fueron cultivados en un medio basal suplementado con 1 mg l⁻¹ de ANA y 3 mg l⁻¹ de BA, combinación hormonal que arrojó los mejores resultados durante la etapa de Establecimiento (capítulo I).

Diseño experimental y análisis de los resultados

La calidad de la semilla donante se testeó a través de las siguientes variables: Germinación, Viabilidad por tetrazolio, Vigor por tetrazolio, Conductividad y Vigor por envejecimiento acelerado. En el test de Germinación se realizaron 4 repeticiones de 100 semillas cada uno. Se colocaron entre papel a germinar a 20-30 °C. A fin de romper dormición se embebió el sustrato con Ethrel 50 ppm. (Baley and Bear, 1973). A los siete días se evaluó el porcentaje de plántulas normales, anormales y semilla muertas (ISTA, 2003). A las plántulas normales obtenidas se les determinó el peso seco total

manteniéndolas a 80°C durante 48 horas. Los resultados se expresaron en mg PS total (ISTA, 1995). Para la variable Viabilidad y Vigor por Tetrizolio, se realizaron 3 repeticiones de 50 semillas. Se incubaron entre papel humedecido con agua destilada durante 16 horas a 10°C. Posteriormente se retiró el tegumento, se separaron los cotiledones y aquél conteniendo el eje embrionario se sumergió en solución de 2,3,5 tifeniltetrizolio, durante 2 horas a 30°C, en oscuridad. Luego del lavado con agua corriente se procedió a evaluar según el patrón de coloración para maní propuesto por Pérez y Arguello, 1998. Los resultados se expresaron en porcentaje de semillas viables y porcentaje de semillas vigorosas (Pérez y Arguello, 1998). En conductividad, se realizaron 5 repeticiones de 10 ejes embrionarios. Se sumergieron en 10 ml de agua destilada deionizada durante 2 horas. Se determinó la conductividad eléctrica del líquido de imbibición mediante un conductímetro Parsec Antares III. Los resultados se expresaron como porcentaje de conductividad respecto a la conductividad total (Pérez and Arguello, 1995). En el test de Envejecimiento Acelerado se realizaron 3 repeticiones de 25 semillas cada una. Se mantuvieron a 45°C y 100% Humedad Relativa durante 48 horas (Pérez, 1992). Posteriormente se sembraron en arena a 20-30°C, 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. A los siete días se evaluó el porcentaje de plántulas normales, anormales y semilla muertas (ISTA, 2003).

El diseño del ensayo para las variables de regeneración fue en bloques al azar con tres repeticiones. La unidad experimental en todos los casos estuvo constituida por una caja de Petri. Las cajas de cada repetición se distribuyeron dentro de la cámara de cultivo en forma completamente aleatorizada. A los 30 días de cultivo, se evaluaron los tratamientos midiendo para ambas condiciones de almacenamiento (ambiente y heladera) las siguientes variables: *i*) tipo de desarrollo obtenido (yema, callo, raíz), *ii*) estado de crecimiento de la yema (yemas múltiples, brote) y *iii*) número de yemas por explante prosperado. A partir de estos datos se estableció la probabilidad de éxito del tratamiento tanto para el tipo de desarrollo obtenido, como para el estado de crecimiento de la yema. En el primer caso, se consideró como “éxito” al desarrollo de yemas y en el segundo caso, a la formación de brotes.

Los datos fueron procesados utilizando el software INFOSTAT Profesional v2004. Se les realizó un análisis de la varianza no paramétrico debido a la falta de normalidad en el comportamiento de los datos (Kruskal-Wallis).

RESULTADOS

La calidad fisiológica de la semilla donante de explantes evaluada a través del test de Germinación no arrojó interacción significativa. El efecto del tiempo no ajustó ninguna tendencia y las diferencias observadas de mes a mes son aleatorias. Las diferencias entre tratamientos fueron significativas, ya que a temperatura ambiente el porcentaje promedio (general a través de todos los meses) fue del 51% mientras que en heladera fue del 57% (Fig.2.1). Este ensayo resultó poco sensible para detectar daños provocados por deterioro.

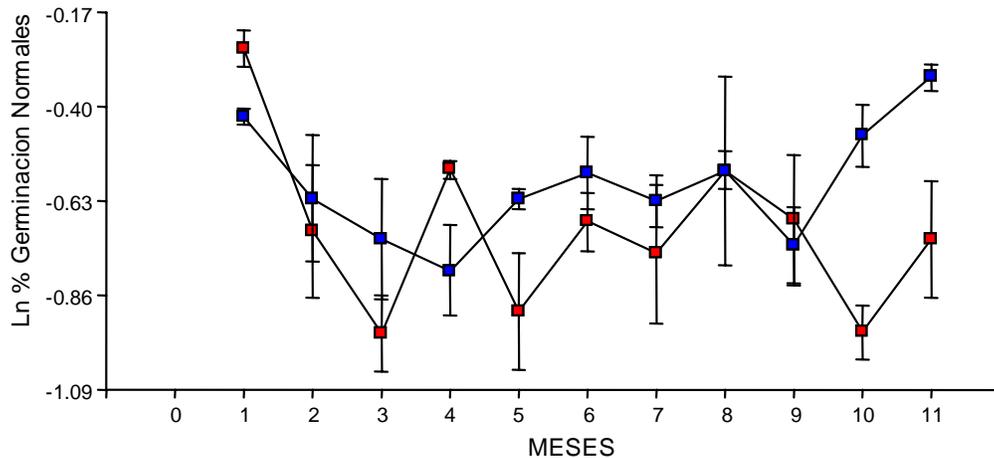


Fig.2.1. Porcentaje de Germinación de las semillas conservadas bajo condiciones de Ambiente (■) y Heladera (■) clasificadas como plántulas normales desde la cosecha (0 a 11 meses).

El test de Viabilidad por tetrazolio mostró una variación por tratamiento en el tiempo significativa ($p=0.0103$), aunque su perfil no es el mismo bajo ambos tratamientos (Fig.2.2). A temperatura ambiente, se encontró una tendencia lineal negativa estadísticamente significativa ($p=0.0006$), lo que implica que la viabilidad disminuye en el

tiempo (Fig.2.3). Sin embargo, la viabilidad de las semillas conservadas en heladera no fue significativamente distinta de cero ($p>0.05$). Es de observar que al final del tiempo del ensayo es donde se comienza a observar caídas relativamente importantes de viabilidad (Fig.2.2). Esto pone en evidencia la sensibilidad del ensayo ante el deterioro que se produce en las semillas a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento.

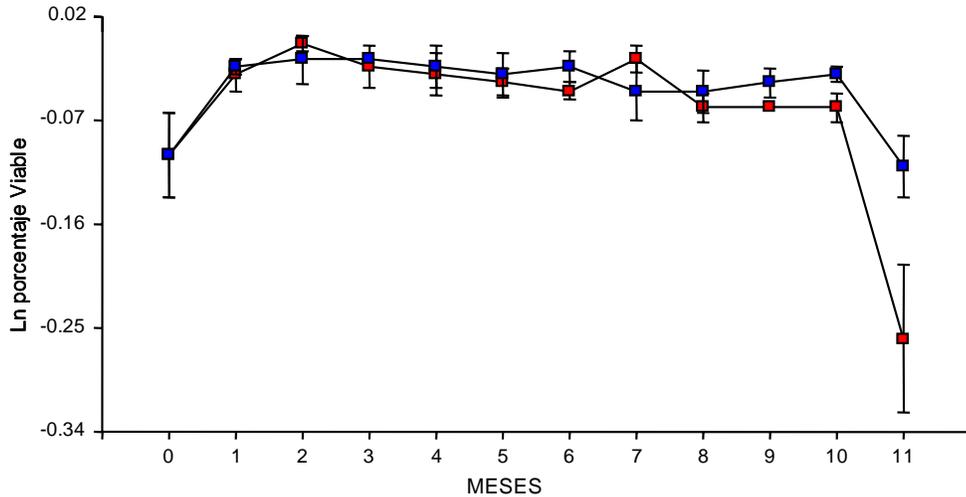


Fig.2.2. Viabilidad evaluada por el test de Tetrazolio de las semillas conservadas bajo condiciones de Ambiente (■) y Heladera (■) desde la cosecha (0 a 11 meses).

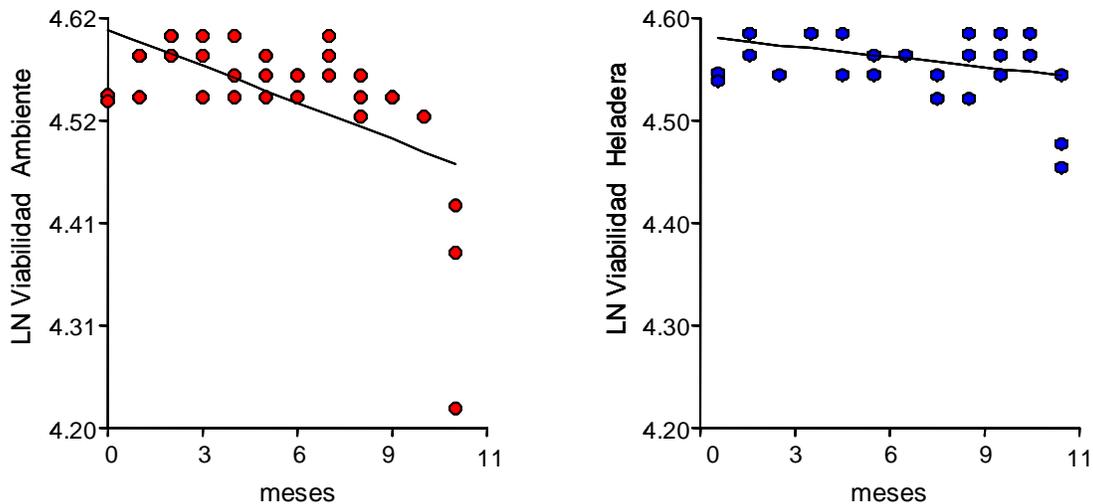


Fig.2.3. Tendencias de la Viabilidad por tratamiento: Ambiente (■) y Heladera (■) desde la cosecha (0 a 11 meses).

La prueba de Vigor por Tetrazolio permite identificar posibles diferencias en la calidad fisiológica de las semillas. Esta variable no resultó estadísticamente significativa por tratamiento en el tiempo ($p=0.1927$). En ambos tratamientos, la tendencia en el tiempo fue lineal con pendiente negativa, es decir que el vigor disminuyó a través de los meses. A pesar de que las diferencias entre tratamientos no fueron significativas, la pendiente que estima la disminución del vigor en condiciones de almacenamiento en heladera (1,17% por mes) fue menor que la pendiente en condiciones de ambiente (1,85 % por mes) (Fig.2.4).

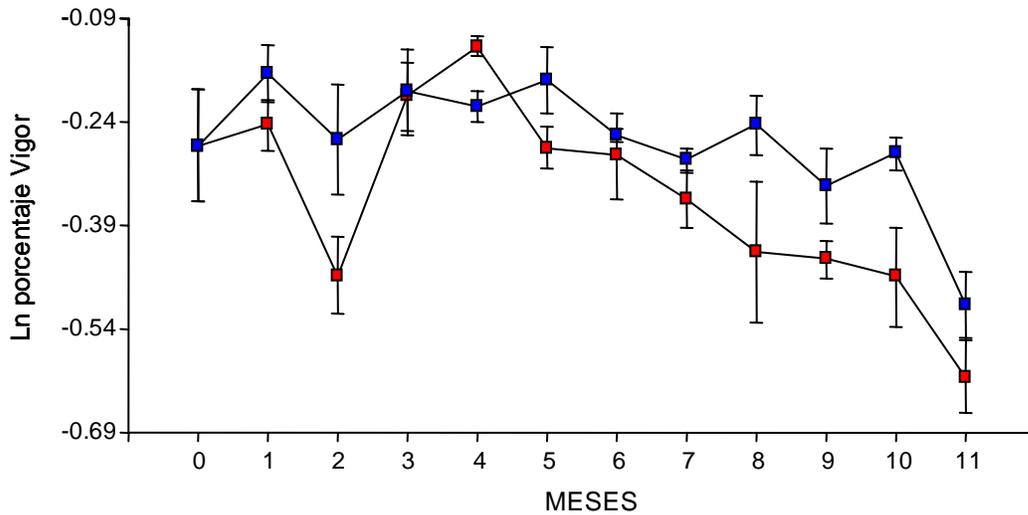


Fig.2.4. Vigor evaluado por el test de Tetrazolio de las semillas conservadas bajo condiciones de Ambiente (■) y Heladera (■) desde la cosecha (0 a 11 meses).

La variable Conductividad en relación al peso seco de las semillas nos dió un perfil en el tiempo diferente para cada condición de almacenamiento ($p=0.0106$). En ambos casos existe una tendencia lineal positiva estadísticamente significativa ($p>0.0001$), pero las semillas almacenadas en condiciones ambientales mostraron mayor variabilidad en los primeros seis meses. Al comparar las medias de ambos tratamientos, las semillas almacenadas en condiciones ambientales resultaron mayores que las semillas almacenadas en condiciones de baja temperatura. Sin embargo estas diferencias después de los 6 meses se hacen no significativas (Fig.2.5).

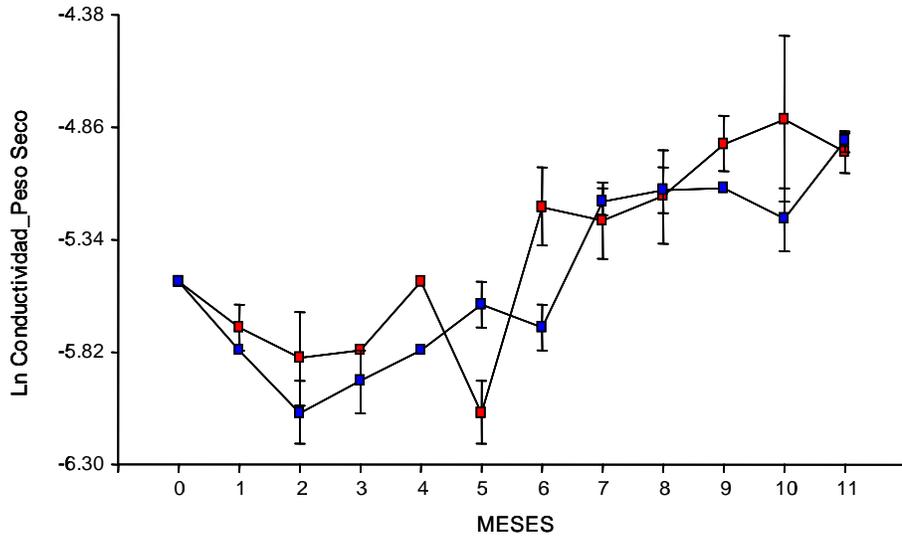


Fig.2.5. Conductividad evaluada en relación al Peso Seco de las semillas conservadas bajo condiciones de Ambiente (■) y Heladera (■) desde la cosecha (0 a 11 meses).

La prueba de Vigor por Envejecimiento Acelerado mostró (Fig.2.6) que de las cuatro categorías evaluadas (Normales, Anormales, Frescas y Muertas) las plántulas normales determinan la variación ante el efecto de los tratamientos evaluados. La interacción tratamiento por tiempo fue estadísticamente significativa ($p=0.0289$). Se detectaron diferencias significativas entre tratamientos (Ambiente y Heladera) para un nivel de significación del 10% ($p=0.093$). En ambos tratamientos, la tendencia en el tiempo fue lineal con pendiente negativa, es decir que el vigor disminuyó a través de los meses. La pendiente que estima la disminución del vigor en Heladera (1% por mes) fue significativamente menor que la pendiente en Ambiente (3.35 % por mes).

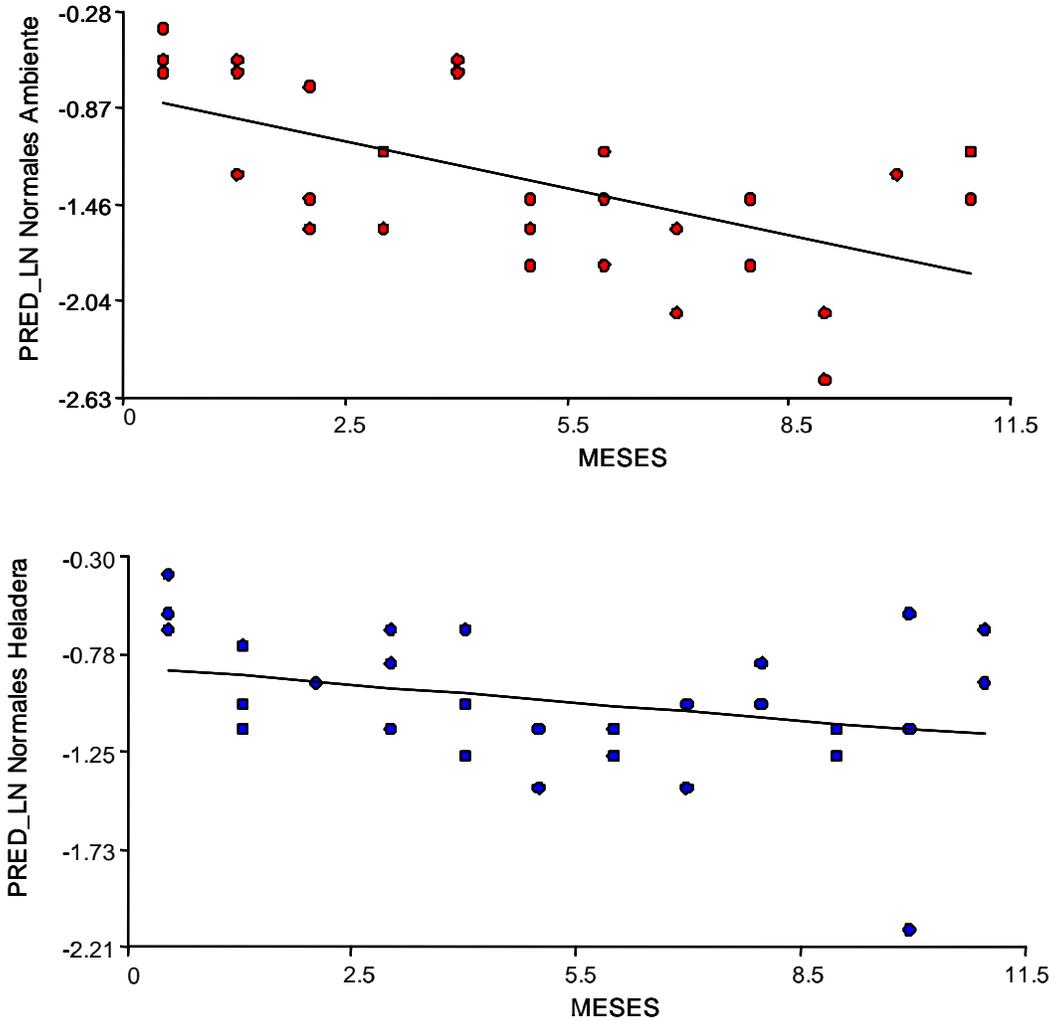


Fig.2.6. Tendencia del Vigor evaluado por Envejecimiento Acelerado de las plántulas Normales por tratamiento: Ambiente (■) y Heladera (■) desde la cosecha (0 a 11 meses).

De las variables evaluadas para testear la capacidad regenerativa del explante donado, el porcentaje de explantes que evolucionaron a yemas adventicias, el número de brotes obtenidos por explante y el número de yemas por explantes obtenidos durante un año, desde el inicio del ensayo (meses 0 al 11), se presentan en la Figura 2.7 A, B y C.

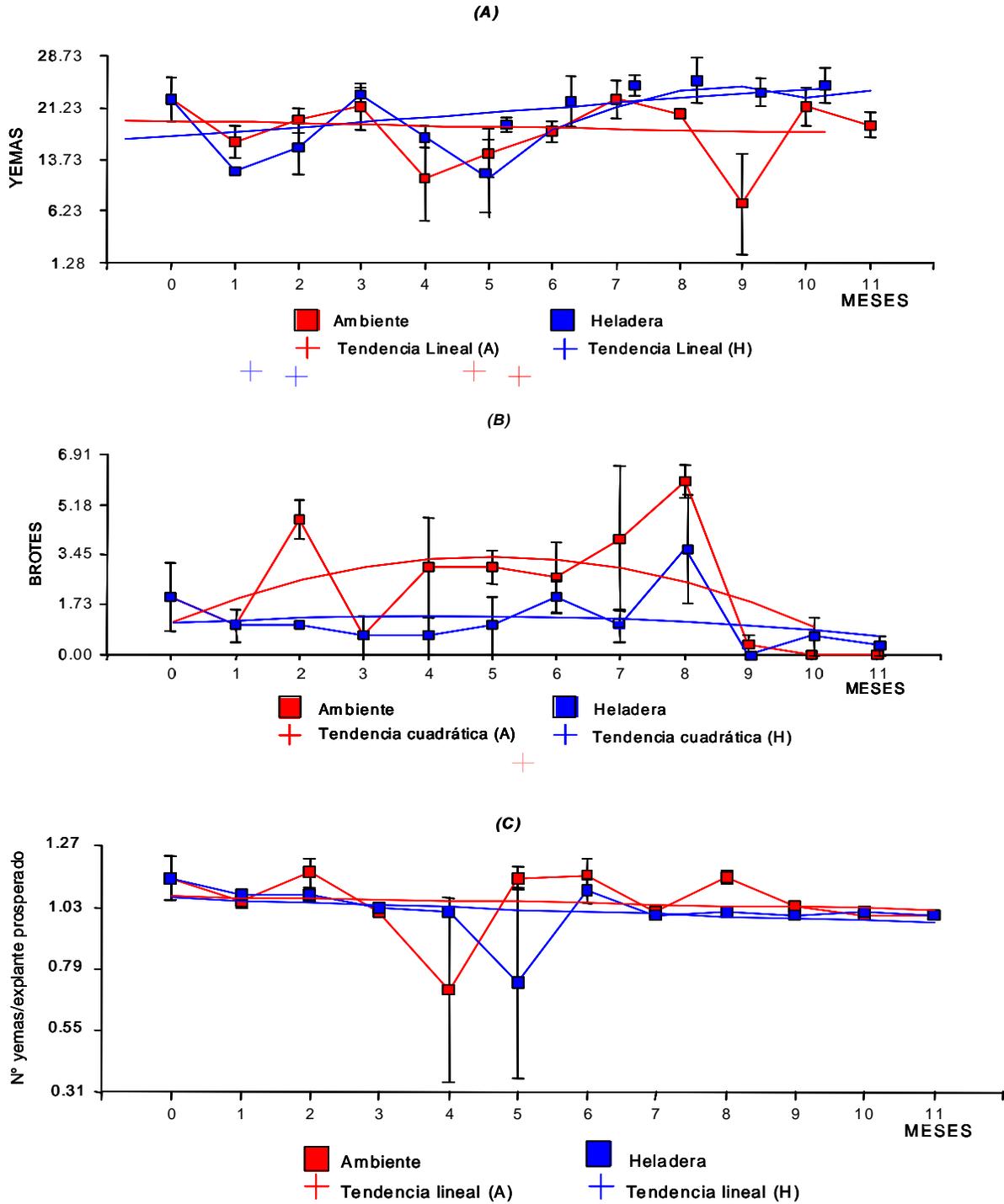


Fig. 2.7. Porcentajes de explantes que evolucionaron a yemas adventicias (A), número de brotes obtenidos por explante (B) y número de yemas por explante prosperado (C), obtenidos a partir de semillas de diferentes edades desde la cosecha (0 a 11 meses) conservadas bajo condiciones de Ambiente (■) y Heladera (■). Las líneas indican la tendencia lineal en A y C, y la tendencia cuadrática en B, de los datos.

Para el tipo de desarrollo obtenido como éxito “yema” se observó una tendencia lineal en donde ambas condiciones de almacenamiento, Ambiente y Heladera, no muestran diferencias significativas ($p > 0.3288$). Se puede observar que a temperatura ambiente, los explantes extraídos de estas semillas tienden a no cambiar en cuanto al número de yemas adventicias producidas, mientras que los explantes donados por aquellas semillas conservadas en heladera tienden a aumentar dicha relación aunque no en forma estadísticamente significativa (Fig.2.7.A).

Para el estado de crecimiento de la yema, la producción de “brotes” presenta una tendencia cuadrática sin mostrar diferencias significativas entre ambas condiciones de almacenamiento ($p > 0.0758$). En general, se puede observar que las semillas conservadas en heladera se mantienen más constantes a lo largo de un año mientras que las conservadas a temperatura ambiente presentan un decrecimiento más abrupto a partir del quinto mes (Fig.2.7.B).

En el caso del número de yemas por explante prosperado, la tendencia lineal no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.1231$). Se puede observar que el comportamiento para ambas condiciones de almacenamiento fue similar a lo largo del año (Fig.2.7.C).

DISCUSIÓN

El estado fisiológico de la semilla donante de los explantes es un factor crítico en la regulación de la regeneración *in vitro* (Murashige, 1974). La edad fisiológica de la semilla donante del explante se evaluó en base a su deterioro bajo dos condiciones de almacenamiento: ambiente y heladera.

Los resultados mensuales obtenidos en viabilidad (Fig. 2.2 y 2.3), conductividad (Fig. 2.5) y envejecimiento acelerado (Fig. 2.6) realizados a las semillas donantes evidenciaron que las condiciones de almacenamiento durante el período poscosecha afectaron de manera diferencial tanto la viabilidad como el vigor de las semillas. La variable conductividad tiende a aumentar significativamente a medida que transcurre el período de almacenamiento lo que evidencia aumento del deterioro fisiológico de la semilla. Resultados similares fueron hallados en maní por Pérez y Arguello (1995). En particular, la conductividad es un ensayo de vigor que detecta de manera muy sensible los daños provocados a nivel de membranas celulares debidos principalmente al deterioro (Poppinigs 1985; ISTA 2003). En este test en particular, las condiciones ambientales producen un mayor daño a nivel de membranas y paredes celulares que las condiciones a baja temperatura. Esto implica pérdida de su capacidad (potencial) para producir brotes normales. Estas membranas degradadas con pérdida de permeabilidad selectiva, producen condiciones de oxidación que en el tiempo, deterioran las condiciones fisiológicas de la semilla. Las otras dos variables muestran una tendencia durante el año lineal negativa en donde la viabilidad y el vigor de las semillas conservadas a temperatura ambiente disminuyen más significativamente que en las semillas conservadas a 4°C. Estos resultados acuerda con los obtenidos por Gavrielit-Gelmond (1971) en maní, donde semillas conservadas a 4°C mantenían casi invariable sus cualidades fisiológicas en el período de 36 meses. En base a estos resultados nosotros también podemos concluir que las semillas de maní Florman INTA conservadas a 4°C disminuyen el deterioro fisiológico.

Por otra parte en esta tesis se evaluó el efecto del deterioro de la semilla sobre la capacidad regenerativa del explante donado. En tal sentido, el comportamiento de las

variables regenerativas tanto de los explantes obtenidos de semillas conservadas a temperatura ambiente como a 4°C se mantuvieron constantes en cuanto al número de explantes que producen yemas adventicias. A temperatura ambiente, las semillas se mantuvieron constantes en cuanto al número de explantes que producen yemas adventicias. La producción de brotes (Fig. 2.7 B) presentó un decrecimiento abrupto a partir del quinto mes y la producción de yemas por explante prosperado fue similar a lo largo del año. A partir del quinto mes se observó además, un cambio en los patrones morfogénéticos con un incremento en la formación de callo que fue en detrimento de la cantidad de explantes que evolucionaron a yema (datos no mostrados). En condiciones constantes de 4°C (heladera), las semillas tienden a mantener y/o aumentar el número de explantes que producen yemas adventicias. La producción de brotes y el número de yemas por explante prosperado se mantuvieron constantes a lo largo del año. Si bien aquellas semillas conservadas a 4°C donan explantes más íntegros y estables, las diferencias con las conservadas a temperatura ambiente no son estadísticamente significativas. Esto no concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores como Bhatia *et al.* (2004) quienes observaron que tejidos jóvenes responden generalmente con mayor eficacia al cultivo *in vitro* que los tejidos adultos. Murthy *et al.* (1995) y El-Farash *et al.* (1993) pudieron confirmar que el potencial morfogénético del explante es notablemente reducido con la edad del órgano donante del explante. Ozias-Akins *et al.* (1992) reportó que la formación de embriones somáticos en maní era reducida si provenían de cotiledones morfológicamente maduros. Goldfarb *et al.* (1991) también observaron en el cultivo de “Douglas fir” una considerable influencia de la edad en la regeneración, donde explantes provenientes de cotiledones totalmente expandidos (viejos) eran menos regenerativos comparados con aquellos provenientes de cotiledones apenas expuestos (jóvenes). Nosotros asumimos que estas diferencias se deben quizás a una selección de las semillas que serán donantes de los explantes. Estas semillas son pre-germinadas y los explantes son extraídos solamente de aquellas que muestran signos de hidratación e emisión de raíz. Esto posiblemente marco la diferencia de nuestros resultados con los obtenidos por estos autores, debido principalmente a que los explantes provenían de semillas aún vigorosas. Usberti and Gomes (1998) observaron en maní que la temperatura juega un papel muy importante en el porcentaje de viabilidad durante el almacenamiento. Teniendo en cuenta que lo importante en la etapa de

Establecimiento dentro del protocolo de regeneración organogénico planteado en el Capítulo I, es la producción de la mayor cantidad de brotes posible para lograr un sistema de regeneración eficiente, la tendencia de los explantes provenientes de semillas almacenadas a temperatura ambiente fue de decaer a partir del quinto mes, lo cual nos permitiría optar por la condición de almacenamiento a 4°C (heladera) que permite conservar las condiciones fisiológicas de la semilla donante por mas tiempo.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que independientemente de la condición de almacenamiento a las que se sometan las semillas, después de transcurrido un año sus cualidades se deterioran de forma tal, que se tornan no propicias para la obtención de explantes óptimos (Fig. 2.7). Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores. Roos (1980) observó que aún bajo condiciones de baja temperatura, el deterioro continúa en el interior celular principalmente auto-oxidaciones, mutaciones o desnaturalización de enzimas. A su vez, el cultivo de tejidos permite la manifestación de variaciones pre-existentes como el contenido de componentes secundarios (taninos, fenoles, ligninas) derivados de tejidos dañados por procesos oxidativos debidos principalmente al almacenamiento prolongado (Benson, 1990). Buchvarov & Gantcheff, (1984) sugirieron que los cambios peroxidativos de los lípidos podrían contribuir a la pérdida de viabilidad y que este envejecimiento comenzaba primero en los ejes embrionarios. Esto nos permite sugerir que semillas almacenadas por más de un año no deben considerarse como posibles donantes de explantes dentro de un sistema de regeneración organogénico, debido a que sus cualidades fisiológicas se ven deterioradas infiriendo en la capacidad regenerativa de los explantes donados.

CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPITULO II

Si bien ensayos preliminares nos alertaron sobre una posible “causa” debido a una diferencia en el comportamiento de los explantes frente a idéntica combinación hormonal (datos no mostrados) no pudimos corroborar la existencia de una relación entre la edad fisiológica de la semilla donante del explante, evaluada a través de su deterioro, y la capacidad de ese explante de regenerar brotes.

Semillas conservadas en heladera mantuvieron su calidad fisiológica mas constantes otorgándole al explante donado mayor integridad a nivel de membranas y tejidos. Estos resultados son importantes al momento de querer diseñar un protocolo de regeneración estable para la variedad de maní Florman INTA en donde el tiempo causal de deterioro, no se considere dentro del tipo de variables impredecibles.

Encontramos una condición de almacenamiento óptima de la semilla donante que no solo mantiene constantes sus cualidades fisiológicas sino que también permite que el explante extraído de ella responda a los tratamientos sin la alteración de variables aleatorias como podrían ser el estado fisiológico de la misma semilla donante. Los resultados obtenidos refuerzan la importancia de mantener constantes variables aleatorias dentro de un diseño de experimentos.

Las conclusiones obtenidas en este capítulo permiten adicionarle al protocolo de regeneración *in vitro* para maní variedad Florman INTA obtenido en el Capítulo 1, la condición de conservar la fuente de semillas de las cuales se extraen los explantes a una temperatura constante de 4°C y por un período no mayor al de un año, otorgándole al protocolo mas validez y fortaleza en los resultados que se obtengan de él.

BIBLIOGRAFIA CAPITULO II

1. Baley, W. K. and J. E. Bear. 1973. Search for a practical procedure for breaking dormancy of peanut seeds, *Arachis hypogaea* L.. J. Amer. Peanut Res. & Educ. Assoc. 5:20-26.
2. Benson, E. E. 1990. Free radical damage in stored plant germplasm. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 128 pp.
3. Bhatia P., Ashwath, N., Senaratna, T. and D. Midmore. 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 1-3.
4. Buchvarov, P. and Ts. Gantcheff. 1984. Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. Physiol. Plant. 60: 53-56.
5. El-Farash, E. M., Abdalla, H. I., Taghian, A. S. and M. H. Ahmad. 1993. Genotype, explant age and explant type as effecting callus and shoot regeneration in tomato. Assiut J. Agri. Sci. 24: 3-14.
6. Gavrielit-Gelmond H. 1971. Moisture content and storage of peanut seed (*Arachis hypogaea* L.). Proceedings of International Seed Testing Association 36: 159-171.
7. Goldfarb, B., Howe, G. T., Bailey, L. M., Strauss, S. H. and J. B. Zaerr. 1991. A liquid cytokinin pulse induces adventitious shoot formation from Douglas-fir cotyledones. Plant Cell Rep. 10: 156-160.
8. INFOSTAT Profesional versión 1.1. 2004. Universidad Nacional de Córdoba. Estadística y Diseño. F. C. A.
9. International Seed Testing Association (ISTA). 1995. Handbook of vigour test methods. 3rd. Vigour Test Committee.
10. International Seed Testing Association (ISTA). 2003. Rules for Seed Testing.
11. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166.
12. Murthy, N. S., Murch, S. J. and P. K. Saxena. 1995. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Physiologia Plantarum 94: 268-276
13. Ozias-Akins, P., Anderson W. F. and C. C. Holbrook. 1992. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L.: genotype comparison. Plant Science, 83: 103-111.

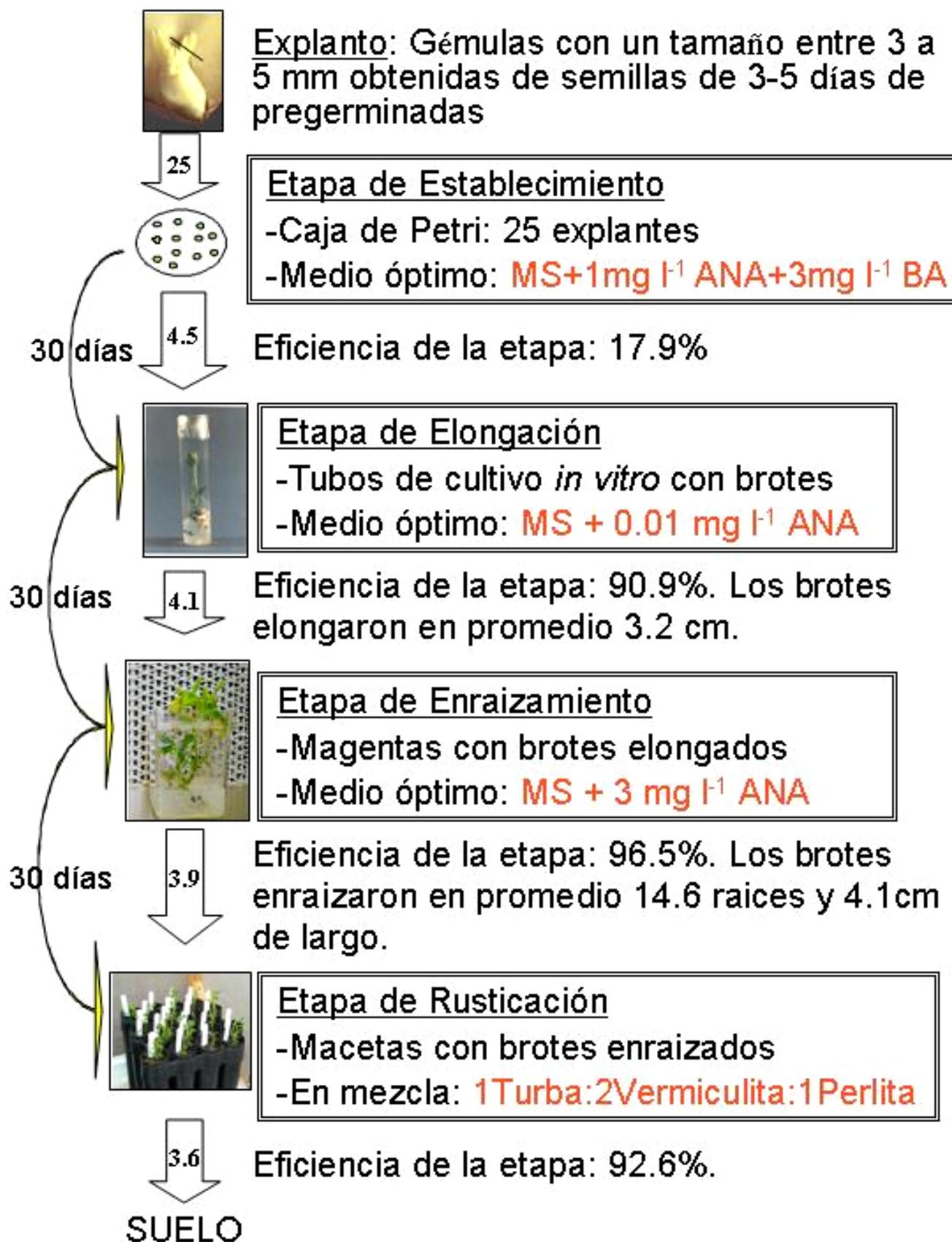
14. Pérez, M. A. 1992. Fisiología del deterioro de semilla de maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Florman. Tesis de Magíster en Tecnología de semillas. FCA-UNC.
15. Pérez, M. A; Arguello, J. A. 1995. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds under natural and accelerated aging. *Seed Sci. and Technol.* 23, 439-444.
16. Pérez, M. A; Arguello, J. A. 1998. Determinación del vigor por tetrazolio en semillas de maní cv. Florman bajo distintas condiciones de almacenamiento. *Agriscientia*, vol.14, 19-24.
17. Poppiniggis, F. 1985. Fisiologia da sementes 2º Edicao Brasilia DF. pp 145-199.
18. Roos, E. E. 1980. Physiological, biochemical and genetic changes in seed quality during storage. *Hort. Science*. Vol 15 (6) 19-22.
19. Usberti R. and Gomes 1998. Seed viability constants for groundnut. *Annals of Botany* 82: 691-694.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente reporte, se desarrollo un protocolo que permitió aceptar la hipótesis planteada en la que afirmábamos que la relación de auxinas y citocininas es específica para cada etapa del proceso de regeneración organogenético para la variedad de maní Florman INTA.

Este protocolo diseñado para regenerar maní Florman INTA vía organogénesis quedó establecido de acuerdo a los resultados obtenidos y se representa en el siguiente Esquema 3.1.

Esquema 3.1. Protocolo de Regeneración organogénica establecido para la variedad de maní Florman INTA.



El maní, a pesar de ser considerado una especie recalcitrante (Birch, 1997), se ha logrado regenerar y transformar en condiciones definidas con diferentes porcentajes de eficiencia. El protocolo establecido puede asegurar que los brotes inducidos tengan una alta probabilidad de convertirse en planta. La habilidad de muchos genotipos de maní de producir embriones, yemas o brotes a frecuencias razonables usando un protocolo sencillo, no son necesariamente aquellos que dan un alto porcentaje de conversión a planta (Ozias-Akins *et al.*, 1992). Es decir que, para la variedad de maní Florman INTA, el sistema de regeneración organogénico planteado logró una eficiencia general aceptable.

En esta tesis se rechazó la hipótesis donde aseverábamos que la capacidad de formación de yemas adventicias, a partir de gémulas extraídas de semillas pre-germinadas, es inversa a su edad fisiológica. Los resultados obtenidos con respecto a la edad fisiológica de la semilla donante del explante, conservada bajo dos condiciones de almacenamiento, y la capacidad regenerativa de ese explante, nos permitió adicionarle al protocolo de regeneración de maní, la condición de conservar la fuente de semillas de las cuales se extraen los explantes a una temperatura constante de 4°C y por un período no mayor al de un año, lo cual le otorga al protocolo una validez y fortaleza en los resultados que de él se obtengan.

Si bien el proceso de generación de nuevas variedades a través de los métodos convencionales ha sido muy útil y ha dado lugar a la generación de nuevas variedades que se cultivan hoy en día, las promesas de la biotecnología agrícola residen en aumentar la productividad y reducir costos, generar innovaciones y mejoras en los alimentos, otorgar mayor resistencia biótica y abiótica, y conducir a prácticas agrícolas más "ecológicas".

El protocolo de regeneración organogénico planteado para maní Florman INTA puede referirse en futuras líneas de investigación dentro del área de la transformación génica, ya que para lograr plantas transformadas es necesario contar con metodologías eficientes para regenerar plantas completas a partir de un explante.

A modo de sugerencia, se podría aumentar la eficiencia de la etapa de Establecimiento considerando las yemas múltiples regeneradas, que en este protocolo han sido clasificadas como variable “éxito”, debido a que el objetivo era regenerar directamente brotes vía organogénesis directa. La apertura a otras alternativas de cultivo *in vitro* podría permitir inducir brotes a partir de estas yemas múltiples utilizando por ejemplo la caulogénesis, vía que requiere del planteamiento de nuevos ensayos donde se consideren otras concentraciones y combinaciones hormonales.