

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) DE CULTIVARES DE INTERÉS PARA ARGENTINA

R.D. MEDINA^(1*), M.M. FALOCI⁽²⁾, V. SOLÍS NEFFA⁽³⁾,
L.A. MROGINSKI⁽⁴⁾

RESUMEN

Se ha ajustado un procedimiento para la regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta*) vía embriogénesis somática a partir del cultivo de hojas inmaduras de clones de interés para la Argentina mantenidos in vitro. A partir de estos explantes se pudo diferenciar embriones somáticos en un medio de Murashige y Skoog (MS)

Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Sargento Cabral 2131, CC. 209. Tel: 03783 427589. Fax: 03783 427131. E-mail: ibone@agr.unne.edu.ar, Corrientes (3400), Argentina.

⁽¹⁾ Becario de Perfeccionamiento de la SGCyT (UNNE). E-mail: ricardomedina@agr.unne.edu.ar

⁽²⁾ Profesional Principal CPA, CONICET y J.T.P. de la Cátedra de Botánica III, FACENA (UNNE).

⁽³⁾ J.T.P. de la Cátedra de Botánica Sistemática y Fitogeografía, Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

⁽⁴⁾ Investigador Principal, CONICET y Profesor Titular de la Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la SGCyT (UNNE) y por el CABBIO.

* a quien debe dirigirse la correspondencia

suplementado con 2 % de sacarosa y tres concentraciones de 2,4-D, Picloram ó Dicamba. Los mejores medios para la inducción de la embriogénesis somática fueron: MS + 2 % de sacarosa + 6 mg/L de 2,4-D ó 10 mg/L de Picloram. Después de 30 días, los embriones somáticos fueron transferidos al medio de maduración y conversión a plantas que consistió de MS + 2 % de sacarosa + 0,1 mg/L de BA + 0,01 mg/L de 2,4-D. El porcentaje de germinación de los embriones somáticos varió entre 2-50 % y la conversión a plantas entre 2-30 %. Se obtuvieron plantas completas en cuatro clones (MCol 1505, 76, 30 y MPar 75), las que fueron transferidas exitosamente al suelo. El número cromosómico ($2n=36$) y los zimogramas de 8 sistemas isoenzimáticos de las plantas regeneradas permanecieron estables respecto del material original.

Palabras claves: *Manihot esculenta*, embriogénesis somática, regeneración de plantas, in vitro.

SUMMARY

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION OF CASSAVA (*Manihot esculenta* CRANTZ) CULTIVARS INTERESTING FOR ARGENTINA

A procedure for plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta*) via somatic embryogenesis from immature leaf explants culture of in vitro grown plants of clones interesting for Argentina has been adjusted. Explants differentiated somatic embryos when cultured on Murashige and Skoog medium (MS) with 2 % sucrose and three concentrations of 2,4-D, Picloram or Dicamba. The best media for induction of somatic embryogenesis consisted of MS + 2 % sucrose supplemented with either 6 mg/L 2,4-D or 10 mg/L Picloram. After 30 days of culture, the somatic embryos were transferred to a maturation and plant conversion medium consisting of MS + 2 % sucrose + 0.1 mg/L BA + 0.01 mg/L 2,4-D. Somatic embryo germination varied between 2-50 % and plant conversion percentage between 2-30 %. Whole plants were achieved in four clones (MCol 1505, 76, 30 y MPar 75), which were successfully transferred to

soil. Both, chromosome number ($2n=36$) and zymograms of 8 isozyme systems of plants obtained via somatic embryogenesis remained stable with regard to those of the donor plants.

Key words: *Manihot esculenta*, somatic embryogenesis, plant regeneration, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Las denominadas biotecnologías, basadas en el uso de la Ingeniería Genética, han posibilitado importantes avances en el mejoramiento genético de las plantas. Se han obtenido plantas resistentes a herbicidas, plagas, enfermedades y estreses abióticos (Shah *et al.*, 1995; John, 1997; Puonti Kaerlas *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Sin embargo, para que ello ocurra es necesario contar con sistemas *in vitro* de regeneración a partir de células indiferenciadas que brinden como producto final plantas enteras.

Para la mandioca (*Manihot esculenta*) –uno de los principales cultivos del mundo (Cock, 1989)– se han desarrollado sistemas que permiten la inducción de embriones somáticos a partir del cultivo de hojas inmaduras y la ulterior obtención de plantas (Stamp y Henshaw, 1987; Raemakers *et al.*, 1993a; Sofiari *et al.*, 1997). Sin embargo, éste es un proceso altamente dependiente del genotipo de las plantas dadoras de explantes (Szabados *et al.*, 1987). Trabajos preliminares de Mroginski y Scocchi (1993) sugieren que los cultivares argentinos (Palomita, 76, Pombero, Catiguá, Misionera, Cambí y Caroba) tendrían un comportamiento similar.

Por otra parte, si bien estos sistemas de regeneración adventicia brindan procedimientos de propagación eficientes, también deberían garantizar la estabilidad genética de los individuos obtenidos respecto del material de origen (Stamp y Henshaw, 1987). Ambos aspectos deben tenerse en cuenta en la utilización de las modernas biotecnologías en el mejoramiento de nuestros cultivares.

El objeto de este trabajo fue ajustar un sistema para la obtención de plantas de mandioca vía embriogénesis somática para los

cultivares de interés para la Argentina y verificar la estabilidad genética de las plantas regeneradas mediante estudios cromosómicos e isoenzimáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Vegetal

Se trabajó con 12 clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en la Argentina (Tabla 1), excepto MCol 1505 que proviene del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia), y que fue incluido en este estudio a manera de control debido a su gran potencialidad para formar embriones somáticos in vitro. Este material vegetal se encuentra conservado in vitro en el IBONE, para lo cual se realizó el cultivo de meristemas siguiendo el procedimiento recomendado por Roca et al. (1991). Las plantas resultantes fueron micropropagadas mediante el cultivo de segmentos nodales en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0,01 mg/L de ácido naftalenacético (ANA), 0,01 mg/L de 6-bencilaminopurina (BA) y 0,1 mg/L de ácido giberélico (AG₃). De estas plantas se obtuvieron hojas inmaduras de no más de 5 mm de longitud, que se utilizaron como explantes iniciales.

2. Medios de cultivo y condiciones físicas de incubación

Los explantes fueron cultivados en tubos de vidrio de 12 mL que contenían 3 mL del medio MS suplementado con los reguladores de crecimiento ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4 amino 3,5,6 tricloropicolínico (Picloram) ó ácido-o-anísico (Dicamba), en las concentraciones que resultaron óptimas en los trabajos de Stamp y Henshaw (1987), Raemakers et al. (1993b), Taylor et al. (1993) y Sudarmonowati y Henshaw (1993) (Tabla 1). El pH de los medios fue ajustado a 5,8 con soluciones de KOH o HCl, antes del agregado de 0,75 % de agar (Sigma A-1296). Los

tubos fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados en un autoclave a 1,46 kg.cm² durante 20 minutos. El regulador de crecimiento Dicamba fue esterilizado mediante filtración (filtros Millipore 0,45 µm).

Para la inducción de los embriones somáticos, los tubos que contenían una hoja, fueron obturados con "Resinite AF 50®" (Casco S.A.C. Company. Bs. As.) e incubados en un cuarto oscuro climatizado a 27±2 °C.

Para la maduración de los embriones somáticos, éstos fueron cultivados en MS + 0,1 mg/L de BA + 0,01 mg/L de 2,4-D (Stamp y Henshaw, 1987) e incubados en un cuarto climatizado a 27±2 °C y 14 hs de fotoperíodo (150 µmol.m⁻².s⁻¹, provistos por lámparas fluorescentes blancas). Las plantas obtenidas fueron transplantadas en macetas, permaneciendo durante 14 días en el cuarto climatizado. Posteriormente las macetas fueron transferidas a un invernadero.

3. Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados

Para cada tratamiento (combinación de clon, regulador de crecimiento y concentración del mismo) se utilizaron al menos tres repeticiones de 10 explantes cada una. Con los resultados se calcularon las medias aritméticas y los errores estándar. Se efectuó un análisis de variancia (ANOVA), previa verificación de los criterios de normalidad con el test de Shapiro-Wilks, para los resultados expuestos en las tablas 1 y 2. Para cada clon se compararon las medias obtenidas en los diferentes medios de cultivo con el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

4. Análisis citológico

El recuento de cromosomas fue realizado en metafases mitóticas en puntas de raíces de las plantas regeneradas (extraídas a las 15,30 hs del día) pretratadas con 2 mM de 8-hidroxiquinoleína (3 hs a temperatura ambiente), fijadas en etanol absoluto - ácido láctico (5:1) (Fernández, 1973) durante 12 hs a 4 °C y conservadas en etanol 70 % a 4 °C. Para la coloración se empleó la técnica de

Feulgen y los preparados permanentes se hicieron de acuerdo con la técnica de Bowen (1956).

5. Análisis de isoenzimas

Los extractos crudos se prepararon a partir de hojas jóvenes en activo crecimiento de las plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de embriones somáticos y de las plantas dadoras de explante. Las muestras se homogeneizaron en mortero con buffer de extracción (Tris/HCL 0,1 M pH 6,8 + 2 % de glicerol + 1 % de β -mercaptoetanol + 0,01 % de azul de bromofenol), de acuerdo con Laemmli (1970) en una relación 0,1 g/mL. Las muestras se centrifugaron a 15.780 g durante 10 minutos, los sobrenadantes se fraccionaron en alícuotas y se conservaron a -70°C . Se ensayaron 8 sistemas isoenzimáticos: Fosfatasa ácida (ACP), Diaforasa (DIA), Esterasa (EST), Transaminasa glutámico oxaloacética (GOT), Peroxidasa (PER), Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), Fosfoglucomutasa (PGM) y Siquimato deshidrogenasa (SDH). Los electroforetogramas se realizaron en minigeles discontinuos de poliacrilamida no desnaturalizantes 3 % - 7,5 % (PAGE) según Laemmli (1970), utilizando buffer de electrodo Tris-glicina 0,025 M - 0,192 M pH 8,3. Dependiendo del sistema isoenzimático, se sembraron 15 - 20 μl del homogenado de muestra por calle. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C y a intensidad de corriente constante (1,2 mA/cm). Finalizada la corrida, los geles se sumergieron en la mezcla de revelado específica para cada sistema isoenzimático: ACP, PER, PGD, PGM y SDH según Arulsekar y Parfitt (1986); DIA y GOT según Stuber *et al.* (1988); EST según Soltis *et al.* (1983); luego se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Se calculó la movilidad electroforética relativa (R_f), para cada una de las bandas isoenzimáticas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, el porcentaje de explantes cultivados que no formaron callos (explantes ennegrecidos, sin respuestas o contamina-

dos con bacterias y hongos) no superó el 30 %, por lo que se puede decir que el establecimiento *in vitro* fue exitoso. En solamente 4 clones (Palomita, EM14, MPar 75 y EC55) el porcentaje de cultivos sin respuestas alcanzó entre el 40 y 50 % en el medio suplementado con 1 mg/L de Dicamba.

En prácticamente todos los medios de cultivo ensayados, fue factible apreciar la formación de callos a partir de los 7 días de cultivo. A los 20 días de cultivo, éstos podían ser clasificados como: 1) callos no embriogénicos de aspecto friable (Figura 1a) y 2) callos embriogénicos de aspecto mucilaginoso (Figura 1b). En estos últimos fue posible observar la aparición de embriones somáticos en varios estados de desarrollo (Figura 2a).

Si bien la embriogénesis somática fue inducida en 11 de los 12 clones ensayados, en algunos de ellos (Palomita y EM 14) la frecuencia fue baja y dependió del medio de cultivo empleado (Tabla 1). Cabe destacar que con el clon Palomita sólo se pudo obtener embriones con el medio suplementado con 10 mg/L de Dicamba. En el clon EC 55 no fue posible la diferenciación de embriones somáticos. El

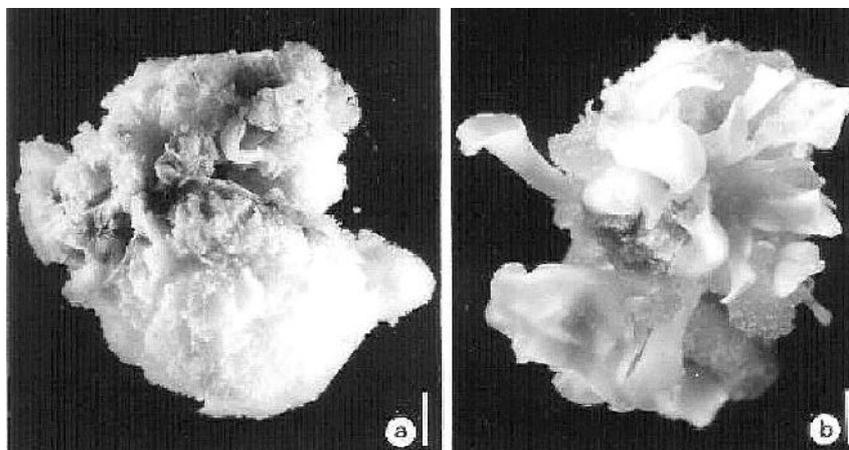


Figura 1. a) Callo no embriogénico y b) callo embriogénico de mandioca producido a partir del cultivo *in vitro* de hojas inmaduras (barras = 2 mm).

clon colombiano MCol 1505 tuvo una respuesta destacada brindando embriones somáticos en 8 de los 9 medios utilizados con porcentajes de hasta el 50 %. Estos resultados confirman la gran capacidad embriogénica de este clon puesta de manifiesto por otros autores (Szabados *et al.*, 1987; Mroginski y Scocchi, 1993; Mathews *et al.*, 1993). Entre los cultivares de interés para la Argentina, los mayores porcentajes (23 – 27 %) de explantes con embriones somáticos se obtuvieron en los clones CM 3306-4 y 76. En la mayo-

Tabla 1. Respuesta de diferenciación de embriones somáticos (%) que distintos clones de mandioca exhibieron en relación con el contenido de diferentes reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, luego de 30 días.

Clones	Medio de cultivo MS suplementado con (mg/L)									F (ANOVA)
	2,4-D			Picloram			Dicamba			
	4	6	8	5	10	15	1	5	10	
MCol 1505	33 ^a ±8,8	50 ^a ±5,8	50 ^a ±17,3	50 ^a ±15,3	50 ^a ±5,8	47 ^a ±12,0	0 ^b	17 ^{ab} ±3,3	27 ^{ab} ±8,8	3,29 *
76	23 ±14,5	23 ±13,3	3,3 ±3,3	10 ±10	27 ±12,0	13 ±3,3	0	0	7 ±6,7	1,40 ns
CM 3306-4	17 ±3,3	17 ±6,7	27 ±8,8	20 ±5,8	17 ±6,7	10 ±5,8	0	13 ±3,3	23 ±3,3	2,04 ns
30	10 ^a ±0,0	7 ^{ab} ±3,3	0 ^b	7 ^{ab} ±3,3	10 ^a ±5,8	0 ^b	0 ^b	0 ^b	7 ^{ab} ±3,3	2,63 *
Cuba Srta.	13 ±3,3	13 ±3,3	3,3 ±3,3	7 ±3,3	10 ±0,0	20 ±10,0	0	10 ±0,0	17 ±8,8	1,63 ns
90	3,3 ^a ±3,3	13 ^b ±3,3	0 ^a	0 ^a	13 ±6,7	13 ^b ±3,3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	4,85 **
MPar 75	0	7 ±6,7	0	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	0	0	0	0,68 ns
140	3,3 ^a ±3,3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	3,3 ^a ±3,3	10 ^b ±0,0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	5,63 **
70	0	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	0	0	0	0,50 ns
Palomita	0	0	0	0	0	0	0	0	3,3 ±3,3	1,00 ns
EM 14	3,3 ±3,3	3,3 ±3,3	0	0	0	0	0	0	0	0,88 ns
EC 55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

* Diferencias significativas (P<0,05); ** diferencias significativas (P<0,01); ns diferencias no significativas (P>0,05).

^{a,b} Letras distintas indican diferencias significativas según el test de comparaciones múltiples de Duncan (P ≤ 0,05).

ría de los clones empleados el medio sugerido por Stamp y Henshaw (1987) y por Raemakers *et al.* (1993b), compuesto de MS + 2 % de sacarosa + 6 mg/L de 2,4-D y el medio recomendado por Taylor *et al.* (1993) y por Sudarmonowati y Henshaw (1993) compuesto de MS + 2 % de sacarosa + 10 mg/L de Picloram fueron los que presentaron un comportamiento más uniforme, posibilitando porcentajes satisfactorios de explantes con embriones somáticos.

La Tabla 2 muestra el número de embriones por explante embriogénico y puede observarse que en esta respuesta también se destacan los mismos clones y medios antes mencionados.

Tabla 2. Número de embriones somáticos por explante foliar que distintos clones de mandioca diferenciaron en medios de cultivo adicionados con diferentes reguladores de crecimiento, luego de 30 días.

Clones	Medio de cultivo MS suplementado con (mg/L)									F (ANOVA)
	2,4-D			Picloram			Dicamba			
	4	6	8	5	10	15	1	5	10	
MCol 1505	5,0 ^a ±0,3	5,2 ^a ±1,2	4,9 ^a ±0,4	3,3 ^a ±0,9	4,9 ^a ±1,1	4,5 ^a ±0,9	0 ^b	3,3 ^a ±0,3	2,9 ^a ±0,9	4,60 **
76	1,6 ±0,9	7,9 ±3,7	0,3 ±0,3	4,3 ±4,3	7,4 ±4,2	3,2 ±0,4	0	0	0,5 ±0,5	1,68 ns
CM 3306-4	2,8 ±1,1	3,9 ±0,7	2,1 ±0,4	2,3 ±0,9	3,0 ±1,5	1,0 ±0,6	0	2,2 ±0,9	2,7 ±1,1	1,58 ns
30	3,3 ±1,5	2,7 ±2,2	0	1,7 ±1,2	1,2 ±0,6	0	0	0	5,7 ±2,9	2,00 ns
Cuba Srta.	1,7 ±0,3	2,3 ±0,7	0,3 ±0,3	2,3 ±1,5	1,0 ±0,0	1,5 ±0,5	0	1,0 ±0,0	1,1 ±0,6	1,71 ns
90	0,3 ^{ab} ±0,3	1,5 ^{abc} ±0,3	0 ^a	0 ^a	1,8 ^{bc} ±1,4	2,3 ^c ±0,3	0 ^a	0 ^a	0 ^a	3,72 *
MPar 75	0	1,0 ±1,0	0	0,3 ±0,3	0,3 ±0,3	0,3 ±0,3	0	0	0	0,75 ns
140	1,0 ^a ±1,0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,0 ^a ±1,0	2,7 ^b ±0,7	0 ^a	0 ^a	0 ^a	5,15 **
70	0	0,3 ±0,3	0,3 ±0,3	0,7 ±0,7	2,7 ±2,7	0,3 ±0,3	0	0	0	0,87 ns
Palomita	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7 ±1,7	1,00 ns
EM 14	0,3 ±0,3	1,3 ±1,3	0	0	0	0	0	0	0	0,94 ns
EC 55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

* Diferencias significativas ($P < 0,05$); ** diferencias significativas ($P < 0,01$); ns diferencias no significativas ($P > 0,05$).

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencias significativas según el test de comparaciones múltiples de Duncan ($P \leq 0,05$).

Si bien no fue posible comparar los efectos relativos de cada regulador de crecimiento utilizado, puesto que las concentraciones evaluadas para cada uno de ellos fueron diferentes, el 2,4-D y Picloram han sido en la mayoría de los clones los que mayores resultados arrojaron. Por otra parte, Raemakers *et al.* (2000) afirman que los medios suplementados con Picloram y Dicamba resultan ser ineficientes comparados con los que llevan 2,4-D. Sin embargo, en este trabajo, las diferencias encontradas en los medios con 2,4-D y Picloram no son relevantes.

Durante la etapa de la maduración de embriones somáticos se diferenciaron tanto embriones normales aislados (Figura 2b) y con hipocótilos bien definidos (Figura 2c) como fusionados ó en forma de copa (Figura 2d), tal como lo mencionan Wetztein y Baker (1993) en la embriogénesis somática del maní (*Arachis hypogaea* L.).

La germinación de los embriones somáticos (Figura 2e), teniendo en cuenta el criterio de Mathews *et al.* (1993) el cual denota la elongación de la radícula, en general fue baja (Tabla 3), siendo posible en 8 de los 11 clones probados; en el mejor de los casos germinó el 50 % de los embriones del clon Cuba Señorita provenientes del medio suplementado con 8 mg/L de 2,4-D. Los valores de conversión de los embriones somáticos en plantas (Figura 2f) fueron aún más bajos (2-30 %) y sólo se obtuvo la regeneración en ciertos clones (MCol 1505, 76, 30 y MPar 75). Estos bajos porcentajes de conversión concuerdan con los citados por otros autores (Szabados *et al.*, 1987; Schöpke *et al.*, 1993; Raemakers *et al.*, 1993a). En estudios previos Mroginski y Scocchi (1993), obtuvieron embriones somáticos en los clones Palomita, 76 y MCol 1505, pero sólo en este último fue posible la regeneración de plantas. Mathews *et al.* (1993), trabajando con el mismo clon colombiano, informaron bajos porcentajes de regeneración de plantas y que mejoraron sustancialmente usando embriones somáticos deshidratados.

Por otra parte, si bien Raemakers *et al.* (2000) sugieren el uso del medio de maduración con BA, al igual que Stamp y Henshaw (1987) -quienes recomiendan el suplemento de este regulador de

crecimiento junto a una pequeña dosis de 2,4-D-, se debería tener en cuenta la presencia de AG_3 en este medio, tal como lo señalan Szabados *et al.* (1987); Taylor *et al.* (1993) y Cabral *et al.* (1993), quienes destacan su importancia en la extensión del tallo y la formación de hojas maduras de los embriones somáticos.

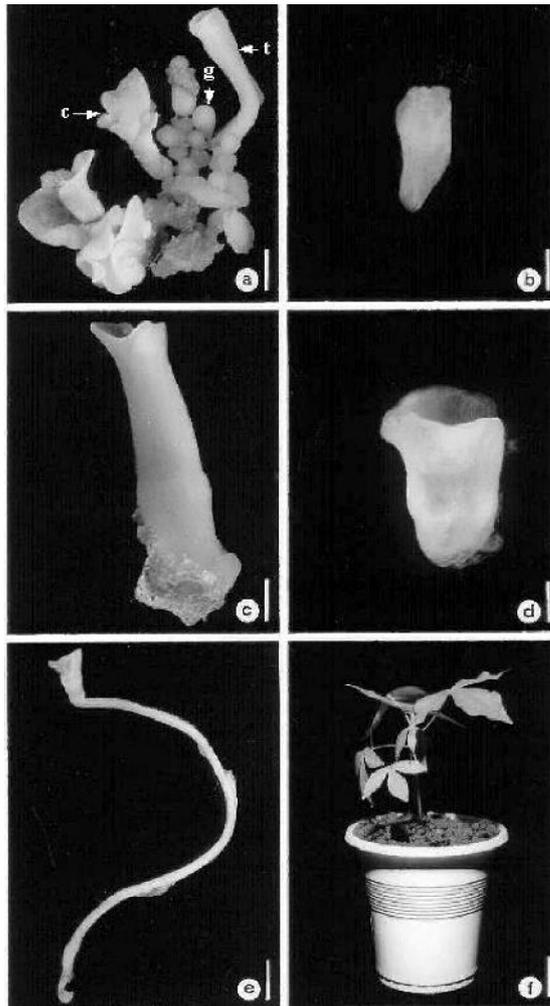


Figura 2. a) Diferentes estados de desarrollo de embriones somáticos provenientes de un mismo callo embriogénico (barra = 1,8 mm) (g: estado globular, t: estado torpedo, c: estado cotiledonar); b) embrión somático aislado (barra = 0,5 mm); c) embrión somático en estado de torpedo (barra = 0,5 mm); d) embrión somático en forma de copa (barra = 0,5 mm); e) embrión somático germinado (barra = 4 mm); f) planta regenerada de mandioca transferida a tierra (barra = 18 mm).

Tabla 3. Porcentajes de germinación y conversión a plantas a partir de embriones somáticos de diferentes clones de mandioca provenientes de distintos medios de inducción.

Clones	Medios de inducción MS suplementado con (mg/L)								
	2,4-D			Picloram			Dicamba		
	4	6	8	5	10	15	1	5	10
MCol 1505	17/29*	0/16	0/18	0/14	7/10	0/6	-	0/17	0/14
76	0/34	2/11	17/25	0/2	0/19	0/16	-	-	0
CM 3306-4	0/49	0/4	0/35	0/5	0/10	0/14	-	0/41	0/11
30	0/21	17/29	0	0	0	0	-	0	30/9
Cuba Srta.	0	0	0/50	0	0	0	-	0	0
90	0	0	0	-	0	0	-	-	-
MPar 75	-	11/17	0	0	0	0	-	-	-
140	-	-	-	-	0	0/5	-	-	-
70	-	0	0	0	0	0	-	-	-
Palomita	-	-	-	-	-	-	-	-	0/25
EM 14	0	0	-	-	-	-	-	-	-

Referencias:

* % de embriones somáticos convertidos en plantas completas/
% de embriones somáticos germinados

El análisis citológico mostró que las plantas obtenidas fueron estables desde el punto de vista del número de cromosomas ya que todos los individuos analizados tenían $2n=36$ cromosomas (Figura 3a), que es el esperado para la especie (Carvalho y Guerra, 2002). Asimismo, Raemakers *et al.* (1993b) informaron la existencia de una alta estabilidad genética tanto en las plantas normales como en las morfológicamente alteradas, si bien una de estas últimas resultó ser mixoploide ($2n=36$ y $2n=54$). Sin embargo, estas observaciones no concuerdan con los hallazgos de Mussio *et al.* (1998) y Rey *et al.* (1980), quienes informaron la existencia de variaciones cromosómicas numéricas en plantas regeneradas mediante la organogénesis indirecta a partir de hojas inmaduras de

mandioca y de alteraciones en el número de cromosomas en células de callos, respectivamente.

Del análisis de los 8 sistemas isoenzimáticos ensayados surge que todas las plantas regeneradas presentaron patrones de bandas idénticos al de las plantas dadoras de explantes. En las figuras 3b, c, d, e, y f se pueden observar, a modo de ejemplo, los zimogramas de algunos de los sistemas isoenzimáticos probados. En los zimogramas del sistema GOT se observaron 2 bandas monomórficas tanto en las regeneradas *in vitro* como en las plantas control, independientemente de los clones analizados. Estos resultados coinciden con los informados por Mussio et al. (1998). En los sistemas ACP, EST, DIA, PER, PGD, PGM y SDH también se obtuvieron perfiles isoenzimáticos iguales tanto en las plantas regeneradas como en los controles, pero variaron de acuerdo con el clon. En este trabajo, utilizando las mismas dosis de 2,4-D (6 y 8 mg/L) no se encontró la banda adicional de PGM cuya ocurrencia fue de un 3,4 % de las plantas de mandioca regeneradas *in vitro* con el procedimiento reportado por Mussio et al. (1998).

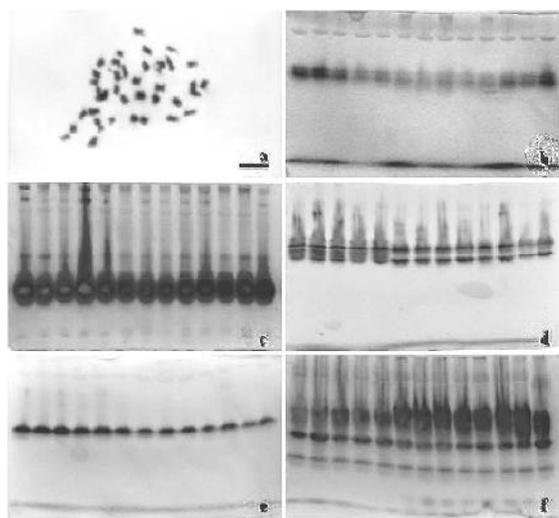


Figura 3. a) Metafase mitótica del meristema apical de raíz de una planta regenerada de mandioca mostrando $2n=36$ cromosomas (barra = $10 \mu\text{m}$); Zimogramas de los sistemas isoenzimáticos b) GOT; c) EST; d) PGD; e) SDH y f) ACP. Los patrones de bandas corresponden a una muestra de plantas dadoras de explantes (líneas 1-2; 6-7) y de las plantas regeneradas *in vitro* (líneas restantes) de los clones MPar 75 y 76.

En este contexto, los resultados de este trabajo constituyen pruebas a favor de la estabilidad genética de las plantas regeneradas in vitro, si bien restaría analizar otras características no consideradas en este estudio.

CONCLUSIONES

Con este trabajo queda demostrado que: i) es factible inducir la diferenciación de embriones somáticos a partir del cultivo de hojas inmaduras de 10 clones de mandioca de interés para la Argentina, además de MCol 1505 usado como control, ii) en por lo menos 4 clones, incluyendo MCol 1505, los embriones somáticos se convierten en plantas que crecen exitosamente en el suelo y iii) que las evidencias presentadas sugieren que estas plantas serían genéticamente estables respecto de las plantas madres, teniendo en cuenta el número de cromosomas y los patrones isoenzimáticos estudiados.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE por sufragar la beca de Ricardo Medina.

Al Sr. Aldo Goytía por la confección de las fotografías.

BIBLIOGRAFÍA

ARULSEKAR, S.; PARFITT, D. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *HortScience* 21, pp 928-933.

BOWEN, C. 1956. Freezing by liquid carbon dioxide in making slides permanent. *Stain Technology* 31, pp 87-90.

CABRAL, G.B.; ARAGAO, F.J.L.; MATSUMOTO, K.; MONTE-NESHICH, D.C.; RECH, L. 1993. Cassava tissue culture: multiple shoots and somatic embryogenesis. En: *Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava*

Biotechnology Network. Roca, W.M. y Thro, A.M., Eds. CIAT, Cartagena de Indias, Colombia. pp. 180-184.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136, pp 159-168.

COCK, J.H. 1989. La yuca, nuevo potencial para un cultivo tradicional. Westview Press Boulder, Colorado, USA. 240 p.

FERNÁNDEZ, A. 1973. El ácido láctico como fijador cromosómico. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15, pp 287-290.

JOHN, M.E. 1997. Cotton crop improvement through genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, pp 185-208.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, pp 680-685.

LEE, S.I.; LEE, S.H.; KOO, J.C.; CHUN, H.J.; LIM, C.O.; MUN, J.H.; SONG, Y.H.; CHO, M.J. 1999. Soybean kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. *Molecular Breeding* 5, pp 1-9.

MATHEWS, H.; SCHÖPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R.N. 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports* 12, pp 328-333.

MROGINSKI, L.A.; SCOCCHI, A.M. 1993. Somatic embryogenesis of Argentine cassava varieties. En: *Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*. Roca, W.M. y Thro, A.M., Eds. CIAT, Cartagena de Indias, Colombia. pp. 175-179.

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

MUSSIO, I.; CHAPUT, M.; SERRAT, I.; DUCREUX, G.; SIHACHAKR, D. 1998. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53, pp 205-211.

PUONTI-KAERLAS, J.; KLÖTI, A.; POTRYKUS, I. 1999. Biotechnological contributions to food security with cassava and rice. *Plant Biotechnology* 16, pp 39-48.

RAEMAKERS, C.J.J.M.; AMATI, M.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER,

R.G.F. 1993a. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Annals of Botany* 71, pp 289-294.

RAEMAKERS, C.J.J.M.; BESSEMBINDER, J.J.E.; STARITSKY, G.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. 1993b. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33, pp 151-156.

RAEMAKERS, C.J.J.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. 2000. Direct cyclic somatic embryogenesis of cassava for mass production purposes. En: *Methods in Molecular Biology. Plant Cell Culture Protocols*. Hall, R.D., Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 61-70.

REY, H.; MROGINSKI, L.A.; FERNÁNDEZ, A. 1980. Inducción *in vitro* de callos y raíces en explantos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Phyton* 39, pp 161-170.

ROCA, W.M.; NOLT, B.; MAFLA, G.; ROA, J.; REYES, R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W.M. y Mroginski, L.A., Eds. CIAT, Cali, Colombia. pp. 403-420.

SHAH, D.M.; ROMMENS, C.M.T.; BEACHY, R.N. 1995. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends in Biotechnology* 13, pp 362-368.

SCHÖPKE, C.; FRANCHE, C.; BOGUSZ, D.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R.N. 1993. Transformation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV*. Bajaj, Y.P.S., Ed. Springer Verlag, Heidelberg. Vol. 23. pp. 273-289.

SOFIARI, E.; RAEMAKERS, C.J.J.M.; KANJU, E.; DANSO, K.; VAN LAMMEREN, A.M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.F. 1997. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50, pp 45-56.

SOLTIS, D.; HAUFLER, C.; DARROW, D.; GASTONY, G. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal* 73, pp 9-27.

STAMP, J.A.; HENSHAW, G.G. 1987. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava. *Annals of Botany* 59, pp 445-450.

STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; SMITH, J.S.C.; GOODMAN, M.M. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize

(*Zea mays* L.). North Carolina Agricultural Research Service. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. Technical Bulletin 286, pp 1-87.

SUDARMONOWATI, E.; HENSHAW, G. 1993. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using Picloram and Dicamba. En: Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Roca, W.M. y Thro, A.M., Eds. CIAT, Cartagena de Indias, Colombia. pp. 128-133.

SZABADOS, L.; HOYOS, R.; ROCA, W. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Reports 6, pp 248-251.

TAYLOR, N.; CLARKE, M.; HENSHAW, G. 1993. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and one South American cassava. En: Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Roca, W.M. y Thro, A.M., Eds. CIAT, Cartagena de Indias, Colombia. pp. 134-139.

WETZTEIN, H.Y.; BAKER, C.M. 1993. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Science 92, pp 81-89.