



**Universidad Nacional del Nordeste**  
**Facultad de Ciencias Agrarias**  
**Maestría en Producción Vegetal**

**“Micropropagación de cultivares de mandioca  
(*Manihot esculenta* Crantz) de interés  
para Argentina”.**

**Tesista:**

Bióloga María Inés Cavallero

**Director:** Ing. Agr. Luis A. Mroginski

**Co-director:** Dr. Ricardo D. Medina

## PREFACIO

Esta tesis es presentada como requisito para el otorgamiento del grado académico de Magister en Producción Vegetal de la Universidad Nacional del Nordeste. La misma contiene los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Cultivos *in vitro* de Tejidos Vegetales del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, bajo la dirección del Ing. Agr. Luis A. Mroginski y la codirección del Ing. Agr. Ricardo D. Medina.

La tesis está dividida en 5 capítulos:

El Capítulo 1 contiene un marco general que incluye aspectos básicos de la mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), su cultivo, usos, potencialidades y limitantes, así como los antecedentes con respecto a las técnicas de cultivo de tejidos empleadas en esta especie. Se presentan además la descripción del problema de estudio, la hipótesis y los objetivos.

El Capítulo 2 aborda el establecimiento *in vitro* y la regeneración de plantas de mandioca por organogénesis, evaluando la respuesta de diferentes cultivares utilizados en Argentina. Además se evalúa el efecto de distintas citocininas con respecto a la regeneración de plantas y a la producción de múltiples vástagos. Finalmente se estudia la respuesta de los segmentos uninodales de mandioca a la encapsulación, como otra estrategia de micropropagación.

El Capítulo 3 plantea la regeneración de plantas por embriogénesis somática, evaluando la capacidad embriogénica de diferentes cultivares de interés para Argentina. Además, con un cultivar de mandioca que presentó el mayor índice de embriogénesis (EC 118), se evalúa el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal, fuentes carbonadas, tipos de explantes y tiempos de incubación sobre la embriogénesis somática en mandioca.

El Capítulo 4 aborda la aclimatización de las plantas de mandioca producidas *in vitro* utilizando diferentes sistemas (sustratos e hidroponía) y su producción a campo comparando con el sistema de plantación tradicionalmente utilizado.

El Capítulo 5 expresa las conclusiones generales de la tesis.

Al final del manuscrito se encuentra la bibliografía citada en el texto.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en diferentes congresos y reuniones científicas:

- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos; B. Vicentino y L. A. Mroginski. 2007.** Establecimiento y evaluación del comportamiento *in vitro* de cultivares de mandioca de interés para Argentina. XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Corrientes, Argentina. 1 al 3 de agosto de 2007.
- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos; B. Vicentino y L. A. Mroginski. 2008.** Acción de diferentes tipos de citocininas sobre la morfogénesis caulinar y radical de (*Manihot esculenta* Crantz). XIX Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Corrientes, Argentina. 5 al 8 de agosto de 2008.
- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos y L. A. Mroginski. 2009.** Evaluación de la capacidad embriogénica de 33 clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de interés para Argentina. VII Simposio Nacional de Biotecnología, II Congreso Internacional REDBIO Argentina. Santa Fe, Argentina. 20 al 24 de abril de 2009.
- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos y L. A. Mroginski. 2009.** Potencial embriogénico de clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de interés para Argentina. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina. 22 al 24 de junio de 2009.
- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos y L. A. Mroginski. 2009.** Aclimatización de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) obtenidas por cultivo de tejidos. XXXII Congreso Argentino de Horticultura. Salta, Argentina. 23 al 26 de setiembre de 2009.
- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos y L. A. Mroginski. 2009.** Influencia de diferentes fuentes carbonadas en la inducción de embriogénesis somática en *Manihot esculenta* Crantz. XX Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Corrientes, Argentina. 18 al 19 de noviembre de 2009.
- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos y L. A. Mroginski. 2010.** Transferencia y evaluación del comportamiento a campo de plantas de mandioca obtenidas por cultivo de tejidos. Reunión de Comunicaciones

Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina. 09 al 11 de junio de 2010.

- **Cavallero, M.I.; R. D. Medina; R. E. Hoyos y L. A. Mroginski. 2010.** Efecto de la encapsulación de segmentos uninodales de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) en alginato de calcio. XXXIII Congreso Nacional de Horticultura, Rosario, Argentina. 28 de septiembre al 1° de agosto de 2010.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, en especial al Centro Regional Chaco-Formosa, por otorgarme la beca para realizar esta maestría.

A las autoridades de la Estación Experimental INTA El Colorado, en particular al coordinador provincial del Proyecto Integrado Pro-Huerta, Ing. Raúl Freixa por gestionar la beca para realizar la maestría.

A la Lic. (MSc.) Cármen Peralta y al Agr. Bonifacio Vicentino de la EEA INTA El Colorado por aportar el material vegetal y su caracterización a campo.

Al Instituto de Botánica del Nordeste, por brindar las instalaciones e insumos para el desarrollo de esta tesis.

Al Ing. Luis Mroginski, por permitirme realizar la tesis en el laboratorio de Fisiología Vegetal, por su confianza, interés y apoyo constante.

Al Dr. Ricardo Medina, por su compromiso y por el tiempo dedicado a la concreción de esta tesis.

A la Dra. Hebe Rey por su ayuda solícita.

Al Ing. Pedro Cenoz por facilitar el ensayo de producción en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste.

A todos los profesionales y técnicos del laboratorio de Fisiología Vegetal del IBONE, desde el inicio al final de esta tesis, por sus aportes, su tiempo y su amistad, en particular a las Dras. Ernestina Galdeano y Mónica Collavino y a la Lic. Rosa Hoyos por sus oportunos consejos y ayuda permanente.

A mis compañeros en los cursos de esta Maestría por los lindos momentos compartidos.

A mi familia por respetar mis decisiones y tolerar las distancias.

A Patricio por su ayuda permanente y su respeto por mi trabajo.

## RESUMEN

Esta tesis tuvo como objetivo establecer procedimientos para la micropropagación de clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en Argentina, mediante organogénesis y embriogénesis somática.

Se realizó la introducción, regeneración y multiplicación de 28 clones de mandioca, en medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA + 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>.

Se evaluó el efecto de diferentes citocininas sobre la morfogénesis caulinar y radical de mandioca. Los resultados mostraron que la adición de 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP al medio MS favoreció la producción de múltiples vástagos, mientras que 2iP y CIN promovieron la regeneración de plantas en menor tiempo.

Por otra parte, se evaluó el crecimiento de segmentos uninodales encapsulados en alginato de calcio sólo o combinado con el medio MS y reguladores de crecimiento vegetal. Las cápsulas de alginato de calcio no impidieron el crecimiento de las plantas. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los segmentos encapsulados sólo con alginato de calcio se cultivaron sobre el medio MS sólo o adicionado con ANA, BAP y AG<sub>3</sub>.

Se evaluó el potencial embriogénico de 33 clones de mandioca cultivados en Argentina y un clon colombiano a modo de control, registrándose embriones somáticos en 30 clones; embriones germinados en 16 y plantas regeneradas en 9 de ellos, siendo el clon EC 118 uno de los de mejor desempeño.

Se observó un importante efecto del genotipo en el desarrollo *in vitro* de las plantas de mandioca, tanto a nivel de organogénesis como de embriogénesis somática.

Se evaluó el efecto del tipo de explante, las auxinas, la fuente de carbono y el tiempo de inducción sobre el clon EC 118. Se observó que los ápices caulinares y las yemas axilares produjeron respuestas similares. Las auxinas que produjeron mayor índice de embriogénesis fueron 2,4-D y Picloram. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar glucosa como fuente de carbono. Con respecto al tiempo de inducción, los ápices caulinares requirieron menos tiempo en medio de inducción (10 días), mientras que las yemas axilares incrementaron su respuesta embriogénica al aumentar el tiempo de inducción.

Se estudiaron diferentes sistemas para aclimatizar las plantas micropropagadas. Los mejores resultados se obtuvieron con las plantas aclimatizadas con sustrato comercial o mediante un sistema hidropónico en solución nutritiva de Arnon y Hoagland.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to develop organogenesis and somatic embryogenesis procedures for the micropropagation of Argentinian cassava clones (*Manihot esculenta* Crantz).

Twenty eight clones were successfully established, regenerated and multiplied in MS medium with  $0.01 \text{ mg.l}^{-1}$  ANA +  $0.01 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP +  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$  AG<sub>3</sub>.

The effect of cytokinine on cassava shoot and root development was assayed. The results showed that  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP added to the MS medium improved multiple shoot formation while the addition of 2iP and KIN improved the plant regeneration in a short period of time.

The growth of uninodal segments encapsulated in calcium alginate, alone or with MS medium and plant growth regulators was evaluated. The capsule did not prevent the shoots growth. The best results were obtained when the uninodal segments encapsulated only with calcium alginate were cultured on MS alone or added with ANA, BAP and AG<sub>3</sub>.

The embryogenic potential of 33 Argentinian cassava clones and a Colombian one, used as a control, was evaluated. Thirty clones produced somatic embryos. Embryos germination was achieved in 16 clones while regenerated plants were obtained in 9 of them. EC 118 was one of the best clones.

Genotype had an important effect on the *in vitro* development of cassava plants, as regards organogenesis and somatic embryogenesis.

The effects of type of explant, auxins, carbon source and induction time on embryogenic response was assayed in clone EC 118. Shoots and buds produced similar responses. 2,4-D and Picloram were the auxins that produced the highest embryogenic index. The best results were obtained using glucose as carbon source. As regards induction time, the experiments showed that shoots require less induction time (10 days) than buds which increase their embryogenic response with higher induction time.

Different acclimatization systems were studied for the micropropagated plants. The best results were obtained when the plantlets were acclimatized with a commercial substrate or in an hydroponic system with Arnon and Hoagland nutritive solution.

## INDICE

LISTA DE TABLAS.....	<i>iv</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>vi</i>
ABREVIATURAS.....	<i>x</i>

### CAPITULO 1

<b>Introducción general</b> .....	<b>1</b>
1.1. Biología de la mandioca .....	<b>1</b>
1.2. Importancia del cultivo .....	<b>6</b>
1.3. Usos .....	<b>7</b>
1.4. Principales problemas y limitantes del cultivo .....	<b>8</b>
1.4.1. Deterioro postcosecha de las raíces .....	<b>8</b>
1.4.2. Cianogénesis .....	<b>9</b>
1.4.3. Escasez de material de propagación .....	<b>9</b>
1.5. Propagación de mandioca mediante cultivo <i>in vitro</i> de tejidos .....	<b>10</b>
1.5.1. Organogénesis <i>in vitro</i> .....	<b>12</b>
1.5.2. Embriogénesis somática .....	<b>12</b>
1.5.3. Acclimatización de las plantas micropropagadas .....	<b>14</b>
1.6. Descripción del problema .....	<b>14</b>
1.7. Hipótesis .....	<b>15</b>
1.8. Objetivos .....	<b>15</b>
1.8.1. Objetivo general .....	<b>15</b>
1.8.2. Objetivos específicos .....	<b>16</b>

### CAPITULO 2

<b>Organogénesis en clones de mandioca cultivados en Argentina</b> .....	<b>17</b>
2.1. Introducción .....	<b>17</b>
2.2. Materiales y métodos .....	<b>19</b>
2.2.1. Material vegetal .....	<b>19</b>
2.2.2. Evaluación del establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de clones de mandioca .....	<b>20</b>
2.2.3. Evaluación del efecto de diferentes citocininas en la morfogénesis caulinar y en la regeneración de plantas de mandioca .....	<b>20</b>
2.2.4. Evaluación del efecto del BAP sobre la formación de múltiples vástagos en mandioca .....	<b>22</b>



2.2.5. Encapsulación de segmentos uninodales de mandioca.....	23
2.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	24
2.3. Resultados y discusión.....	25
2.3.1. Evaluación del establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de clones de mandioca .....	25
2.3.2. Evaluación del efecto de diferentes citocininas en la morfogénesis caulinar y la regeneración de plantas de mandioca.....	32
2.3.3. Evaluación del efecto del BAP sobre la formación de múltiples vástagos en diferentes clones de mandioca.....	40
2.3.4. Efecto de la encapsulación de segmentos uninodales de mandioca.....	45
2.4. Conclusiones .....	51

### **CAPITULO 3**

<b>Embriogénesis somática en clones de mandioca cultivados en Argentina</b>	<b>54</b>
3.1. Introducción.....	54
3.2. Materiales y métodos.....	56
3.2.1. Material vegetal.....	56
3.2.2. Evaluación de la capacidad embriogénica de 34 clones de mandioca...	58
3.2.3. Evaluación del efecto de diferentes auxinas y tipos de explantes sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	58
3.2.4. Evaluación del efecto de diferentes tiempos de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	60
3.2.5. Evaluación del efecto de diferentes fuentes carbonadas en el medio de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	60
3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados.....	61
3.3. Resultados y discusión.....	62
3.3.1. Evaluación de la capacidad embriogénica de 34 clones de mandioca...	62
3.3.2. Evaluación del efecto de diferentes auxinas y tipos de explantes sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	69
3.3.3. Evaluación del efecto de diferentes tiempos de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	77
3.3.4. Evaluación del efecto de diferentes fuentes carbonadas en el medio de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	80
3.4. Conclusiones.....	86

<b>CAPITULO 4</b>	
<b>Aclimatización de plantas de mandioca obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de tejidos</b> .....	<b>89</b>
4.1. Introducción .....	<b>89</b>
4.2. Materiales y métodos .....	<b>90</b>
4.2.1. Material vegetal .....	<b>90</b>
4.2.2. Acondicionamiento de las vitroplantas para su aclimatización.....	<b>91</b>
4.2.3. Aclimatización en cámara de cultivo .....	<b>91</b>
4.2.4. Transferencia a condiciones de umbráculo .....	<b>92</b>
4.2.5. Transplante a campo .....	<b>92</b>
4.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	<b>92</b>
4.3. Resultados y discusión.....	<b>95</b>
4.4. Conclusiones.....	<b>103</b>
<b>CAPITULO 5</b>	
<b>Conclusiones generales</b> .....	<b>105</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>108</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b>	Procedencia y principales características de los clones de mandioca del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado, Formosa, utilizados en los ensayos de organogénesis.....	<b>19</b>
<b>Tabla 2.2</b>	Medios de cultivo utilizados para evaluar el efecto de las citocininas sobre la morfogénesis caulinar y la regeneración de plantas de mandioca .....	<b>21</b>
<b>Tabla 2.3</b>	Tratamientos de encapsulación de segmentos uninodales de mandioca. Descripción de los componentes de la cápsula y los medios o soportes sobre los que estas fueron cultivadas .....	<b>24</b>
<b>Tabla 2.4</b>	Efecto de diferentes citocininas adicionadas al MS sobre el porcentaje de vástagos regenerados menores y mayores a 5 mm, la altura de los vástagos, el número promedio de nudos por explante y el porcentaje de abscisión foliar a los 50 días de cultivo...	<b>36</b>
<b>Tabla 2.5</b>	Producción de múltiples vástagos en diferentes clones de mandioca cultivados en MS adicionado con 1 mg.l <sup>-1</sup> de BAP y enraizamiento de los vástagos generados.....	<b>42</b>
<b>Tabla 3.1</b>	Tipos de explantes utilizados para inducir embriogénesis somática en mandioca y referencias bibliográficas correspondientes .....	<b>55</b>
<b>Tabla 3.2</b>	Procedencia y principales características de los clones de mandioca del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado, Formosa, evaluados con respecto a su capacidad embriogénica.....	<b>57</b>
<b>Tabla 3.3</b>	Tratamientos realizados para evaluar el efecto de diferentes tipos y concentraciones de auxinas en el medio de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca .....	<b>59</b>
<b>Tabla 3.4</b>	Tratamientos realizados para evaluar el efecto de diferentes tipos y concentraciones de fuentes carbonadas adicionadas al medio de inducción, sobre la embriogénesis somática en mandioca.....	<b>61</b>
<b>Tabla 3.5</b>	Porcentaje de embriogénesis somática y número promedio de embriones somáticos por explante en las etapas de inducción y maduración para 34 clones de mandioca.....	<b>65</b>
<b>Tabla 3.6</b>	Porcentaje de embriogénesis somática y número promedio de embriones somáticos, en la etapa de maduración, para diferentes explantes de mandioca (clon EC 118), cultivados en medio MS adicionado con distintas auxinas .....	<b>72</b>

<b>Tabla 3.7</b>	Índice de embriogénesis y porcentaje de germinación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares y yemas axilares de mandioca (clon EC 118), cultivados en medios de inducción con diferente tipo y concentración de auxinas .....	<b>75</b>
<b>Tabla 3.8</b>	Porcentaje de embriogénesis somática y número promedio de embriones somáticos por explante, obtenidos a partir de yemas axilares de mandioca (clon EC 118), cultivadas durante 30 días en medio de inducción constituido por MS adicionado con 6 mg.l <sup>-1</sup> de 2,4-D y diferentes tipos y concentraciones de fuentes carbonadas ...	<b>84</b>
<b>Tabla 4.1</b>	Descripción de los tratamientos de aclimatización de plantas de mandioca (clon EC 118) .....	<b>91</b>
<b>Tabla 4.2</b>	Influencia de diferentes tratamientos de aclimatización de plantas de mandioca (clon EC 118) sobre diferentes parámetros de crecimiento, evaluados a los 20 días, con respecto a la condición inicial <i>in vitro</i> ....	<b>96</b>
<b>Tabla 4.3</b>	Variables evaluadas a los 165 días de realizada la plantación a campo, para plantas de mandioca (clon EC 118) aclimatizadas con diferentes tratamientos, en relación al control .....	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.1</b>	Planta de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	<b>2</b>
<b>Fig. 1.2</b>	Detalle de <i>Manihot esculenta</i> : flor masculina y femenina, fruto, semilla y sistema radical.....	<b>5</b>
<b>Fig. 2.1</b>	Porcentaje de explantes establecidos <i>in vitro</i> para 28 clones de mandioca a los 30 días de cultivo.....	<b>26</b>
<b>Fig. 2.2</b>	Porcentaje de explantes brotados <i>in vitro</i> para 28 clones de mandioca a los 30 días de cultivo.....	<b>26</b>
<b>Fig. 2.3</b>	Altura de los vástagos de 28 clones <i>in vitro</i> de mandioca, a los 30 días de cultivo.....	<b>27</b>
<b>Fig. 2.4</b>	Número de nudos por vástago de 28 clones <i>in vitro</i> de mandioca, a los 30 días de cultivo.....	<b>27</b>
<b>Fig. 2.5</b>	Porcentaje de explantes enraizados de 28 clones <i>in vitro</i> de mandioca, a los 30 días de cultivo.....	<b>27</b>
<b>Fig. 2.6</b>	Número promedio de raíces por vástago para 28 clones <i>in vitro</i> de mandioca, a los 30 días de cultivo.....	<b>28</b>
<b>Fig. 2.7</b>	Porcentaje de explantes brotados <i>in vitro</i> para 28 clones de mandioca a los 30 días de la primera multiplicación.....	<b>28</b>
<b>Fig. 2.8</b>	Altura de los vástagos de 28 clones de mandioca cultivados <i>in vitro</i> , a los 30 días de la primera multiplicación.....	<b>29</b>
<b>Fig. 2.9</b>	Número de nudos por vástago para 28 clones de mandioca cultivados <i>in vitro</i> a los 30 días de la primera multiplicación.....	<b>30</b>
<b>Fig. 2.10</b>	Porcentaje de explantes enraizados de 28 clones de mandioca cultivados <i>in vitro</i> a los 30 días de la primera multiplicación.....	<b>31</b>
<b>Fig. 2.11</b>	Número promedio de raíces por vástago para 28 clones de mandioca cultivados <i>in vitro</i> , a los 30 días de la primera multiplicación.....	<b>31</b>
<b>Fig. 2.12</b>	Diferencia de altura de vástagos, número de nudos y de raíces en clones de mandioca, a los 30 días de establecidos <i>in vitro</i> .....	<b>32</b>
<b>Fig. 2.13</b>	Efecto de las citocininas sobre la organogénesis de mandioca <i>in vitro</i> a los 30 días de cultivo.....	<b>37</b>
<b>Fig. 2.14</b>	Efecto de las citocininas sobre la organogénesis de mandioca <i>in vitro</i> a los 50 días de cultivo.....	<b>37</b>
<b>Fig. 2.15</b>	Efecto de las citocininas sobre la producción de raíces de mandioca <i>in vitro</i> a los 30 y 50 días de cultivo.....	<b>38</b>

<b>Fig. 2.16</b>	Efecto de las citocininas sobre la producción de múltiples vástagos en mandioca a los 30 y 50 días de cultivo.....	<b>38</b>
<b>Fig. 2.17</b>	Efecto de las citocininas sobre el número de vástagos producidos por explante a los 30 y 50 días de cultivo.....	<b>38</b>
<b>Fig. 2.18</b>	Efecto de diferentes citocininas sobre la morfogénesis caulinar y radical y la formación de múltiples vástagos en mandioca.....	<b>39</b>
<b>Fig. 2.19</b>	Efecto del BAP sobre la brotación de segmentos uninodales de diferentes clones de mandioca a los 30 días de cultivo.....	<b>43</b>
<b>Fig. 2.20</b>	Efecto del BAP sobre la formación de múltiples vástagos en diferentes clones de mandioca a los 30 días de cultivo.....	<b>43</b>
<b>Fig. 2.21</b>	Efecto del BAP sobre la morfogénesis caulinar y la formación de múltiples vástagos a partir de segmentos uninodales de mandioca, a los 30 días de cultivo.....	<b>44</b>
<b>Fig. 2.22</b>	Efecto del BAP sobre el IPMV en diferentes clones de mandioca a los 30 días de cultivo.....	<b>45</b>
<b>Fig. 2.23</b>	Respuesta de segmentos uninodales de mandioca, sin encapsular y encapsulados cultivados sobre diferentes medios y soportes, a los 15 días de cultivo.....	<b>48</b>
<b>Fig. 2.24</b>	Respuesta de segmentos uninodales de mandioca, sin encapsular y encapsulados cultivados sobre diferentes medios y soportes, a los 30 días de cultivo.....	<b>48</b>
<b>Fig. 2.25</b>	Efecto de diferentes soportes sobre el porcentaje de brotación y enraizamiento de segmentos uninodales de mandioca sin encapsular y encapsulados, a los 15 días de cultivo.....	<b>49</b>
<b>Fig. 2.26</b>	Efecto de diferentes soportes sobre el porcentaje de brotación y enraizamiento de segmentos uninodales de mandioca sin encapsular y encapsulados, a los 30 días de cultivo.....	<b>49</b>
<b>Fig. 2.27</b>	Efecto de la encapsulación de segmentos uninodales de mandioca en alginato de calcio sólo o adicionado con MS con o sin RCV y su posterior cultivo sobre diferentes medios y soportes.....	<b>50</b>
<b>Fig. 3.1</b>	Porcentaje de embriogénesis somática a los 30 días de cultivo en medio de inducción, para 34 clones de mandioca.....	<b>66</b>
<b>Fig. 3.2</b>	Número de embriones somáticos por explante a los 30 días de cultivo en medio de inducción, para 34 clones de mandioca.....	<b>66</b>
<b>Fig. 3.3</b>	Porcentaje de embriogénesis somática a los 30 días de cultivo en medio de maduración, para 34 clones de mandioca.....	<b>66</b>

<b>Fig. 3.4</b>	Número de embriones somáticos por explante a los 30 días de cultivo en medio de maduración, para 34 clones de mandioca.....	<b>67</b>
<b>Fig. 3.5</b>	Porcentaje de embriones somáticos germinados para 34 clones de mandioca.....	<b>67</b>
<b>Fig. 3.6</b>	Diferentes etapas en la embriogénesis somática.....	<b>68</b>
<b>Fig. 3.7</b>	Porcentaje de embriogénesis somática obtenida a partir de ápices caulinares de mandioca cultivados en diferentes medios de inducción.....	<b>73</b>
<b>Fig. 3.8</b>	Porcentaje de embriogénesis somática obtenida a partir de yemas axilares de mandioca cultivadas en diferentes medios de inducción.....	<b>73</b>
<b>Fig. 3.9</b>	Número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares de mandioca cultivados en diferentes medios de inducción.....	<b>73</b>
<b>Fig. 3.10</b>	Número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de yemas axilares de mandioca cultivadas en diferentes medios de inducción.....	<b>74</b>
<b>Fig. 3.11</b>	Índice de embriogénesis en la etapa de maduración para ápices caulinares y yemas axilares de mandioca cultivados en diferentes medios de inducción.....	<b>74</b>
<b>Fig. 3.12</b>	Porcentaje de germinación de embriones somáticos de mandioca obtenidos a partir de ápices caulinares y de yemas axilares cultivados en diferentes medios de inducción.....	<b>74</b>
<b>Fig. 3.13</b>	Inducción de embriogénesis somática en mandioca en el medio MS adicionado con diferentes auxinas.....	<b>76</b>
<b>Fig. 3.14</b>	Porcentaje de embriogénesis somática en mandioca, en las etapas de inducción y maduración, para diferentes tiempos de inducción...	<b>79</b>
<b>Fig. 3.15</b>	Número promedio de embriones somáticos de mandioca, obtenidos en las etapas de inducción y maduración, para diferentes tiempos de inducción.....	<b>79</b>
<b>Fig. 3.16</b>	Porcentaje de germinación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares y yemas axilares de mandioca, sometidos a diferentes tiempos de inducción.....	<b>80</b>
<b>Fig. 3.17</b>	Inducción de embriogénesis somática en yemas de mandioca en medio MS adicionado con 6 mg.l <sup>-1</sup> de 2,4-D y diferentes fuentes carbonadas en el medio de inducción.....	<b>83</b>

<b>Fig. 3.18</b>	Porcentaje de embriogénesis somática obtenida a partir de yemas axilares de mandioca cultivadas en medio de inducción adicionado con diferentes fuentes carbonadas.....	<b>85</b>
<b>Fig. 3.19</b>	Número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de yemas axilares de mandioca cultivadas en medio de inducción adicionado con diferentes fuentes carbonadas.....	<b>85</b>
<b>Fig. 3.20</b>	Índice de embriogénesis en la etapa de maduración para yemas axilares de mandioca cultivadas en medio de inducción adicionado con diferentes fuentes carbonadas.....	<b>86</b>
<b>Fig. 4.1</b>	Dispositivos utilizados durante la fase de aclimatización en cámara de cultivo.....	<b>94</b>
<b>Fig. 4.2</b>	Aspecto de las plantas de mandioca al iniciar y al finalizar la etapa de aclimatización en cámara de cultivo.....	<b>97</b>
<b>Fig. 4.3</b>	Peso seco y porcentaje de materia seca al finalizar la etapa de aclimatización en cámara de cultivo.....	<b>98</b>
<b>Fig. 4.4</b>	Supervivencia a campo de plantas de mandioca aclimatizadas mediante diferentes tratamientos durante el ciclo productivo.....	<b>99</b>
<b>Fig. 4.5</b>	Parámetros de crecimiento de plantas de mandioca a los 165 días de realizada la plantación a campo.....	<b>100</b>
<b>Fig. 4.6</b>	Peso fresco aéreo y radical de plantas de mandioca aclimatizadas bajo diferentes tratamientos y cultivadas a campo.....	<b>101</b>
<b>Fig. 4.7</b>	Distribución del peso fresco aéreo y radical de plantas de mandioca aclimatizadas bajo diferentes tratamientos y cultivadas a campo.....	<b>101</b>
<b>Fig. 4.8</b>	Porcentaje de rendimiento de raíces tuberosas a campo, obtenido a partir de vitroplantas aclimatizadas, en relación a las plantas establecidas mediante estacas caulinares.....	<b>103</b>



## ABREVIATURAS

<b>AF</b>	área foliar
<b>AG<sub>3</sub></b>	ácido giberélico
<b>ANA</b>	ácido naftalenacético
<b>ANOVA</b>	análisis de varianza
<b>BAP</b>	6-bencilaminopurina
<b>CIN</b>	cinetina
<b>cm</b>	centímetro
<b>4-CPA</b>	ácido 4-clorofenoxiacético
<b>2,4-D</b>	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>2,4,5-T</b>	ácido 2, 4, 5 triclorofenoxiacético
<b>2iP</b>	2-isopentenil adenina fosfato
<b>EEA</b>	Estación Experimental Agropecuaria
<b>g</b>	gramo
<b>ha</b>	hectárea
<b>h</b>	hora
<b>IBA</b>	ácido indolbutírico
<b>IE</b>	índice de embriogénesis
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
<b>IPMV</b>	índice de producción de múltiples vástagos
<b>kg</b>	kilogramo
<b>M</b>	molar
<b>m</b>	metro
<b>µm</b>	micrómetro
<b>µmol</b>	micromol
<b>mg</b>	miligramo
<b>mg.l<sup>-1</sup></b>	miligramo por litro
<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>min</b>	minuto
<b>ms</b>	materia seca
<b>MS</b>	medio de Murashige y Skoog (1962)
<b>MV</b>	múltiples vástagos
<b>NOA</b>	ácido naftoxiacético
<b>p/p</b>	peso en peso

<b>PFA</b>	peso fresco de parte aérea
<b>PFR</b>	peso fresco radical
<b>PFT</b>	peso fresco total
<b>PSA</b>	peso seco de parte aérea
<b>PSR</b>	peso seco radical
<b>PST</b>	peso seco total
<b>Picloram</b>	ácido 4 amino 3,5,6 tricloropicolínico
<b>RCV</b>	reguladores de crecimiento vegetal
<b>s</b>	segundo
<b>t</b>	Tonelada
<b>TDZ</b>	Tidiazurón
<b>v/v</b>	volumen en volumen
<b>ZEA</b>	Zeatina

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

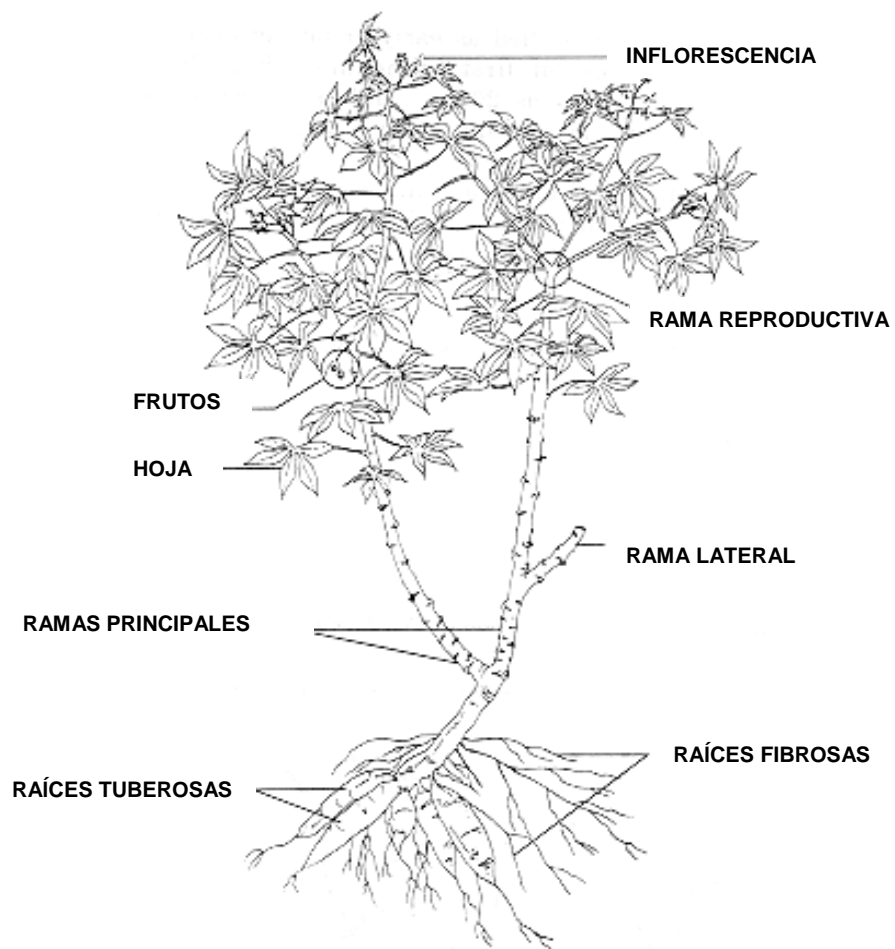
### 1.1. Biología de la mandioca

La mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne, diclino monoico y de ramificación simpodial, cultivado principalmente por la producción de raíces tuberosas que almacenan almidón. Pertenece, junto a aproximadamente 7.200 especies, a la familia Euphorbiaceae, (Ceballos y de la Cruz, 2002). Dentro de esta familia, el género *Manihot* comprende 98 especies de origen americano, de las cuales la mandioca es la de mayor importancia económica (Jennings, 1995; Ceballos y de la Cruz, 2002). Todas las especies estudiadas dentro de este género poseen  $2n=36$  cromosomas (Rogers y Appan, 1973; Domínguez *et al.*, 1983; Bai *et al.*, 1993) y pueden cruzarse entre sí, aunque existen evidencias que indican que en la naturaleza se encuentran reproductivamente aisladas (Jennings, 1995).

El género *Manihot* presenta la mayor diversidad en dos áreas, una al NE de Brasil, considerada el principal centro diversidad, y otra al SO de México (Jennings, 1995). La mandioca es nativa de América del Sur (Olsen y Schaal, 2001), comprendiendo un amplio rango de hábitats, desde el suroeste de Estados Unidos (33° Norte) hasta la Argentina (33° Sur) (Rogers y Appan, 1973).

Las plantas de mandioca miden entre 1 y 5 metros de altura, aunque generalmente no exceden los 3 metros. Sus hojas son pecioladas y simples; poseen una lámina foliar palmada, con 3 a 9 lóbulos, siendo los centrales de mayor tamaño que los laterales. Las hojas maduras son glabras y presentan la cara adaxial cubierta por una cutícula cerosa, mientras que la cara abaxial es opaca y posee la mayoría de los estomas (Domínguez *et al.*, 1983). Los tallos son particularmente importantes ya que son el medio utilizado para la multiplicación vegetativa de este cultivo (Ceballos y de la Cruz, 2002). El tallo maduro es cilíndrico, con un diámetro de 2 a 6 cm. Tanto el diámetro como el color varían con el cultivar y la edad de la planta. Los tallos primarios, luego de cierto tiempo, producen ramificaciones que pueden ser vegetativas o reproductivas (Fig. 1.1).

**Fig. 1.1:** Planta de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (Ekanayake *et al.*, 1997).



Las flores masculinas y femeninas se encuentran en la misma planta. Las flores masculinas son más pequeñas y numerosas y se abren 1 o 2 semanas más tarde que las flores femeninas de la misma inflorescencia (Domínguez *et al.*, 1983). Por tal motivo la polinización es principalmente cruzada, explicando el elevado nivel de heterocigosis detectado en la mandioca (Alves, 2002). Las flores son sencillas, tienen un perianto compuesto por cinco tépalos cuyo color varía dependiendo del cultivar. Los granos de polen se producen en poca cantidad, son grandes, esféricos y pegajosos, lo que facilita la polinización entomófila (Ceballos y de la Cruz, 2002). Los frutos son cápsulas dehiscentes, triloculares, de 1 a 1,5 cm de diámetro con seis aristas longitudinales. La semilla es elipsoidal, carunculada, de testa lisa y color café con moteado gris (Domínguez *et al.*, 1983) (Fig. 1.2 A-D).

El sistema radical de la planta de mandioca presenta una baja densidad de raíces que penetran profundamente en el suelo, lo que le otorga mayor resistencia a los periodos de sequía. Se caracteriza por poseer tanto raíces fibrosas como tuberosas. Las raíces fibrosas pueden alcanzar hasta 2,5 metros de profundidad, permitiéndole a la planta absorber agua y nutrientes, capacidad que pierden al transformarse en raíces tuberosas. Las raíces tuberosas se forman por el engrosamiento secundario de las raíces fibrosas y presentan formas y tamaños muy variables, dependiendo tanto de la variedad como de las condiciones ambientales. Su distribución en el suelo está determinada tanto por factores genéticos como culturales (Domínguez *et al.*, 1983; Wheatley y Chuzel, 1993; Ceballos y de la Cruz, 2002). Estas raíces tienen la capacidad de almacenar en forma de almidón más del 80% de su peso seco, lo que las transforma en los órganos de mayor valor económico (El-Sharkawy, 2003) (Fig. 1.2 E).

El efecto de la interacción variedad - ambiente es muy notable en el caso de la mandioca y determina que la arquitectura típica de una variedad en un ambiente específico cambie drásticamente cuando es plantada en un ambiente diferente, lo que dificulta la descripción morfológica de la especie, así como la descripción varietal (Domínguez *et al.*, 1983; Ceballos y de la Cruz, 2002).

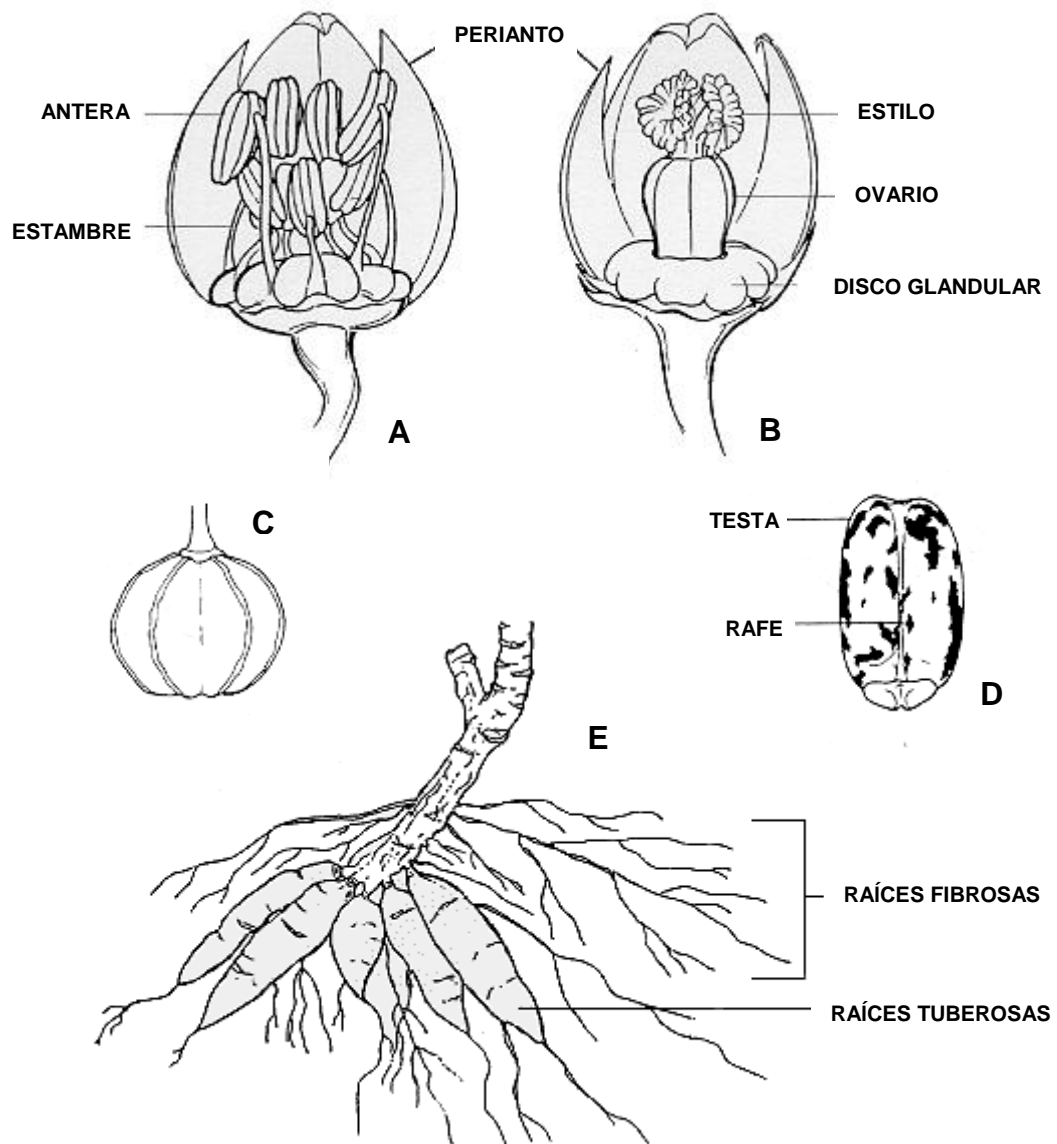
El cultivo de mandioca es altamente productivo en climas cálidos, especialmente en las tierras bajas de los trópicos, donde presenta una elevada eficiencia fotosintética (El-Sharkawy, 2003), aunque también puede producir bien en condiciones climáticas y edáficas adversas (Connor *et al.*, 1981), adaptándose a diferentes regímenes pluviométricos y tolerando prolongados periodos de sequía y suelos ácidos y degradados, siempre que la temperatura media anual supere los 20°C (Puonti-Kaerlas, 1998; El-Sharkawy, 2003).

En este sentido, es importante destacar que la mandioca es una de las especies más eficientes con respecto a la producción de almidón; con rendimientos de hasta 80 t/ha/año en condiciones experimentales, siendo su potencial similar al del maíz (*Zea mays* L.), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), el sorgo (*Sorghum spp*) y el arroz (*Oryza sativa* L.) (Mejía de Tafur, 2002; El-Sharkawy, 2003). Sin embargo, generalmente se la produce bajo condiciones subóptimas, y es en éstas condiciones donde su potencial de rendimiento supera a los demás cultivos, presentando una mayor eficiencia en la conversión de energía por hectárea. Por este motivo, se sostiene que la mandioca tiene la habilidad de producir bajo condiciones en las cuales otros cultivos ni siquiera prosperan (Scott *et al.*, 2000; Mejía de Tafur, 2002).

Algunas de las características morfológicas y fisiológicas que le permiten a esta especie producir en ambientes adversos son: su capacidad para reciclar parte del CO<sub>2</sub> respiratorio en presencia de luz y la ubicación de la mayoría de los estomas en la cara abaxial de las hojas. Además, la mandioca presenta un ciclo fotosintético intermedio entre las plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, aunque sin la típica anatomía Kranz (El-Sharkawy y Cock, 1990). A bajas temperaturas prevalece el ciclo C<sub>3</sub>, mientras que a temperaturas más elevadas lo hace el ciclo C<sub>4</sub>, debido a una mayor actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (El-Sharkawy, 2003).

Por otra parte, este cultivo presenta una elevada eficiencia en el uso del agua con respecto a otras especies, lo que le otorga una ventaja comparativa en condiciones de sequía (Mejía de Tafur, 2002). Una ventaja más con respecto a otros cultivos es la flexibilidad en relación a la época de plantación y cosecha (El-Sharkawy, 2003), lo que le confiere una alta adaptabilidad a gran variedad de ecosistemas.

**Fig. 1.2:** Detalle de *Manihot esculenta* Crantz: (A) Flor masculina; (B) Flor femenina; (C) Fruto; (D) Semilla; (E) Sistema radical (Dibujos extraídos de Ekanayake *et al.*, 1997).



## 1.2. Importancia del cultivo

La mandioca es un cultivo de gran importancia socioeconómica, ya que constituye el alimento básico en la dieta de más de 1000 millones de personas en aproximadamente 90 países tropicales y subtropicales de África, Asia y Latinoamérica (FAO/FIDA, 2000). Ocupa el sexto lugar a nivel mundial como recurso alimenticio y constituye la cuarta fuente más importante de energía alimentaria para los países en desarrollo, después del arroz, el maíz y la caña de azúcar (FAO/FIDA, 2000; Mejía de Tafur, 2002; El Sharkawy, 2003; FAO, 2008), siendo en muchos de ellos, además, la fuente de energía más económica.

Si bien en las dos últimas décadas, debido a su creciente importancia a nivel industrial, la mandioca comenzó a posicionarse como un cultivo de renta en países de Asia, África y Latinoamérica (Janssen, 1986; Konjing, 1989; Nweke *et al.*, 1994; Escobar *et al.*, 2006), la mayor parte de la producción continúa siendo realizada por pequeños agricultores, generalmente en áreas agrícolas marginales (Ceballos, 2002). Las unidades típicas de producción y procesamiento a pequeña escala requieren relativamente pocos insumos de capital, pero son altamente intensivas en cuanto al uso de mano de obra. Ésto es deseable, sobre todo en comunidades rurales con altos niveles de desempleo o subempleo. Para estos productores el cultivo de la mandioca es vital, ya que contribuye tanto a su alimentación como a la generación de ingresos (Buitrago, 1990; Puonti-Kaerlas *et al.*, 1999).

La flexibilidad con respecto al momento de plantación y cosecha posiciona a la mandioca como un cultivo sumamente importante en el marco de las estrategias de seguridad alimentaria, ya que es posible realizar cosechas parciales, permitiendo que el resto de las plantas continúen creciendo y sean cosechadas cuando se lo requiera (Puonti-Kaerlas, 1998; Puonti-Kaerlas *et al.*, 1999; Ihemere, *et al.*, 2006). Además, debido a esa flexibilidad y a que el procesamiento se realiza principalmente en la estación seca, los mayores requerimientos de mano de obra para este cultivo se presentan en los periodos de mínimo requerimiento de las demás labores agrícolas (Buitrago, 1990).

A nivel mundial, en el año 2007 se produjeron 214 millones de toneladas de raíces tuberosas de mandioca, siendo África responsable del 50% de la producción, Asia del 30% y América Latina del 20% restante (FAO, 2009). En la Argentina se producen 200.000 toneladas anuales, con un rendimiento promedio de 12 toneladas de raíz fresca por hectárea y un rendimiento potencial de 40 t/ha.



Las provincias productoras, en orden de importancia, son: Misiones (76%), Formosa (12%), Corrientes (10%) y Chaco (2%), siendo un cultivo realizado principalmente por pequeños productores y a escala familiar. (De Bernardi, 2001).

En las últimas décadas, la producción de mandioca ha crecido a ritmo constante, debido al aumento del área cultivada y a la introducción de variedades nuevas con alto rendimiento (Puonti-Kaerlas, 1998). El aumento de la superficie cultivada, especialmente en África, es una respuesta a la escasez, el hambre y la sequía, confirmando de este modo la importancia de la mandioca como un cultivo básico en las estrategias de seguridad alimentaria (Ihemere, *et al.*, 2006; FAO, 2008).

### **1.3. Usos**

La mandioca se caracteriza por una gran diversidad de usos. Se cultiva principalmente por sus raíces amiláceas, aunque en algunas zonas se utiliza además el follaje, al momento de cosechar las raíces (Ceballos, 2002). Aproximadamente el 70% de la producción mundial de raíces se destina para el consumo humano, ya sea fresca o procesada de diferentes maneras. El 30% restante se utiliza en la alimentación animal o en la elaboración de más de 300 productos industriales, tales como almidón o subproductos de éste como: gomas, dextrinas, glucosa, dextrosa y alcohol (Balagopalan, 2002; Ceballos, 2002; El-Sharkawy, 2003).

Los patrones de uso de la mandioca varían ampliamente de una región a otra. En las zonas de minifundio y en el caso de cultivos de subsistencia, las raíces se usan principalmente como un producto básico en la alimentación a nivel local y en menor escala se destinan a la producción de almidón. En las zonas donde predomina la producción comercial, las raíces se transportan en forma fresca hacia los centros de consumo o se procesan localmente para la obtención de harinas o almidón (Buitrago, 1990).

Las raíces tuberosas constituyen el valor económico más importante del cultivo de mandioca. Su valor nutricional es principalmente calórico, siendo su contenido de proteínas, minerales y vitaminas generalmente bajo (Yeoh y Truong, 1996; Sánchez y Alonso, 2002; Balagopalan, 2002). Sin embargo, las grandes diferencias en el contenido de proteínas (0,95% a 6,42%) detectadas en 149 accesiones sugieren que una considerable proporción de las mismas tendría bases genéticas, existiendo excelentes posibilidades de incrementar el contenido de

proteínas en las raíces de mandioca, utilizando técnicas tradicionales de mejoramiento genético (Ceballos *et al.*, 2005).

El principal componente de la materia seca de la raíz es el almidón, que representa el 96% de los carbohidratos presentes. Aunque actualmente se han reportado variedades colectadas en la Amazonia, caracterizadas por una mayor concentración de glucosa (Carvalho *et al.*, 2004) en unos casos y de carotenoides en otros (Iglesias *et al.*, 1997).

Las hojas poseen un importante contenido nutritivo, con elevados niveles proteicos, que varían en los diferentes cultivares entre 18 y 22% en base seca (Buitrago, 1990). Particularmente, las hojas tiernas presentan buena disponibilidad de minerales y vitaminas, especialmente carotenos y vitamina C.

Tanto las raíces como las hojas de las diferentes variedades de mandioca presentan concentraciones variables de glucósidos cianogénicos, razón por la cual requieren una preparación bastante laboriosa, para garantizar que su consumo sea seguro (Puonti-Kaerlas *et al.*, 1999; Ceballos, 2002).

#### **1.4. Principales problemas y limitantes del cultivo**

A pesar de su enorme potencial productivo, su destacable adaptación a una gran diversidad de ambientes, su reconocida tolerancia a ciertos factores bióticos y abióticos adversos para la producción y su diversidad de usos, la mandioca no ha logrado desarrollar plenamente todo su potencial. Ésto se debe, entre otras causas, a las prácticas agrícolas inadecuadas, al ataque de plagas y enfermedades que a nivel mundial pueden causar pérdidas del 20 al 50% y a nivel local pueden conducir a la pérdida total del cultivo (Puonti-Kaerlas, 1998) y a la escasez de material de propagación certificado (López, 2002; Bellotti *et al.*, 2002). Otros problemas, aún no resueltos, son la baja concentración de proteínas en las raíces, el rápido deterioro poscosecha de las mismas y su naturaleza cianogénica (Puonti-Kaerlas, 1998; Siritunga, 2002; Ceballos y de la Cruz, 2002; Ihemere, 2003).

##### **1.4.1. Deterioro poscosecha de las raíces**

El deterioro poscosecha que sufren las raíces es una limitante importante para su comercialización como producto fresco. Si bien las raíces de mandioca pueden mantenerse en la planta durante años, una vez cosechadas deben

procesarse rápidamente para evitar su deterioro. El deterioro fisiológico comienza generalmente a las 24 horas y es seguido, entre los cinco a siete días, por un deterioro secundario causado por microorganismos, lo que las torna inaceptables tanto para uso humano como animal o industrial (Puonti-Kaerlas, 1998; Siritunga, 2002; Sánchez y Alonso, 2002).

#### **1.4.2. Cianogénesis**

Otro problema importante en este cultivo, es la presencia de cantidades variables de glucósidos cianogénéticos (linamarina y lotaustralina) en la totalidad de la planta, con excepción de las semillas (Siritunga, 2002). Estos compuestos se hidrolizan cuando los tejidos vegetales son dañados y producen ácido cianhídrico, en dosis que pueden ser desde inocuas hasta mortales (Puonti-Kaerlas, 1998).

Dependiendo de los niveles de glucósidos cianogénéticos presentes, se las clasifica en mandiocas dulces, de bajo potencial cianogénico (menos de 50 mg de ácido/kg de raíz) y mandiocas bravas o amargas, con elevado potencial cianogénico (más de 50 mg de ácido/kg de raíz). Éstas últimas no son recomendables para el consumo humano (Domínguez *et al.*, 1983; Ceballos y de la Cruz, 2002).

#### **1.4.3. Escasez de material de propagación**

La mandioca es una especie diclino monoica, de polinización cruzada, ya que las flores femeninas de un racimo se abren antes que las masculinas (protoginia), por lo que cada individuo presenta un alto grado de heterocigosis (Domínguez, *et al.*, 1983; Alves, 2002; Ceballos y de la Cruz, 2002). Ésta es una de las principales razones por las que el cultivo de mandioca es tradicionalmente propagado en forma agámica, mediante estacas caulinarias (Cock, 1989; López, 2002; El-Sharkawy, 2003).

Un inconveniente de la propagación vegetativa convencional es que facilita la rápida diseminación de enfermedades, lo cual afecta la calidad y cantidad del material de plantación y por lo tanto, el rendimiento del cultivo (Puonti-Kaerlas, 1998; Bellotti *et al.*, 2002). A esto se suma la baja tasa de multiplicación (López, 2002), ya que una planta desarrollada es capaz de producir solamente unas 10 a 20 estacas por año (Roca, 1984; Smith *et al.*, 1986), dificultando la multiplicación y difusión de nuevos cultivares y constituyendo un serio obstáculo para los planes de

mejoramiento genético que usualmente requieren de la rápida multiplicación de nuevas líneas. Se debe destacar que el cultivo de estacas de uno y dos nudos en invernáculo ha permitido aumentar considerablemente esos valores, aunque continúan siendo muy inferiores a los obtenidos por las técnicas de multiplicación *in vitro* (Smith *et al.*, 1986; Roca *et al.*, 1991).

Otros problemas que debe enfrentar la propagación convencional de mandioca son: el bajo potencial de almacenamiento de las ramas estaqueras, que se deterioran por deshidratación, pérdida de reservas por brotación y ataque de plagas y patógenos; el costo de la manipulación y transporte de las ramas estaqueras y la falta de sistemas organizados que faciliten el abastecimiento a los productores con material de plantación de calidad (López, 2002).

Ante esta situación, se plantea como alternativa la propagación de mandioca mediante el cultivo *in vitro*, cuyo potencial supera ampliamente el de las técnicas convencionales y las técnicas mejoradas (en invernáculo), permitiendo multiplicar los clones seleccionados para producir material libre de virus y enfermedades, ya sea para intercambio de germoplasma, para uso como “semilla básica” o para propagar masivamente los clones élite, posibilitando su trasplante directamente a campo (Roca *et al.*, 1991).

En este contexto, la biotecnología y dentro de ella el cultivo de tejidos, pueden contribuir a la solución de estos problemas beneficiando tanto a los productores como a los consumidores (Fregene *et al.*, 2002).

### **1.5. Propagación de mandioca mediante cultivo *in vitro* de tejidos**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales hace referencia al crecimiento y multiplicación de células, tejidos y órganos de plantas en medios definidos, en condiciones asépticas y en ambiente controlado. Desde el punto de vista de su aplicación en la agronomía, el cultivo de tejidos brinda herramientas muy valiosas para: 1) la propagación masiva y rápida de plantas selectas (micropropagación); 2) la producción y bioconversión de compuestos útiles; 3) el incremento de la variabilidad genética; 4) el saneamiento de plantas y 5) la conservación e intercambio de germoplasma. La mayoría de estas aplicaciones, así como la obtención de plantas mejoradas mediante técnicas de ingeniería genética y biotecnología requieren del desarrollo de sistemas *in vitro* que permitan la regeneración de plantas completas como producto final (Mroginski y Roca, 1991).

Una de las aplicaciones más importantes es la micropropagación, que según Murashige (1974) se lleva a cabo mediante tres pasos fundamentales: 1) el establecimiento aséptico del cultivo, 2) su multiplicación y 3) el enraizamiento previo a la preparación para su trasplante al suelo.

La regeneración de plantas en sistemas *in vitro*, ocurre por dos vías: una vía organogénica y una vía embriogénica, basadas en el principio de totipotencialidad enunciado por Haberlandt (1902). Cuando se brinda el estímulo adecuado, las células somáticas pueden formar embriones somáticos, raíces o vástagos. Los tres patrones de regeneración muestran similitudes, ya que atraviesan tres fases análogas: una primera *fase de desdiferenciación*, durante la cual los tejidos adquieren la competencia para responder al estímulo embriogénico u organogénico. Esta fase puede involucrar un periodo de crecimiento del callo si la regeneración es indirecta. En cambio cuando es directa, los tres patrones de regeneración se inician a partir de las células de los distintos tejidos. Luego hay una *fase de inducción*, durante la cual las células son determinadas para formar órganos específicos, ya sea, raíces, vástagos o embriones somáticos. Por último ocurre una *fase de expresión*, donde se produce el desarrollo y crecimiento de un órgano determinado (raíz o vástago) o de un embrión (De Klerk *et al.*, 1997).

El proceso de regeneración de plantas, ya sea por vía organogénica o embriogénica, es afectado por diferentes factores (Villalobos y Thorpe, 1991):

- a- *El explante*: afecta la regeneración de acuerdo al tipo de tejido u órgano (hojas, yemas, meristemas, embriones, cotiledones, anteras, polen, etc) y al estado de desarrollo del tejido (juvenil o maduro) de donde fueron extraídos (Vila, 2006). El tamaño es otro factor a considerar, ya que en general, cuanto menor es el tamaño del explante a partir del cual se quiere regenerar una planta, mayor es la complejidad del medio que se debe utilizar (Mroginski y Roca, 1991).
- b- *El estado fisiológico de la planta dadora de explantes*: influye significativamente en la capacidad morfogenética del explante (Villalobos y Thorpe, 1991).
- c- *El medio de cultivo*: Gamborg *et al.*, (1976), sostienen que el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física (sólido o líquido). Existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, agentes gelificantes (en los medios semisólidos) y

otros componentes, entre los que se encuentran complejos naturales de composición indefinida (Mroginski y Roca, 1991).

d- *Las condiciones físicas de incubación:* entre ellos: la forma física del medio de cultivo (semisólidos o líquidos), el pH, la humedad, la luz (intensidad, cantidad de horas de luz y calidad), la temperatura y el medio gaseoso (Vila, 2006).

### **1.5.1. Organogénesis *in vitro***

La organogénesis comprende la formación y desarrollo *in vitro* de órganos tales como raíces y vástagos a partir de un explante (Minocha y Jain, 2000), ya sea en forma directa o indirecta (Litz y Jarret, 1991). Dado que los órganos regenerados son unipolares, se requieren dos etapas de inducción organogénica diferentes para regenerar una planta completa (una para inducir la caulogénesis y otra para inducir la rizogénesis) (Phillips, 2004).

La organogénesis en mandioca ha sido obtenida principalmente a partir del cultivo de: meristemas apicales (Karthá, *et al.*, 1974; Rey y Mroginski, 1978; Roca, 1984), segmentos uninodales con yemas axilares (Roca, 1984; Konan *et al.*, 1994a; 1997; Pedroso de Oliveira *et al.*, 2000; Albarrán *et al.*, 2003), embriones cigóticos inmaduros (Fregene *et al.*, 1999; Konan *et al.*, 1994a), hojas (Mussio *et al.*, 1998) y cotiledones de embriones somáticos inmaduros (Li *et al.*, 1998; Guohua 1998; Hankoua *et al.*, 2005).

La regeneración de plantas de mandioca a partir de meristemas apicales combinada con la termoterapia ha resultado sumamente útil para obtener plantas libres de ciertos organismos patógenos. Por otra parte el uso de diferentes técnicas de cultivo *in vitro* que permiten la multiplicación masiva de plantas ha facilitado la producción de "semilla básica" de clones seleccionados y la propagación a gran escala de clones elite para transplantar directamente a campo (Roca *et al.*, 1991).

### **1.5.2. Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática, adventicia o asexual se refiere al proceso de inducción y desarrollo de embriones a partir de células que no son producto de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Un embrión somático es una estructura bipolar e independiente, sin conexión vascular con el tejido que lo originó (Ammirato, 1987). Si bien su origen es diferente, los embriones somáticos son estructuralmente similares a los embriones cigóticos y comparten con ellos varias

características importantes, entre las que se encuentra su capacidad de convertirse en plantas completas sin separación entre las fases de enraizamiento y desarrollo del vástago (Ammirato, 1983). Esto se debe a que al ser estructuras bipolares son inducidas por una única señal (Phillips, 2004). Este proceso es considerado como el sistema potencialmente más eficiente desde el punto de vista de la micropropagación, ya que permitiría obtener cantidades virtualmente ilimitadas de plantas (Villalobos y Thorpe, 1991). A esto se suma la posibilidad de generar semillas sintéticas a partir de los embriones somáticos.

En mandioca, la competencia embriogénica se restringe a los tejidos meristemáticos y embrionarios, y los embriones somáticos sólo se han obtenido en medios de cultivo adicionados con diferentes tipos y concentraciones de auxinas y en un número limitado de explantes (Puonti-Kaerlas, 1998), tales como: cotiledones y ejes embrionarios de embriones cigóticos (Stamp y Henshaw, 1982; 1987a; Konan *et al.*, 1994b), hojas inmaduras (Stamp y Henshaw, 1987b; Szabados *et al.*, 1987; Mathews *et al.*, 1993; Raemakers *et al.*, 1993a; 1993b; Mroginski y Scocchi, 1993; Sofiari *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2003, Ihemere, 2003), meristemas y ápices caulinares (Stamp y Henshaw, 1987b; Szabados *et al.*, 1987), anteras (Mukherjee, 1995) e inflorescencias inmaduras (Woodward y Puonti-Kaerlas, 2001). Los embriones primarios se desarrollan en embriones maduros con cotiledones verdes y, eventualmente se convierten en plantas (Siritunga, 2002).

Además, ha sido posible establecer sistemas de embriogénesis somática cíclica, que se basan en la inducción de nuevos embriones somáticos (embriones somáticos secundarios) a partir del subcultivo continuo de embriones somáticos primarios en medios suplementados con auxinas (Stamp y Henshaw, 1987a; Raemakers *et al.*, 1993b; 1993c).

Es importante destacar que la embriogénesis somática en mandioca es altamente dependiente del genotipo de las plantas dadoras de explantes (Szabados *et al.*, 1987; Mroginski y Scocchi, 1993; Taylor *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 2003; Atehnkeng *et al.*, 2006) y que los mayores valores de eficiencia y conversión a planta se han obtenido en muy pocos de los casi 6000 clones de mandioca conservados actualmente en el Banco de Germoplasma *in vitro* del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

### **1.5.3. Aclimatización de las plantas micropropagadas**

La micropropagación es muy utilizada para la multiplicación a gran escala de una amplia variedad de especies vegetales. Sin embargo, muchas veces ésta aplicación se ve restringida por el alto porcentaje de plantas que se pierden o se dañan cuando se transfieren a las condiciones *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999).

La aclimatización consiste en el paso gradual de las vitroplantas del ambiente *in vitro* a las condiciones *ex vitro* y se la considera una de las fases críticas de la micropropagación. Las condiciones del cultivo *in vitro* resultan en la formación de plantas con características morfológicas, anatómicas y fisiológicas alteradas (Pospíšilová *et al.*, 1999) que deben revertirse durante el periodo de aclimatización.

Durante esta etapa, las plantas pasan de experimentar condiciones de alta humedad relativa y bajos niveles de intensidad lumínica a los niveles comparativamente menores de humedad relativa y mayores de intensidad lumínica presentes en el invernáculo o en el campo (Jorge *et al.*, 2000). A esto se suman los daños mecánicos ocasionados a las raíces (Segovia *et al.*, 2002); la modificación en las condiciones nutricionales, dado que las plantas deben pasar de un estado heterótrofo a un estado autótrofo, con diferentes niveles de nutrientes y la modificación en las condiciones de asepsia, ya que en esta etapa las plantas pueden quedar expuestas al ataque de microorganismos saprofitos y eventualmente fitopatógenos (Grattapaglia y Machado, 1990; Vilchez *et al.*, 2007).

Existen trabajos que reportan una elevada mortandad para la mandioca en la etapa de aclimatización, pudiendo llegar al 95% si no se realiza con la tecnología adecuada (Segovia *et al.*, 2002). En este sentido, los sustratos utilizados ejercen una gran influencia en la arquitectura del sistema radical y en las asociaciones biológicas que se establecen, afectando el estado nutricional y la translocación de agua en el sistema suelo-planta-atmósfera (De Rezende *et al.*, 2000).

### **1.6. Descripción del problema**

A pesar de su gran potencial productivo y de su importancia mundial en el marco de la seguridad alimentaria, el cultivo de mandioca presenta algunos inconvenientes tales como la susceptibilidad al ataque de algunas plagas y enfermedades, la duración del ciclo de cultivo, la baja concentración de proteínas en las raíces, su naturaleza cianogénica y su rápido deterioro postcosecha; además de la escasez de material de propagación saneado para ser plantado a



campo. En este sentido, la biotecnología puede aportar herramientas para contribuir a solucionar algunos de los inconvenientes mencionados. Pero para que ello sea posible, es necesario contar con sistemas *in vitro* que posibiliten la regeneración de plantas ya sea mediante organogénesis o embriogénesis somática.

Lo expuesto previamente sumado a la gran variabilidad en las respuestas embriogénicas y organogénicas de distintos cultivares de mandioca reportadas por diferentes autores y la escasa información existente sobre el potencial de micropropagación de los cultivares utilizados en Argentina, fundamentan la necesidad de evaluarlos y desarrollar y/o mejorar los procedimientos que posibiliten su regeneración.

En este contexto, la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) El Colorado, Formosa, Argentina, posee un banco de germoplasma *ex vitro* de mandioca que nuclea gran parte de los cultivares utilizados en el NE Argentino. La creciente demanda de material de calidad y la baja tasa de multiplicación del cultivo por los sistemas tradicionalmente usados, hace necesario poner a punto o desarrollar protocolos para la propagación a gran escala de los cultivares de mayor interés.

## **1.7. Hipótesis**

Es posible la regeneración *in vitro* de plantas de clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en Argentina por organogénesis y/o embriogénesis somática, mediante el estudio de factores tales como: plantas dadoras de explantes, tipos de explantes, medios de cultivo y tiempo de inducción.

## **1.8. Objetivos**

### **1.8.1. Objetivo general**

- Establecer procedimientos para la micropropagación de clones de mandioca cultivados en Argentina, mediante organogénesis y/o embriogénesis somática.

### **1.8.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el comportamiento *in vitro* de clones de mandioca cultivados en la Argentina en las etapas de establecimiento y multiplicación.
- Evaluar el potencial embriogénico de clones de mandioca cultivados en la Argentina.
- Estudiar el efecto de diferentes medios de cultivo, tipos de explante y tiempos de inducción sobre la embriogénesis somática.
- Determinar las condiciones necesarias para una exitosa aclimatización de las plantas de mandioca cultivadas *in vitro*.

## CAPÍTULO 2

### ORGANOGENÉISIS EN CLONES DE MANDIOCA CULTIVADOS EN ARGENTINA

#### 2.1. Introducción

En los últimos años, ha aumentado el interés en el cultivo de mandioca, debido a su importancia en el marco de la seguridad alimentaria de millones de personas en Asia, África y Latinoamérica, sumada a la gran diversidad de usos que pueden darse a la totalidad de la planta y a la capacidad de esta especie para producir en un amplio rango de condiciones edafo-climáticas (Puonti-Kaerlas, 1998).

No obstante, el incremento del área de cultivo se ha visto limitado por la escasez de material de plantación saneado, siendo el método tradicional de propagación mediante estacas caulinarias una de las principales causas de este problema (Thro *et al.*, 1999). Si bien éste es un método de propagación sencillo y económico, que al mismo tiempo permite conservar las características varietales, presenta tasas de multiplicación muy bajas (10 a 20 estacas por año por cada planta), y es un importante medio de diseminación de plagas y enfermedades (Roca y Jayasinghe, 1982; Roca, 1984; Garsaball y Cuevas, 2006), lo que afecta el crecimiento y rendimiento del cultivo (Albarrán *et al.*, 2003). Por lo tanto, si se quiere garantizar el desarrollo del cultivo de mandioca, es necesario multiplicar plantas correspondientes a líneas mejoradas o a cultivares de interés, libres de enfermedades y de patógenos sistémicos, a fin de ponerlas a disposición de los agricultores (Smith *et al.*, 1986; Puonti-Kaerlas, 1998; Thro *et al.*, 1999).

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

Los requerimientos para lograr una multiplicación más rápida de clones élite se pueden satisfacer mediante la inducción de vástagos múltiples en medios con diferentes citocininas, a partir de ápices caulinares (Roca, 1984; Puonti-Kaerlas, 1998) o de yemas axilares (Smith *et al.*, 1986; Konan *et al.*, 1997). La adición de altas dosis de BAP al medio de cultivo sólo o en combinación con bajas cantidades de auxinas puede utilizarse para romper la dominancia apical, permitiendo de este modo, la formación de un cultivo en roseta con proliferación de múltiples vástagos (Puonti-Kaerlas, 1998; Smith *et al.*, 1986). Según Roca *et al.*, (1991) la obtención de múltiples vástagos a partir de ápices caulinares permitiría producir hasta  $65 \times 10^4$  estacas en 18 meses.

La posibilidad de encapsular ápices, yemas axilares o segmentos uninodales de mandioca en alginato de calcio, complementaría las técnicas mencionadas anteriormente, constituyendo un modo promisorio de obtener semillas sintéticas de calidad, libres de plagas y enfermedades y en un corto período de tiempo. El crecimiento del explante encapsulado puede ser promovido mediante la adición a la cápsula de nutrientes, fungicidas, reguladores de crecimiento vegetal y/o microorganismos benéficos. Actualmente el concepto de semilla sintética ha sido ampliado, consistiendo no sólo en embriones somáticos, sino también en meristemas apicales, yemas axilares, segmentos nodales u otros tejidos artificialmente encapsulados, que pueden ser sembrados tanto bajo condiciones *in vitro* como *ex vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Rai *et al.*, 2009). La técnica de encapsulación de brotes, yemas y ápices ha sido utilizada en la propagación de varias especies: *Manihot esculenta* (Barrueto Cid *et al.*, 2009), *Morus indica* (Bapat *et al.*, 1987), *Malus pumila* (Piccioni y Standardi, 1995; Piccioni, 1997), *Actinidia deliciosa*, *Betula pendula* y *Rubus spp* (Piccioni y Standardi, 1995), *Musa spp* (Ganapathi *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 1995), *Spilanthes acmella* (Singh *et al.*, 2009), *Solanum melongena* (Huda *et al.*, 2007) y *Psidium guajava* (Rai *et al.*, 2008). Esta técnica ofrece posibilidades para la propagación a campo o en invernáculo de especies comercialmente importantes, especies raras y/o en peligro de extinción, genotipos élite, plantas sin semilla, etc. Además, el pequeño tamaño, la fácil manipulación, la disponibilidad y la uniformidad genética favorecen su uso en el intercambio de germoplasma y en la conservación a corto, mediano y largo plazo (Piccioni y Standardi, 1995; Rai *et al.*, 2009).

Si bien los costos de producción de las plantas aumentan con la implementación de estas técnicas, se cuenta con la potencialidad de producir

grandes volúmenes de plantas de calidad, cientos de veces más rápido que con las técnicas tradicionales y en la época del año en que se lo requiera (Roca, 1984; Thro *et al.*, 1999; Ceballos, 2002).

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado consistió en diferentes clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), provenientes del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado (Formosa, Argentina), detallados en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1:** Procedencia y principales características de los clones de mandioca del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado, Formosa, utilizados en los ensayos de organogénesis.

Clon	Procedencia	kg/ Planta	Nº Raíces		kg Raíz		Altura de Planta	Color de raíz
			Com	Desc	Com	Desc		
EC22	Col Drifin Porá Ctes	2,200	28	5	6,6	0,75	2,85	Blanca
EC 107	EEA EC Mariño	3,030	25	9	9,1	1,00	2,80	Marrón
EC44	Picada Sur Javier, Mnes	3,300	26	11	11,1	1,60	2,45	Blanca
EC42	Paraje Lopez Misiones	5,330	37	5	16	0,70	2,25	Marrón
EC 6	Monte Caseros, Ctes	2,930	17	6	8,8	0,60	3,00	Blanca
EC20	Ing. Juárez, Fsa	1,760	17	9	5,3	1,00	2,30	Marrón
EC 88	Cahuare Misiones	3,700	19	5	11,1	0,55	2,00	Marrón
EC 19	Paso Ita, Ctes	1,730	12	5	5,2	0,80	1,60	Blanca
EC26	Col San Justo, Ctes	1,660	17	7	5,0	0,65	1,50	Marrón
EC24-10	Col Drifin Pora, Ctes	1,916	17	11	5,75	1,50	1,50	Marrón
EC29-9	Col San Justo, Ctes	2,030	13	6	6,1	1,10	1,70	Marrón
EC 3	Col Santa Ana, Ctes	3,160	21	7	9,5	1,00	2,10	Marrón
EC90	Cahuare Misiones	4,200	27	5	12,6	0,80	1,90	Marrón
EC 157	Manantiales, Ctes	2,400	19	3	7,8	0,30	1,90	Marrón
EC 165	Manantiales, raíz bca, Ctes	2,900	22	7	8,7	1,00	1,80	Blanca
EC 161	Yrigoyen, Fsa	2,660	22	6	8,0	0,70	1,90	Marrón
EC 110	Pomberí	2,730	24	10	8,2	0,90	2,00	Blanca
EC 111	Campeona C.B.	2,860	18	10	8,6	1,30	1,80	Marrón
EC74	Km 1124 San Javier, Ctes	1,800	20	18	5,4	1,30	2,05	Blanca
EC 113	EEA, E.C., Negra, Fsa	1,860	17	3	5,6	0,20	1,80	Blanca
EC23	Drifin Porá	0,900	16	3	2,7	0,20	1,30	Blanca
EC118	C.A.6 3, Misiones	2,160	18	2	6,5	0,30	1,80	Blanca
EC124	Yerutí	3,860	20	5	11,6	0,60	2,20	Blanca
EC1-1	Col. Sta Ana, Entre Ríos	1,860	16	4	5,6	0,60	3,00	Blanca
EC121	C.A. 25.1, Misiones	3,000	24	4	9,0	0,60	2,90	Marrón
EC163	Manantiales, Ctes	1,160	12	5	3,5	1,60	2,20	Blanca
EC27-4	San Justo, Ctes	3,730	21	0	11,2	0	2,00	Marrón
EC 162	Sin caracterización	-	-	-	-	-	-	-

**Com:** comercial. **Desc:** descarte. **Fuente:** EEA INTA El Colorado. Datos no publicados.

### **2.2.2. Evaluación del establecimiento y multiplicación *in vitro* de clones de mandioca**

El material vegetal consistió en 28 clones de *Manihot esculenta* Crantz provenientes del Banco de Germoplasma del EEA INTA El Colorado (Tabla 2.1).

Se utilizaron como explantes segmentos uninodales provenientes de plantas de mandioca cultivadas en maceta y mantenidas bajo umbráculo. Los explantes fueron desinfectados sumergiéndolos en etanol al 70% durante 1 minuto y luego en hipoclorito de sodio al 1,1% más 0,05% (v/v) de Triton X-100<sup>®</sup> durante 20 minutos, siendo posteriormente enjuagados 3 veces con agua destilada estéril.

Los segmentos uninodales, de aproximadamente 1 cm de longitud, se cultivaron asépticamente en el medio basal desarrollado por Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH y/o HCl y se solidificó con 0,75% de agar (Agar Sigma<sup>®</sup> A1296). Se dispensaron 15 ml de medio de cultivo en tubos de ensayo de 50 ml que fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados en autoclave a 1 atmósfera de presión (120°C) durante 20 minutos. Se cultivó un segmento uninodal por tubo, incubándose luego en un cuarto climatizado a 27±2°C con un fotoperíodo de 14 h (irradiancia de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Al cabo de 30 días de realizada la introducción *in vitro* del material, se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de explantes infectados, porcentaje de explantes establecidos, porcentaje de explantes brotados, longitud de vástagos, número de nudos, porcentaje de enraizamiento y número de raíces por planta. Se consideró explante establecido a todo aquel explante desinfectado y vivo a los 30 días de cultivo.

Posteriormente, las plantas regeneradas fueron sometidas a un primer ciclo de multiplicación, cultivando segmentos uninodales en MS suplementado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. Luego de 30 días, se registraron nuevamente los valores de las variables evaluadas en la etapa anterior.

### **2.2.3. Evaluación del efecto de diferentes citocininas en la morfogénesis caulinar y en la regeneración de plantas de mandioca**

Se utilizaron como explantes segmentos uninodales menores a 7 mm de longitud, provenientes de plantas de mandioca del clon EC118, de dos meses de

edad, cultivadas *in vitro* en el medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> e incubadas en un cuarto climatizado a 27±2°C con un fotoperíodo de 14 h (irradiancia de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Se seleccionó este clon porque habiendo presentado los mejores valores en los ensayos de embriogénesis somática, resultaba interesante conocer su respuesta a diferentes citocininas con vistas a la generación de múltiples vástagos, ya que los ápices caulinares fueron uno de los explantes utilizados en los ensayos de embriogénesis somática sobre los que brindan detalles en el capítulo siguiente.

Los segmentos uninodales se cultivaron en posición horizontal, en diferentes medios de cultivo, constituidos por el medio basal MS, suplementado con 2iP, CIN, ZEA, BAP o TDZ en diferentes concentraciones (1, 5 o 10 mg.l<sup>-1</sup>) (Tabla 2.2). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH y/o HCl y se solidificó con 0,75% de agar (agar Sigma® A1296). Finalmente los tratamientos se incubaron en las condiciones anteriormente descritas.

**Tabla 2.2:** Medios de cultivo utilizados para evaluar el efecto de las citocininas sobre la morfogénesis caulinar y la regeneración de plantas de mandioca.

Tratamiento	Medio
<b>T<sub>1</sub> (control)</b>	MS
T <sub>2</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> 2iP
T <sub>3</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> 2iP
T <sub>4</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> 2iP
T <sub>5</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> CIN
T <sub>6</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> CIN
T <sub>7</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> CIN
T <sub>8</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> Zea
T <sub>9</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> Zea
T <sub>10</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> Zea
T <sub>11</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> BAP
T <sub>12</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> BAP
T <sub>13</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> BAP
T <sub>14</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> TDZ
T <sub>15</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> TDZ
T <sub>16</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> TDZ

En cada tratamiento se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de brotación, porcentaje de yemas hinchadas (yemas axilares que aumentaron su tamaño, pero no diferenciaron brotes), porcentaje de enraizamiento, número total de nudos (considerando los nudos de todos los vástagos producidos por cada explante), longitud de vástagos, porcentaje de explantes que produjeron múltiples vástagos, cantidad de vástagos obtenidos por explante y porcentaje de plantas que presentaron abscisión foliar a los 30 y 50 días de cultivo.

#### **2.2.4. Evaluación del efecto del BAP sobre la formación de múltiples vástagos en mandioca**

En este ensayo se utilizaron como explantes segmentos uninodales menores a 7 mm de longitud, provenientes de plantas de mandioca de dos meses de edad de 7 clones seleccionados por su respuesta a nivel de crecimiento en el ensayo de multiplicación *in vitro* (apartado 2.2.2), los cuales se agruparon en: clones de elevado crecimiento (EC 20 y EC 107), de crecimiento intermedio (EC 74, EC 165 y EC 118) y de crecimiento reducido (EC 44 y EC 113). Las plantas dadoras de explantes fueron cultivadas *in vitro* en el medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> e incubadas en un cuarto climatizado a 27±2°C con un fotoperíodo de 14 h (irradiancia de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Los segmentos uninodales se cultivaron en posición horizontal, en medio basal MS, suplementado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (el medio que mejor resultado produjo en la generación de múltiples vástagos en la experiencia realizada previamente) y solidificado con 0,75% de agar (agar Sigma<sup>®</sup> A1296), incubándose luego en las condiciones anteriormente descritas. A los 30 días de iniciado el ensayo, se separaron los nuevos vástagos formados y se transfirieron a MS sin RCV y a MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> a fin de evaluar su enraizamiento.

En cada tratamiento se analizaron las siguientes variables: porcentaje de brotación, porcentaje de enraizamiento, número total de nudos, longitud de vástagos, porcentaje de explantes que produjeron múltiples vástagos, cantidad de vástagos obtenidos por explante a los 30 días de cultivo y porcentaje de enraizamiento de los vástagos una vez separados. Además se calculó un índice de producción de múltiples vástagos (IPMV) combinando las variables porcentaje de explantes que produjeron múltiples vástagos (MV) y número de vástagos por explante:



$$\text{IPMV} = \frac{\% \text{ de explantes que produjeron MV} \times \text{N}^\circ \text{ de vástagos por explante}}{100}$$

### **2.2.5. Encapsulación de segmentos uninodales de mandioca**

Se utilizaron como explantes segmentos uninodales menores a 5 mm de longitud, correspondientes a la porción apical (nudos 3, 4 y 5 comenzando desde el ápice), provenientes de plantas de mandioca del clon EC 118, de dos meses de edad, cultivadas *in vitro* en el medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> e incubadas en un cuarto climatizado a 27±2°C con un fotoperíodo de 14 h (irradiancia de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Se utilizó este clon, debido a su rápida brotación en medios adicionados con 2-IP, uno de los RCV evaluados en este ensayo.

La encapsulación se realizó sumergiendo los segmentos uninodales en una solución de alginato de sodio (3%) sólo o adicionado con medio MS con o sin reguladores de crecimiento vegetal, previamente autoclavado, según se describe en la Tabla 2.3. Los segmentos fueron retirados de la solución de alginato de sodio con una pipeta y colocados con parte del alginato de sodio en una solución 0,1 M de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O), donde se mantuvieron en agitación durante 3 minutos. Finalmente las cápsulas de alginato de calcio fueron retiradas de la solución de cloruro de calcio, secadas sobre papel de filtro y luego cultivadas sobre diferentes medios y soportes previamente autoclavados (Tabla 2.3). Los soportes empleados consistieron en agar y perlita hidratada (colocados en tubos de vidrio de 50 ml) y papel de filtro humedecido dispuesto en cápsulas de Petri.

Se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de brotación, porcentaje de enraizamiento y longitud de los vástagos regenerados a partir de los segmentos uninodales a los 15 y 30 días de cultivo.

**Tabla 2.3:** Tratamientos de encapsulación de segmentos uninodales de mandioca. Descripción de los componentes de la cápsula y los medios o soportes sobre los que éstas fueron cultivadas.

Trat	Descripción de las cápsulas	Medios/soportes para el cultivo de las cápsulas
T <sub>1</sub>	Segmento uninodal sin cápsula	M1
T <sub>2</sub>	Segmento uninodal sin cápsula	M2
T <sub>3</sub>	Segmento uninodal sin cápsula	M3
T <sub>4</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato	M1
T <sub>5</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato	M2
T <sub>6</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato	M3
T <sub>7</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M1	Agar
T <sub>8</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M2	Agar
T <sub>9</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M3	Agar
T <sub>10</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M1	Perlita hidratada
T <sub>11</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M2	Perlita hidratada
T <sub>12</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M3	Perlita hidratada
T <sub>13</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M1	Papel de filtro humedecido
T <sub>14</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M2	Papel de filtro humedecido
T <sub>15</sub>	Segmento uninodal con cápsula de alginato + M3	Papel de filtro humedecido

**Referencias:** M1: MS

M2: MS + 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>

M3: MS + 1mg.l<sup>-1</sup> de 2iP

### 2.2.6. *Diseño experimental y análisis estadístico*

El diseño de los experimentos fue completamente aleatorizado, con 3 repeticiones de 10 explantes cada una para cada clon (experimentos 2.2.2 y 2.2.4) o tratamiento (experimentos 2.2.3 y 2.2.5). El diseño para evaluar el porcentaje de enraizamiento de los vástagos generados (experimento 2.2.4) fue completamente aleatorizado, con estructura factorial.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando el programa estadístico InfoStat/P versión 1.1 (InfoStat, 2002), previa verificación de la normalidad de las variables. Las variables expresadas en porcentaje (x) fueron transformadas mediante  $\sqrt{(x/100 + 0,5)}$  mientras que las demás variables (x)

que no mostraron distribución normal se transformaron mediante  $\sqrt{x + 0,5}$ , a fin de normalizarlas. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas, se compararon los valores medios de las variables evaluadas, mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan.

## **2.3. Resultados y discusión**

### **2.3.1. Evaluación del establecimiento y multiplicación *in vitro* de clones de mandioca**

#### **- Etapa de Establecimiento:**

Fue posible establecer *in vitro* el 100% de los clones de mandioca evaluados. El porcentaje de explantes establecidos varió entre 38,7% (clon EC 1.1) y 100% (clon EC 19) (Fig. 2.1).

El 89% de los clones presentó algún tipo de contaminación. Se observó la presencia de hongos en el 71% de los clones; de bacterias en el 57% y la presencia simultánea de hongos y bacterias en el mismo tubo de ensayo sólo en el 11% de los clones. Si bien la infección con hongos fue más generalizada, ya que afectó a un mayor número de clones, ésta varió entre 4,6% y 18%, mientras que la infección con bacterias llegó a 56,4% en el clon EC 1.1, afectando menor cantidad de clones. El porcentaje de explantes sin respuestas fluctuó entre 0% y 6%, con la excepción del clon EC 19 que presentó un 20% de explantes sin respuesta.

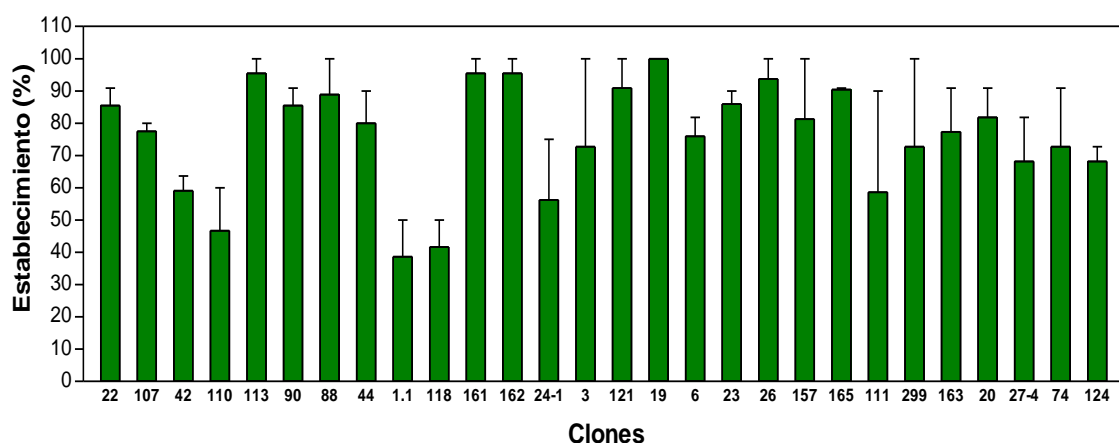
El porcentaje de brotación no presentó diferencias significativas entre clones ( $p \leq 0,05$ ), variando entre 38,7% (clon EC 1.1) y 95,5% (clones EC 161 y EC 162). El 89% de los clones presentó valores de brotación superiores al 50%; mientras que el 61% de los clones superó el 75% de explantes brotados (Fig. 2.2).

Se hallaron diferencias significativas entre los clones con respecto a la altura de las plantas ( $p \leq 0,01$ ). Las longitudes promedio de los vástagos para los diferentes clones variaron entre 3,3 y 69,4 mm, siendo los clones de mayor altura: EC 121, EC 107 y EC 20 y los de menor altura: EC 29-9 y EC 26 (Fig. 2.3).

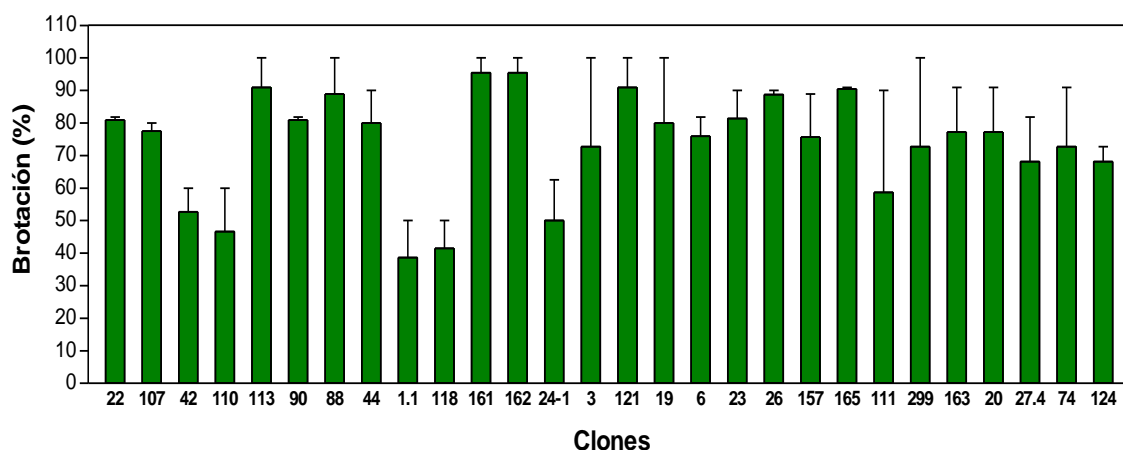
El número de nudos por vástago también difirió significativamente entre los clones ( $p \leq 0,01$ ), presentando valores promedio entre 2,4 y 9,7 nudos por vástago (Fig. 2.4). En general, el menor número de nudos correspondió a los clones de menor altura y el mayor número de nudos a los clones de mayor altura.

El 93% de los clones produjo raíces en el mismo medio donde se estableció, observándose diferencias significativas entre clones con respecto al porcentaje de enraizamiento ( $p \leq 0,01$ ). Los valores de enraizamiento oscilaron entre 6,3% (clon EC 90) y 91% (clon EC 162). Cabe destacar que el 57% de los clones presentó un porcentaje de enraizamiento superior al 50%. Sólo dos clones no enraizaron durante la etapa de establecimiento: EC 26 y EC 299 (Fig. 2.5).

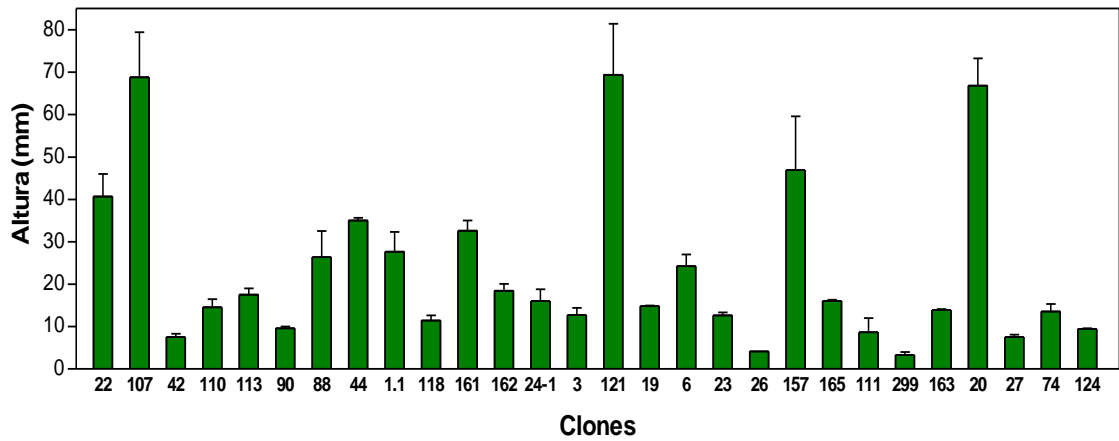
El número de raíces por planta también presentó diferencias significativas entre clones ( $p \leq 0,01$ ), variando entre 0 y 4 raíces promedio por planta (Fig. 2.6). En general, las plantas más altas fueron las que presentaron mayor número de raíces.



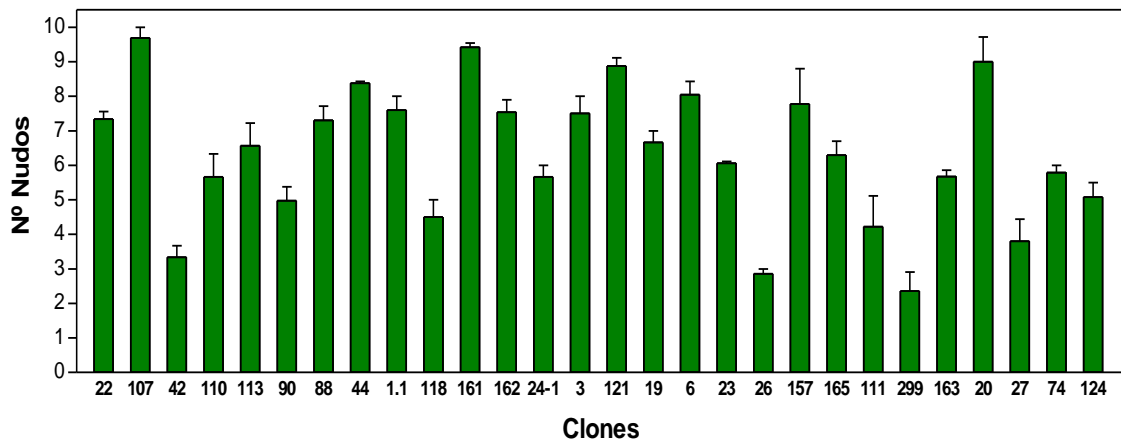
**Fig. 2.1:** Porcentaje de explantes establecidos *in vitro* para 28 clones de mandioca a los 30 días de cultivo.



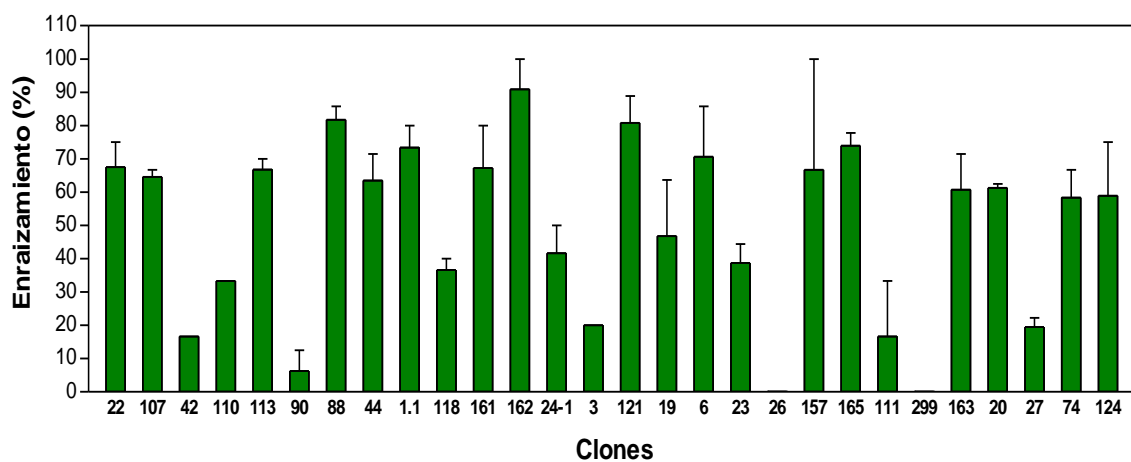
**Fig. 2.2:** Porcentaje de explantes brotados *in vitro* para 28 clones de mandioca a los 30 días de cultivo.



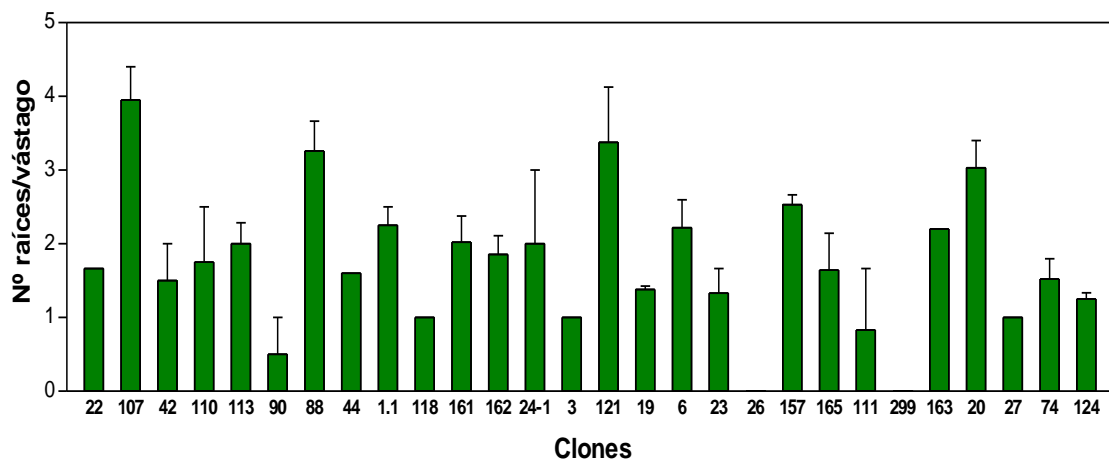
**Fig. 2.3:** Altura de los vástagos de 28 clones *in vitro* de mandioca, a los 30 días de cultivo.



**Fig. 2.4:** Número de nudos por vástago de 28 clones *in vitro* de mandioca, a los 30 días de cultivo.



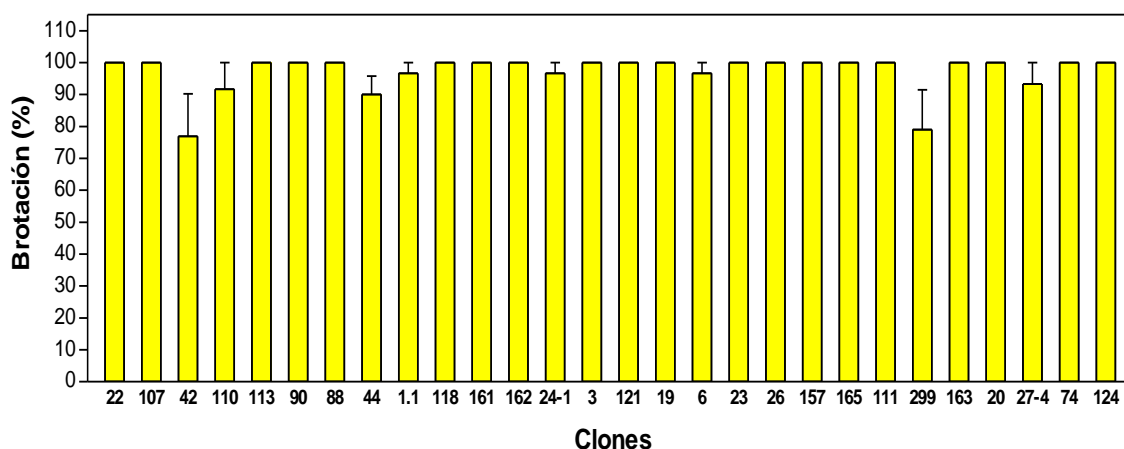
**Fig. 2.5:** Porcentaje de explantes enraizados de 28 clones *in vitro* de mandioca, a los 30 días de cultivo.



**Fig. 2.6:** Número promedio de raíces por vástago para 28 clones *in vitro* de mandioca, a los 30 días de cultivo.

- **Etapa de Multiplicación:**

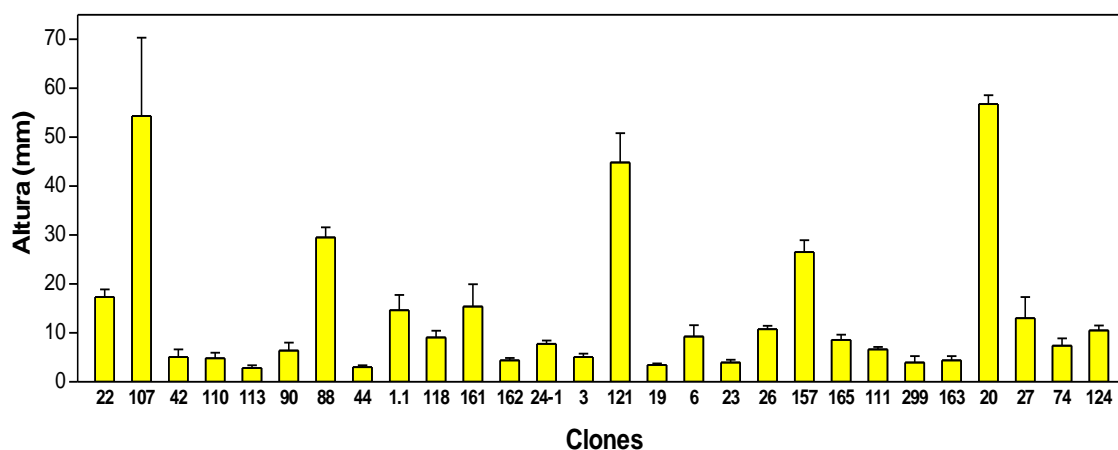
En esta etapa fue posible regenerar plantas a partir de segmentos uninodales en el 100% de los clones. El 71% de los clones presentó un 100% de regeneración de vástagos y el 29% restante valores superiores al 77% (Fig. 2.7). En este sentido, Albarrán *et al.*, (2003), obtuvieron plantas en los 34 clones que evaluaron, informando porcentajes de regeneración relativamente altos, entre 60 y 90%; mientras que Acedo (2002) informó el 100% de regeneración para esta especie, cultivando el clon “Golden Yellow” en medio basal MS libre de RCV, a diferencia del 13% al 21% de regeneración obtenido al adicionar AG<sub>3</sub>, BAP y ANA al medio basal.



**Fig. 2.7:** Porcentaje de explantes brotados *in vitro* para 28 clones de mandioca a los 30 días de la primera multiplicación.

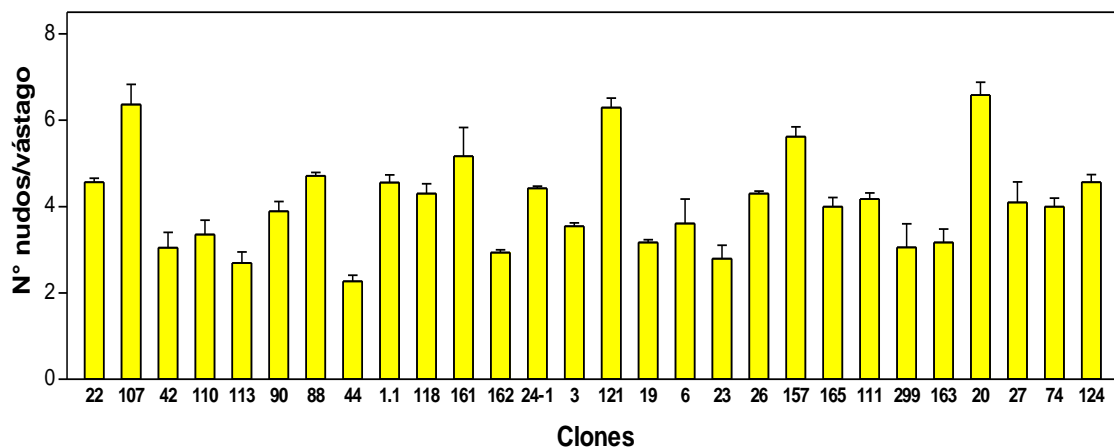
Independientemente de los clones evaluados, las plantas se desarrollaron normalmente en cuanto a su tamaño, forma y coloración. Por lo tanto, teniendo en cuenta los caracteres morfológicos visibles, puede decirse que las plantas establecidas se mantuvieron estables fenotípicamente con respecto al material original.

Al igual que en la etapa de establecimiento, las variables evaluadas presentaron diferencias significativas entre clones. La longitud de los vástagos varió significativamente ( $p \leq 0,01$ ), con valores promedio entre 2,9 y 57 mm, levemente inferiores a los registrados en la etapa de establecimiento (Fig. 2.8). En general, los clones más altos en la etapa de establecimiento continuaron siéndolo durante el primer ciclo de multiplicación.



**Fig. 2.8:** Altura de los vástagos de 28 clones de mandioca cultivados *in vitro*, a los 30 días de la primera multiplicación.

El número de nudos por vástago también difirió significativamente entre los clones ( $p \leq 0,01$ ), presentando valores promedio entre 2,3 y 6,6 nudos por vástago. Nuevamente los valores mínimos se mantuvieron iguales, mientras que los valores máximos fueron levemente inferiores a los registrados durante la etapa de establecimiento (Fig. 2.9).



**Fig. 2.9:** Número de nudos por vástago para 28 clones de mandioca cultivados *in vitro* a los 30 días de la primera multiplicación.

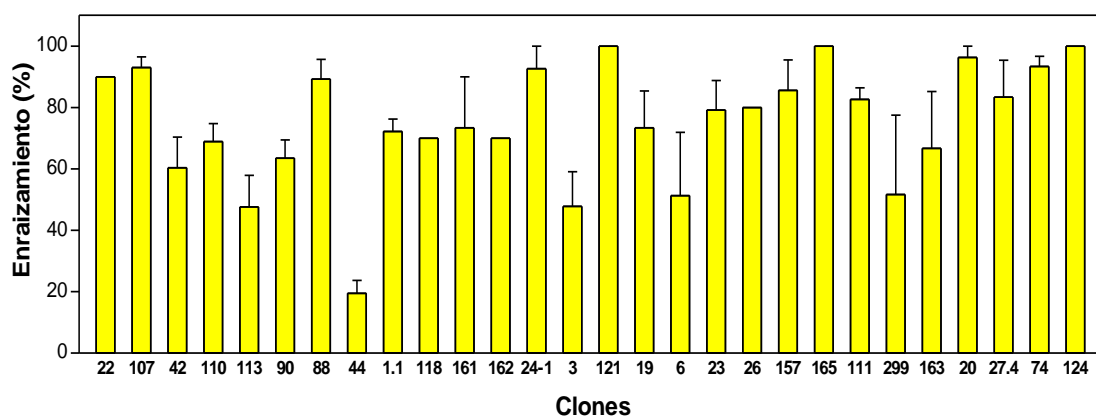
Con respecto a la altura de planta y el número de nudos, Marín *et al.*, (2008) obtuvieron valores entre 30 y 70 mm y entre 3,5 y 7 nudos promedio por planta respectivamente, para 19 clones élite de mandioca después de 60 días de cultivo (el doble del tiempo informado en este ensayo), en un medio constituido por  $\frac{1}{3}$  MS y  $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA. Smith *et al.*, (1986) informaron la obtención de 3,5 nudos promedio en clones de mandioca cultivados en medio basal MS libre de RCV, que aumentaron a 4,4 nudos al adicionarle IBA, ya que promovió el enraizamiento y favoreció el crecimiento de las plantas; y a 7 nudos promedio por explante al adicionar ANA y BAP en concentraciones que promovieron la formación de múltiples vástagos.

Por otra parte, Pedroso de Oliveira *et al.*, (2000) informaron alturas de plantas en la primera multiplicación entre 8,6 y 17,7 mm para 6 variedades de mandioca procedentes de Brasil, utilizando un medio de cultivo compuesto por 35% de los macronutrientes y micronutrientes del MS, suplementado con  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de inositol,  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA,  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y 2% de sacarosa. Según estos autores, la presencia de plantas poco desarrolladas fue más frecuente que la presencia de plantas etioladas.

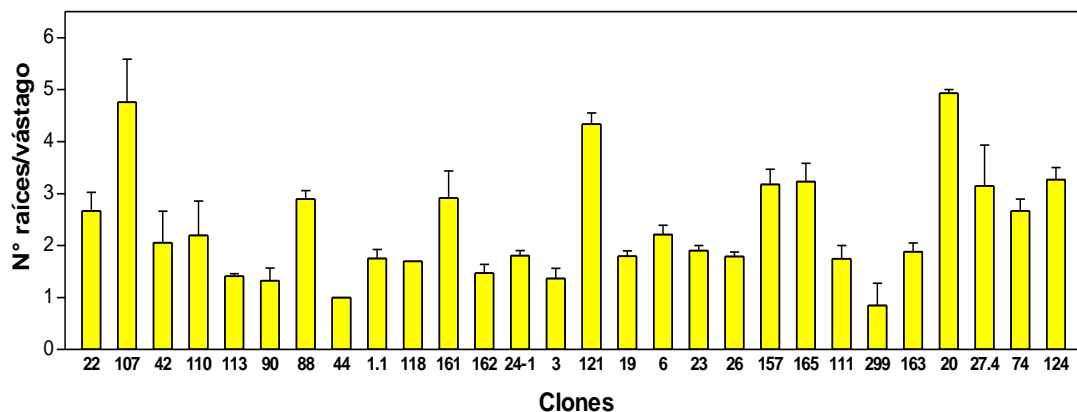
A diferencia de lo observado en la etapa de establecimiento, el 100% de los clones evaluados generó raíces, variando el porcentaje de enraizamiento entre 20% y 100%. Cabe destacar que el 89% de los clones presentaron valores de enraizamiento superiores al 50% (Fig. 2.10). Pedroso de Oliveira *et al.*, (2000) informaron enraizamiento en el primer ciclo de multiplicación en 4 de los 6 clones que evaluaron, con valores entre 30% y 70%, alcanzando el enraizamiento de la totalidad de los clones recién en el tercer ciclo de multiplicación.



El número de raíces por planta también difirió significativamente entre clones ( $p \leq 0,01$ ), variando entre 1 y 5 raíces por planta (Fig. 2.11). Al igual que durante la etapa de establecimiento, los clones que presentaron plantas con mayores alturas fueron los mismos que registraron los mayores números de raíces por planta. En este sentido, Pedroso de Oliveira *et al.*, (2000) sostienen que la presencia de raíces en las plántulas de mandioca, en cantidad equilibrada con el desarrollo de la parte aérea, resulta beneficiosa para el proceso de multiplicación, ya que promueve la absorción de nutrientes y por lo tanto, la producción de yemas que servirán de explantes para los siguientes ciclos de cultivo. Suárez y Hernández (2008), informaron la formación de 2 raíces por planta de mandioca (clon CM 40) en  $\frac{1}{3}$  MS, que aumentó hasta 4,6 al incrementar la concentración de oligogalacturónidos en el medio.

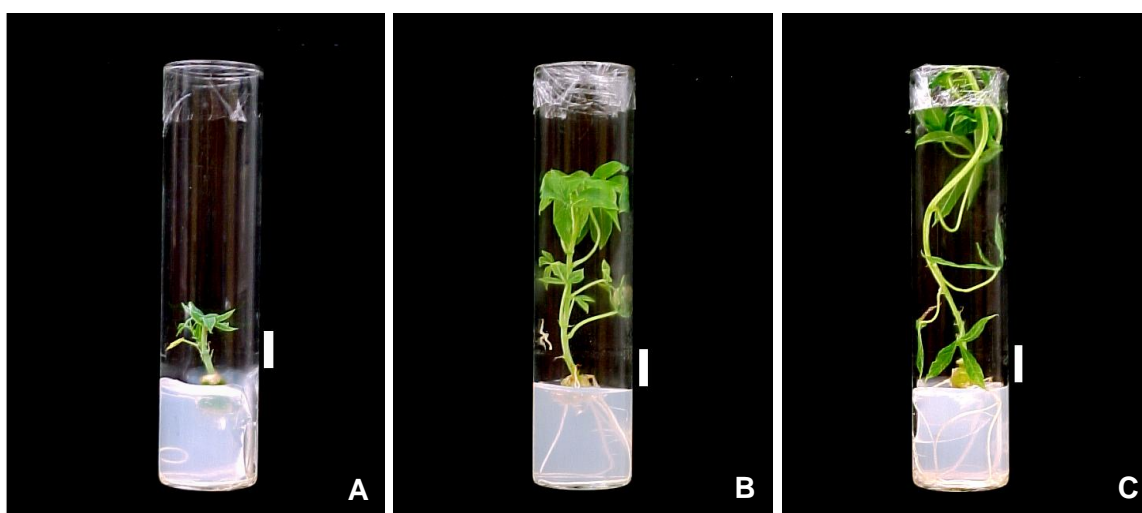


**Fig. 2.10:** Porcentaje de explantes enraizados de 28 clones de mandioca cultivados *in vitro* a los 30 días de la primera multiplicación.



**Fig. 2.11:** Número promedio de raíces por vástago para 28 clones de mandioca cultivados *in vitro*, a los 30 días de la primera multiplicación.

En general, los resultados indicaron una gran variabilidad entre clones con respecto a los valores obtenidos para las variables evaluadas (Fig. 2.12). Este efecto pronunciado del genotipo en el desarrollo *in vitro* de las plantas coincide con lo observado en mandioca por otros autores (Roca, 1984; Pedroso de Oliveira *et al.*, 2000; Albarrán, *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2008). En este sentido, Smith *et al.*, (1986), proponen realizar ajustes en el medio de cultivo a fin de estimular el proceso en aquellas variedades de mandioca que presentan baja eficiencia de micropropagación; mientras que Bromees y Lacon (1995), recomiendan evaluar diferentes concentraciones de sacarosa, nitrógeno y otros reguladores de crecimiento vegetal.



**Fig. 2.12:** Diferencia de altura de los vástagos, número de nudos y de raíces en clones de mandioca, a los 30 días de establecidos *in vitro*: (A) Clon EC 24; (B) Clon EC 161; (C) Clon EC 121. Barra: 10 mm.

### **2.3.2. Evaluación del efecto de diferentes citocininas en la morfogénesis caulinar y en la regeneración de plantas de mandioca**

A excepción del TDZ, en una concentración de 10 mg.l<sup>-1</sup>, todas las citocininas evaluadas permitieron la brotación de las microestacas. Se observó un porcentaje de brotación similar a los 30 y a los 50 días del inicio del cultivo, que varió entre 6,7% y 96,7%, con valores mayores al 70% de brotación en 12 de los 16 medios evaluados. Tanto el porcentaje de vástagos menores a 5 mm como el porcentaje de vástagos mayores a 5 mm, presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre los medios evaluados (Tabla 2.4). El 2-iP en todas sus concentraciones y la CIN y el BAP, ambos en su menor concentración (1 mg.l<sup>-1</sup>),

permitieron regenerar un mayor porcentaje de vástagos mayores a 5 mm en menor tiempo (Figs. 2.13 y 2.14). Esto es contrario a lo expresado por Raemakers *et al.*, (1997), quienes informaron que el BAP promueve la regeneración de plantas en mayor grado que la ZEA, el 2iP y la CIN. En este sentido, a los 50 días de cultivo, el tratamiento con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (T<sub>11</sub>) no presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos con 1 y 5 mg.l<sup>-1</sup> de 2-iP (T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>) y al tratamiento con 1 mg.l<sup>-1</sup> de CIN (T<sub>5</sub>) para vástagos mayores a 5 mm (Tabla 2.4). Por otra parte, la CIN, el BAP y el TDZ mostraron, en general, un menor porcentaje de brotación al aumentar su concentración en el medio de cultivo (Figs. 2.13 y 2.14). Zok *et al.*, (1993) informaron un 31% de brotación de ápices caulinares en MS suplementado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, lo cual es considerablemente inferior al 93% obtenido en este ensayo, a partir de segmentos uninodales.

El porcentaje de explantes que no respondieron a los diferentes medios ensayados varió entre 0% y 13% a los 30 días, disminuyendo a 3,3% a los 50 días. El porcentaje de explantes que murieron durante el ensayo, habiendo emitido vástago o no, varió entre 0% y 30% en ambas fechas. Cabe destacar que a los 30 días de cultivo se observaron explantes muertos en el 50% de los medios, mientras que a los 50 días este valor se elevó al 75% de los medios evaluados. En ambas fechas, los mayores porcentajes de explantes y vástagos muertos se observaron en las concentraciones de 5 y 10 mg.l<sup>-1</sup> de ZEA, BAP y TDZ (Figs. 2.13 y 2.14).

En todos los medios evaluados se observó la formación de callos en los explantes, especialmente en la zona de contacto con el medio. Los callos fueron de menor tamaño en el control con respecto al resto de los medios adicionados con citocininas, aumentando su tamaño al incrementar la concentración de citocininas. En este sentido, Roca (1984) planteó que la formación de callos no es deseable ya que pueden inhibir el crecimiento de las plantas. La formación de callos en esta especie también fue observada por Smith *et al.*, (1986), Zok *et al.*, (1993), Gou y Liu (1995) y Le *et al.*, (2007) asociada a niveles de BAP mayores a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> y al cultivo en medios semisólidos (Bhagwat *et al.*, 1996).

A los 30 días de cultivo, se observaron explantes con yemas hinchadas en 15 de los 16 medios evaluados, variando entre 3,3% y 80%. A los 50 días de cultivo, se registraron yemas hinchadas en 13 de los 16 medios, debido a que algunas de ellas emitieron brotes (Figs. 2.13 y 2.14).

Sólo se observó enraizamiento de vástagos en el control y en los medios adicionados con 2iP en las tres concentraciones y con CIN y ZEA en la menor

concentración. El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en los tratamientos con  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2iP. Los valores de enraizamiento obtenidos variaron entre 13,3% y 63,3% y aumentaron al incrementarse el tiempo de cultivo. En los medios adicionados con BAP y TDZ no se observó diferenciación de raíces (Fig. 2.15).

Coincidiendo con Smith *et al.*, (1986), los resultados obtenidos con las citocininas evaluadas demostraron que el BAP, en la menor concentración ensayada ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) promovió el mayor porcentaje de explantes con vástagos múltiples (56,7%) y la mayor cantidad de vástagos por explante (3,1). También la CIN, la ZEA y el TDZ promovieron la formación de vástagos múltiples con valores entre 3,3% y 16,7% (Figs. 2.16, 2.17 y 2.18).

En este sentido, Roca *et al.*, (1991) expresaron que la adición al medio de cultivo de una dosis alta de BAP (entre 1 y  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) permite romper la dominancia apical y generar vástagos múltiples al ser posteriormente transferido a un medio libre de BAP y enriquecido con  $\text{AG}_3$ . En coincidencia, Cabral *et al.*, (1993) informaron la inducción de múltiples vástagos a partir de segmentos uninodales de mandioca (MCol 22) en MS adicionado con  $3 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. Smith *et al.*, (1986) obtuvieron un 65% de plantas con múltiples vástagos al adicionar al MS  $0,22 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA, destacando que con concentraciones de BAP inferiores a las utilizadas prevalecieron los vástagos simples, mientras que con concentraciones superiores disminuyó la longitud de los vástagos, dificultando el cultivo, a la vez que aumentó el tamaño de los callos.

Bhagwat *et al.*, (1996) luego de evaluar el efecto de diferentes citocininas sobre mandioca (clon CG 1-56), informaron que el mejor resultado (6,6 vástagos por explante) lo obtuvieron cultivado por 6 semanas explantes nodales en MS adicionado con  $0,50 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0,55 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  luego de 2 semanas de incubación en medio líquido constituido por MS y  $0,025 \text{ mg.l}^{-1}$  de TDZ.

A diferencia de los resultados obtenidos, Konan *et al.*, (1997) informaron un mayor porcentaje de múltiples vástagos de mandioca (cv TMS 30555) en los medios adicionados con TDZ, resultando menos efectivas la ZEA y la CIN, destacando que la mayor concentración ( $20 \text{ mg.l}^{-1}$ ) de todas las citocininas evaluadas produjo efectos negativos sobre esta variable. Por otra parte, los medios adicionados con BAP les permitieron lograr el mayor número de vástagos por explante, coincidiendo esto último con los resultados aquí informados.

Tanto la altura promedio de los vástagos como el número promedio de nudos mostraron diferencias significativas en función del medio utilizado ( $p \leq 0,01$ )

(Tabla 2.4). La altura promedio de los vástagos varió entre 1,7 y 17 mm, obteniéndose los vástagos más altos en los medios adicionados con todas las concentraciones de 2iP y con 1 mg.l<sup>-1</sup> de CIN. Con respecto al número promedio de nudos, los mayores valores coincidieron con los tratamientos que produjeron vástagos más altos, a excepción del tratamiento adicionado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, que obtuvo el mayor número de nudos por explante, al compensar la escasa altura con una mayor cantidad de vástagos (Fig. 2.18).

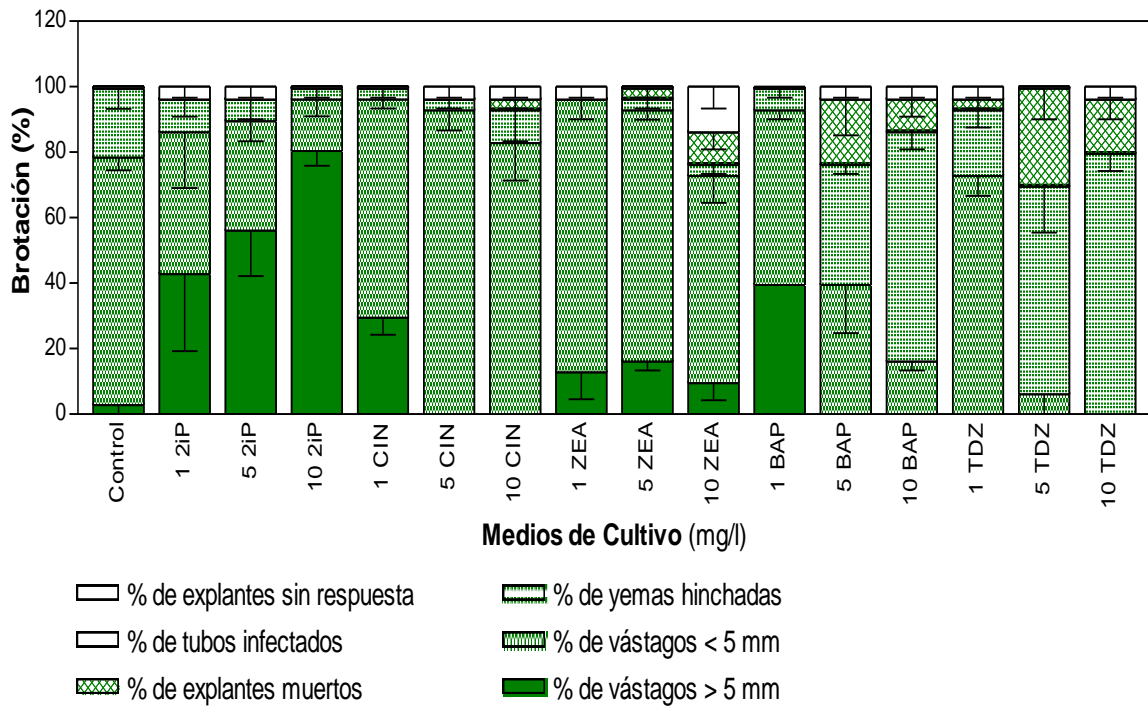
El porcentaje de explantes que presentó abscisión foliar aumentó al aumentar el tiempo de cultivo. A los 50 días de cultivo se hallaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,01$ ), observándose abscisión foliar entre 13% y 67% de los explantes, siendo más intensa en los medios donde se desarrollaron las plantas de mayor tamaño (Tabla 2.4).

Concentraciones crecientes de TDZ afectaron negativamente todos los parámetros evaluados. La actividad biológica de esta citocinina es, en general, igual o mayor que la de las citocininas tipo adenina más activas (Mok *et al.*, 1987). El efecto inhibitorio del TDZ sobre la elongación de vástagos fue reportado por Bates *et al.*, (1992) y Bhagwat, *et al.*, (1996), quienes informaron que debe reducirse la concentración de TDZ y/o utilizarse otras citocininas o combinaciones de citocininas y auxinas, a fin de estimular la elongación de los vástagos formados.

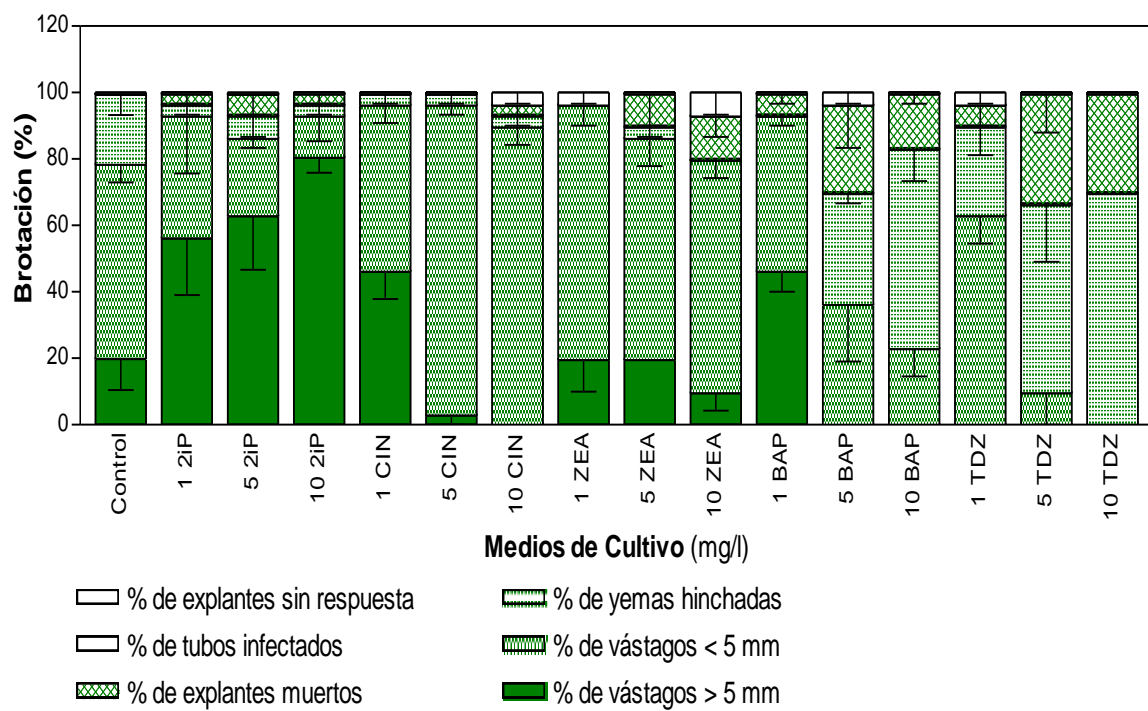
**Tabla 2.4:** Efecto de diferentes citocininas adicionadas al MS sobre el porcentaje de vástagos regenerados menores y mayores a 5 mm, la altura de los vástagos, el número promedio de nudos por explante y el porcentaje de abscisión foliar, a los 50 días de cultivo.

Trat	Citocinina (mg.l <sup>-1</sup> )	Vástagos < 5mm (%)	Vástagos > 5mm (%)	Altura (mm)	Nudos por explante	Abscisión foliar (%)
T <sub>1</sub> (control)	MS	58,6 <sup>def</sup>	20,4 <sup>a</sup>	8,0 <sup>cd</sup>	3,7 <sup>cde</sup>	13,3 <sup>ab</sup>
T <sub>2</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> 2iP	36,7 <sup>bcd</sup>	56,7 <sup>b</sup>	16,3 <sup>e</sup>	5,3 <sup>fg</sup>	30,0 <sup>abcd</sup>
T <sub>3</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> 2iP	23,3 <sup>abc</sup>	63,3 <sup>bc</sup>	13,2 <sup>de</sup>	5,4 <sup>fg</sup>	56,7 <sup>cd</sup>
T <sub>4</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> 2iP	12,4 <sup>ab</sup>	80,9 <sup>c</sup>	12,9 <sup>de</sup>	5,7 <sup>gh</sup>	62,4 <sup>cd</sup>
T <sub>5</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> CIN	50,0 <sup>cdef</sup>	46,7 <sup>b</sup>	17,0 <sup>e</sup>	5,2 <sup>fg</sup>	33,3 <sup>abcd</sup>
T <sub>6</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> CIN	93,33 <sup>h</sup>	3,3 <sup>a</sup>	1,7 <sup>ab</sup>	4,1 <sup>def</sup>	16,7 <sup>ab</sup>
T <sub>7</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> CIN	90,0 <sup>gh</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	4,5 <sup>efg</sup>	36,7 <sup>abcd</sup>
T <sub>8</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> Zea	76,7 <sup>fgh</sup>	20,0 <sup>a</sup>	5,9 <sup>bc</sup>	4,5 <sup>efg</sup>	40,0 <sup>bcd</sup>
T <sub>9</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> Zea	66,7 <sup>efgh</sup>	20,0 <sup>a</sup>	7,0 <sup>bc</sup>	4,7 <sup>efg</sup>	50,0 <sup>bcd</sup>
T <sub>10</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> Zea	70,0 <sup>efgh</sup>	10,0 <sup>a</sup>	4,8 <sup>abc</sup>	2,8 <sup>bcd</sup>	66,7 <sup>d</sup>
T <sub>11</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> BAP	46,7 <sup>cde</sup>	46,7 <sup>b</sup>	7,9 <sup>cd</sup>	6,8 <sup>h</sup>	0,0 <sup>a</sup>
T <sub>12</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> BAP	36,7 <sup>bcd</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	2,5 <sup>bc</sup>	0,0 <sup>a</sup>
T <sub>13</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> BAP	23,3 <sup>abc</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	2,2 <sup>b</sup>	0,0 <sup>a</sup>
T <sub>14</sub>	MS + 1 mg.l <sup>-1</sup> TDZ	66,3 <sup>defg</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup>	26,7 <sup>abc</sup>
T <sub>15</sub>	MS + 5 mg.l <sup>-1</sup> TDZ	10,0 <sup>ab</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
T <sub>16</sub>	MS + 10 mg.l <sup>-1</sup> TDZ	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>

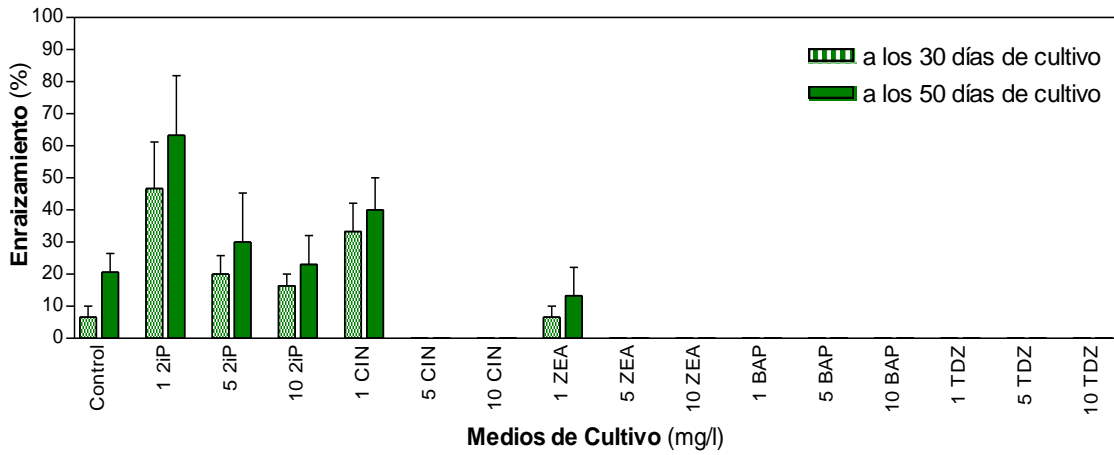
Letras distintas en cada columna indican diferencias altamente significativas (p≤0,01)



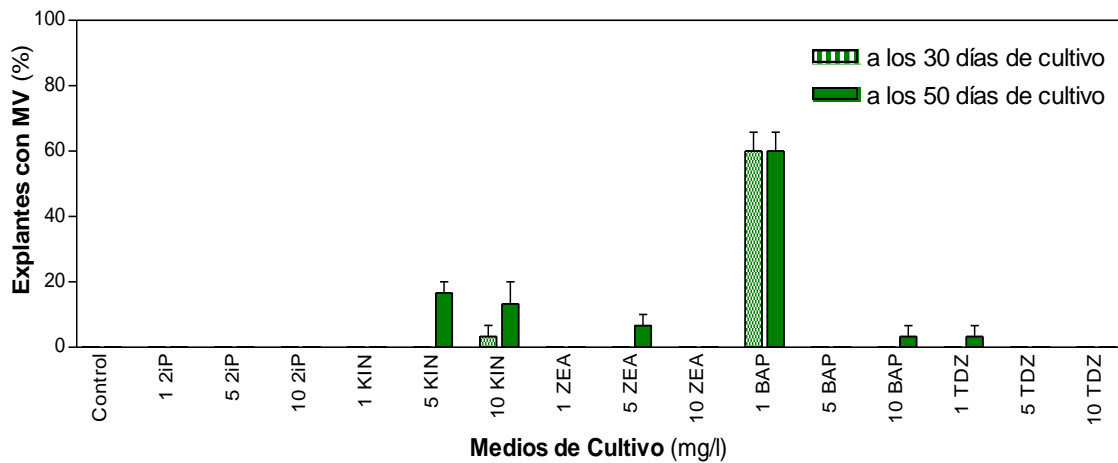
**Fig. 2.13:** Efecto de las citocininas adicionadas al MS sobre la organogénesis de mandioca *in vitro* (clon EC 118) a los 30 días de cultivo.



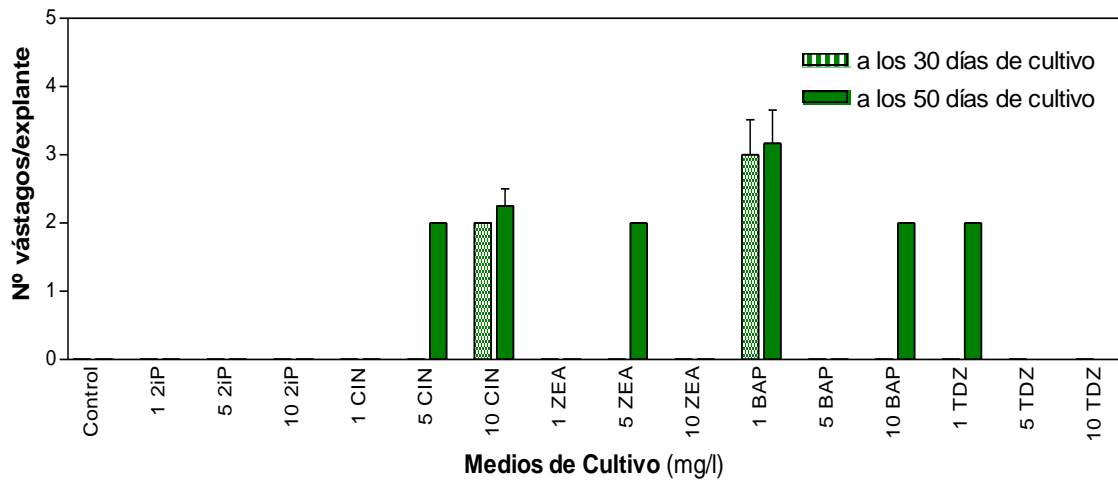
**Fig. 2.14:** Efecto de las citocininas adicionadas al MS sobre la organogénesis de mandioca *in vitro* (clon EC 118) a los 50 días de cultivo.



**Fig. 2.15:** Efecto de las citocininas adicionadas al MS sobre la producción de raíces en mandioca (clon EC 118) a los 30 y 50 días de cultivo.

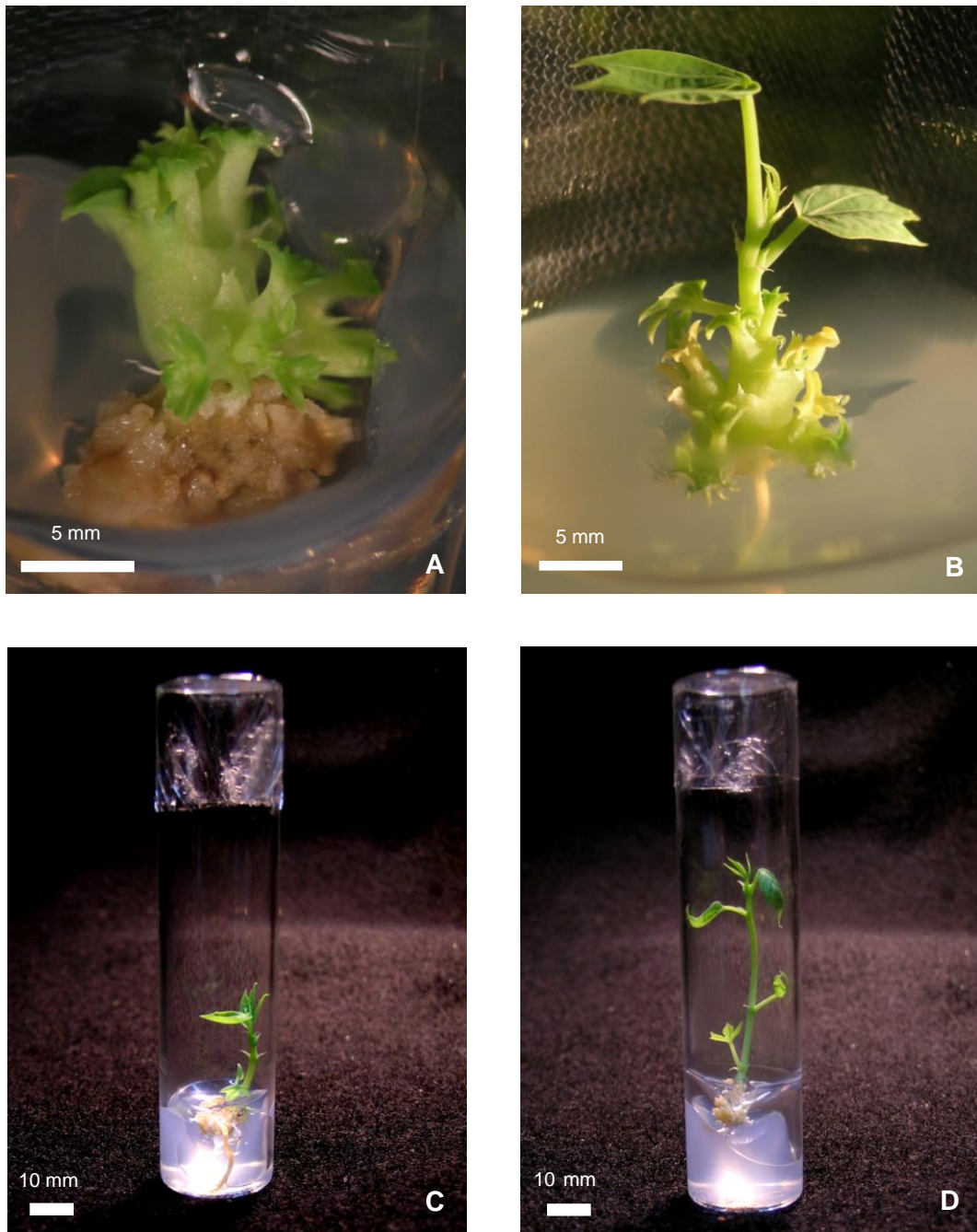


**Fig. 2.16:** Efecto de las citocininas adicionadas al MS sobre la producción de múltiples vástagos (MV) en mandioca (clon EC 118) a los 30 y 50 días de cultivo.



**Fig. 2.17:** Efecto de las citocininas adicionadas al MS sobre el número de vástagos producidos por explante, en mandioca (clon EC 118) a los 30 y 50 días de cultivo.





**Fig. 2.18:** Efecto de diferentes citocininas adicionadas al MS sobre la morfogénesis caulinar y radical y la formación de múltiples vástagos a partir de segmentos uninodales de mandioca (clon EC 118): (A)  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BAP a los 30 días de cultivo; (B)  $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BAP a los 50 días de cultivo; (C)  $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 2iP a los 50 días de cultivo; (D)  $10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de 2iP a los 50 días de cultivo.

### **2.3.3. Evaluación del efecto del BAP sobre la formación de múltiples vástagos en diferentes clones de mandioca**

La brotación de las microestacas fue elevada, observándose entre 96,7% y 100% de brotación en todos los clones evaluados. Hubo diferencias significativas entre clones con respecto al porcentaje de vástagos regenerados mayores a 5 mm y también a los menores a 5 mm ( $p \leq 0,01$ ). Los clones EC 118 y EC 44 presentaron un 63% y 90% de vástagos menores a 5 mm, respectivamente, mientras que los restantes clones presentaron entre 60% y 97% de vástagos mayores a 5 mm (Tabla 2.5; Fig. 2.19).

Sólo se observaron explantes muertos en el clon EC 118 (3,3%) y explantes con yemas hinchadas en el clon EC 74 (3,3%). Se registró formación de callos en todos los clones, siendo en general de gran tamaño. La abscisión foliar también fue importante en todos los clones, siendo más intensa en los vástagos más desarrollados, coincidiendo con lo informado en el apartado 2.2.3.

Todos los clones evaluados produjeron múltiples vástagos. Se registraron diferencias significativas entre los clones con respecto a esta variable ( $p \leq 0,01$ ), observándose los valores máximos en el clon EC 165 (100%) y los mínimos en el clon EC 118 (43%). Es importante destacar que el 71% de los clones presentó porcentajes de formación de múltiples vástagos superiores al 50%. El número de vástagos regenerados por cada explante también varió significativamente entre clones ( $p \leq 0,01$ ), entre 2,2 (clon EC 44) y 4,4 (clon EC 20) (Tabla 2.5; Fig. 2.20 y 2.21). Este efecto del genotipo sobre el número de vástagos regenerados por explante también fue reportado por Bhagwat *et al.*, (1996) quienes obtuvieron valores entre 2 y 5 vástagos por explante para 8 clones de mandioca cultivados en MS adicionado con  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0,55 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  luego de 2 semanas de incubación en medio líquido constituido por MS adicionado con  $0,025 \text{ mg.l}^{-1}$  de TDZ.

Los valores obtenidos con respecto a la cantidad de vástagos regenerados por explante son similares a los hallados por Konan *et al.*, (1997) quienes cultivaron segmentos uninodales de 17 cultivares de mandioca en medio MS adicionado con  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP durante 4 a 6 días. Posteriormente separaron las yemas axilares y las subcultivaron en el mismo medio durante 5 a 6 semanas, obteniendo generalmente 1 o 2 y raramente más de 5 vástagos por explante inicial, a excepción del clon TMS 30555 que produjo 25 vástagos por explante.

El índice de producción de múltiples vástagos (IPMV) presentó valores entre 1 (clon EC 44) y 3,5 (clon EC 20). En general, los clones de mayor crecimiento (EC 20 y EC 107) presentaron un mayor IPMV que los de crecimiento intermedio o reducido, a excepción del EC 165 que, siendo un cultivar de crecimiento intermedio, presentó un elevado IPMV (Fig. 2.22).

El número total de nudos producidos por explante, una de las variables más importantes desde el punto de vista de la micropropagación, varió significativamente entre clones ( $p \leq 0,01$ ), presentando valores entre 4,8 y 15,3 nudos por explante en los clones EC 44 y EC 20 respectivamente, a los 30 días de cultivo (Tabla 2.5). Estos valores son similares a los obtenidos por Smith *et al.*, (1986) cultivando yemas axilares en MS adicionado con  $0,23 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA. Cabe destacar que los cultivares EC 20 y EC 107 (de elevado crecimiento), fueron los que presentaron una cantidad significativamente mayor de nudos por explante (15,3 y 12,7, respectivamente) (Tabla 2.5).

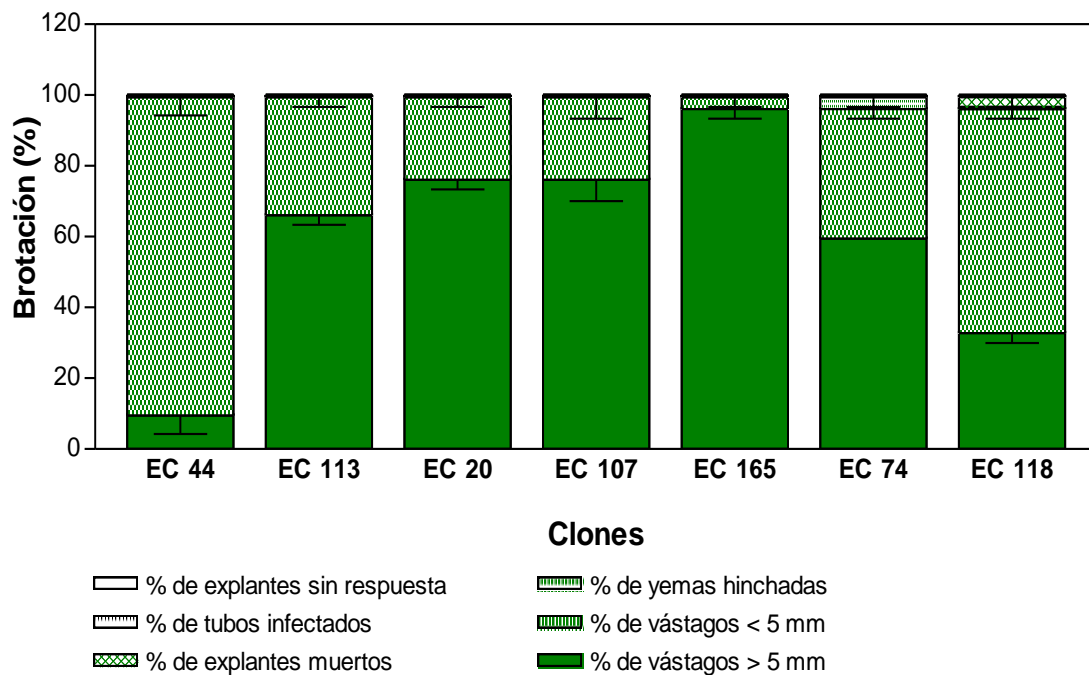
Fue posible el enraizamiento de los vástagos producidos en el 100% de los clones evaluados. Los clones de mayor crecimiento (EC 120 y EC 107) fueron los que presentaron los mayores porcentajes de enraizamiento en MS. Si bien en estos dos clones no se observaron diferencias significativas al utilizar el medio basal MS sólo o adicionado con  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de ANA,  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  (MS + RCV), los porcentajes de enraizamiento fueron mayores con este último. Para los clones de crecimiento bajo o intermedio, excepto el clon EC 118, el medio adicionado con ANA, BAP y  $\text{AG}_3$  (MS + RCV) fue significativamente mejor que el MS desprovisto de RCV con respecto a esta variable ( $p \leq 0,01$ ) (Tabla 2.5). La posibilidad que brinda el medio con RCV de promover la formación de raíces en el 100% de los clones, con una mejora en el porcentaje de enraizamiento en la mayoría de ellos, justificaría su elección para ser utilizado en la regeneración de plantas luego de la inducción de múltiples vástagos. En este sentido, Konan *et al.*, (1997) y Cabral *et al.*, (1993) informaron el enraizamiento satisfactorio de los vástagos producidos en MS sin RCV, mientras que Smith *et al.*, (1986) indujeron la formación de raíces en MS adicionado con  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de IBA.

**Tabla 2.5:** Producción de múltiples vástagos en diferentes clones de mandioca cultivados en MS adicionado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y enraizamiento de los vástagos generados.

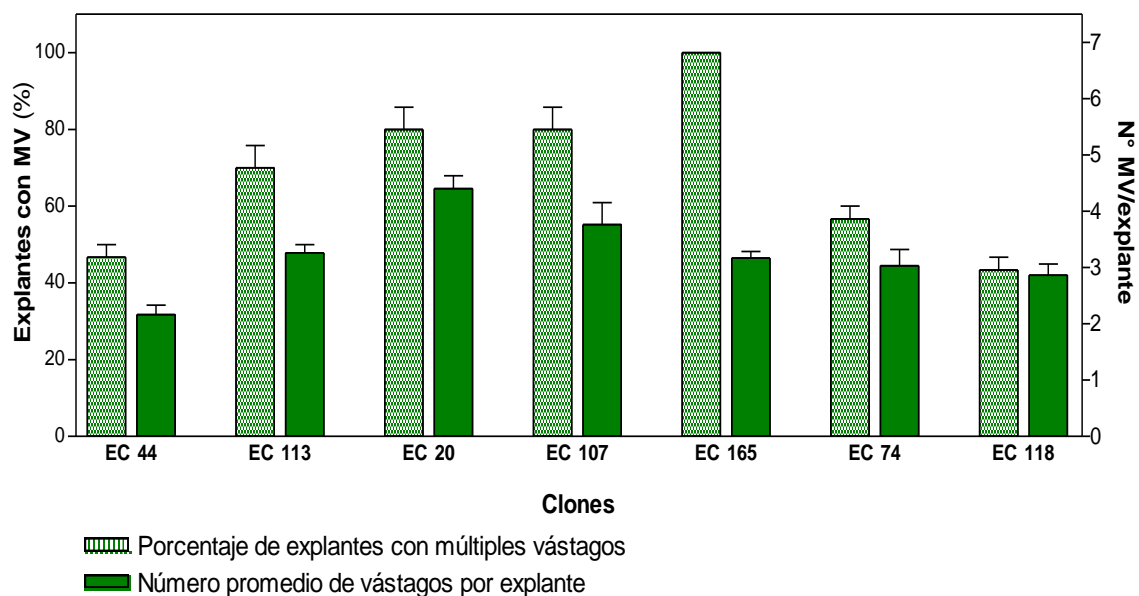
Clon	Vástagos > 5mm (%)	Múltiples vástagos (%)	Vástagos/explante	Nudos/explante	Enraizamiento (%)	
					MS	MS+RCV <sup>1</sup>
EC 44	10,0 <sup>a</sup>	46,7 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	8,8 <sup>b</sup>
EC 113	66,7 <sup>cd</sup>	70,0 <sup>b</sup>	3,3 <sup>bc</sup>	8,93 <sup>c</sup>	40,0 <sup>d</sup>	83,3 <sup>ef</sup>
EC 20	76,7 <sup>d</sup>	80,0 <sup>b</sup>	4,4 <sup>d</sup>	15,3 <sup>f</sup>	70,0 <sup>e</sup>	90,0 <sup>ef</sup>
EC 107	76,7 <sup>d</sup>	80,0 <sup>b</sup>	3,8 <sup>cd</sup>	12,7 <sup>e</sup>	81,7 <sup>ef</sup>	92,7 <sup>f</sup>
EC 165	96,7 <sup>e</sup>	100 <sup>c</sup>	3,2 <sup>bc</sup>	11,4 <sup>d</sup>	33,3 <sup>cd</sup>	80,0 <sup>ef</sup>
EC 74	60,0 <sup>c</sup>	56,7 <sup>a</sup>	3,0 <sup>bc</sup>	6,7 <sup>b</sup>	22,0 <sup>c</sup>	80,0 <sup>ef</sup>
EC 118	33,3 <sup>b</sup>	43,3 <sup>a</sup>	2,9 <sup>ab</sup>	5,2 <sup>a</sup>	35,7 <sup>d</sup>	29,3 <sup>cd</sup>

Letras distintas en cada columna indican diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )

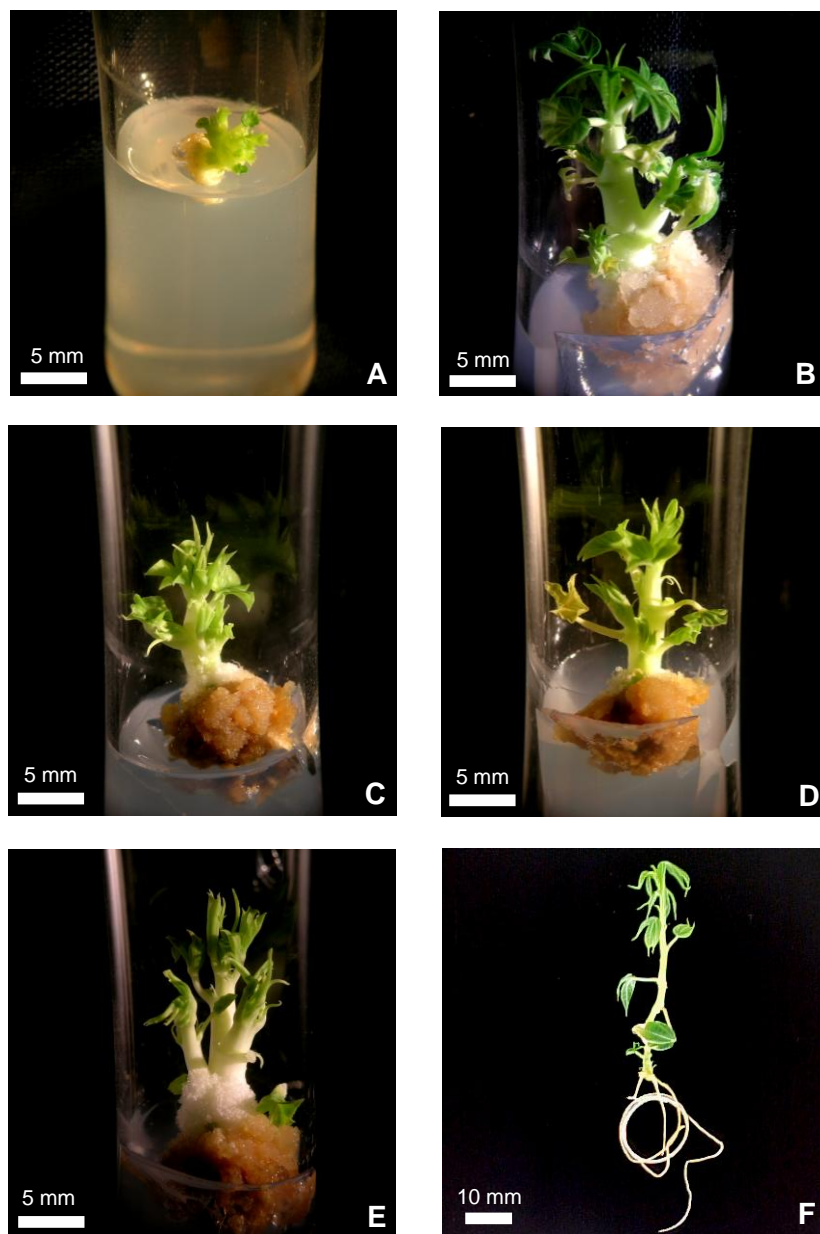
<sup>1</sup>MS + RCV: MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> ANA + 0,01 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> AG<sub>3</sub>



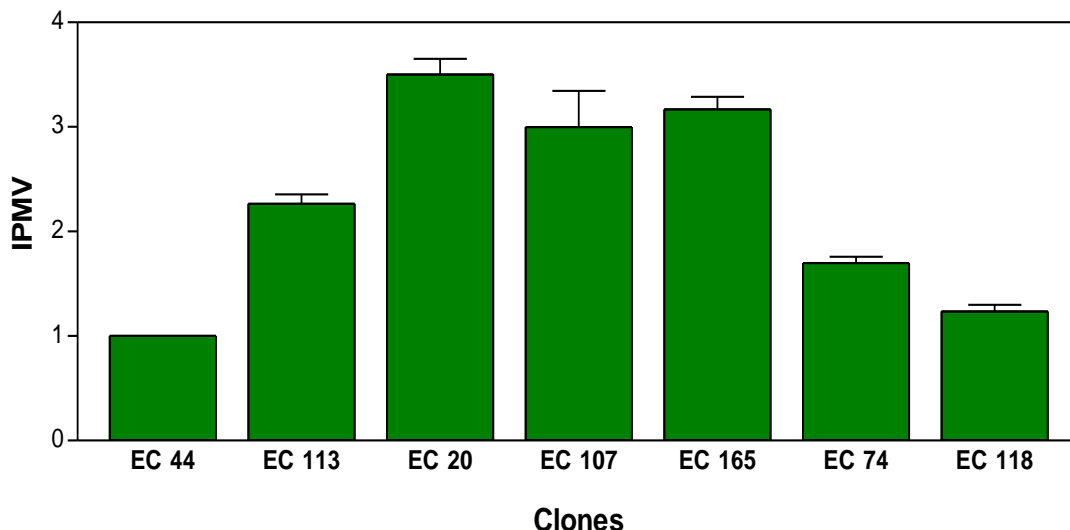
**Fig. 2.19:** Efecto del BAP adicionado al MS sobre la brotación de segmentos uninodales de diferentes clones de mandioca a los 30 días de cultivo (medio de cultivo: MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP).



**Fig. 2.20:** Efecto del BAP adicionado al MS sobre la formación de múltiples vástagos en diferentes clones de mandioca a los 30 días de cultivo (medio de cultivo: MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP).



**Fig. 2.21:** Efecto del BAP ( $1\text{mg.l}^{-1}$ ) adicionado al MS sobre la morfogénesis caulinar y la formación de múltiples vástagos a partir de segmentos uninodales de mandioca, a los 30 días de cultivo: (A) Clon EC 118; (B) Clon EC 20; (C) Clon EC 165; (D) Clon EC 74; (E) Clon EC 113; (F) Aspecto de una planta de mandioca regenerada a partir de los vástagos producidos y enraizados en MS adicionado con  $0,01\text{ mg.l}^{-1}$  de ANA,  $0,01\text{ mg.l}^{-1}$  de BAP y  $0,1\text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  (MS + RCV).



**Fig. 2.22:** Efecto del BAP adicionado al MS sobre el índice de producción de múltiples vástagos (IPMV) en diferentes clones de mandioca a los 30 días de cultivo (medio de cultivo: MS + 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP).

#### **2.3.4. Efecto de la encapsulación de segmentos uninodales de mandioca**

El cultivo de los segmentos uninodales sin encapsular sobre MS sin RCV, MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y MS adicionado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, respectivamente) brindó un 100% de brotación en todos los casos, incrementándose a los 30 días la cantidad de vástagos mayores a 5 mm. Es importante destacar que si bien el medio adicionado con 2iP (T<sub>3</sub>) permitió un 83% de explantes mayores a 5 mm a los 15 días, recién a los 30 días de cultivo fue posible observar el enraizamiento de los vástagos. Además, en este tratamiento se observó la formación de callos de gran tamaño en la zona de contacto del explante con el medio de cultivo. Por otra parte, los T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> generaron vástagos de menor tamaño que comenzaron a enraizar a los 15 días de cultivo, llegando al 49% de enraizamiento en el T<sub>2</sub>. Estos tratamientos permitieron comprobar la viabilidad de los explantes (Figs. 2.23; 2.24; 2.25 y 2.26).

Al encapsular los segmentos uninodales en alginato de calcio y cultivar las cápsulas sobre los medios antes descritos (T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>), fue posible comprobar que los porcentajes de brotación de los T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> se mantuvieron constantes con respecto a los controles sin encapsular, observándose una importante disminución sólo en el T<sub>6</sub>, acompañado de un aumento en la cantidad de explantes que no produjeron respuesta. Los segmentos encapsulados sólo en alginato de calcio y cultivados sobre MS (T<sub>4</sub>) y MS + ANA, BAP y AG<sub>3</sub> (T<sub>5</sub>) presentaron un elevado porcentaje de

enraizamiento (66,7%, 72,2%, respectivamente), repitiendo el patrón observado en los segmentos sin encapsular, a excepción del T<sub>6</sub> (21,5%) (Figs. 2.23; 2.24; 2.25; 2.26 y 2.27). Esto nos permitiría inferir que la encapsulación de los segmentos de mandioca en alginato de calcio no impediría su brotación y enraizamiento, coincidiendo con los resultados obtenidos para esta y otras especies (Bapat *et al.*, 1987; Ganapathi *et al.*, 1992; Piccioni y Standardi, 1995; Piccioni, 1997; Rai *et al.*, 2008; 2009; Singh *et al.*, 2009; Barrueto Cid *et al.*, 2009).

Se observó formación de callos, principalmente en los explantes cultivados en el medio adicionado con 2iP, siendo de tamaño considerablemente mayor en los segmentos desnudos con respecto a los encapsulados. Ésto coincide con lo hallado por Piccioni (1997) y podría deberse a que la cápsula de alginato de calcio implica una barrera física que actuaría disminuyendo la tasa de crecimiento del callo.

La incorporación de diferentes compuestos a la cápsula de alginato de calcio, a modo de endosperma artificial, es una de las posibilidades que brinda esta técnica (Piccioni, 1997; Rai *et al.*, 2009). En este contexto, se evaluó el porcentaje de brotación y enraizamiento de las microestacas encapsuladas en alginato de calcio adicionado con cada uno de los 3 medios de cultivo anteriormente detallados, colocándolas sobre diferentes soportes estériles (agar, perlita hidratada y papel de filtro humedecido). Los resultados indicaron diferencias significativas entre los medios cuando los segmentos encapsulados se cultivaron sobre agar o perlita ( $p \leq 0,01$ ), siendo en ambos casos superior la brotación en MS adicionado con 2iP (T<sub>9</sub> y T<sub>12</sub>). El porcentaje de brotación de los explantes encapsulados y colocados sobre papel de filtro arrojó los mayores valores promedio: 77,8% (T<sub>13</sub>), 81,5% (T<sub>14</sub>) y 85,2% (T<sub>15</sub>), sin que se detectaran diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre los medios evaluados. Debe destacarse que los explantes encapsulados con alginato de calcio adicionado con MS, ANA, BAP y AG<sub>3</sub> (T<sub>14</sub>) fueron los únicos que permitieron obtener plantas mayores a 5 mm, con respecto a los demás tratamientos evaluados (Figs. 2.23; 2.24; 2.25; 2.26 y 2.27).

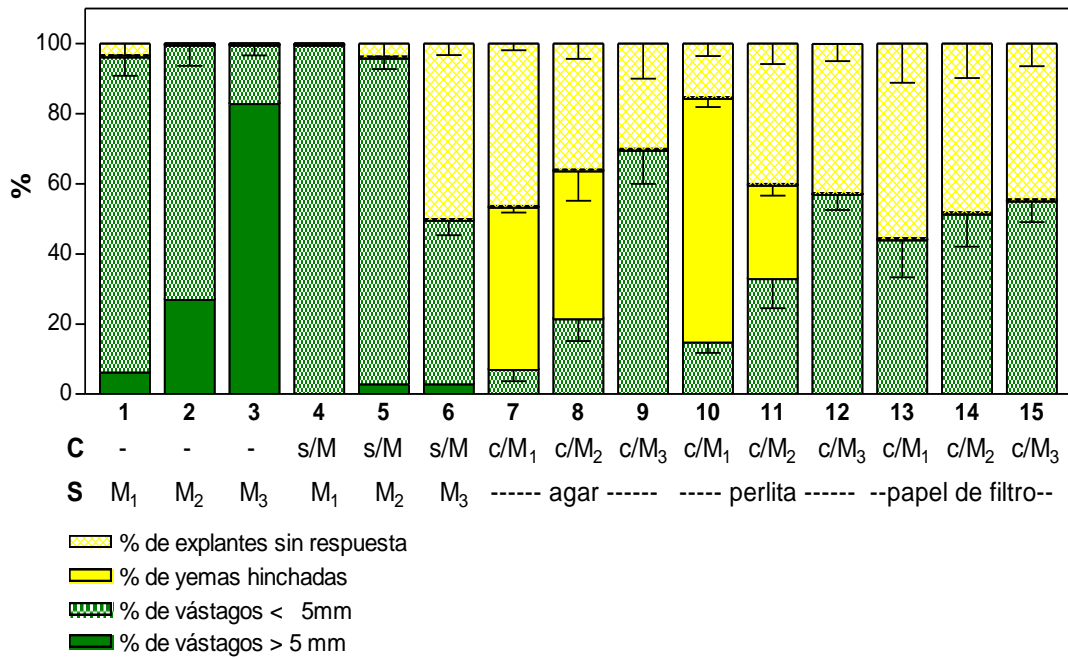
Es importante destacar que no se registró enraizamiento de las microestacas encapsuladas en alginato adicionado con MS + 1mg.l<sup>-1</sup> de 2iP en ninguno de los soportes evaluados (T<sub>9</sub>, T<sub>12</sub> y T<sub>15</sub>). En este sentido, las cápsulas adicionadas con MS + ANA, BAP y AG<sub>3</sub> permitieron el enraizamiento sobre dos de los soportes evaluados, aunque en un porcentaje bajo (7 y 15% en los explantes colocados sobre perlita y papel de filtro humedecido, respectivamente) (Figs. 2.25; 2.26 y 2.27).



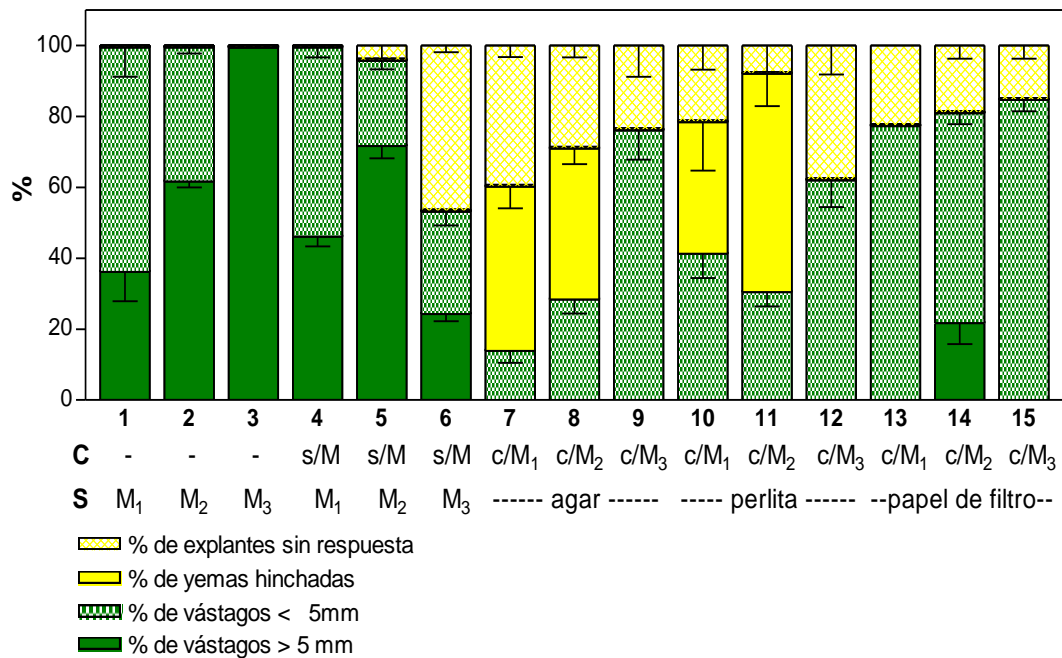
Bhattacharya (1988) destaca el elevado requerimiento de oxígeno que tiene lugar durante los estadios iniciales del enraizamiento. Piccioni (1997) atribuye la falta de enraizamiento *in vitro* de segmentos uninodales de manzana al menor intercambio gaseoso entre los segmentos encapsulados y el medio externo. En este experimento no es posible atribuir el bajo porcentaje de enraizamiento a la matriz de alginato de calcio, ya que se obtuvieron porcentajes de enraizamiento similares cuando se cultivaron los segmentos nodales encapsulados sólo con alginato de calcio y sin encapsular sobre los diferentes medios nutritivos. Tal vez ocurra algún tipo de interacción entre los minerales, vitaminas, sacarosa y/o reguladores de crecimiento vegetal adicionados y el alginato, que disminuyan el intercambio gaseoso entre el explante y el medio. Otra posible causa del bajo porcentaje de enraizamiento es la elevada concentración salina del medio de cultivo que rodea al explante encapsulado que podría estar influyendo negativamente sobre su enraizamiento.

En este sentido, el bajo porcentaje de enraizamiento observado en los segmentos encapsulados en alginato de calcio con endosperma artificial e incubados sobre sustratos no nutritivos, coincide con lo hallado por Piccioni (1997) en manzana. Este autor logró mejorar los porcentajes de enraizamiento al encapsular segmentos con primordios radicales formados, nueve días después de haber sido tratados con IBA. Por otra parte, Singh *et al.*, (2009) lograron porcentajes de conversión a planta similares cuando cultivaron, sobre medio basal, ápices de *Spilanthes acmella* encapsulados en alginato de calcio con y sin agregado de medio basal, pero este valor disminuyó significativamente cuando le agregaron a la cápsula reguladores de crecimiento vegetal.

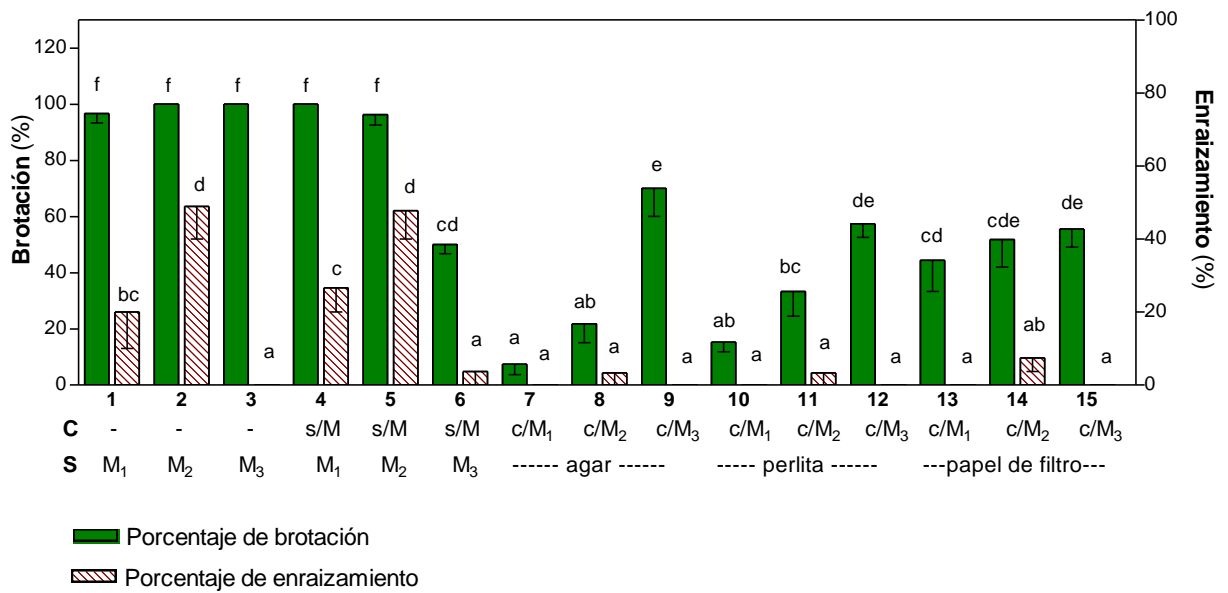
En función de su futura utilización, sería conveniente evaluar diferentes pretratamientos de los segmentos encapsulados con soluciones nutritivas solas o adicionadas con RCV, previo a la siembra.



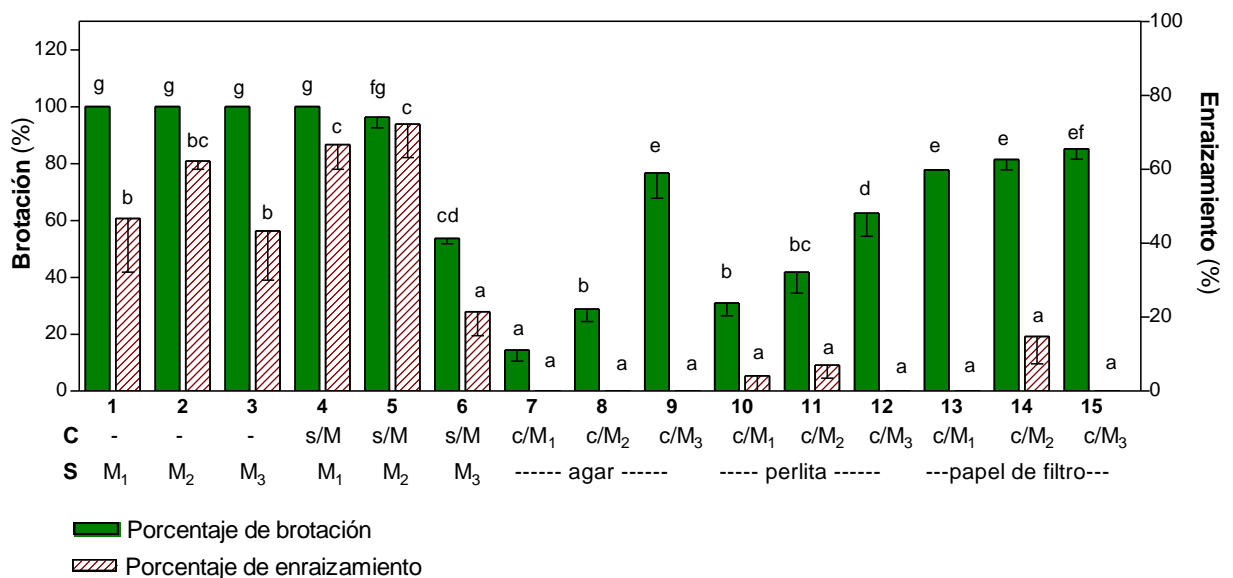
**Fig. 2.23:** Respuesta de segmentos uninodales de mandioca, sin encapsular y encapsulados cultivados sobre diferentes medios y soportes, a los 15 días de cultivo. **C:** cápsula; **S:** soporte sobre el que se cultivó el explante o la cápsula; **M<sub>1</sub>:** MS; **M<sub>2</sub>:** MS + ANA + BAP + AG<sub>3</sub>; **M<sub>3</sub>:** MS + 2iP.



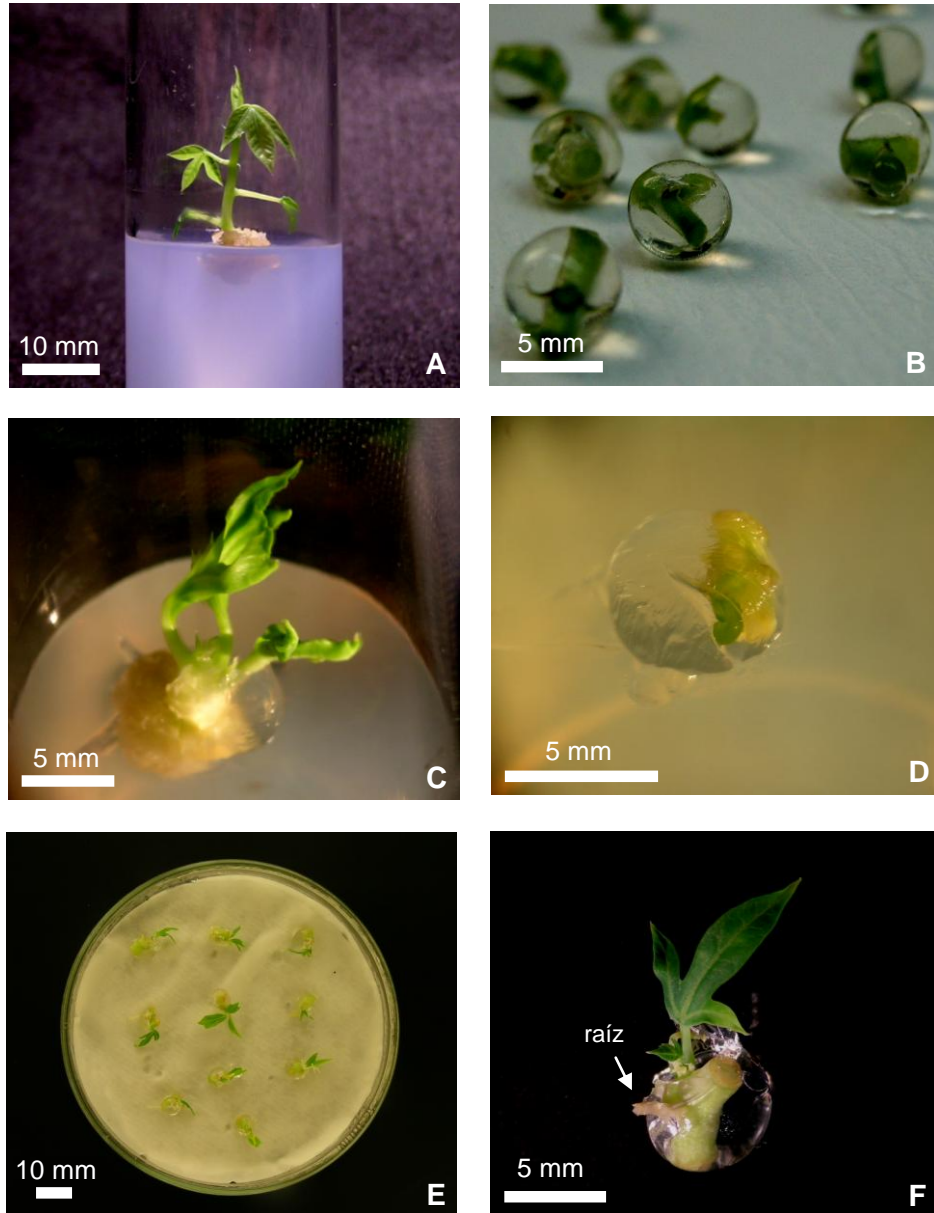
**Fig. 2.24:** Respuesta de segmentos uninodales de mandioca, sin encapsular y encapsulados cultivados sobre diferentes medios y soportes, a los 30 días de cultivo. **C:** cápsula; **S:** soporte sobre el que se cultivó el explante o la cápsula; **M<sub>1</sub>:** MS; **M<sub>2</sub>:** MS + ANA + BAP + AG<sub>3</sub>; **M<sub>3</sub>:** MS + 2iP.



**Fig. 2.25:** Efecto de diferentes soportes sobre el porcentaje de brotación y enraizamiento de segmentos uninodales de mandioca sin encapsular y encapsulados, a los 15 días de cultivo. **C:** cápsula; **S:** soporte sobre el que se cultivó el explante o la cápsula; **M<sub>1</sub>:** MS; **M<sub>2</sub>:** MS + ANA + BAP + AG<sub>3</sub>; **M<sub>3</sub>:** MS + 2iP



**Fig. 2.26:** Efecto de diferentes soportes sobre el porcentaje de brotación y enraizamiento de segmentos uninodales de mandioca sin encapsular y encapsulados, a los 30 días de cultivo. **C:** cápsula; **S:** soporte sobre el que se cultivó el explante o la cápsula; **M<sub>1</sub>:** MS; **M<sub>2</sub>:** MS + ANA + BAP + AG<sub>3</sub>; **M<sub>3</sub>:** MS + 2iP



**Fig. 2.27:** Efecto de la encapsulación de segmentos uninodales de mandioca (clon EC 118) en alginato de calcio sólo o adicionado con MS con o sin RCV y su posterior cultivo sobre diferentes medios y soportes: (A) Segmento sin encapsular sobre MS adicionado con  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  2iP; (B) Segmentos encapsulados sólo con alginato de calcio; (C) Segmento encapsulado con alginato de calcio y cultivado sobre MS adicionado con 2iP; (D) Segmento encapsulado con alginato de calcio adicionado con MS +  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2iP; (E) Segmentos encapsulados en alginato de calcio adicionado con MS +  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  ANA +  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP +  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  AG<sub>3</sub> y cultivados sobre papel de filtro; (F) Detalle de un segmento uninodal encapsulado con alginato de calcio adicionado con MS + ANA + BAP + AG<sub>3</sub>. Nótese la raíz emergiendo de la cápsula.

## 2.4. Conclusiones

- Fue posible establecer *in vitro* el 100% de los clones de mandioca evaluados, provenientes del Banco de Germoplasma a campo de la EEA INTA El Colorado, Formosa. El procedimiento utilizado fue el siguiente: desinfección de los segmentos uninodales en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de 20 minutos en hipoclorito de sodio al 1,1% + 0,05% (v/v) de surfactante y de tres enjuagues con agua destilada estéril. Cada segmento de aproximadamente 10 mm se cultivó en tubos de vidrio de 50 ml con 15 ml de medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA + 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y solidificado con 0,75% de agar. La incubación se realizó en un cuarto climatizado a 27±2°C, con fotoperíodo de 14 h (irradiancia de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), durante 30 días.
- Existió un pronunciado efecto del genotipo en el desarrollo *in vitro* de las plantas de mandioca.
- En la etapa de establecimiento *in vitro*, se logró enraizar el 93% de los clones, de los cuales el 57% presentó un porcentaje de enraizamiento superior al 50%. En el primer ciclo de multiplicación *in vitro* se consiguió enraizar la totalidad de los clones, presentando el 89% de ellos un porcentaje de enraizamiento superior al 50%.
- El número promedio de nudos por planta varió entre 2,3 y 6,6 para los diferentes clones, durante el primer ciclo de multiplicación.
- Los clones EC 121, EC 107 y EC 20 fueron los que mostraron el mejor comportamiento *in vitro* tanto en la fase de establecimiento como en la de multiplicación, contemplando el total de las variables analizadas.
- El medio basal MS suplementado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, permitió el establecimiento y la multiplicación de todos los clones evaluados, con óptimo crecimiento.
- Todas las citocininas evaluadas permitieron regenerar plantas a partir de las microestacas del clon EC 118.
- Los medios suplementados con 2iP (en todas las concentraciones evaluadas) y CIN y BAP (ambos en la menor concentración), permitieron regenerar mayor cantidad de plantas en menor tiempo (30 días), respecto de otras citocininas (TDZ y ZEA).

- En función de la concentración, el TDZ disminuyó marcadamente la brotación e inhibió la formación de raíces.
- El BAP en su menor concentración (1 mg.l<sup>-1</sup>) fue la citocinina que generó mayor producción de múltiples vástagos en el clon EC 118. A su vez, este medio permitió obtener múltiples vástagos en el 100% de los clones evaluados, aunque con diferentes tasas de crecimiento.
- Al adicionar 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP al medio basal MS, el número promedio de vástagos generados por planta varió entre 2,2 y 4,4, mientras que el número de nudos lo hizo entre 4,8 y 15,3 para los diferentes clones evaluados.
- Los vástagos generados fueron exitosamente enraizados en el medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>.
- Fue posible regenerar plantas a partir de segmentos uninodales de mandioca menores a 5 mm encapsulados en alginato de calcio y cultivados sobre MS sin RCV, MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y MS adicionado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP, obteniéndose a los 30 días de cultivo, porcentajes de regeneración de 66,7%, 72,2% y 21,5% respectivamente.
- El porcentaje de enraizamiento de los segmentos encapsulados en alginato de calcio y cultivados sobre MS sin RCV y sobre MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> fue igual o mayor comparado con los segmentos sin encapsular. Por tal motivo se sugiere pretratar los segmentos encapsulados con soluciones nutritivas y/o RCV.
- Cuando se adicionaron a la cápsula de alginato de calcio los diferentes medios evaluados, a modo de endosperma artificial, se produjo brotación de las microestacas en todos casos, contemplando la incubación de las cápsulas sobre medios y soportes distintos.
- En las cápsulas adicionadas con MS con o sin RCV, sólo ocurrió enraizamiento en un bajo porcentaje de explantes. Es probable que la elevada concentración salina del medio de cultivo que rodea al explante encapsulado influya negativamente sobre su enraizamiento.
- A fin de optimizar la regeneración de plantas a partir de segmentos uninodales encapsulados de mandioca, sería importante realizar combinaciones de RCV o inducir la formación de raíces previo a la

encapsulación de los segmentos, a fin de garantizar la generación de raíces en el menor tiempo, tal como se ha conseguido en otras especies.

## CAPÍTULO 3

### EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CLONES DE MANDIOCA CULTIVADOS EN ARGENTINA

#### 3.1. Introducción

Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es considerada el sistema potencialmente más eficiente, ya que permitiría obtener cantidades virtualmente ilimitadas de plantas (Villalobos y Thorpe, 1991; Raemakers *et al.*, 1997). A esto se suma su empleo para la regeneración de plantas en el marco de los programas de transformación genética y la posibilidad de obtener semillas sintéticas mediante la encapsulación de los embriones somáticos (Guerra *et al.*, 1999).

El patrón de desarrollo de los embriones somáticos en las dicotiledóneas presenta muchas características morfológicas similares al de los embriones cigóticos, ya que ambos pasan por los estadios de desarrollo pro-embrionarios y embrionarios propiamente dichos: globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Zimmerman, 1993; Guerra *et al.*, 1999; Vila, 2006), para luego convertirse en plantas completas. Sin embargo pueden ocurrir algunas anomalías durante el desarrollo de los embriones somáticos, por ejemplo, la fasciación y la fusión de los cotiledones (Litz y Jarret, 1991), que se ven reflejadas en el bajo porcentaje de embriones que se convierten en plantas (Szabados *et al.*, 1987; Raemakers *et al.*, 1997; Vila, 2006).

Desde que la embriogénesis somática en mandioca, fue descrita por primera vez por Stamp y Henshaw (1982), se reportó la formación de embriones somáticos a partir de distintos tejidos (Tabla 3.1).

Diferentes protocolos fueron desarrollados a fin de optimizar la regeneración de plantas de mandioca a partir de embriones somáticos. Stamp y Henshaw (1987b) propusieron un protocolo en dos etapas, en el cual primero se induce la formación de embriones somáticos en medio basal MS adicionado con 2 a 12 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D (etapa I), que luego son transferidos a un medio constituido por MS suplementado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (etapa II). Szabados *et al.*, (1987) lograron mejorar el desarrollo de los vástagos formados a partir de embriones somáticos, mediante la adición de AG<sub>3</sub> en el medio de



maduración. Por otra parte, Mathews *et al.*, (1993) propusieron un nuevo método que incluye una etapa de cultivo de los embriones somáticos en medio MS libre de RCV y adicionado con 0,5% de carbón activado, seguido por desecación y posterior transferencia al medio MS libre de RCV.

**Tabla 3.1:** Tipos de explantes utilizados para inducir embriogénesis somática en mandioca y referencias bibliográficas correspondientes.

Tipo de explante	Referencia bibliográfica
Cotiledones y ejes embrionarios de embriones cigóticos	Stamp y Henshaw, 1987a Konan <i>et al.</i> , 1994b
Hojas o lóbulos foliares inmaduros	Stamp y Henshaw, 1987b Szabados <i>et al.</i> , 1987 Mathews <i>et al.</i> , 1993 Raemakers <i>et al.</i> , 1993a; 1993b; 1993c Mroginski y Scocchi, 1993 Cabral <i>et al.</i> , 1993 Sudarmonowati y Henshaw, 1993 Mukherjee, 1995 Galdeano <i>et al.</i> , 1996 Sofiari <i>et al.</i> , 1997 Mussio <i>et al.</i> , 1998; Li <i>et al.</i> , 1998 Guohua; 1998 Joseph, <i>et al.</i> , 1999 Medero <i>et al.</i> , 2000 Taylor <i>et al.</i> , 1993; 2001 Guohua y Xu, 2002 Medina <i>et al.</i> , 2003 Ihemere, 2003 Hankoua <i>et al.</i> , 2005; 2006 Atehnkeng <i>et al.</i> , 2006 Le <i>et al.</i> , 2007
Meristemas y ápices caulinares	Szabados <i>et al.</i> , 1987 Stamp y Henshaw, 1987b Medero <i>et al.</i> , 2000 Hankoua <i>et al.</i> , 2005; 2006 Feitosa <i>et al.</i> , 2007
Yemas axilares	Medero <i>et al.</i> , 2000 Rengifo <i>et al.</i> , 2006 Atehnkeng <i>et al.</i> , 2006
Inflorescencias inmaduras	Woodward y Puonti-Kaerlas, 2001
Anteras	Mukherjee, 1995

Sin embargo, la embriogénesis somática en mandioca continúa presentando serias limitaciones. Una de ellas es la baja eficiencia en la regeneración (Szabados *et al.*, 1987; Mathews *et al.*, 1993; Mroginski y Scocchi, 1993; Konan *et al.*, 1994b; Galdeano *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2003). Otras limitantes no menos importantes, son la lentitud del proceso (Raemakers *et al.*, 1993c) y la alta dependencia con respecto al genotipo, la fuente de explantes y el tipo de explantes (Szabados *et al.*, 1987; Mroginski y Scocchi, 1993; Puonti-Kaerlas, 1998; Medina *et al.*, 2003). En este sentido, existen muchos cultivares en los cuales aún no ha sido posible inducir la formación de embriones somáticos (Mroginski y Scocchi, 1993; Galdeano *et al.*, 1996; Puonti Kaerlas, 1998; Ihemere, 2003; Medina, *et al.*, 2003).

Existen diferentes factores que afectan la embriogénesis somática y que pueden ser manipulados con el objetivo de optimizar la frecuencia y calidad morfológica de los embriones somáticos generados, tales como: a) el tipo de explante y su estado fisiológico, b) la composición del medio nutritivo, especialmente con respecto al balance de sales minerales, a la concentración y tipos de carbohidratos presentes, a la concentración y tipos de RCV y el tiempo de exposición a ellos y c) las condiciones de incubación (Litz y Jarret, 1991; Guerra *et al.*, 1999; Phillips, 2004). Algunos de estos factores deben ser ajustados o completamente modificados durante la maduración de los embriones somáticos, etapa en la cual éstos adquieren competencia para convertirse en plantas (Thorpe, 2000).

Este capítulo tiene como objetivo evaluar la capacidad embriogénica de clones de mandioca cultivados en Argentina y estudiar la influencia de diferentes factores (RCV, fuentes carbonadas, tipos de explantes y tiempos de inducción) sobre la producción de embriones somáticos y su posterior conversión a plantas.

## **3.2. Materiales y métodos**

### **3.2.1. Material vegetal**

El material vegetal utilizado en el ensayo de evaluación de la capacidad embriogénica consistió en 33 clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), provenientes del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado, Formosa, Argentina (Tabla 3.2) y el clon colombiano MCOL1505 proveniente del Centro Internacional de Agricultura Tropical, que fue incluido en este estudio a modo de control positivo, debido a su gran capacidad para generar embriones somáticos *in*

*vitro*. En el resto de los experimentos realizados se utilizó sólo el clon EC 118, por ser el que demostró mayor capacidad embriogénica.

**Tabla 3.2:** Procedencia y principales características de los clones de mandioca del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado, Formosa, evaluados con respecto a su capacidad embriogénica.

Clon	Procedencia	kg/ Planta	Nº Raíces		kg Raíz		Altura de planta	Color de raíz
			Com	Desc	Com	Desc		
EC 22	Col Drifin Porá Ctes	2,200	28	5	6,6	0,75	2,85	Blanca
EC 107	EEA EC Mariño	3,030	25	9	9,1	1,00	2,80	Marrón
EC 44	Picada Sur Javier Misiones	3,300	26	11	11,1	1,60	2,45	Blanca
EC 42	Paraje Lopez Misiones	5,330	37	5	16	0,70	2,25	Marrón
EC 6	Monte Caseros, Ctes	2,930	17	6	8,8	0,60	3,00	Blanca
EC 20	Ing. Juárez, Fsa	1,760	17	9	5,3	1,00	2,30	Marrón
EC 88	Cahuare Misiones	3,700	19	5	11,1	0,55	2,00	Marrón
EC 19	Paso Ita, Ctes	1,730	12	5	5,2	0,80	1,60	Blanca
EC 26	Col San Justo, Ctes	1,660	17	7	5,0	0,65	1,50	Marrón
EC24-10	Col Drifin Porá, Ctes	1,916	17	11	5,75	1,50	1,50	Marrón
EC 29-9	Col San Justo, Ctes	2,030	13	6	6,1	1,10	1,70	Marrón
EC 3	Col Santa Ana, Ctes	3,160	21	7	9,5	1,00	2,10	Marrón
EC 90	Cahuare Misiones	4,200	27	5	12,6	0,80	1,90	Marrón
EC 157	Manantiales, Ctes	2,400	19	3	7,8	0,30	1,90	Marrón
EC 165	Manantiales Raíz Blanca, Ctes	2,900	22	7	8,7	1,00	1,80	Blanca
EC 161	Yrigoyen, Fsa	2,660	22	6	8,0	0,70	1,90	Marrón
EC 110	Pomberí	2,730	24	10	8,2	0,90	2,00	Blanca
EC 111	Campeona C.B.	2,860	18	10	8,6	1,30	1,80	Marrón
EC 74	Km 1124 San Javier, Ctes	1,800	20	18	5,4	1,30	2,05	Blanca
EC 113	EEA, E.C., Negra, Fsa	1,860	17	3	5,6	0,20	1,80	Blanca
EC 23	Drifin Porá	0,900	16	3	2,7	0,20	1,30	Blanca
EC 118	C.A.6 3, Misiones	2,160	18	2	6,5	0,30	1,80	Blanca
EC 124	Yerutí	3,860	20	5	11,6	0,60	2,20	Blanca
EC 1-1	Col. Sta Ana, Entre Ríos	1,860	16	4	5,6	0,60	3,00	Blanca
EC 121	C.A. 25.1, Misiones	3,000	24	4	9,0	0,60	2,90	Marrón
EC 163	Manantiales, Ctes	1,160	12	5	3,5	1,60	2,20	Blanca
EC 27-4	San Justo, Ctes	3,730	21	0	11,2	0	2,00	Marrón
EC 162	Sin caracterización	-	-	-	-	-	-	-
EC 168	Manantiales Corrientes	2,860	20	0	8,60	0,00	1,65	Blanca
EC 53	Cahuaré, Misiones	5,230	24	7	15,7	1,20	2,40	Marrón
EC 170	Sin caracterización	-	-	-	-	-	-	-
EC 89	Cahaguaré, Misiones	2,360	18	5	7,10	0,90	1,85	Marrón
EC 4	Monte Caseros, Corrientes	2,230	15	4	6,70	0,50	2,40	Blanca

**Com:** comercial. **Desc:** descarte. **Fuente:** EEA INTA El Colorado. Datos no publicados

### **3.2.2. Evaluación de la capacidad embriogénica de 34 clones de mandioca**

Se utilizaron como explantes ápices caulinares provenientes de plantas mantenidas *in vitro* en medio basal MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>.

Los explantes fueron cultivados en tubos de vidrio de 12 ml con 3 ml de medio MS adicionado con 2% de sacarosa y 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, por ser éste uno de los medios más eficientes para inducir embriogénesis somática en mayor cantidad de clones (Stamp y Henshaw, 1987; Raemakers *et al.*, 1993a; Medina *et al.*, 2003). Luego de cultivados, los tubos fueron incubados en un cuarto climatizado a 27±2°C en condiciones de oscuridad durante 30 días.

Posteriormente, los callos formados, con embriones somáticos o sin ellos, se transfirieron al medio de maduración propuesto por Szabados *et al.*, (1987), compuesto por medio MS adicionado con 2% de sacarosa, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y se incubaron en un cuarto climatizado a 27±2°C, con un fotoperíodo de 14 h (irradiancia de 116 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A los 30 días, se los transfirió al medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, a fin de favorecer el desarrollo de las plantas.

El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH y/o HCl. Los medios se solidificaron con 0,75% de agar (Sigma® A1296) y se esterilizaron en autoclave a 1 atmósfera de presión (120°C) durante 20 minutos. El AG<sub>3</sub> fue esterilizado mediante filtración (filtros Millipore 0,22 µm) y luego agregado al medio de cultivo, que fue dispensado en cámara de flujo laminar de aire estéril.

Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de embriogénesis y número de embriones somáticos producidos por explante en las etapas de inducción y de maduración, porcentaje de embriones somáticos germinados, teniendo en cuenta el criterio utilizado por Mathews *et al.*, (1993) el cual denota la elongación de la radícula y porcentaje de plantas regeneradas para cada clon.

### **3.2.3. Evaluación del efecto de diferentes auxinas y tipos de explantes sobre la embriogénesis somática en mandioca**

Se utilizaron como explantes ápices caulinares y yemas axilares provenientes de plantas de mandioca del clon EC 118 (por resultar el de mayor capacidad embriogénica en el experimento previo), mantenidas *in vitro* en medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. Los

explantos fueron cultivados en tubos de vidrio de 12 ml conteniendo 3 ml del medio MS adicionado con 2% de sacarosa y cinco reguladores de crecimiento: 4-CPA, 2,4-D, 2,4,5-T, NOA y Picloram, en tres concentraciones diferentes: 2 mg.l<sup>-1</sup>, 6 mg.l<sup>-1</sup> y 10 mg.l<sup>-1</sup> (Tabla 3.3). Luego de cultivados, los explantes fueron incubados en un cuarto climatizado a 27±2°C en condiciones de oscuridad durante 30 días.

**Tabla 3.3:** Tratamientos realizados para evaluar el efecto de diferentes tipos y concentraciones de auxinas en el medio de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca.

Tratamiento	Medio
T <sub>1</sub>	2 mg.l <sup>-1</sup> 4-CPA
T <sub>2</sub>	6 mg.l <sup>-1</sup> 4-CPA
T <sub>3</sub>	10 mg.l <sup>-1</sup> 4-CPA
T <sub>4</sub>	2 mg.l <sup>-1</sup> 2,4-D
T <sub>5</sub>	6 mg.l <sup>-1</sup> 2,4-D
T <sub>6</sub>	10 mg.l <sup>-1</sup> 2,4-D
T <sub>7</sub>	2 mg.l <sup>-1</sup> 2,4,5-T
T <sub>8</sub>	6 mg.l <sup>-1</sup> 2,4,5-T
T <sub>9</sub>	10 mg.l <sup>-1</sup> 2,4,5-T
T <sub>10</sub>	2 mg.l <sup>-1</sup> NOA
T <sub>11</sub>	6 mg.l <sup>-1</sup> NOA
T <sub>12</sub>	10 mg.l <sup>-1</sup> NOA
T <sub>13</sub>	2 mg.l <sup>-1</sup> Picloram
T <sub>14</sub>	6 mg.l <sup>-1</sup> Picloram
T <sub>15</sub>	10 mg.l <sup>-1</sup> Picloram

El procedimiento seguido posteriormente, las condiciones de incubación de los embriones somáticos y las variables evaluadas fueron las mismas que se detallaron en el apartado anterior (3.2.2). Además se calculó el índice de embriogénesis (IE) como:

$$IE = \frac{\% \text{ de embriogénesis somática} \times N^{\circ} \text{ promedio de embriones somáticos}}{100}$$

### **3.2.4. Evaluación del efecto de diferentes tiempos de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca**

Se continuaron utilizando como explantes ápices caulinares y yemas axilares provenientes de plantas de mandioca del clon EC 118, mantenidas *in vitro* en el medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. Los explantes fueron cultivados en tubos de vidrio de 12 ml conteniendo 3 ml del medio MS adicionado con 2% de sacarosa y 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D e incubados en un cuarto climatizado a 27±2°C en condiciones de oscuridad durante diferentes periodos de tiempo: 10 días (T<sub>1</sub>), 20 días (T<sub>2</sub>) y 30 días (T<sub>3</sub>).

El procedimiento seguido posteriormente, las condiciones de incubación de los embriones somáticos y las variables evaluadas fueron las mismas que se detallaron en el apartado 3.2.2.

### **3.2.5. Evaluación del efecto de diferentes fuentes carbonadas en el medio de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca**

Se utilizaron como explantes sólo yemas axilares del clon EC 118 (por existir mayor disponibilidad del material, habiendo demostrado en los experimentos previos una importante capacidad embriogénica), provenientes de plantas mantenidas *in vitro* en el medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. Los explantes fueron cultivados en tubos de vidrio de 12 ml conteniendo 3 ml del medio MS sin sacarosa adicionado con 6mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinco fuentes carbonadas: glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y rafinosa, en tres concentraciones diferentes: 1%, 3% y 5% (Tabla 3.4). Luego de cultivados, se los incubó en un cuarto climatizado a 27±2°C en condiciones de oscuridad durante 30 días.

El procedimiento seguido posteriormente, las condiciones de incubación de los embriones somáticos y las variables evaluadas fueron las mismas que se detallaron en el apartado 3.2.2.

**Tabla 3.4:** Tratamientos realizados para de evaluar el efecto de diferentes tipos y concentraciones de fuentes carbonadas adicionadas al medio de inducción, sobre la embriogénesis somática en mandioca.

Tratamiento	Medio
T <sub>1</sub>	Glucosa 1%
T <sub>2</sub>	Glucosa 3%
T <sub>3</sub>	Glucosa 5%
T <sub>4</sub>	Fructosa 1%
T <sub>5</sub>	Fructosa 3%
T <sub>6</sub>	Fructosa 5%
T <sub>7</sub>	Sacarosa 1%
T <sub>8</sub>	Sacarosa 3%
T <sub>9</sub>	Sacarosa 5%
T <sub>10</sub>	Galactosa 1%
T <sub>11</sub>	Galactosa 3%
T <sub>12</sub>	Galactosa 5%
T <sub>13</sub>	Rafinosa 1%
T <sub>14</sub>	Rafinosa 3%
T <sub>15</sub>	Rafinosa 5%

### 3.2.6. *Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados*

El diseño de los experimentos fue completamente aleatorizado, con 3 repeticiones de 10 explantes cada una para cada tratamiento (o para cada clon en el experimento detallado en el apartado 3.2.2).

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza, utilizando el programa estadístico InfoStat/P versión 1.1 (InfoStat, 2002), previa verificación de la normalidad de las variables. Las variables expresadas en porcentaje (x) fueron transformadas mediante  $\sqrt{(x/100 + 0,5)}$  mientras que las demás variables (x) que no mostraron distribución normal se transformaron mediante  $\sqrt{(x + 0,5)}$  a fin de normalizarlas. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas, se compararon los valores medios de las variables evaluadas, mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan.

### **3.3. Resultados y Discusión**

#### **3.3.1. Evaluación de la capacidad embriogénica de 34 clones de mandioca**

A los 30 días de cultivo en medio de inducción, fue posible observar en todos los clones evaluados, la formación de callos no embriogénicos de aspecto friable y de callos embriogénicos de aspecto mucilaginoso. Éstos últimos originaron embriones somáticos en distintos estadios, coincidiendo con lo hallado por Medina *et al.* (2003). Al finalizar la etapa de inducción el 79,4% de los clones evaluados (27 clones) presentaron embriones somáticos, hallándose diferencias significativas entre clones con respecto al porcentaje de embriogénesis somática ( $p \leq 0,01$ ), que varió entre 3% y 44% (Tabla 3.5; Fig. 3.1). Estos valores son similares a los informados por Atehnkeng *et al.*, (2006) para 11 clones de mandioca cultivados en Africa.

El número promedio de embriones somáticos observados en la etapa de inducción presentó diferencias significativas entre clones ( $p \leq 0,01$ ), variando entre 0,7 y 3,7 embriones somáticos para los clones cultivados en Argentina, mientras que el clon MCOL 1505 diferenció, en promedio, 7 embriones somáticos (Tabla 3.5; Figs. 3.2 y 3.6 A).

En la etapa de maduración se registró un aumento en el número de clones que generaron embriones somáticos, así como en la cantidad de embriones somáticos por explante. El 82,4% de los clones evaluados (28 clones) presentó embriones somáticos en estadios de torpedo o cotiledonar. Se hallaron diferencias significativas entre los clones con respecto al porcentaje de embriogénesis ( $p \leq 0,01$ ), variando entre 3% y 50%. Los mayores valores correspondieron al clon EC 118, que superó al clon colombiano MCOL 1505, utilizado como control por ser considerado altamente embriogénico. Estos valores coinciden con lo reportado por Medina *et al.* (2003) y son superiores a los obtenidos por Atehnkeng *et al.* (2006). En sólo dos clones (EC 20 y EC 22) se observaron embriones globulares en la etapa de inducción (7% y 3% respectivamente) que fueron cubiertos por el callo y no prosperaron en la etapa de maduración, coincidiendo con lo observado por Raemakers *et al.*, (1993b) y Atehnkeng *et al.*, (2006). Mientras que tres clones (EC 121, EC 111 y EC 27-4) que no habían formado embriones somáticos en la etapa de inducción, lo hicieron en la de maduración (3%, 7% y 3% respectivamente) (Tabla 3.5; Fig. 3.3).

El número promedio de embriones somáticos por explante aumentó en la etapa de maduración, observándose diferencias significativas entre los clones



( $p \leq 0,01$ ) con valores que oscilaron entre 0,3 y 6,2 para los clones cultivados en Argentina, ascendiendo a 7,6 para el clon MCOL 1505 (Tabla 3.5; Figs. 3.4 y 3.6 B y C). Es importante destacar que se observaron embriones fusionados en la mayoría de los clones.

Durante esta etapa fue posible observar la formación de estructuras foliosas en la mayoría de los clones (79%), tal como fuera reportado por Stamp y Henshaw (1987b), Raemakers *et al.*, (1993b); Konan *et al.*, (1994a) y Mussio *et al.*, (1998). Coincidiendo con estos autores, las estructuras foliosas no se desarrollaron posteriormente y no expresaron competencia embriogénica, tal vez por el efecto inhibitorio del BAP presente en el medio de maduración (Atehnkeng, *et al.*, 2006) (Fig. 3.6 D).

La amplia variación en el porcentaje de embriogénesis y en el número promedio de embriones somáticos por explante en los diferentes clones evaluados, evidencia la importancia del genotipo con respecto a la capacidad embriogénica, tal como expresaron Szabados *et al.*, (1987); Mroginski y Scocchi (1992); Taylor *et al.*, (1993); Sudarmonowati y Henshaw (1993); Medina *et al.*, (2003) y Hankoua *et al.*, (2005) y sugiere algún tipo de control genético subyacente. En este sentido es importante destacar la eficiencia del medio de inducción empleado, sugerido por Stamp y Henshaw (1987b), Raemakers *et al.*, (1993a), Li *et al.*, (1998) y Medina *et al.*, (2003) ya que a pesar de las diferencias a nivel de genotipo, permitió inducir la formación de embriones en 30 de los 34 clones evaluados (88%) si se consideran todos los clones que brindaron respuesta embriogénica en las fase de inducción y/o la de maduración. La respuesta generalizada de los clones al medio de inducción compuesto por 2,4-D es contraria a lo informado por Taylor *et al.*, (1993) quienes para 15 clones de mandioca africanos y uno sudamericano obtuvieron respuestas más efectivas con Picloram que con 2,4D.

Por otra parte, Sudarmonowati y Henshaw (1993) observaron que los clones de mandioca que no produjeron embriones somáticos en medios suplementados con 2,4-D, respondieron, en cambio, en medios con elevadas dosis de Picloram o Dicamba. Por tal motivo sería de interés evaluar la respuesta a esos reguladores de crecimiento en los 4 clones de mandioca que en este experimento no produjeron embriones somáticos (EC 44, EC 88, EC 107 y EC 163).

La germinación de los embriones somáticos, sólo fue posible en el 47% de los clones (16 clones). El porcentaje de embriones que germinaron varió entre 0,4% a 11,6% para los diferentes clones, a pesar de haber incorporado AG<sub>3</sub> al

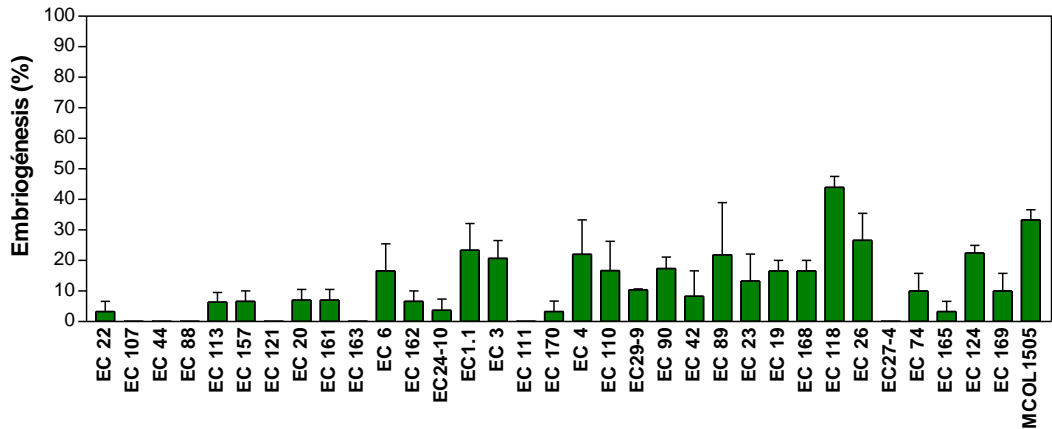
medio de maduración a fin de favorecer la extensión del tallo y la formación de hojas maduras, tal como propusieron Szabados *et al.*, (1987) y Taylor *et al.*, (1993). Los valores obtenidos resultaron inferiores a los reportados por Medina *et al.*, (2003), quienes para otros clones cultivados en Argentina utilizaron el medio sin AG<sub>3</sub> propuesto por Stamp y Henshaw (1987b). Sólo el clon EC 113 presentó un elevado porcentaje de germinación (68,9%) (Figs. 3.5 y 3.6 E).

Se observó la conversión a plantas en 9 de los 34 clones evaluados (26,5%): EC 113, EC 118, EC 162, EC70, EC 6, EC110, EC 74, EC 169 y EC 1505 (Fig. 3.6 F). Esto supone un incremento importante en la cantidad de clones con capacidad para regenerar plantas enteras de interés agronómico para Argentina, con respecto al obtenido por Mroginski y Scocchi (1993), Galdeano *et al.*, (1996) y Medina *et al.*, (2003). El porcentaje de conversión a planta, con respecto a los embriones germinados, varió entre 0% y 23,3%, siendo inferior a lo hallado por Medina *et al.*, (2003), con excepción del clon EC 113 que presentó un porcentaje de conversión a planta significativamente superior (66,7%). Los bajos valores de conversión a planta coinciden con lo informado por Szabados *et al.*, (1987), Mroginski y Scocchi (1993), Taylor *et al.*, (1993), Galdeano *et al.*, (1996), Puonti-Kaerlas (1998); Medina *et al.*, (2003) y Hankoua *et al.*, (2005).

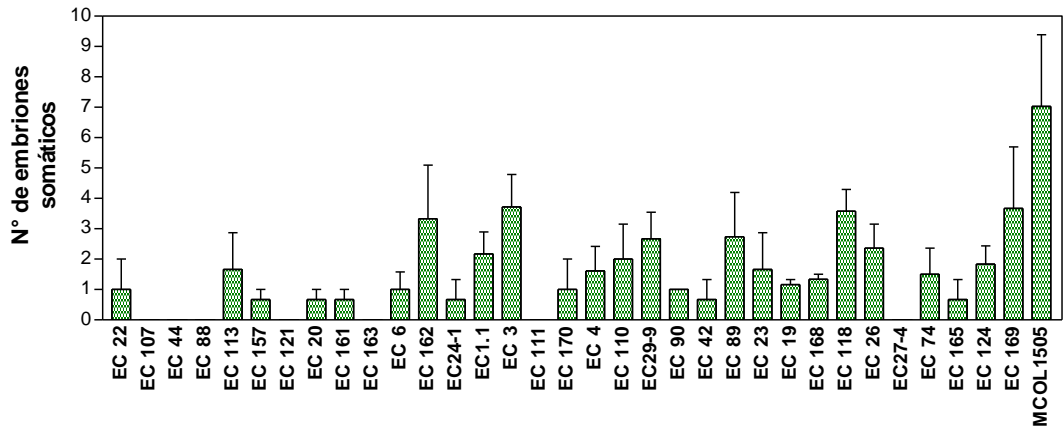
**Tabla 3.5:** Porcentaje de embriogénesis somática y número promedio de embriones somáticos por explante en las etapas de inducción y maduración para 34 clones de mandioca.

Clones	Embriogénesis somática (%)		N° embriones somáticos/explante	
	Inducción	Maduración	Inducción	Maduración
EC 22	3,3 <sup>ab</sup>	0,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>abc</sup>	0,0 <sup>a</sup>
EC 107	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
EC 44	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
EC 88	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
EC 113	6,4 <sup>abcd</sup>	13,1 <sup>abcd</sup>	1,7 <sup>abc</sup>	1,5 <sup>abc</sup>
EC 157	6,7 <sup>abcd</sup>	3,3 <sup>a</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,7 <sup>ab</sup>
EC 121	0,0 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,3 <sup>ab</sup>
EC 20	7,0 <sup>abcd</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,0 <sup>a</sup>
EC 161	6,7 <sup>abcd</sup>	10,0 <sup>abcd</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	1,2 <sup>abc</sup>
EC 163	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
EC 6	16,7 <sup>abcde</sup>	39,8 <sup>ef</sup>	1,0 <sup>abc</sup>	2,3 <sup>abc</sup>
EC 162	6,7 <sup>abcd</sup>	10,0 <sup>abcd</sup>	3,3 <sup>bcd</sup>	2,8 <sup>abc</sup>
EC 24-10	3,7 <sup>abc</sup>	3,3 <sup>a</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,3 <sup>ab</sup>
EC 1.1	23,3 <sup>cde</sup>	46,7 <sup>f</sup>	2,2 <sup>abc</sup>	2,3 <sup>abc</sup>
EC 3	20,7 <sup>bcde</sup>	26,1 <sup>cde</sup>	3,7 <sup>cd</sup>	6,2 <sup>de</sup>
EC 111	0,0 <sup>a</sup>	6,7 <sup>ab</sup>	0,0 <sup>a</sup>	2,0 <sup>abc</sup>
EC 170	3,3 <sup>ab</sup>	3,3 <sup>a</sup>	1,0 <sup>abc</sup>	2,3 <sup>abc</sup>
EC 4	22,0 <sup>bcde</sup>	27,4 <sup>de</sup>	1,6 <sup>abc</sup>	3,3 <sup>bcd</sup>
EC 110	16,7 <sup>abcde</sup>	16,7 <sup>abcd</sup>	2,0 <sup>abc</sup>	3,2 <sup>abcd</sup>
EC 29-9	10,4 <sup>bcde</sup>	10,0 <sup>abcd</sup>	2,7 <sup>bc</sup>	3,0 <sup>abcd</sup>
EC 90	17,4 <sup>abcde</sup>	7,0 <sup>ab</sup>	1,0 <sup>abc</sup>	0,7 <sup>abc</sup>
EC 42	8,3 <sup>abcd</sup>	8,3 <sup>abc</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,3 <sup>ab</sup>
EC 89	21,9 <sup>bcde</sup>	11,1 <sup>abcd</sup>	2,7 <sup>abc</sup>	1,2 <sup>abc</sup>
EC 23	13,3 <sup>abcd</sup>	16,7 <sup>abcd</sup>	1,7 <sup>abc</sup>	1,1 <sup>abc</sup>
EC 19	16,7 <sup>abcde</sup>	10,0 <sup>abcd</sup>	1,2 <sup>abc</sup>	0,8 <sup>abc</sup>
EC 168	16,7 <sup>abcde</sup>	23,3 <sup>bcde</sup>	1,3 <sup>abc</sup>	2,1 <sup>abc</sup>
EC 118	44,0 <sup>f</sup>	50,0 <sup>f</sup>	3,6 <sup>cd</sup>	4,1 <sup>cd</sup>
EC 26	26,7 <sup>def</sup>	16,7 <sup>abcd</sup>	2,4 <sup>abc</sup>	2,7 <sup>abc</sup>
EC 27-4	0,0 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>	0,7 <sup>abc</sup>
EC 74	10,0 <sup>abcd</sup>	13,3 <sup>abcd</sup>	1,5 <sup>abc</sup>	2,3 <sup>abc</sup>
EC 165	3,3 <sup>ab</sup>	6,7 <sup>ab</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,7 <sup>abc</sup>
EC 124	22,4 <sup>bcde</sup>	25,8 <sup>cde</sup>	1,8 <sup>abc</sup>	2,3 <sup>abc</sup>
EC 169	10,0 <sup>abcd</sup>	15,0 <sup>abcd</sup>	3,7 <sup>bcd</sup>	3,7 <sup>bcd</sup>
MCOL1505	33,3 <sup>ef</sup>	46,7 <sup>f</sup>	7,0 <sup>d</sup>	7,6 <sup>e</sup>

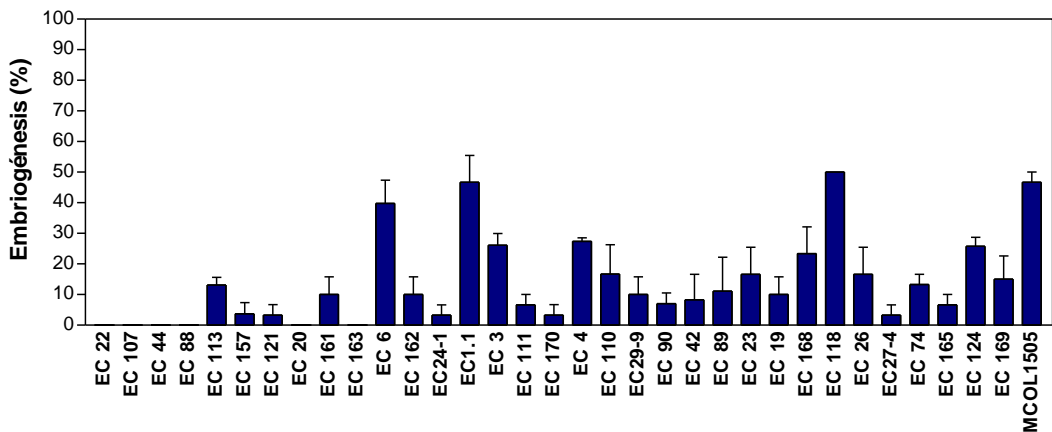
Letras distintas en las columnas indican diferencias altamente significativas (p<0,01)



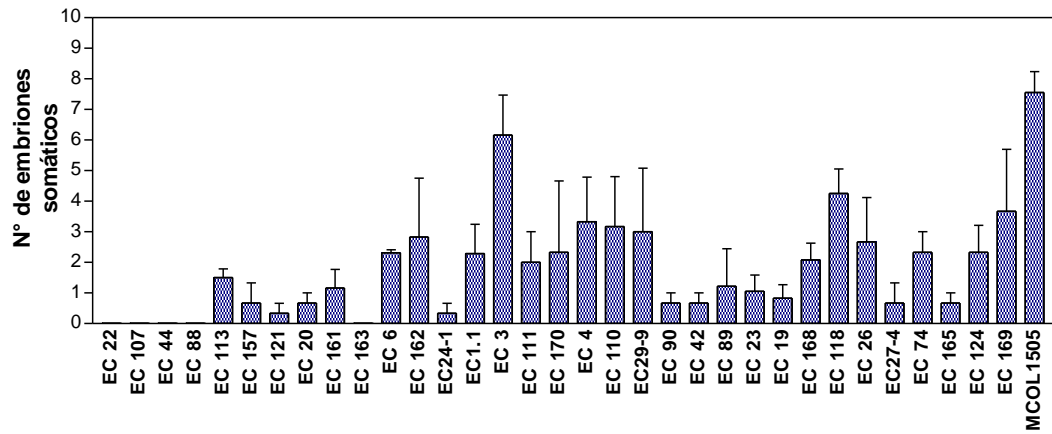
**Fig. 3.1:** Porcentaje de embriogénesis somática a los 30 días de cultivo en medio de inducción, para 34 clones de mandioca.



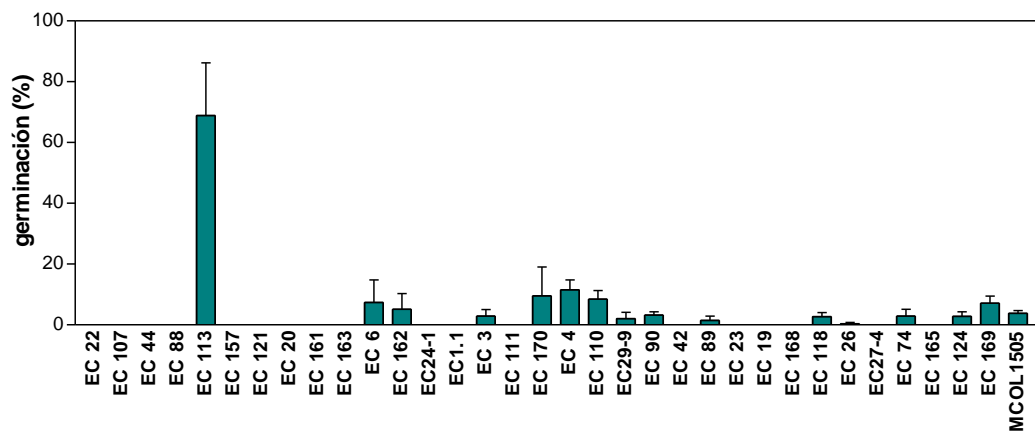
**Fig. 3.2:** Número de embriones somáticos promedio por explante a los 30 días de cultivo en medio de inducción, para 34 clones de mandioca.



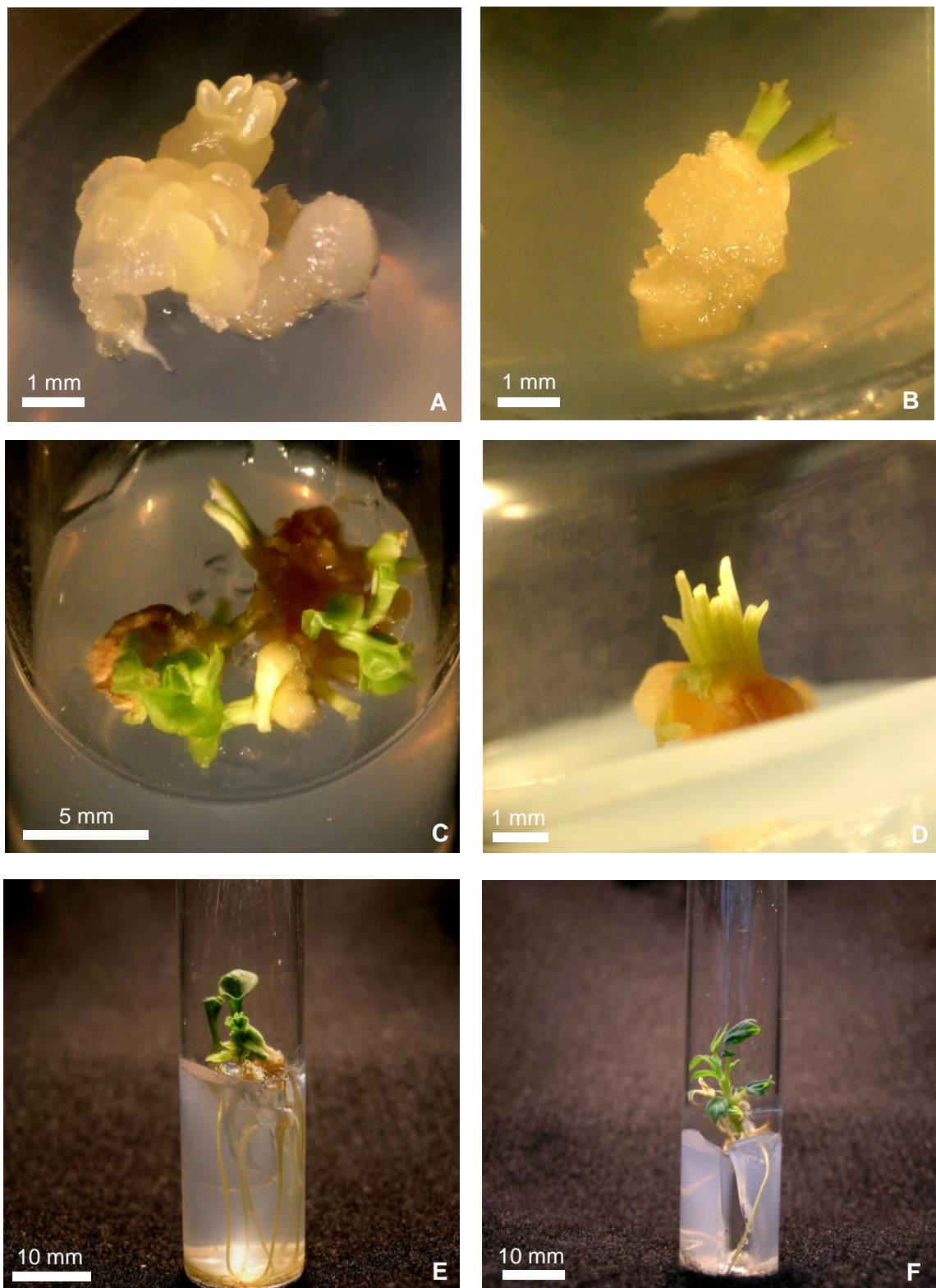
**Fig. 3.3:** Porcentaje de embriogénesis somática a los 30 días de cultivo en medio de maduración, para 34 clones de mandioca.



**Fig. 3.4:** Número de embriones somáticos promedio por explante a los 30 días de cultivo en medio de maduración, para 34 clones de mandioca.



**Fig. 3.5:** Porcentaje de embriones somáticos germinados para 34 clones de mandioca.



**Fig. 3.6:** Diferentes etapas en la embriogénesis somática: (A) Inducción de embriones somáticos; (B y C) Maduración de los embriones somáticos; (D) Estructuras foliosas; (E) Germinación de embriones somáticos; (F) Planta regenerada a partir de embriones somáticos.

### **3.3.2. Evaluación del efecto de diferentes auxinas y tipos de explantes sobre la embriogénesis somática en mandioca**

Fue posible inducir la formación de embriones somáticos en todos los medios de cultivo evaluados, independientemente del tipo de auxina y de la concentración empleada.

Al finalizar la etapa de inducción se hallaron diferencias significativas entre los medios con respecto al porcentaje de embriogénesis obtenido a partir de ápices caulinares ( $p \leq 0,01$ ), con valores entre 10% y 67,5%. A los 30 días de ser transferidos a medio de maduración, las diferencias entre los medios de cultivo continuaron siendo significativas con respecto a esta variable ( $p \leq 0,01$ ). Los porcentajes de embriogénesis se mantuvieron aproximadamente entre los mismos valores (10% y 64,2%) con leves variaciones entre los medios con respecto a la etapa anterior (Tabla 3.6; Fig. 3.7). Los mayores porcentajes de embriogénesis al utilizar ápices caulinares como explantes se obtuvieron con las concentraciones más elevadas de 2,4-D y Picloram (6 y 10  $\text{mg.l}^{-1}$ ). El 2,4,5-T, en su menor concentración (2  $\text{mg.l}^{-1}$ ) no difirió significativamente de las auxinas de mejor desempeño. En general, se observaron mejores resultados con las mayores concentraciones de la auxinas evaluadas, a excepción del 2,4,5-T y el 4-CPA (Tabla 3.6; Fig. 3.7).

El porcentaje de embriogénesis somática obtenido al utilizar como explantes yemas axilares varió significativamente entre los medios evaluados tanto en la etapa de inducción como en la de maduración ( $p \leq 0,01$ ), observándose embriones somáticos en todos los medios y registrándose valores entre 6,7% y 73,3% en ambas etapas. Si bien los valores máximos y mínimos son similares a los obtenidos con ápices caulinares, las yemas axilares permitieron obtener porcentajes de embriogénesis superiores al 50% en 8 de los 16 medios evaluados, mientras que en el caso de los ápices sólo 4 medios produjeron más del 50% de embriogénesis somática. Los mayores porcentajes de embriogénesis se obtuvieron en los medios adicionados con 2,4-D en todas las concentraciones, manteniéndose una tendencia similar a la observada con los ápices caulinares (Tabla 3.6; Fig. 3.8).

Rengifo *et al.*, (2006) reportaron porcentajes de embriogénesis similares a los obtenidos en este trabajo (70% y 40%) a partir de yemas axilares de dos clones diferentes cultivados en medio MS adicionado con 6  $\text{mg.l}^{-1}$  de 2,4-D. En este sentido, Medero *et al.*, (2000) informaron porcentajes de embriogénesis significativamente superiores al utilizar como explantes yemas axilares, con

respecto a los ápices caulinares y a las hojas inmaduras cultivados en medio de inducción adicionado con diferentes dosis de 2,4-D resultando, en todos los casos, inferiores a los valores obtenidos en el presente estudio. Contrariamente Atehnkeng *et al.*, (2006) reportaron un mayor porcentaje de embriogénesis al cultivar en el medio MS adicionado con Picloram lóbulos foliares inmaduros (21,7%), con respecto a las yemas axilares (13,8%).

El efecto positivo de concentraciones crecientes de 2,4-D (hasta 8 o 12 mg.l<sup>-1</sup>) sobre la embriogénesis somática en mandioca fue reportado por Stamp y Henshaw (1987b); Raemakers *et al.*, (1993a; 1993b); Cabral *et al.*, (1993); Guohua (1998); Li *et al.*, (1998); Ihemere, (2003); Rengifo, *et al.*, (2006) y Le *et al.*, (2007). Medero *et al.*, (2000) obtuvieron mejores resultados con 2 y 4 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, al emplear como explantes ápices caulinares y yemas axilares. Por otra parte, Ihemere (2003) informó que la respuesta embriogénica de las hojas inmaduras de mandioca mostraba mayor dependencia del genotipo cuando se utilizaba Picloram en el medio de inducción con respecto al 2,4-D. Esto es contrario a lo reportado por Taylor *et al.* (2001).

La adición de 10 mg.l<sup>-1</sup> de NOA en el medio de inducción produjo un 46% y 57% de embriogénesis somática, a partir de ápices caulinares y yemas axilares respectivamente, sin presentar diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos al utilizar las mejores concentraciones de 2,4-D o Picloram ( $p \leq 0,01$ ) (Tabla 3.6; Figs. 3.7 y 3.8). Este valor es claramente superior al 5% informado por Stamp y Henshaw (1987b) para lóbulos foliares inmaduros incubados sobre un medio adicionado con 12 mg.l<sup>-1</sup> de NOA.

El número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares presentó diferencias significativas entre los medios evaluados ( $p \leq 0,01$ ), registrándose valores entre 0,6 y 9,8 embriones en la etapa de inducción, que llegaron a un máximo de 12,4 en la etapa de maduración, coincidiendo con lo informado por Le *et al.*, (2007). Los mayores valores se registraron en los medios adicionados con Picloram. En general, concentraciones crecientes de las diferentes auxinas evaluadas aumentaron la cantidad de embriones somáticos producidos, a excepción del 2,4,5-T que presentó el comportamiento opuesto (Tabla 3.6; Figs. 3.9 y 3.13 A).

Las yemas axilares también brindaron una respuesta significativamente diferente en los distintos medios evaluados con respecto al número promedio de embriones somáticos generados ( $p \leq 0,01$ ). Si bien los ápices caulinares produjeron



más embriones somáticos en el medio adicionado con  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de Picloram, nuevamente la respuesta de las yemas axilares fue más homogénea en los diferentes medios (entre 0,8 y 8,2 embriones somáticos), registrándose 6 medios con más de 5 embriones por explante. Los medios que brindaron las mejores respuestas con los ápices caulinares, también lo hicieron con las yemas axilares (Tabla 3.6; Figs. 3.10 y 3.13 B). Coincidiendo con Rengifo *et al.*, (2006), el mayor número de embriones somáticos por explante se obtuvo con 6 y  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D, si bien los valores informados por esos autores son superiores a los obtenidos en este trabajo.

El índice de embriogénesis (IE) presentó diferencias significativas entre los medios evaluados para los dos tipos de explantes ( $p \leq 0,01$ ). Si bien en ambos casos fue posible observar un patrón similar con respecto a los medios que brindaron las mejores respuestas, los ápices caulinares tuvieron el mejor desempeño con  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de Picloram, mientras que las yemas axilares respondieron mejor con 6 y  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D (Tabla 3,7; Fig. 3.11). Según Guerra *et al.*, (1999) la respuesta diferencial de distintos tipos de explantes pertenecientes a un mismo genotipo ante diferentes RCV, podría deberse a la presencia de una mayor cantidad de receptores para determinado RCV en las células de un tipo de explante, mientras que las células de otro tipo de explante, del mismo clon, tendrían mayor cantidad de receptores para otro(s) RCV.

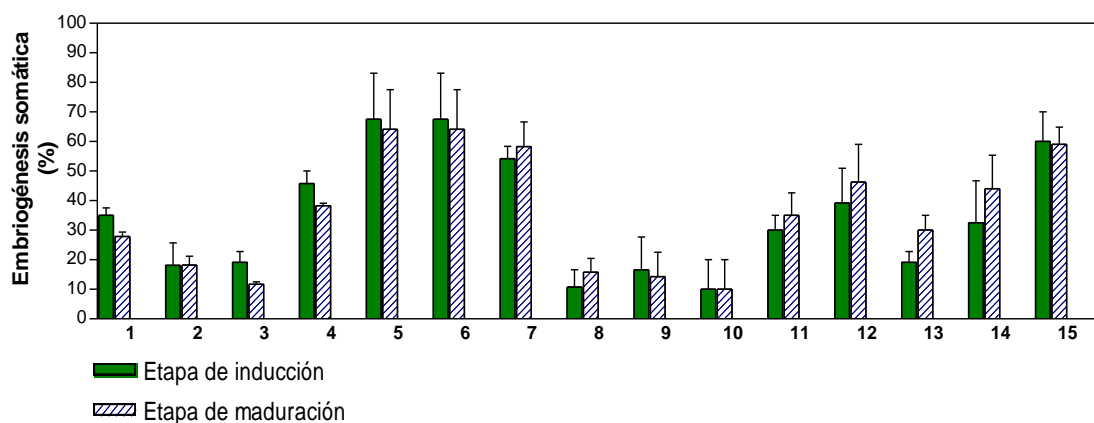
El porcentaje de germinación no presentó diferencias significativas entre los medios para ninguno de los explantes evaluados ( $p \leq 0,01$ ). Los valores variaron entre 0% y 61% para los ápices caulinares y 6,7% y 40% para las yemas axilares. En ambos casos los mayores valores se obtuvieron con  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4,5-T (Tabla 3.7; Figs. 3.12 y 3.13 C y D).

El porcentaje de plantas regeneradas, en función del número de embriones somáticos germinados, varió para ambos tipos de explantes entre 0% y 33%, obteniéndose plantas en 4 de los medios evaluados cuando se utilizaron ápices caulinares y en 6 de los medios cuando se utilizaron yemas axilares. En ambos casos, el mayor porcentaje de conversión a planta se obtuvo en los medios adicionados con NOA ( $2$  y  $6 \text{ mg.l}^{-1}$ ), siendo posible también la conversión a planta en los medios adicionados con 2,4-D y Picloram en ambos tipos de explantes. Estos últimos valores son similares a los reportados por Medina *et al.*, (2003) para clones de mandioca cultivados en Argentina.

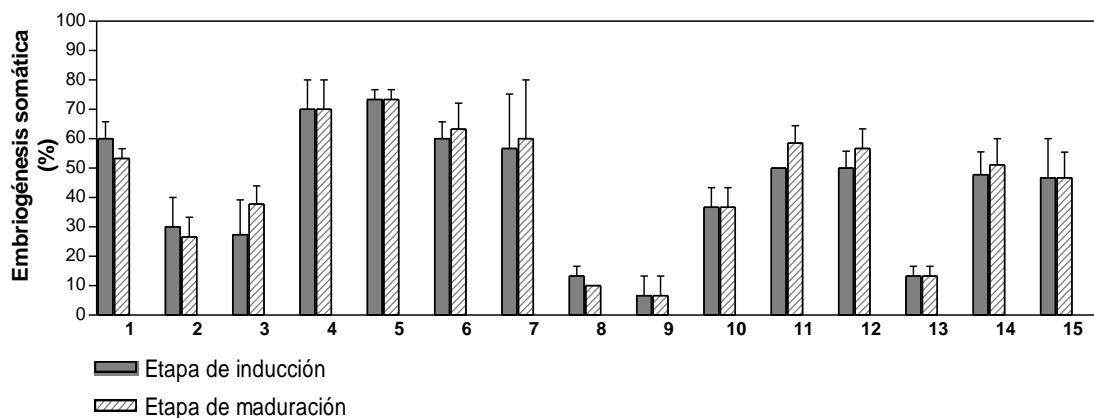
**Tabla 3.6:** Porcentaje de embriogénesis somática y número promedio de embriones somáticos en la etapa de maduración, para diferentes explantes de mandioca (clon EC 118) cultivados en medio MS adicionado con distintas auxinas.

Trat	Auxina	Concentración (mg.l <sup>-1</sup> )	Embriogénesis somática (%)		N° embriones somáticos/explante	
			Ápices caulinares	Yemas axilares	Ápices caulinares	Yemas axilares
1	4-CPA	2 mg.l <sup>-1</sup>	27,9 <sup>abcde</sup>	53,3 <sup>cde</sup>	4,2 <sup>abc</sup>	5,9 <sup>cd</sup>
2		6 mg.l <sup>-1</sup>	18,2 <sup>abcd</sup>	26,7 <sup>bc</sup>	3,5 <sup>abc</sup>	2,5 <sup>b</sup>
3		10 mg.l <sup>-1</sup>	11,7 <sup>ab</sup>	37,7 <sup>cd</sup>	3,7 <sup>abc</sup>	2,9 <sup>bc</sup>
4	2,4-D	2 mg.l <sup>-1</sup>	38,3 <sup>cdef</sup>	70,0 <sup>de</sup>	4,8 <sup>bc</sup>	5,6 <sup>cd</sup>
5		6 mg.l <sup>-1</sup>	64,2 <sup>f</sup>	73,3 <sup>e</sup>	6,5 <sup>cd</sup>	8,0 <sup>d</sup>
6		10 mg.l <sup>-1</sup>	64,2 <sup>f</sup>	63,3 <sup>de</sup>	6,8 <sup>cd</sup>	8,2 <sup>d</sup>
7	2,4,5-T	2 mg.l <sup>-1</sup>	56,3 <sup>f</sup>	60,0 <sup>de</sup>	4,6 <sup>bc</sup>	3,1 <sup>bc</sup>
8		6 mg.l <sup>-1</sup>	15,8 <sup>abc</sup>	10,0 <sup>ab</sup>	2,2 <sup>abc</sup>	3,7 <sup>bc</sup>
9		10 mg.l <sup>-1</sup>	14,3 <sup>abc</sup>	6,7 <sup>a</sup>	1,5 <sup>ab</sup>	0,8 <sup>a</sup>
10	NOA	2 mg.l <sup>-1</sup>	10,0 <sup>a</sup>	36,7 <sup>cd</sup>	0,6 <sup>a</sup>	3,0 <sup>bc</sup>
11		6 mg.l <sup>-1</sup>	35,0 <sup>bcdef</sup>	58,7 <sup>de</sup>	1,6 <sup>abc</sup>	3,3 <sup>bc</sup>
12		10 mg.l <sup>-1</sup>	46,3 <sup>ef</sup>	56,7 <sup>de</sup>	3,6 <sup>abc</sup>	3,7 <sup>bc</sup>
13	Picloram	2 mg.l <sup>-1</sup>	30,0 <sup>abcde</sup>	13,3 <sup>ab</sup>	2,4 <sup>abc</sup>	2,33 <sup>b</sup>
14		6 mg.l <sup>-1</sup>	44,1 <sup>def</sup>	51,0 <sup>cde</sup>	6,5 <sup>cd</sup>	6,8 <sup>d</sup>
15		10 mg.l <sup>-1</sup>	59,1 <sup>f</sup>	46,7 <sup>cde</sup>	12,4 <sup>d</sup>	7,8 <sup>d</sup>

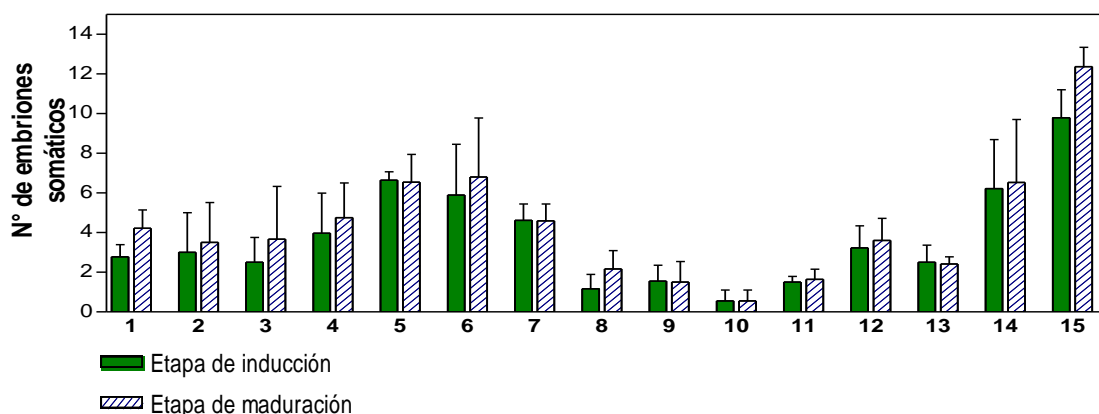
Letras distintas en las columnas indican diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )



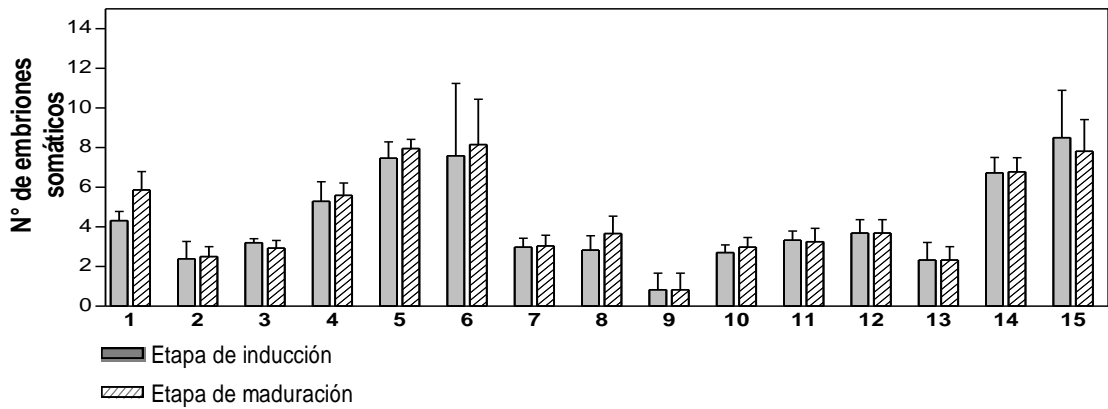
**Fig. 3.7:** Porcentaje de embriogénesis somática obtenida a partir de ápices caulinares de mandioca (clon EC 118) cultivados en diferentes medios de inducción, en las etapas de inducción y de maduración.



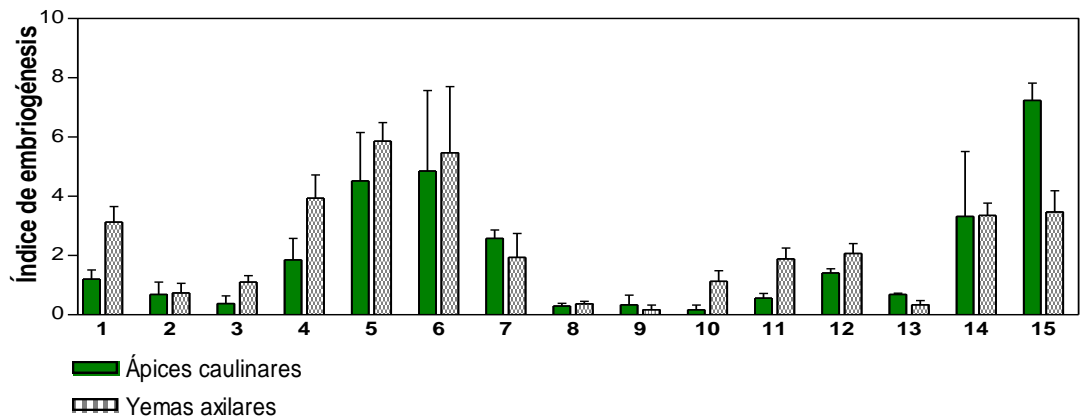
**Fig. 3.8:** Porcentaje de embriogénesis somática obtenida a partir de yemas axilares de mandioca (clon EC 118) cultivadas en diferentes medios de inducción en las etapas de inducción y de maduración.



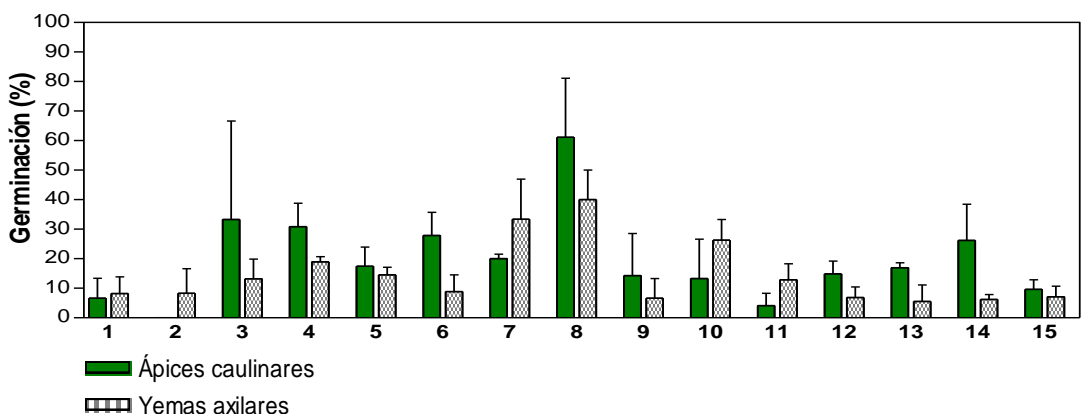
**Fig. 3.9:** Número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares de mandioca (clon EC 118) cultivados en diferentes medios de inducción, en las etapas de inducción y de maduración.



**Fig. 3.10:** Número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de yemas axilares de mandioca (clon EC 118) cultivadas en diferentes medios de inducción, en las etapas de inducción y de maduración.



**Fig. 3.11:** Índice de embriogénesis en la etapa de maduración para ápices caulinares y yemas axilares de mandioca (clon EC 118) cultivados en diferentes medios de inducción.

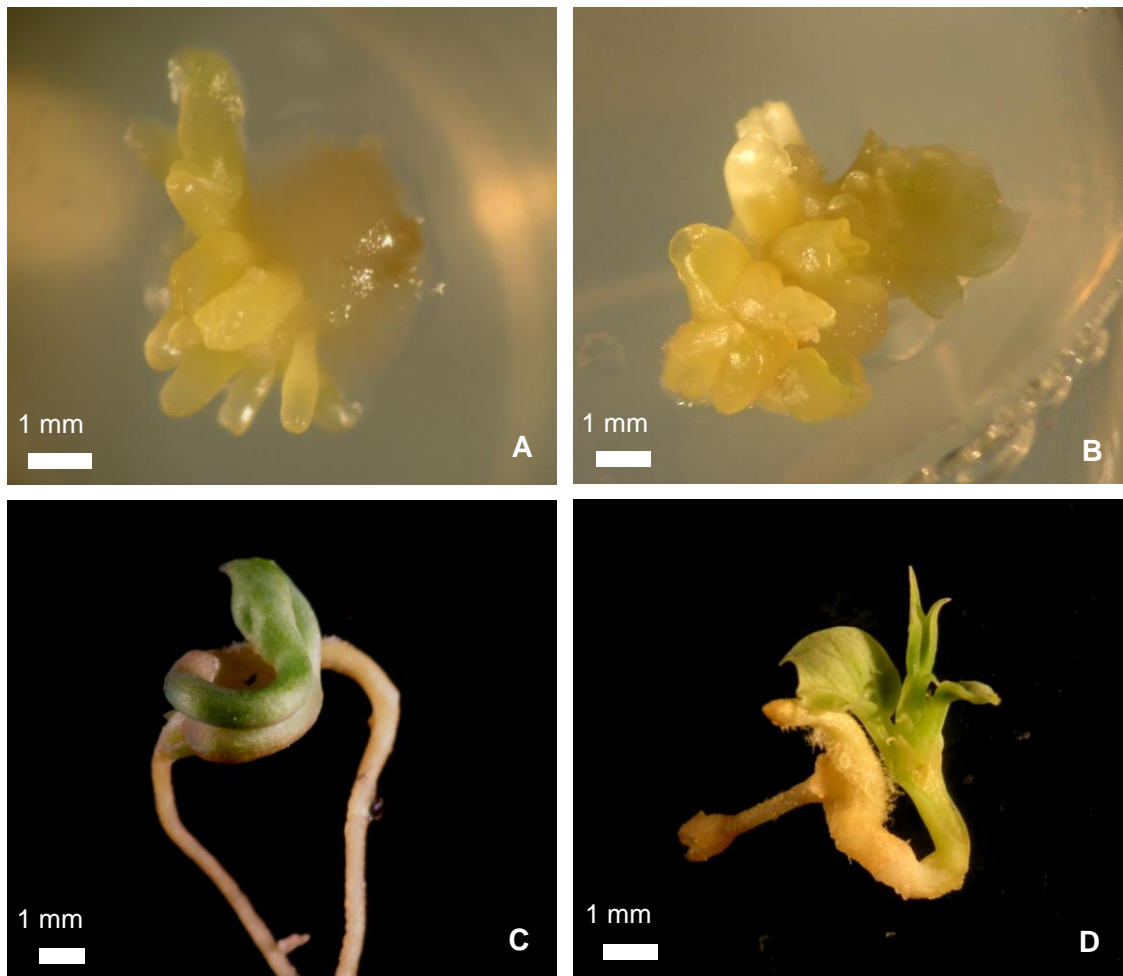


**Fig. 3.12:** Porcentaje de germinación de embriones somáticos de mandioca (clon EC 118) obtenidos a partir de ápices caulinares y de yemas axilares cultivados en diferentes medios de inducción.

**Tabla 3.7:** Índice de embriogénesis y porcentaje de germinación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares y yemas axilares de mandioca (clon EC 118), cultivados en medios de inducción con diferentes tipos y concentraciones de auxinas.

Trat	Auxina	Concentración (mg.l <sup>-1</sup> )	Índice de embriogénesis somática		Germinación (%)	
			Ápices caulinares	Yemas axilares	Ápices caulinares	Yemas axilares
1	4-CPA	2 mg.l <sup>-1</sup>	1,2 <sup>abcde</sup>	3,1 <sup>cd</sup>	6,7	8,2
2		6 mg.l <sup>-1</sup>	0,7 <sup>abc</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	0,0	8,3
3		10 mg.l <sup>-1</sup>	0,4 <sup>abcd</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	33,3	13,2
4	2,4-D	2 mg.l <sup>-1</sup>	1,9 <sup>cde</sup>	3,9 <sup>cde</sup>	30,1	19,0
5		6 mg.l <sup>-1</sup>	4,5 <sup>ef</sup>	5,9 <sup>e</sup>	17,5	14,6
6		10 mg.l <sup>-1</sup>	4,9 <sup>ef</sup>	5,5 <sup>de</sup>	27,9	8,8
7	2,4,5-T	2 mg.l <sup>-1</sup>	2,6 <sup>def</sup>	1,9 <sup>bc</sup>	20,1	33,4
8		6 mg.l <sup>-1</sup>	0,3 <sup>ab</sup>	0,4 <sup>a</sup>	61,1	40,0
9		10 mg.l <sup>-1</sup>	0,3 <sup>abc</sup>	0,2 <sup>a</sup>	14,3	6,7
10	NOA	2 mg.l <sup>-1</sup>	0,2 <sup>a</sup>	1,1 <sup>ab</sup>	13,3	26,3
11		6 mg.l <sup>-1</sup>	0,6 <sup>abcd</sup>	1,9 <sup>bc</sup>	20,8	12,9
12		10 mg.l <sup>-1</sup>	1,4 <sup>abcde</sup>	2,1 <sup>bc</sup>	14,9	6,9
13	Picloram	2 mg.l <sup>-1</sup>	0,7 <sup>abcd</sup>	0,3 <sup>a</sup>	17,0	5,6
14		6 mg.l <sup>-1</sup>	3,3 <sup>bcde</sup>	3,4 <sup>cde</sup>	26,2	6,2
15		10 mg.l <sup>-1</sup>	7,2 <sup>f</sup>	3,5 <sup>cde</sup>	9,6	7,1

Letras distintas en las columnas indican diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )



**Fig. 3.13:** Inducción de embriogénesis somática en mandioca (clon EC 118) en medio MS adicionado con diferentes auxinas: (A) Embriones somáticos producidos en la etapa de inducción en medio adicionado con 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, a partir de ápices caulinares; (B) Embriones somáticos generados en el mismo medio a partir de yemas axilares; (C) Germinación de un embrión somático fusionado; (D) Embrión somático normal germinado.

### **3.3.3. Evaluación del efecto de diferentes tiempos de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca**

El tiempo de permanencia de los ápices en medio de inducción afectó significativamente el porcentaje de embriogénesis al finalizar esa etapa ( $p \leq 0,01$ ), siendo mayor (75%) cuando los explantes se mantuvieron durante 20 ó 30 días en medio de inducción. Sin embargo, al finalizar la etapa de maduración no se registraron diferencias significativas con respecto al porcentaje de embriogénesis para los diferentes tiempos de inducción, obteniéndose valores de 76,7%, 78,9% y 80% para 10, 20 y 30 días en medio de inducción, respectivamente (Fig. 3.14 A). Esto podría deberse a que 10 días en medio de inducción resultaron suficientes para inducir los embriones somáticos, que recién se expresaron cuando fueron transferidos al medio de maduración. Lo expuesto coincide con lo informado por Guohua y Xu (2002), quienes obtuvieron 26% de embriogénesis en mandioca (cv Nanzhi 188) luego de 6 días de incubación en  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D, sin hallar diferencias significativas con respecto a los explantes incubados durante 6 a 15 días.

Cuando se utilizaron como explantes yemas axilares, no se detectaron diferencias significativas en la etapa de inducción ni en la de maduración ( $p \leq 0,01$ ), obteniéndose porcentajes de embriogénesis entre 58,5% (10 días) y 53,3% (30 días) en la etapa de maduración (Fig. 3.14 B).

Los porcentajes de embriogénesis obtenidos con ambos tipos de explantes son superiores a los informados por Medero *et al.*, (2000) quienes mantuvieron los explantes por 30 días en medio de inducción adicionado con 4 y  $8 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D.

El número promedio de embriones somáticos generados por los ápices caulinares presentó diferencias significativas al finalizar la etapa de inducción ( $p \leq 0,01$ ), aumentando al aumentar el tiempo de exposición al medio de inducción, con valores promedio de: 1,8, 5,2 y 7,3 embriones somáticos para 10, 20 y 30 días en el medio de inducción, respectivamente. Al finalizar la etapa de maduración, se pudo observar que mientras los tratamientos de 20 y 30 días en medio de inducción mantuvieron valores similares a los de la etapa anterior, los explantes mantenidos sólo 10 días en medio de inducción diferenciaron nuevos embriones somáticos (5,3 embriones por explante), no observándose diferencias significativas entre tratamientos en esta etapa (Fig. 3.15 A).

Por otra parte, cuando se utilizaron como explantes yemas axilares, se observaron diferencias significativas entre los tiempos de inducción, siendo mayor

la producción de embriones somáticos por explante en los tratamientos de 20 y 30 días (6,6 y 7,6 embriones somáticos por explante), con respecto a los 10 días en medio de inducción (4,2 embriones somáticos por explante), tanto en la etapa de inducción como en la de maduración (Fig. 3.15 B).

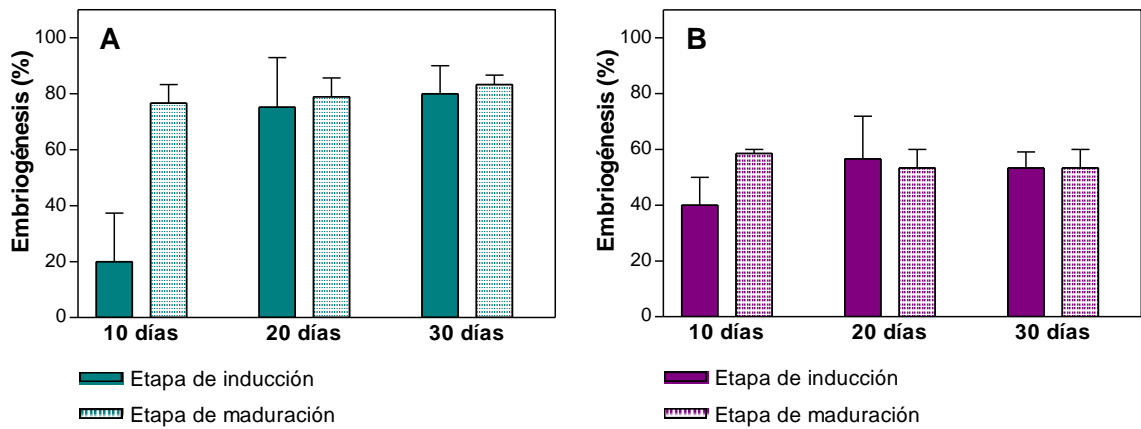
Luego de 30 días en medio de maduración, los ápices presentaron un mayor porcentaje de embriogénesis que las yemas axilares, siendo similar el número promedio de embriones somáticos generados por ambos tipos de explantes (Figs. 3.14 A y B y 3.15 A y B).

Se observó la formación de estructuras foliosas en ambos tipos de explantes, siendo mayor en los ápices caulinares. En estos explantes se hallaron diferencias significativas con respecto al porcentaje de formación de estructuras foliosas, que aumentaron al disminuir el tiempo de inducción (6,7%, 31,5% y 40% respectivamente). Esto es consistente con lo expresado por Stamp y Henshaw (1987b) y Mussio *et al.*, (1998) quienes destacaron la importancia de la duración de la etapa de inducción en el control de la expresión de la competencia morfogenética de los lóbulos foliares, detallando que períodos cortos (5 a 9 días) en medios adicionados con 2,4-D indujeron la formación de estructuras foliosas.

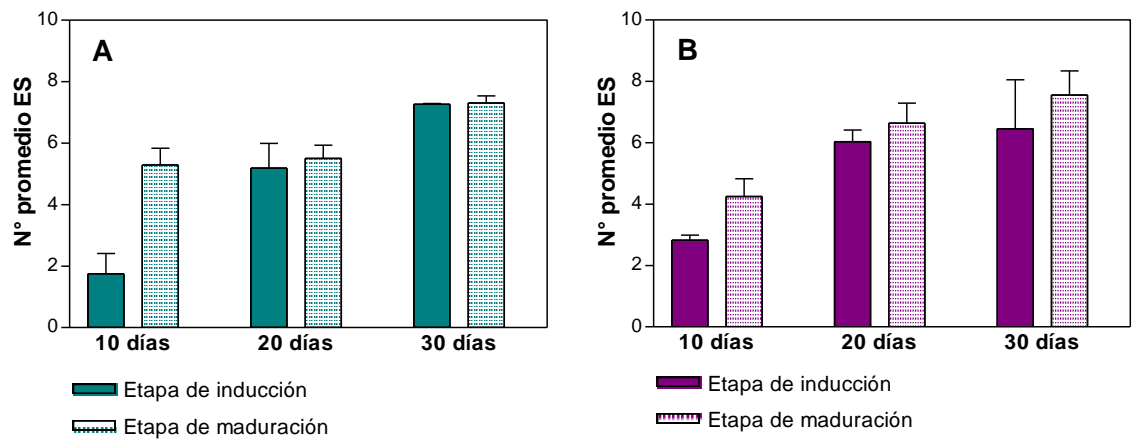
El porcentaje de germinación de los embriones somáticos generados a partir de los ápices caulinares no presentó diferencias significativas con respecto a los diferentes tiempos de permanencia de los explantes en el medio de inducción. Se observaron valores entre 12,1% y 13,9% para los tiempos de inducción de 30 y 10 días, respectivamente. El porcentaje de germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de yemas axilares fue superior en el tratamiento de 30 días en medio de inducción (14,4%), con respecto a los de 10 (3,5%) y 20 (5,6%) días en medio de inducción (Fig. 3.16).

Si bien el porcentaje de regeneración de plantas fue bajo, los mayores valores se obtuvieron con los menores tiempos de inducción, registrándose un 23,4% cuando se utilizaron como explantes ápices caulinares y un 16,7% al emplear yemas axilares.

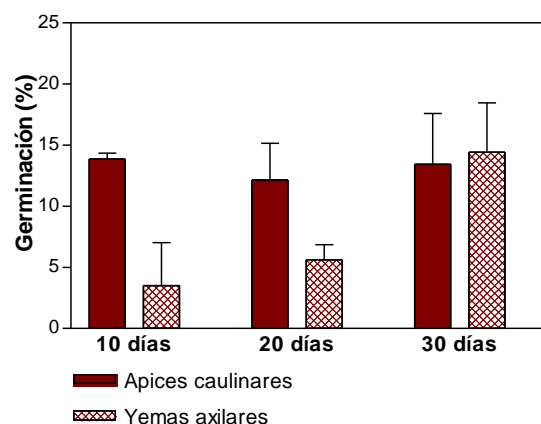




**Fig. 3.14:** Porcentaje de embriogénesis somática en mandioca (clon EC 118) obtenida en las etapas de inducción y de maduración, para diferentes tiempos de permanencia de los explantes en el medio de inducción: (A) Ápices caulinares; (B) Yemas axilares.



**Fig. 3.15:** Número promedio de embriones somáticos en mandioca (clon EC 118), obtenidos en las etapas de inducción y de maduración, para diferentes tiempos de permanencia de los explantes en el medio de inducción: (A) Ápices caulinares; (B) Yemas axilares.



**Fig. 3.16:** Porcentaje de germinación de embriones somáticos obtenidos a partir de ápices caulinares y yemas axilares de mandioca (clon EC 118), sometidos a diferentes tiempos de permanencia en el medio de inducción.

### 3.3.4. Evaluación del efecto de diferentes fuentes carbonadas en el medio de inducción sobre la embriogénesis somática en mandioca

Todas las fuentes carbonadas en las diferentes concentraciones evaluadas permitieron la formación de callos a partir de las yemas axilares, siendo superior al 68% en los tratamientos con fructosa, rafinosa, sacarosa y glucosa (Fig. 3.17 A). Sólo en los tratamientos con galactosa la formación de callos fue inferior al 30%.

Fue posible inducir embriogénesis somática en los medios adicionados con todos los carbohidratos ensayados, a excepción de los que contenían galactosa (Tabla 3.8). La falta de respuesta en el medio adicionado con galactosa coincide con lo obtenido por Strickland *et al.*, (1987) en alfalfa y es opuesto a lo reportado por Kochba *et al.*, (1982) en *Citrus*.

Las fuentes carbonadas evaluadas difirieron significativamente con respecto al porcentaje de embriones formados ( $p \leq 0.001$ ). El porcentaje más elevado de explantes con embriones somáticos (53,3%) se obtuvo en el medio adicionado con 3% de glucosa. No se observó diferenciación de embriones somáticos en los tratamientos con galactosa (1%, 3% y 5%), rafinosa (1% y 3%) y fructosa (1%). Para cada fuente carbonada, los mayores porcentajes de embriogénesis se obtuvieron con la mayor concentración (5%) cuando se trató de un disacárido y con concentraciones intermedias (3%) en el caso de los monosacáridos (Tabla 3.8; Fig. 3.18).

Según Guerra *et al.*, (1999) una concentración de 3% de sacarosa es satisfactoria para los procesos de iniciación y diferenciación de embriones

somáticos. En este sentido, Ihemere (2003) no obtuvo diferencias significativas al cultivar lóbulos foliares inmaduros de mandioca en medio MS suplementado con 12 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y diferentes concentraciones de sacarosa (2%, 4% y 8%) en el medio de inducción. Sin embargo, este autor destacó que los embriones formados en el medio con 2% de sacarosa tenían un aspecto más saludable y que los embriones somáticos perdían el color verde a medida que aumentaba la concentración de sacarosa. En los medios con 8% de sacarosa los callos y los embriones se tornaron marrones y finalmente murieron a causa de la formación de compuestos fenólicos.

Por otra parte Li *et al.*, (1998) evaluaron el efecto de diferentes fuentes carbonadas sobre la embriogénesis secundaria en mandioca, obteniendo que la maltosa aumentó el porcentaje de embriogénesis, la germinación de embriones y la regeneración de plantas con respecto a la sacarosa. Contrariamente a lo hallado en este trabajo, reportaron que la glucosa y la sacarosa (4%) inhibieron tanto la formación de embriones somáticos como la regeneración de plantas.

La mayor eficiencia de la glucosa con respecto al porcentaje de embriogénesis en comparación con la sacarosa coincide con lo informado por Tokuhara y Mii (2003) en el híbrido *Doriatenopsis* y es contrario a lo hallado por Strickland *et al.*, (1987) en alfalfa. Fuentes *et al.*, (2000) informaron una mayor producción de embriones somáticos de *Coffea canephora* en medios con fructosa con respecto a los medios con sacarosa y glucosa, destacando que en el cultivar N91 la glucosa favoreció el desarrollo sincrónico de los embriones, con respecto a la sacarosa.

La rafinosa en la mayor concentración evaluada (5%) no difirió significativamente de la sacarosa con respecto al porcentaje de embriogénesis y al número de embriones somáticos generados. Pero, a diferencia de lo informado por Vila *et al.*, (2007) en *Melia azedarach*, este azúcar no permitió observar germinación de los embriones somáticos ni regeneración de plantas.

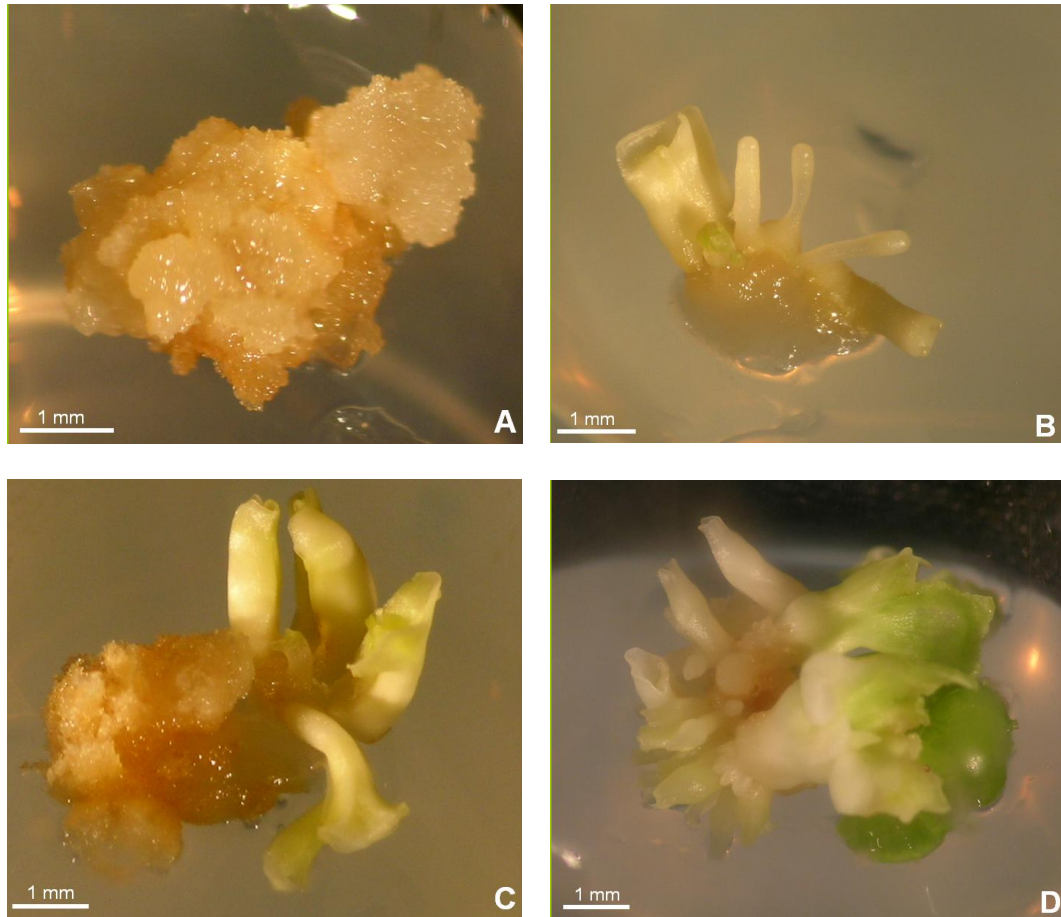
A excepción de los medios adicionados con galactosa, fue posible observar la formación de estructuras foliosas (Stamp y Henshaw 1987b; Raemakers *et al.*, 1993b; Konan *et al.*, 1994a; Mussio *et al.*, 1998) en los medios adicionados con los restantes carbohidratos, con valores entre 3% y 23%, siendo superior con la mayor concentración de sacarosa.

El número promedio de embriones somáticos observados difirió significativamente entre las distintas fuentes carbonadas ( $p \leq 0.001$ ), con valores

entre 1 y 6,5 embriones somáticos por explante, registrándose los mayores valores en el medio adicionado con 5% de sacarosa (Tabla 3.8; Figs. 3.17 B, C y D y 3.19). Por otra parte, el mayor porcentaje de embriones somáticos germinados y el de conversión a planta se observó en los medios adicionados con glucosa.

El índice de embriogénesis (IE), que combina el porcentaje de embriogénesis con el número promedio de embriones formados, varió entre 0 y 2,5, registrándose los mayores valores en el medio adicionado con 3% de glucosa (Fig. 3.20). El índice de embriogénesis demuestra que la glucosa favoreció la embriogénesis somática con respecto a las demás fuentes carbonadas, superando incluso a la sacarosa que es la fuente de carbono comúnmente utilizada en el cultivo de tejidos vegetales (Tisserat *et al.*, 1979; Guerra *et al.*, 1999). La mayor eficiencia de la glucosa con respecto al IE coincide con lo informado por Vila *et al.*, (2007) en *Melia azedarach*.

Según Gibson (2004), muchos procesos de desarrollo, metabólicos y fisiológicos en los vegetales están regulados, al menos en parte, por la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto las alteraciones en la disponibilidad de los azúcares solubles influirían en la regulación de diversos procesos. En particular, se observó que la glucosa y la sacarosa colaboran en la regulación de la transición entre el crecimiento por división celular y el crecimiento por expansión celular y acumulación de reservas en los embriones en desarrollo, siendo los niveles de glucosa más elevados en los tejidos en activa división con respecto a los tejidos más diferenciados, donde predomina la sacarosa. Esto sugiere que ambos azúcares tendrían diferentes roles durante la embriogénesis.

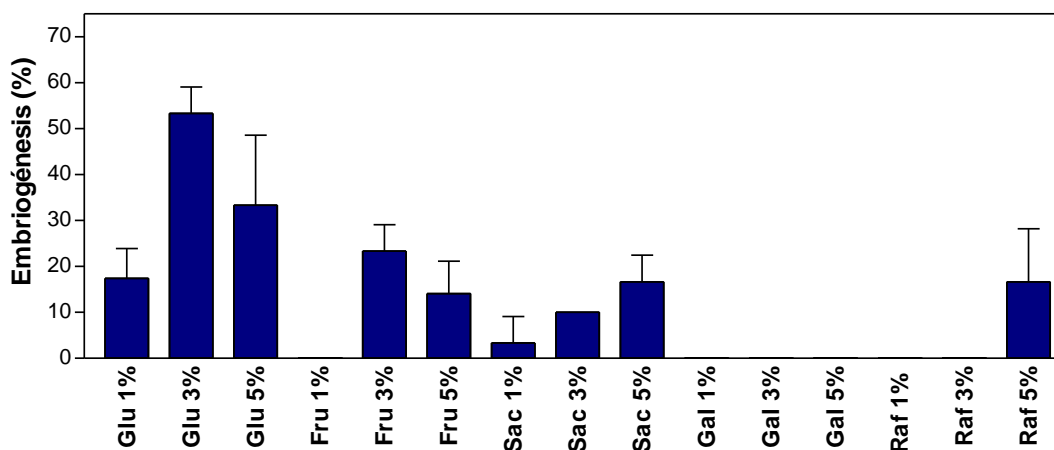


**Fig. 3.17:** Inducción de embriogénesis somática en yemas de mandioca (clon EC 118) en medio MS adicionado con  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D y diferentes fuentes carbonadas: (A) Callo embriogénico; (B) Embriones somáticos obtenidos utilizando rafinosa; (C) sacarosa y (D) glucosa en el medio de inducción.

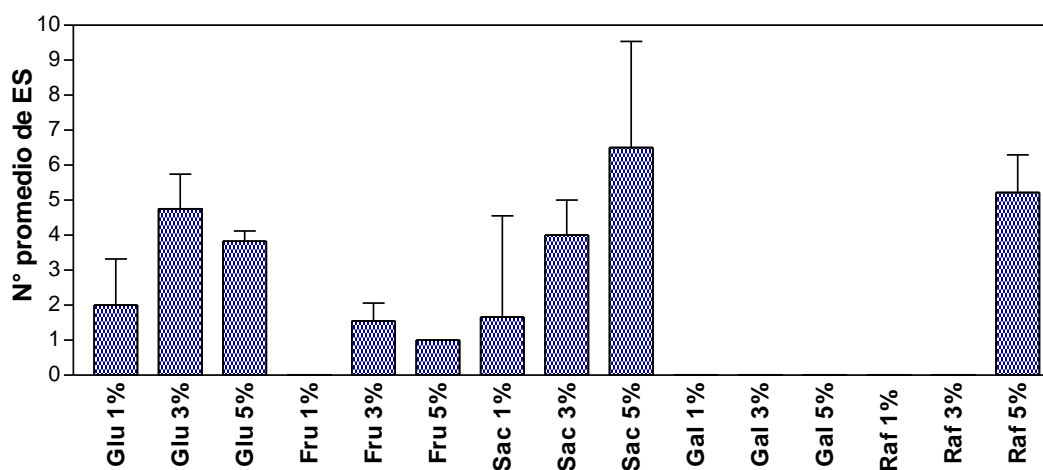
**Tabla 3.8:** Porcentaje de embriogénesis somática y número promedio de embriones somáticos por explante obtenidos a partir de yemas axilares de mandioca (clon EC 118), cultivadas durante 30 días en medio de inducción constituido por medio MS adicionado con 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y diferentes tipos y concentraciones de fuentes carbonadas.

Trat	Medios	Concentración (% p/p)	Embriogénesis somática (%)	N° embriones somáticos por explante
1	Glucosa	1%	17,4 <sup>c</sup>	2,0 <sup>bc</sup>
2		3%	53,3 <sup>d</sup>	4,8 <sup>de</sup>
3		5%	25,0 <sup>c</sup>	2,9 <sup>bcd</sup>
4	Fructosa	1%	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
5		3%	23,3 <sup>c</sup>	1,6 <sup>ab</sup>
6		5%	14,1 <sup>c</sup>	1,0 <sup>ab</sup>
7	Sacarosa	1%	3,3 <sup>ab</sup>	1,7 <sup>ab</sup>
8		3%	10,0 <sup>bc</sup>	4,0 <sup>cde</sup>
9		5%	16,7 <sup>c</sup>	6,5 <sup>e</sup>
10	Galactosa	1%	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
11		3%	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
12		5%	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
13	Rafinosa	1%	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
14		3%	0,0 <sup>a</sup>	0,0 <sup>a</sup>
15		5%	16,7 <sup>c</sup>	5,2 <sup>de</sup>

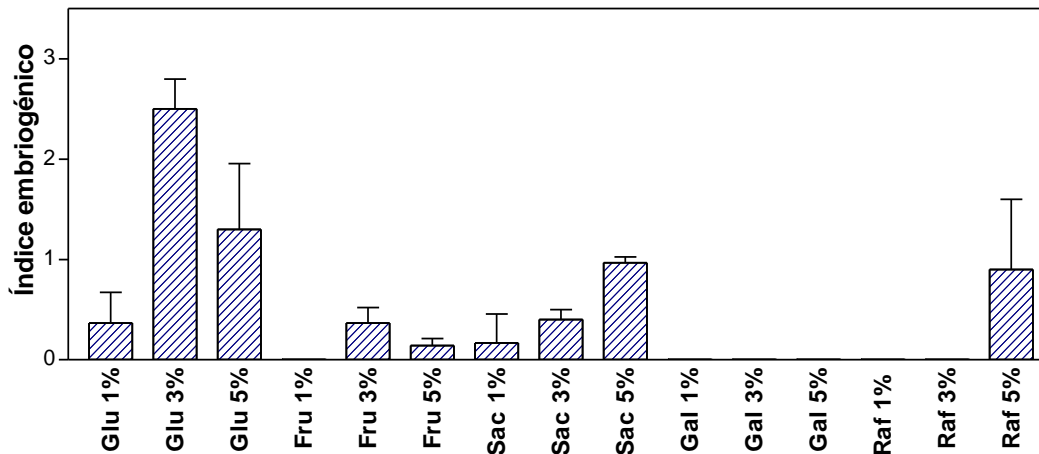
Letras distintas en las columnas indican diferencias altamente significativas ( $p \leq 0,01$ )



**Fig. 3.18:** Porcentaje de embriogénesis somática a partir de yemas axilares de mandioca (clon EC 118) cultivadas durante 30 días en medio de inducción constituido por MS adicionado con 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y diferentes tipos y concentraciones de fuentes carbonadas.



**Fig. 3.19:** Número promedio de embriones somáticos (ES) obtenidos a partir de yemas axilares de mandioca (clon EC 118) cultivadas durante 30 días en medio de inducción constituido por MS adicionado con 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y diferentes tipos y concentraciones de fuentes carbonadas.



**Fig. 3.20:** Índice de embriogénesis en la etapa de maduración para yemas axilares de mandioca (clon EC 118) cultivadas durante 30 días en medio de inducción con MS adicionado con  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D y diferentes fuentes carbonadas.

### 3.4. Conclusiones

- Fue factible inducir la formación de embriones somáticos en 29 de los 33 clones de mandioca de interés para Argentina, mantenidos en el Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado (Formosa, Argentina), utilizando un medio de inducción compuesto por el medio basal MS adicionado con  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D y 2% de sacarosa.
- Se observó un importante efecto del genotipo sobre la capacidad embriogénica de los clones evaluados, variando los porcentajes de embriogénesis entre 3% y 50% y el número promedio de embriones somáticos por explante entre 0,3 a 7,6.
- Se destaca la eficiencia del medio de inducción empleado, ya que a pesar de las diferencias en la capacidad embriogénica de los genotipos evaluados, la adición de  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D posibilitó la inducción de embriogénesis en el 88% de los clones.
- Los clones cultivados en Argentina que permitieron obtener mayor porcentaje de embriogénesis fueron: EC 118 (50%), EC 1.1 (47%) y EC 6 (40%). Por otra parte, los clones EC 44, EC 88, EC 107 y EC 163 no produjeron embriones en el medio de inducción compuesto por el medio basal MS adicionado con  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  de 2,4-D y 2% de sacarosa.



- Se observaron estructuras foliosas y embriones fusionados en la mayoría de los clones evaluados.
- Todas las auxinas evaluadas permitieron la inducción de embriones somáticos, siendo superiores los índices de embriogénesis obtenidos con 2,4-D y Picloram. Si bien el patrón de respuestas fue similar con ambos tipos de explantes, los ápices caulinares tuvieron el mejor desempeño con 10 mg.l<sup>-1</sup> de Picloram, mientras que las yemas axilares respondieron mejor con 6 y 10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D.
- Las yemas axilares permitieron obtener porcentajes de embriogénesis superiores al 50% en 8 de los 16 medios evaluados, mientras que en el caso de los ápices sólo en 4 medios se registraron valores mayores al 50% de embriogénesis somática.
- Las yemas axilares demostraron un excelente desempeño como explantes para la inducción de embriones somáticos, siendo además un material más abundante con respecto a los ápices caulinares.
- En general, se observaron mejores resultados con las mayores concentraciones de la auxinas evaluadas (6 y 10 mg.l<sup>-1</sup>), a excepción del 2,4,5-T y el 4-CPA que brindaron mejores resultados con la menor concentración (2 mg.l<sup>-1</sup>).
- El mayor porcentaje de conversión a planta se obtuvo en los medios adicionados con NOA (2 y 6 mg.l<sup>-1</sup>), siendo posible también la conversión a planta en los medios adicionados con 2,4-D y Picloram en ambos tipos de explantes.
- No se registraron diferencias en el porcentaje de embriogénesis ni en el número promedio de embriones generados a partir de ápices caulinares sometidos a diferentes tiempos de inducción en medio MS suplementado con 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D. Por lo que podría inferirse que 10 días en el medio de inducción serían suficientes para que estos explantes expresaran su capacidad embriogénica. Por otra parte, si bien las yemas axilares tampoco difirieron con respecto al porcentaje de embriogénesis, produjeron mayor cantidad de embriones somáticos al incrementarse el tiempo de inducción.
- El porcentaje de estructuras foliosas generadas fue mayor cuando se utilizaron ápices caulinares con respecto a las yemas axilares y aumentó al disminuir el tiempo de exposición de los explantes al medio de inducción.

- El porcentaje más elevado de explantes con embriones somáticos se obtuvo en el medio adicionado con 3% de glucosa. Para cada fuente carbonada, los mayores porcentajes de embriogénesis se obtuvieron con la mayor concentración (5%) cuando se trató de disacáridos y con concentraciones intermedias (3%) en el caso de los monosacáridos. No se observó formación de embriones somáticos en los medios adicionados con galactosa.
- El número promedio de embriones somáticos por explante varió entre 1 y 6,5 para las distintas fuentes carbonadas, registrándose los mayores valores en el medio adicionado con 5% de sacarosa.
- Si bien la sacarosa es usada satisfactoriamente para la obtención de embriones somáticos en mandioca, el índice de embriogénesis demostró que la adición de 3% de glucosa al medio de cultivo incrementa significativamente la embriogénesis somática a partir de yemas axilares con respecto a las demás fuentes carbonadas. Además la glucosa permitió los mayores porcentajes de embriones somáticos germinados y regeneración de plantas.
- Los resultados informados con respecto a las auxinas y fuentes carbonadas más eficientes en el medio de inducción, así como el efecto del tipo de explante y el periodo de tiempo necesario para inducir embriogénesis somática fueron evaluados sólo con el clon EC 118, por lo que sería importante comprobar en qué grado los resultados aquí obtenidos permiten optimizar la respuesta embriogénica de otros clones de mandioca. Además, es necesario seguir optimizando el sistema para obtener una mayor frecuencia embriogénica y regeneración de plantas de mandioca.

## CAPÍTULO 4

### ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS DE MANDIOCA OBTENIDAS POR CULTIVO

#### *in vitro* DE TEJIDOS

##### 4.1. Introducción

La mandioca es una especie de polinización cruzada, por lo que cada individuo presenta un alto grado de heterocigosis (Domínguez *et al.*, 1983; Alves, 2002), siendo ésta una de las razones por las que este cultivo es tradicionalmente propagado en forma agámica, mediante estacas de tallo (Cock, 1989; López, 2002; El-Sharkawy, 2003). Si bien este tipo de propagación es sencilla y económica, presenta serios problemas, tales como la baja tasa de multiplicación, las dificultades de conservación de las ramas estaqueras y la diseminación de plagas y enfermedades. A su vez, estos inconvenientes se ven amplificados por la falta de sistemas organizados que permitan abastecer a los productores con “estacas semilla” (López, 2002; Escobar *et al.*, 2006).

Las técnicas de cultivo de tejidos pueden colaborar en la solución de estos problemas. En este sentido, el cultivo *in vitro* de meristemas de mandioca permite la propagación de plantas libres de virus y otros patógenos sistémicos (Roca *et al.*, 1991), mientras que el cultivo *in vitro* de segmentos nodales facilita la multiplicación rápida y masiva de las plantas (Segovia *et al.*, 2002; Albarrán *et al.*, 2003).

Una de las fases críticas de la micropropagación es la aclimatación, que consiste en el proceso por el cual las plantas producidas *in vitro*, bajo condiciones controladas, son transferidas a las condiciones edafo-climáticas naturales. El paso de las plantas de las condiciones *in vitro* a las condiciones *ex vitro* debe realizarse progresivamente, a fin de minimizar las condiciones de estrés que pueden producir daños profundos o a la muerte de las plantas (Da Silva *et al.*, 1995). En las nuevas condiciones de crecimiento, las plantas experimentan una humedad relativa muy inferior y una intensidad lumínica comparativamente muy superior (Pospíšilová *et al.*, 1999; Jorge *et al.*, 2000), a lo que deben sumarse el paso de un medio rico en nutrientes a un sustrato más empobrecido, los daños mecánicos ocasionados a las raíces (Segovia *et al.*, 2002; Zimmerman, *et al.*, 2007) y la exposición al ataque de microorganismos saprófitos y eventualmente fitopatógenos (Grattapaglia y Machado, 1990).

De este modo, las plantas en proceso de aclimatización requieren de tiempo para adaptarse gradualmente a las nuevas condiciones y corregir las posibles modificaciones anatómicas y fisiológicas inducidas por las condiciones particulares que conlleva el cultivo *in vitro*. Los cambios más importantes que deben operar para garantizar la supervivencia y el crecimiento de las plantas son: el desarrollo de cutícula y ceras epicuticulares, la regulación estomática a fin de evitar la deshidratación, cambios en los parámetros fotosintéticos (contenido de clorofila, número y estructura de los cloroplastos, eficiencia del fotosistema II y tasa de fotosíntesis neta), para asegurar un crecimiento completamente autotrófico; además de cambios en la actividad de enzimas antioxidantes que protegen a la planta ante el estrés oxidativo y reducen la cantidad de radicales libres (Pospíšilová *et al.*, 2007; Faisal y Anis, 2009).

Si bien existen trabajos que reportan una aclimatización exitosa para las plantas de mandioca obtenidas por cultivo de tejidos (Broomes y Lacon, 1995; Gou y Liu, 1995; Pedroso de Oliveira *et al.*, 2000), otros autores reportan una elevada mortandad en esta etapa (Zok *et al.*, 1993; Da Silva *et al.*, 1995; Jorge, 1996; Azcón Aguilar *et al.*, 1997; Saborio *et al.*, 1998; Jorge *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2007; Marín *et al.*, 2008), que puede llegar al 95% si no se realiza con la tecnología adecuada (Segovia *et al.*, 2002).

En este sentido, se considera que la pobre supervivencia en la fase de aclimatización y el establecimiento a campo, podría ser uno de los motivos por los cuales no se ha adoptado el cultivo de tejidos como una herramienta para la propagación de mandioca a gran escala (Pospíšilová *et al.*, 1999; Jorge *et al.*, 2000).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la efectividad de diferentes tratamientos de aclimatización de plantas de mandioca obtenidas *in vitro*, tanto en la etapa de rustificación como en la del transplante definitivo a condiciones de campo.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Material vegetal**

Se utilizaron plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) del clon EC 118, provenientes del Banco de Germoplasma de la EEA INTA El Colorado, Formosa, Argentina. Las plantas fueron propagadas mediante el cultivo *in vitro* de segmentos uninodales en el medio basal de MS suplementado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de

ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, e incubadas a 27±2 °C, con 14 h de fotoperíodo y una irradiancia de 116 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2. Acondicionamiento de las vitroplantas para su aclimatización

Luego de 50 días, las plantas regeneradas *in vitro* fueron extraídas cuidadosamente del medio de cultivo y sus raíces fueron lavadas con agua corriente. Posteriormente las plantas se sumergieron en una solución fungicida (Captan® al 2%) durante 10 minutos.

#### 4.2.3. Aclimatización en cámara de cultivo

Previo acondicionamiento, las plantas fueron sometidas a cinco tratamientos de aclimatización, tres de ellos consistieron en el uso de diferentes sustratos, dispuestos en envases de 180 cm<sup>3</sup> protegidos con un cobertor plástico transparente a modo de cámara húmeda (Fig. 4.1A). Los dos tratamientos restantes se realizaron en condiciones de hidroponía, con un dispositivo diseñado para permitir una aireación constante y autónoma (Tabla 4.1; Figs. 4.1 B y C).

**Tabla 4.1:** Descripción de los tratamientos de aclimatización de plantas de mandioca (clon EC 118).

Tratamiento	Descripción
T1	Sustrato: Perlita
T2	Sustrato: Arena + 3% (p/p) lombricompostado
T3	Sustrato: D1 Dynamics® mezcla de turba y perlita 9:1
T4	Hidroponía en agua corriente
T5	Hidroponía en solución nutritiva de Arnon y Hoagland (1940)

En esta primera etapa de aclimatización, todas las plantas se mantuvieron en cámaras húmedas a 27±2°C, con 14 h de fotoperíodo y una irradiancia de 215 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (tubos fluorescentes blancos fríos Philips® TLD 36W/840) durante 20 días en los que se disminuyó gradualmente la humedad relativa, hasta eliminar por completo las cámaras húmedas. Los tratamientos 1, 2 y 3 fueron tratados con fungicida (Captan® al 2%) y regados con 20 cm<sup>3</sup> de la solución nutritiva propuesta por Arnon y Hoagland (1940) por planta, tres veces por semana, mientras que en

los tratamientos hidropónicos se mantuvo el nivel inicial de solución nutritiva o de agua, según correspondiera.

#### **4.2.4. *Transferencia a condiciones de umbráculo***

Una semana antes del transplante a condiciones de campo, las plantas de los tratamientos 1, 2 y 3 fueron transferidas directamente a condiciones de umbráculo, mientras que las plantas provenientes de hidroponía (tratamientos 4 y 5) fueron previamente transferidas a macetas de 180 cm<sup>3</sup> con sustrato D1 Dynamics®. El área foliar de las plantas de todos los tratamientos fue reducida en un 50% a fin de disminuir la pérdida de agua por transpiración.

#### **4.2.5. *Transplante a campo***

La plantación a campo se realizó a fines de noviembre de 2008 en el campo experimental del Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina). El suelo del predio es un Udipsamment, álfico, mixto, hipertérmico (Escobar *et al.*, 1994). El clima es subtropical con una precipitación anual de 1500 mm y un balance hídrico positivo. La temperatura media anual es de 21,5°C, con una temperatura media mínima en el mes de julio en el orden de 13 a 16°C y un período libre de heladas de 320 a 360 días (Bruniard, 1999).

En esta etapa se evaluó el comportamiento a campo de las vitroplantas aclimatizadas como se detallara en el apartado 4.2.3, en comparación con las plantas crecidas a partir de estacas caulinares del mismo clon, con tres a cuatro nudos (aproximadamente 70 g cada una), a modo de control (T<sub>c</sub>). El marco de plantación para todos los tratamientos fue de 1m por 1m. Luego de la plantación se realizó un riego de asiento y posteriormente las plantas y las estacas fueron regadas tres veces por semana durante las tres primeras semanas. La cosecha se realizó a los cinco meses y medio de la plantación a campo.

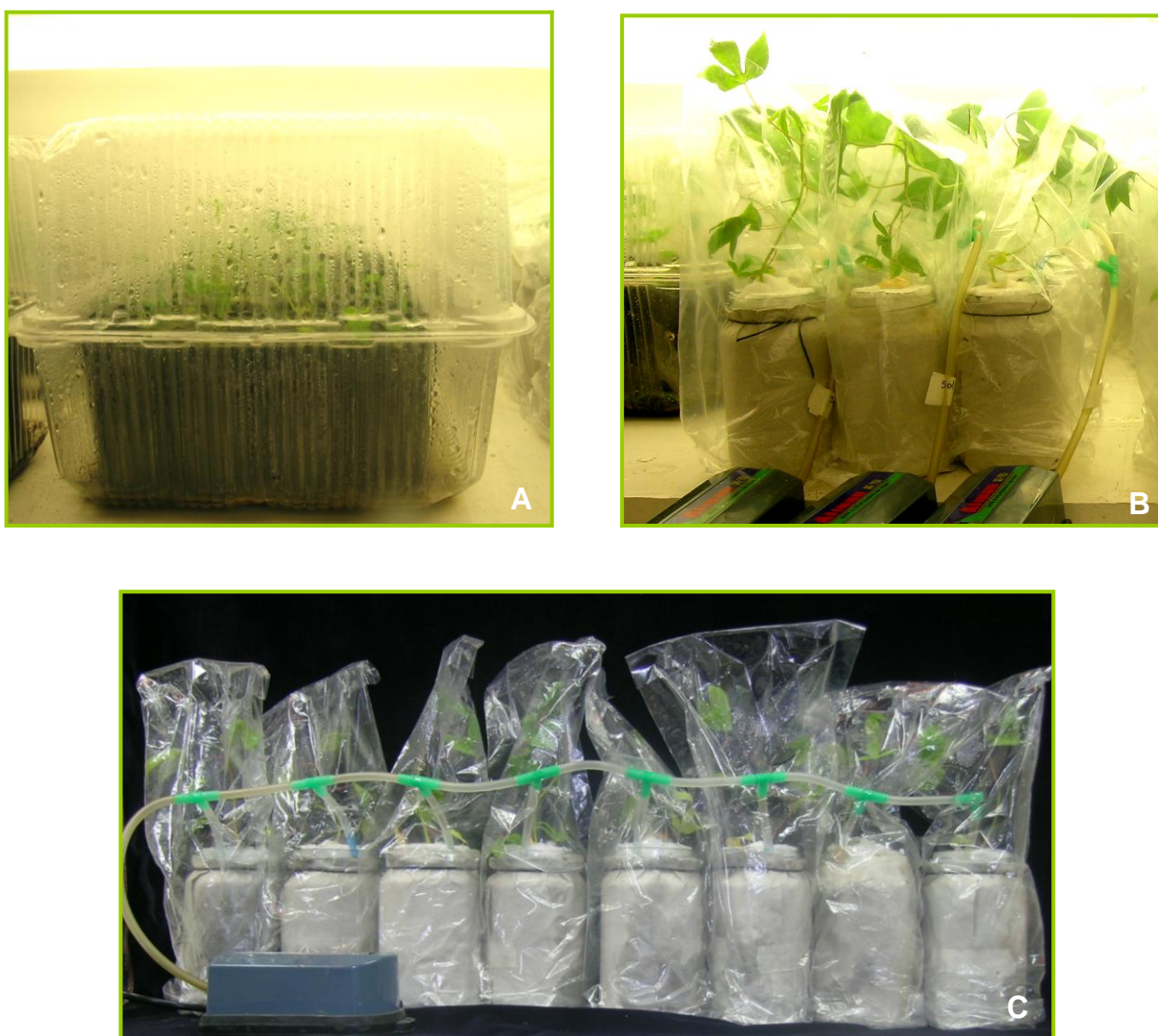
#### **4.2.6. *Diseño experimental y análisis estadístico***

El diseño experimental en la etapa de aclimatización en cámara de cultivo fue completamente aleatorizado con tres repeticiones para cada tratamiento (n= 24), mientras que en la etapa de transplante a campo, el diseño fue en bloques completamente aleatorizados, también con tres repeticiones para cada tratamiento

(n= 15). En ambos casos se realizó un análisis de varianza, utilizando el programa estadístico InfoStat/P versión 1.1 (InfoStat, 2002), previa verificación de la normalidad de las variables. Las variables (X) que no mostraron distribución normal, fueron transformadas mediante logaritmo natural  $\ln(x+0,5)$ . Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se compararon los valores de las variables analizadas mediante el Test de Comparaciones Múltiples de Duncan.

Las variables evaluadas fueron: altura de planta, número de nudos, área foliar (medida con medidor portátil L-3000C LI-COR®), peso fresco y peso seco de la parte aérea y radical, peso fresco total, peso seco total y porcentaje de materia seca por planta, tanto para el estado inicial (plantas cultivadas *in vitro*), como para los diferentes tratamientos luego de finalizar la fase de aclimatización en cámara de cultivo (20 días), en esta última etapa se registró además el porcentaje de supervivencia para cada tratamiento.

La supervivencia a campo se registró a los 20, 30, 60, 90, 120 y 165 días después de la plantación. Al momento de la cosecha se evaluaron: longitud del tallo, número de ramas, número de nudos, porcentaje de plantas que presentaron tallo ramificado, además del peso fresco de la parte aérea y del peso fresco de las raíces tuberosas por planta. El rendimiento para los diferentes tratamientos se expresó como porcentaje del rendimiento por planta con respecto al tratamiento control (estacas caulinarias).



**Fig. 4.1:** Dispositivos empleados durante la fase de aclimatización en cámara de cultivo: (A) Tratamientos de aclimatización en bandejas multiceldas con 3 tipos diferentes de sustratos, introducida dentro de un cobertor plástico; (B) Tratamientos de aclimatización en condiciones de hidroponia; (C) Detalle del dispositivo empleado para favorecer la aireación en el sistema hidropónico, el cual fue diseñado en tándem de ocho frascos cubiertos con papel para evitar la proliferación de algas y obturados con una trapa de poliestireno expandido perforada en el centro para alojar la planta y al costado para introducir una manguera provista con una piedra difusora, las cuales estaban conectadas en paralelo mediante una línea principal alimentada por un aireador Atman AT – F301 50/60 Hz 2 l/min. Cada frasco fue cubierto al inicio de la aclimatización con una bolsa de polietileno a fin de generar una atmósfera húmeda.



### 4.3. Resultados y discusión

Independientemente del método de aclimatización ensayado, la sobrevivencia, la recuperación y el crecimiento de las plantas de mandioca provenientes de las condiciones *in vitro* fueron exitosos.

El porcentaje de supervivencia al finalizar la etapa de aclimatización en cámara de cultivo varió entre 96 % (T<sub>1</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub>) y 100% (T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>). Estos valores de supervivencia resultaron similares a los informados por Pedroso de Oliveira *et al.*, (2000) para seis variedades brasileras de mandioca (92%) y superiores a los obtenidos por Broomes y Lacon (1995) al finalizar la primera semana de aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* en medio líquido (82%). También son superiores a los valores hallados por Azcon Aguilar *et al.*, (1997) quienes inocularon las plantas de mandioca con *Glomus deserticola* como estrategia para aumentar su supervivencia durante la fase de aclimatización (75%). Zimmerman *et al.*, (2007) informaron valores de supervivencia mayores al 95%, al aclimatizar plantas de mandioca enraizadas *in vitro* con vermiculita en reemplazo del agente gelificante, ya que de este modo disminuyeron los daños causados a las raíces durante la remoción del medio adherido. Este mismo sistema fue el que brindó mejores resultados en el enraizamiento *in vitro* de yerba mate y su posterior transferencia al suelo (Sansberro *et al.*, 2000).

Con respecto a la influencia de los diferentes sustratos, Zok *et al.*, (1993) analizaron la supervivencia de plantas de mandioca aclimatizadas utilizando diferentes combinaciones de suelo con vermiculita, aserrín y cáscara de café, usando suelo solo a modo de control. Estos autores encontraron valores de supervivencia de 5% a 55%, con un mejor desempeño de la mezcla de suelo con vermiculita, destacando la importancia del uso de sustratos que permitan una buena aireación y retención de agua para lograr una aclimatización exitosa de las plantas de mandioca. Le *et al.*, (2007) lograron un 93% de supervivencia luego de aclimatizar las plantas durante 7 días en agua y 20 a 25 días en una solución nutritiva. Sin embargo, utilizando un procedimiento similar y posterior plantación en macetas, Marín *et al.*, (2008) sólo obtuvieron entre 0% y 57% de supervivencia para 19 clones élite de mandioca; mientras que Albarrán *et al.*, (2003) lograron un porcentaje de supervivencia mayor al 50 % en 32 de los 34 clones de mandioca evaluados.

En este trabajo fue posible observar diferencias altamente significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,01$ ) con respecto a todas las variables evaluadas,

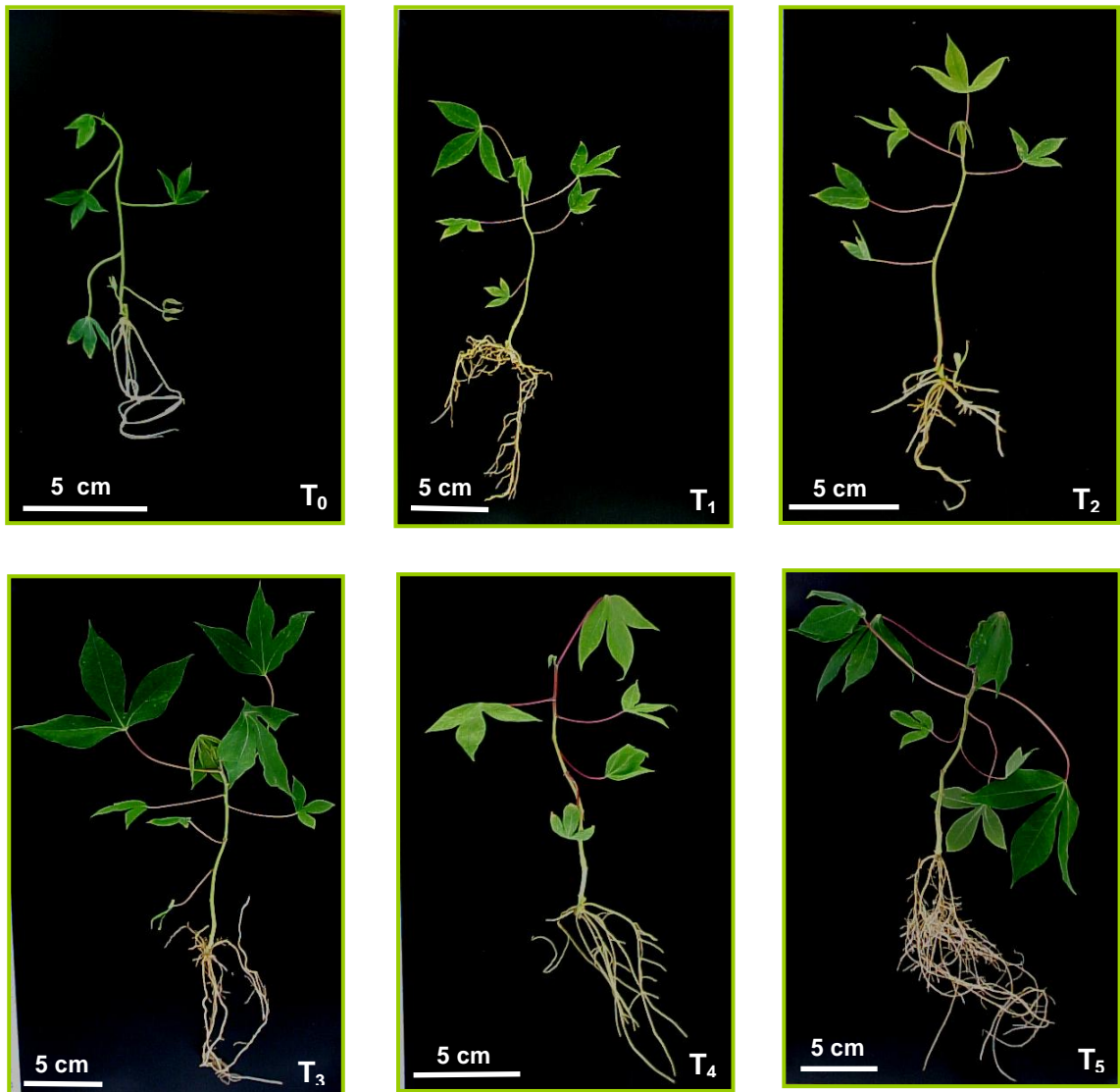
encontrándose los valores superiores en las plantas mantenidas en condiciones de hidroponia en solución de nutritiva de Arnon y Hoagland (1940) (T<sub>5</sub>) (Tabla 4.2). A excepción del peso fresco de las raíces, las demás variables difirieron significativamente entre tratamientos, con respecto a la condición inicial (T<sub>0</sub>) (p≤0,01). La altura y las variables referidas al peso fresco y seco de las plantas, a excepción del peso fresco de raíces, presentaron diferencias significativas entre la condición inicial (T<sub>0</sub>), el tratamiento en hidroponia en solución nutritiva (T<sub>5</sub>) y el resto de los tratamientos, que no difirieron significativamente entre ellos (p≤0,01). El número de nudos y el área foliar fueron mayores en los tratamientos T<sub>5</sub> y T<sub>3</sub>, difiriendo significativamente de los tratamientos T<sub>0</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> (Tabla 4.2). Estos datos son opuestos a los informados por Da Silva *et al.*, (1995) quienes no encontraron diferencias significativas en la supervivencia, el área foliar y el número de nudos, al utilizar diferentes sustratos en la aclimatización de plantas de mandioca. Estos autores obtuvieron valores de supervivencia que variaron entre 49% y 56% e infirieron una relación entre la supervivencia y la edad de los vástagos enraizados al inicio del proceso de aclimatización.

**Tabla 4.2:** Influencia de diferentes tratamientos de aclimatización de plantas de mandioca (clon EC 118), sobre diferentes parámetros de crecimiento, evaluados a los 20 días del inicio, con respecto a la condición inicial *in vitro* (T<sub>0</sub>).

Trat	Altura (cm)	Nº Nudos	AF (cm <sup>2</sup> )	PFA (g)	PFR (g)	PFT (g)	PSA (g)	PSR (g)	PST (g)	Materia seca (%)
T <sub>0</sub>	8,41 <sup>a</sup>	7,67 <sup>a</sup>	7,08 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	11,75 <sup>a</sup>
T <sub>1</sub>	11,31 <sup>b</sup>	11,56 <sup>cd</sup>	33,57 <sup>cd</sup>	0,63 <sup>bc</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,82 <sup>b</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	14,12 <sup>ab</sup>
T <sub>2</sub>	10,38 <sup>b</sup>	10,78 <sup>bc</sup>	17,86 <sup>b</sup>	0,42 <sup>b</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,58 <sup>b</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>	18,02 <sup>c</sup>
T <sub>3</sub>	11,89 <sup>b</sup>	12,11 <sup>de</sup>	44,26 <sup>d</sup>	0,77 <sup>c</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,94 <sup>b</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	13,62 <sup>ab</sup>
T <sub>4</sub>	11,02 <sup>b</sup>	10,00 <sup>b</sup>	21,12 <sup>bc</sup>	0,50 <sup>bc</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,12 <sup>b</sup>	19,20 <sup>c</sup>
T <sub>5</sub>	14,44 <sup>c</sup>	13,22 <sup>e</sup>	90,66 <sup>de</sup>	1,93 <sup>d</sup>	0,44 <sup>b</sup>	2,37 <sup>c</sup>	0,30 <sup>c</sup>	0,07 <sup>c</sup>	0,36 <sup>c</sup>	15,12 <sup>b</sup>

Letras distintas en las columnas indican diferencias altamente significativas (p<=0,01)

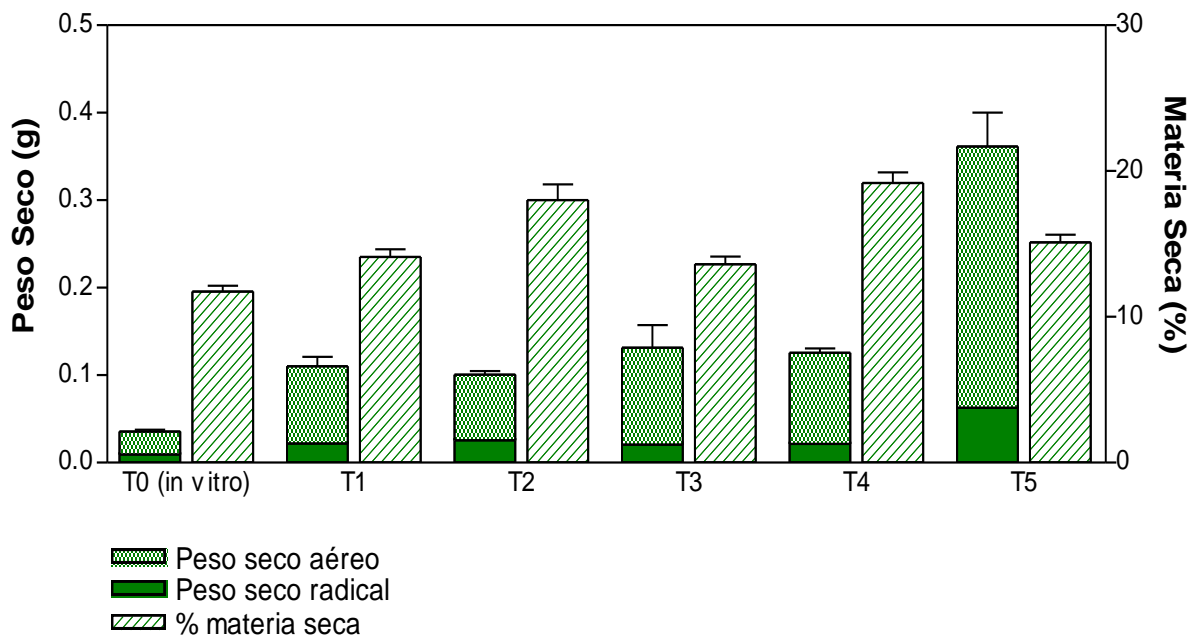
En la figura 4.2 se puede observar el aspecto de las plantas *in vitro* (T<sub>0</sub>), las cuales fueron sometidas a diferentes procedimientos de aclimatización (T<sub>1</sub> a T<sub>5</sub>). Se evidencia el vigor de los vástagos de las plantas derivadas de los tratamientos con sustrato comercial Dynamics® (T<sub>3</sub>) y de las provenientes de hidroponia con la solución nutritiva de Arnon y Hoagland (1940) (T<sub>5</sub>), así como el notable desarrollo radical de estas últimas.



**Figura 4.2:** Aspecto de las plantas de mandioca (clon EC 118) al iniciar y al finalizar la etapa de aclimatización en cámara de cultivo: (T<sub>0</sub>) Situación inicial (planta *in vitro*); (T<sub>1</sub>) Planta aclimatizada usando perlita como sustrato; (T<sub>2</sub>) Planta aclimatizada usando arena + 3% de lombricompost; (T<sub>3</sub>) Planta aclimatizada usando sustrato comercial; (T<sub>4</sub>) Planta aclimatizada en hidroponía con agua corriente; (T<sub>5</sub>) Planta aclimatizada en hidroponía con solución nutritiva de Arnon y Hoagland (1940).

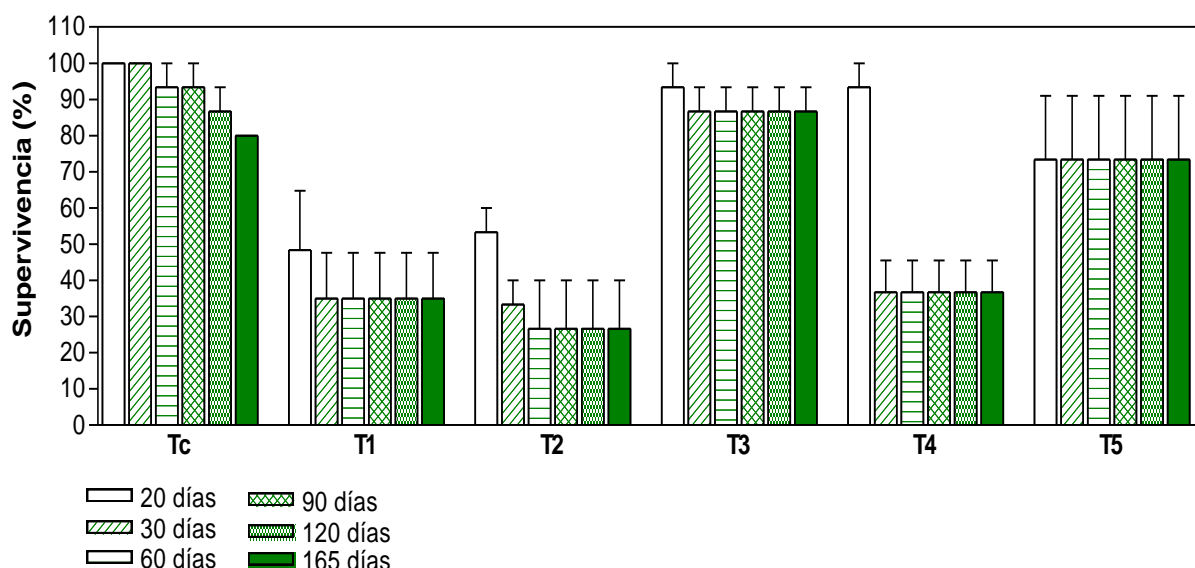
Los tratamientos en sustrato comercial ( $T_3$ ) y en solución nutritiva ( $T_5$ ) permitieron aumentar 3,3 y 9 veces respectivamente, los valores de materia seca obtenidos *in vitro* (Fig. 4.3). Este importante aumento en la biomasa de las plantas de mandioca aclimatizadas concuerda con lo hallado por Pospíšilová *et al.*, (1999) en *Nicotiana tabacum*, quienes sostienen que si el transplante a las condiciones *ex vitro* resulta exitoso, el incremento en el crecimiento puede ser sumamente importante.

El porcentaje de materia seca evidenció valores significativamente superiores ( $p \leq 0,01$ ) en las plantas mantenidas en arena + lombricompost ( $T_2$ ) y en condiciones de hidroponía en agua corriente ( $T_4$ ), durante la etapa de aclimatación en cámara; si bien ambos tratamientos presentaron bajos valores de peso seco total (Figura 4.3), lo que implica un menor contenido de agua en las plantas sometidas a estos tratamientos. Esta disminución en el peso seco acompañada por un aumento en el porcentaje de materia seca fue informada por Clostre y Suni (2007) en *Lemna gibba* L. y por Gerardeax *et al.*, (2009) en *Gossypium hirsutum* L., en ambos casos asociado a un menor contenido de potasio en el medio de crecimiento.



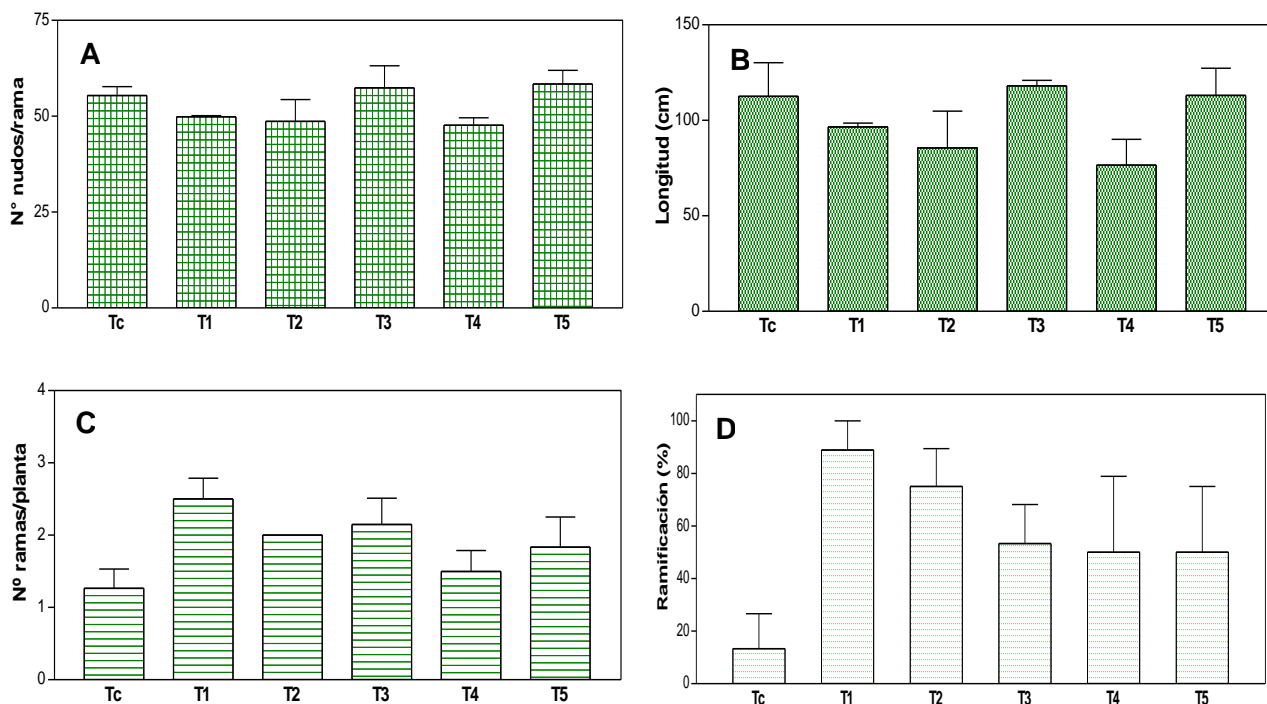
**Figura 4.3:** Peso seco (aéreo y radical) y porcentaje de materia seca para diferentes tratamientos al finalizar la etapa de aclimatación de plantas de mandioca (clon EC 118) en cámara de cultivo, con respecto a la condición inicial ( $T_0$ ).

La supervivencia a campo, mostró diferencias significativas entre tratamientos en todas las fechas evaluadas ( $p \leq 0,05$ ), siendo superior en el tratamiento control (plantas obtenidas a partir de estacas) y en las plantas aclimatizadas en sustrato comercial ( $T_3$ ) y en hidroponía con solución nutritiva ( $T_5$ ). La mayor disminución en el porcentaje de supervivencia de las plantas, se evidenció entre los 20 y los 30 días de realizado el transplante a campo, manteniéndose luego constante hasta los 165 días de cultivo (Fig. 4.4). Por lo tanto, el valor registrado a los 30 días de la plantación a campo sería el más adecuado para comparar la supervivencia de las plantas de mandioca aclimatizadas bajo los diferentes tratamientos. En este sentido, se observaron dos grandes grupos: uno con elevados porcentajes de supervivencia: 73,3%, 86,7% y 100% para los tratamientos  $T_5$ ,  $T_3$  y el control, respectivamente; y otro grupo con bajos porcentajes de supervivencia:  $T_2$  (33,3%),  $T_1$  (35%) y  $T_4$  (36,7%). Albarrán *et al.*, (2003) obtuvieron valores de supervivencia a campo para plantas de mandioca aclimatizadas que variaron entre 22% y 100% según los clones, destacando que aquellas plantas que sobreviven a los dos primeros meses en condiciones de campo, tienen alta probabilidad de alcanzar la edad productiva. Esta disminución en el porcentaje de supervivencia, también se observa cuando se plantan a campo plantas de mandioca derivadas de semilla botánica, ya que durante los dos o tres primeros meses resultan más delicadas que las plantas provenientes de estacas (Ceballos *et al.*, 2002).



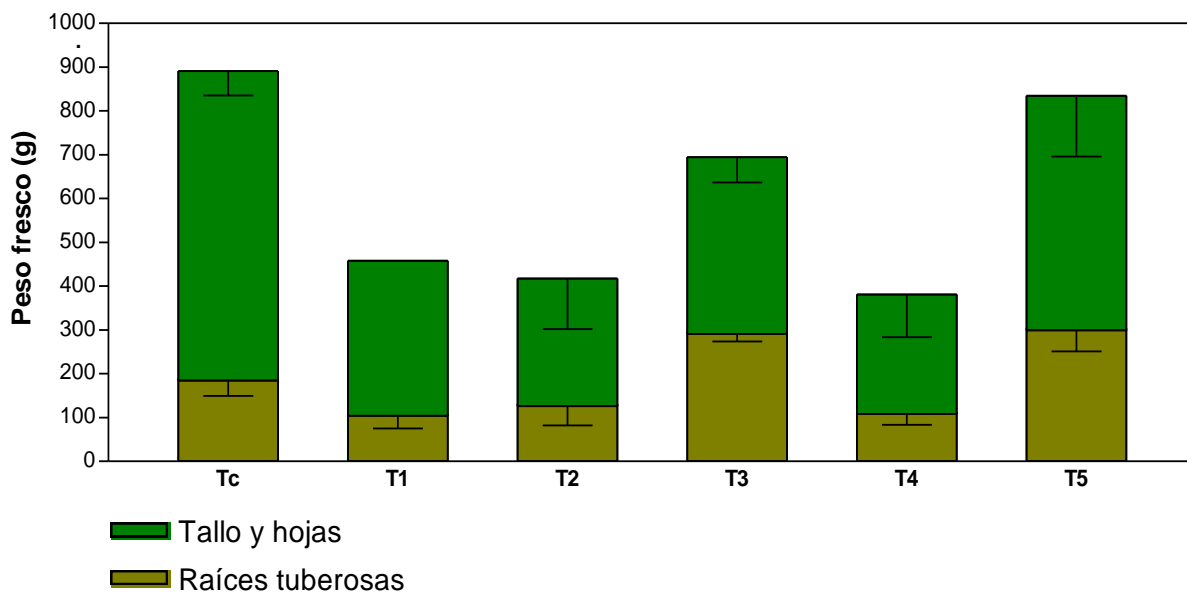
**Figura 4.4:** Supervivencia a campo de plantas de mandioca (clon EC 118) aclimatizadas mediante diferentes tratamientos en relación al control (estacas caulinarias), durante el ciclo productivo.

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a las variables: número de nudos por rama, longitud de la rama principal, número de ramas por planta y porcentaje de plantas que presentaron tallos ramificados ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 4.5).

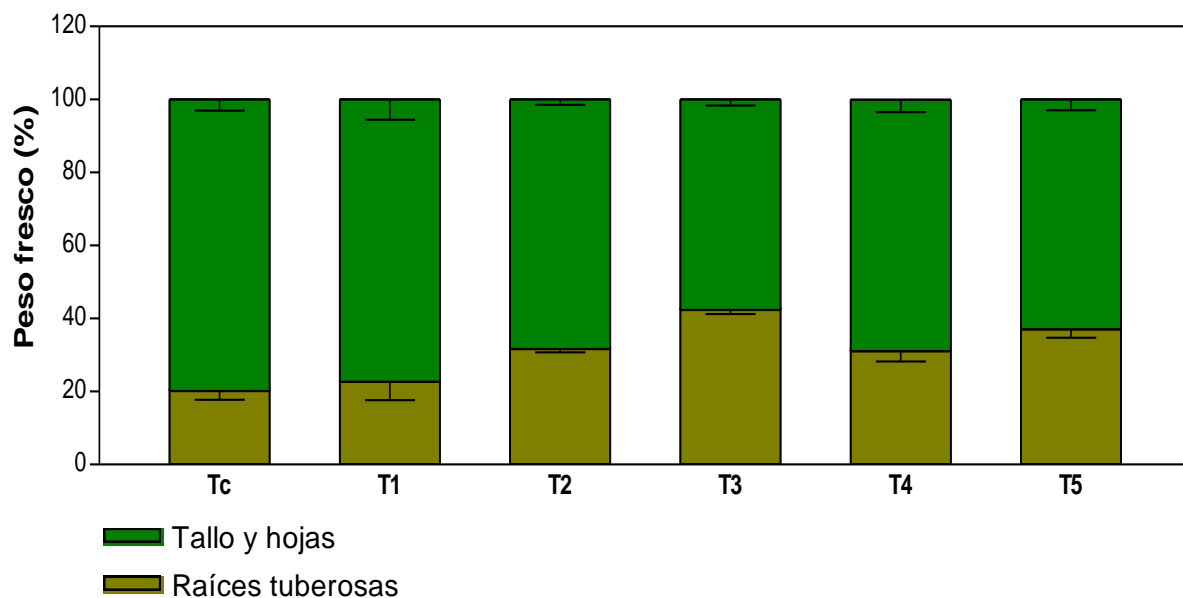


**Figura 4.5:** Parámetros de crecimiento de plantas de mandioca (clon EC 118) aclimatizadas bajo diferentes tratamientos con respecto a las estacas caulinarias, a los 165 días después de realizada la plantación a campo: (A) Número de nudos por rama de mandioca; (B) Longitud de la rama principal; (C) Número de ramas por planta; (D) Porcentaje de plantas con tallo ramificado.

Con respecto al peso fresco de las plantas, fue posible observar diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ ) en el peso de las raíces tuberosas, el peso de tallo y hojas y el peso total; así como también con respecto a la partición entre raíces tuberosas y parte aérea. A pesar que las plantas obtenidas a partir de estacas arrojaron los mayores valores de peso fresco total, fueron las que destinaron menor porcentaje de su peso fresco total a las raíces. Por otra parte, las plantas aclimatizadas bajo los tratamientos T<sub>3</sub> y T<sub>5</sub>, sin diferir significativamente del control con respecto al peso fresco total, presentaron los mayores valores de peso fresco de raíces, tanto en valor absoluto como en porcentaje del peso (Tabla 4.3; Figs. 4.6 y 4.7).



**Figura 4.6:** Peso fresco aéreo y radical de plantas de mandioca (clon EC 118) aclimatizadas bajo diferentes tratamientos y cultivadas a campo, en relación a las plantas control derivadas de estacas caulinareas



**Figura 4.7:** Distribución del peso fresco aéreo y radical de plantas de mandioca (clon EC 118) aclimatizadas bajo diferentes tratamientos y cultivadas a campo, en relación a las plantas control derivadas de estacas caulinareas.

El rendimiento de raíces tuberosas a campo, expresado como porcentaje del rendimiento del control, presentó diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ ), obteniéndose los mayores valores en las plantas aclimatizadas en sustrato comercial ( $T_4$ ) y en condiciones de hidroponía con solución nutritiva ( $T_5$ ), las cuales rindieron un 57% y 61% más respectivamente en relación al método de plantación mediante estacas tradicionalmente utilizado (Tabla 4.3; Fig. 4.8).

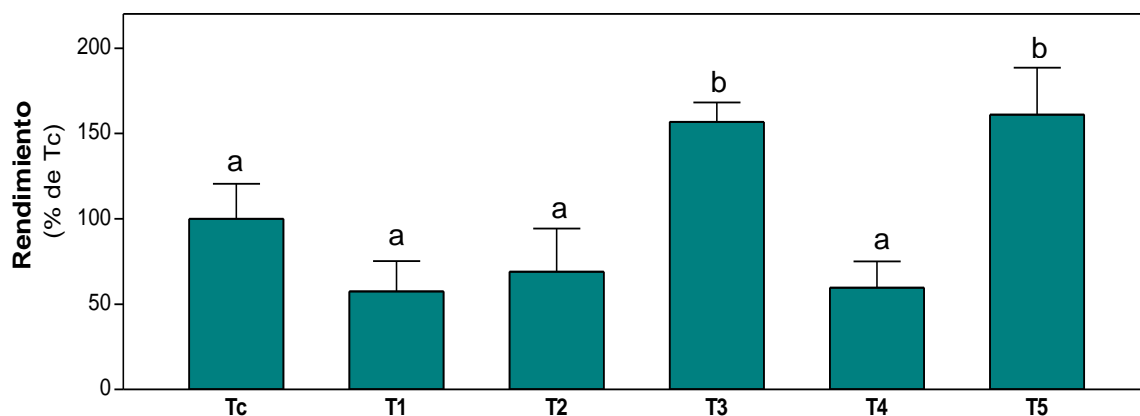
Las plantas de mandioca obtenidas *in vitro* y aclimatizadas mediante estos tratamientos muestran un comportamiento similar al de las plantas derivadas de estacas caulinarias. Es probable que el mayor rendimiento observado en los  $T_3$  y  $T_5$  se debiera al mayor desarrollo inicial de estas plantas con respecto a los demás tratamientos y al retraso que sufren las plantas obtenidas a partir de estacas, ya que según Alves (2002) las hojas verdaderas comienzan a expandirse recién 30 días después de la plantación de la estaca, momento en el que la fotosíntesis comienza a contribuir positivamente con el crecimiento de la planta, ya que hasta entonces el crecimiento de la raíz y el tallo sólo dependen de las reservas contenidas en la estaca. Por este motivo, tanto la tuberización como la traslocación se iniciarían más tarde con respecto a las plantas aclimatizadas, condicionando su producción.

**Tabla 4.3:** Variables evaluadas a los 165 días de realizada la plantación a campo, para plantas de mandioca (clon EC 118) aclimatizadas con diferentes tratamientos, en relación al control ( $T_c$ ).

Trat	PFA (g)	PFR (g)	PFT (g)	Partición tallo/hojas (%)	Partición raíz (%)
$T_c$	702,92 <sup>c</sup>	188,33 <sup>a</sup>	891,25 <sup>b</sup>	79,23 <sup>c</sup>	20,77 <sup>a</sup>
$T_1$	417,17 <sup>ab</sup>	135,38 <sup>a</sup>	552,54 <sup>ab</sup>	67,77 <sup>b</sup>	22,33 <sup>a</sup>
$T_2$	287,50 <sup>ab</sup>	130,00 <sup>a</sup>	417,50 <sup>a</sup>	77,67 <sup>c</sup>	32,23 <sup>b</sup>
$T_3$	399,17 <sup>ab</sup>	295,42 <sup>b</sup>	694,58 <sup>ab</sup>	57,09 <sup>a</sup>	42,91 <sup>c</sup>
$T_4$	268,75 <sup>a</sup>	112,50 <sup>a</sup>	381,25 <sup>a</sup>	68,32 <sup>b</sup>	31,68 <sup>b</sup>
$T_5$	531,25 <sup>bc</sup>	303,33 <sup>b</sup>	834,58 <sup>b</sup>	62,33 <sup>ab</sup>	37,67 <sup>bc</sup>

Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )





**Figura 4.8:** Porcentaje de rendimiento de raíces tuberosas a campo, a partir de plantas obtenidas bajo diferentes tratamientos de aclimatización en relación al rendimiento de las plantas establecidas mediante estacas caulinares ( $T_c$ ).

Si bien la supervivencia en la etapa de aclimatización en cámara de cultivo no difirió entre tratamientos, siendo elevada en todos ellos, las diferencias observadas a nivel de peso total, área foliar y de biomasa radical al finalizar esa etapa, permiten afirmar que las plantas obtenidas fueron significativamente diferentes, condición que sí resultó en respuestas diferenciales en la supervivencia a campo, donde es probable que el mayor desarrollo radical en los  $T_3$  y  $T_5$  favoreciera una mayor exploración del suelo, permitiendo una mejor absorción de agua y nutrientes en las condiciones de campo, con respecto al resto de los tratamientos y al control.

#### 4.4. Conclusiones

- La aclimatización en cámara fue exitosa, registrándose una elevada supervivencia de las plantas bajo todos los tratamientos (96% a 100%).
- Si bien los tratamientos no afectaron la supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatización en cámara de cultivo, permitieron el desarrollo de plantas con diferencias significativas a nivel de área foliar, peso fresco y seco de raíces, tallos y hojas; lo que influyó en la respuesta en condiciones de campo, tanto a nivel de supervivencia como de peso fresco total, partición de biomasa y producción de raíces tuberosas.
- Con respecto a la supervivencia en condiciones de campo se observaron dos tipos de respuesta: supervivencia elevada para el control y los tratamientos aclimatizados en sustrato comercial y en hidroponía con solución nutritiva y

menor supervivencia para los tratamientos con arena + lombricompost, perlita e hidroponia en agua corriente.

- A fin de establecer un procedimiento para la aclimatización eficiente de plantas de mandioca con fines productivos es importante extender la evaluación de la supervivencia, por lo menos, hasta el primer mes de trasplante a campo, y analizar su comportamiento durante todo el ciclo del cultivo.
- Si bien no se observaron diferencias con respecto al peso fresco total, el porcentaje de biomasa destinado a las raíces fue significativamente mayor en los tratamientos con sustrato comercial (T<sub>3</sub>) y en hidroponia con solución nutritiva (T<sub>5</sub>), lo que se tradujo en un mayor rendimiento de raíces tuberosas con respecto al control.
- El proceso de propagación *in vitro*, desde la disección de los segmentos nodales hasta la siembra a campo, se realiza en un tiempo aproximado de 10 semanas.

## CAPÍTULO 5

### 5.1. Conclusiones Generales

Con esta tesis se generó información sobre la capacidad organogénica y embriogénica de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de interés para Argentina, evaluando además diferentes sistemas para lograr una eficaz aclimatización a campo de las plantas micropropagadas.

Se logró el establecimiento *in vitro*, la regeneración y la multiplicación de 28 clones, a partir de segmentos uninodales, utilizando un medio compuesto por MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de BAP y 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>. El número promedio de nudos por planta en el primer ciclo de multiplicación varió entre 2,3 y 6,6 para los diferentes clones.

La evaluación del efecto de las citocininas sobre la morfogénesis caulinar y radical de la mandioca (clon EC 118) demostró que si bien todas las citocininas evaluadas permitieron regenerar vástagos, se destacaron el BAP (1 mg.l<sup>-1</sup>) con respecto a la inducción de múltiples vástagos y el 2iP (en todas las concentraciones evaluadas) y la CIN y el BAP (ambos en su menor concentración) con respecto al porcentaje de plantas regeneradas en menor tiempo.

En función de los resultados obtenidos, la encapsulación de segmentos uninodales de mandioca se presenta como una alternativa factible de implementar para la propagación de esta especie y su futuro uso en la implantación a campo, siendo necesarios mayores estudios. Se obtuvieron porcentajes de regeneración de plantas similares cuando se cultivaron segmentos uninodales sin encapsular y encapsulados en alginato de calcio sobre el medio MS sólo o adicionado con ANA, BAP y AG<sub>3</sub>. Estos valores disminuyeron cuando se adicionó a la cápsula el medio de cultivo a modo de endosperma artificial. En este sentido, sería interesante evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de medio MS a la cápsula de alginato de calcio, ya que es probable que la elevada concentración salina del medio de cultivo que rodea al explante encapsulado influya negativamente sobre su enraizamiento. Otras alternativas a evaluar serían el pretratamiento de las cápsulas con diferentes soluciones nutritivas y la encapsulación de segmentos previa inducción de la formación de raíces, a fin de garantizar su regeneración en el menor tiempo, como se ha conseguido en otras especies.

Con respecto a la embriogénesis somática, fue posible inducir la formación de embriones somáticos en 30 de los 34 clones de mandioca evaluados, utilizando un sistema de dos fases, que consistió en una fase de inducción de ápices caulinares en medio MS adicionado con 6 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y 2% de sacarosa y una fase de maduración en medio MS adicionado con 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D; 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP; 1 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y 2% de sacarosa propuesto por Szabados *et al.*, (1987). Con este procedimiento se logró obtener embriones somáticos germinados en 16 clones y regenerar plantas en 9 de los 34 cultivares evaluados.

El análisis del efecto de diferentes factores sobre la embriogénesis somática en mandioca (clon EC 118), demostró que:

- Todas las auxinas evaluadas promovieron la inducción de embriones somáticos, aunque los mayores índices de embriogénesis se registraron con 2,4-D y Picloran. Si bien el uso de 2,4,5-T y NOA en el medio de inducción produjo elevados porcentajes de embriogénesis, su desempeño no fue tan destacado con respecto al número de embriones por explante.
- Las yemas axilares demostraron ser explantes tan adecuados como los ápices caulinares para inducir la formación de embriones somáticos, presentando menor variabilidad en la respuesta con respecto a los ápices caulinares al utilizar diferentes auxinas en el medio de inducción. Si bien el patrón de respuestas fue similar con ambos tipos de explantes, los ápices caulinares tuvieron el mejor desempeño con 10 mg.l<sup>-1</sup> de Picloram, mientras que las yemas axilares respondieron mejor con 6 y 10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D.
- Un periodo de inducción de 10 días sería suficiente para que los ápices caulinares adquirieran su capacidad embriogénica. Este período sería mayor con las yemas axilares, ya que la cantidad de embriones somáticos generados aumenta al aumentar el tiempo de inducción.
- Si bien la sacarosa es usada satisfactoriamente para la obtención de embriones somáticos en mandioca, el índice de embriogénesis demostró que la adición de 3% de glucosa al medio de cultivo incrementa significativamente la embriogénesis somática a partir de yemas axilares con respecto a las demás fuentes carbonadas. Además la glucosa permitió los mayores porcentajes de embriones somáticos germinados y regeneración de plantas.

Los tratamientos de aclimatización permitieron el desarrollo de plantas con diferencias significativas a nivel de área foliar y peso seco de raíces y parte aérea, lo que condicionó la respuesta de las plantas a campo, resultando en una mayor

producción de raíces tuberosas con respecto al control en los tratamientos aclimatizados con sustrato comercial y en condiciones hidroponia con solución nutritiva.

Se observó un importante efecto del genotipo en el desarrollo *in vitro* de las plantas de mandioca, tanto a nivel de organogénesis como de embriogénesis somática. En este sentido y dado que la evaluación del efecto de auxinas, fuentes carbonadas, tipos de explantes y tiempo de inducción se realizó sólo con el clon EC 118, sería importante comprobar en qué grado los resultados aquí obtenidos permiten optimizar la respuesta embriogénica de otros clones de mandioca. Además es necesario seguir optimizando el sistema para obtener no sólo una mayor frecuencia embriogénica, sino también una mayor regeneración de plantas de mandioca partir de embriones somáticos.

## BIBLIOGRAFIA

- Acedo, V. Z. 2002. Meristem culture and micropropagation of cassava. *Journal of Root Crops* 28: 1-7.
- Aitken-Christie, J.; T. Kozai y M. A. L. Smith. 1995. Glossary. En: J. Aitken-Christie; T. Kozai y M. A. L. Smith (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Neetherlands. ix-xii p.
- Albarrán, J.; F. Fuenmayor y M. Fuchs. 2003. Propagación clonal rápida de variedades comerciales de yuca mediante técnicas biotecnológicas. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela*. CENIAP Hoy N°3. [www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/albarran.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/albarran.htm) [Fecha de consulta: 20/04/2007].
- Alves, A. A. C. 2002. Cassava Botany and Physiology. En: R. J. Hillocks; J. M. Thresh y A. C. Bellotti (eds.), *Cassava Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, New York, USA. 67-89 p.
- Ammirato, P. V. 1983. Embryogenesis. En: D. A. Evans; W. R. Sharp; P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol 1. MacMillan Publishing, New York, USA. 82-123 p.
- Ammirato, P. V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. En: C. E. Green; D. A. Somers; W. P. Hackett y D. D. Biesboer (eds.) *Plant Biology, Vol.3, Plant, Tissue and Cell Culture*. New York, USA. 57-81 p.
- Arnon, D. I. y D. R. Hoagland. 1940. Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Science* 50: 463-83.
- Atehnkeng, J.; V. O. Adetimirin y S. Y. C. Ng. 2006. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germoplasm for somatic embryogenesis competence. *African Journal of Biotechnology* 5: 1324-1329.
- Azcón Aguilar, C.; M. Cantos; A. Troncoso y J. M. Barea. 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae* 72: 63-71.
- Bai, K. V.; R. Asiedu y A. Dixon. 1993. Cytogenetics of *Manihot* species and interespecific hybrids. En: W. M. Roca y A. M. Thro (eds.), *Proceedings of the*

First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia. 51-55 p.

- Balagopalan, C. 2002. Cassava utilization in food, feed and industry. En: R. J. Hillocks; J. M. Tresh y A. C. Bellotti (eds.), Cassava Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, New York, USA. 301-318 p.
- Bapat, V. A.; M: Mhatre y P. S. Rao. 1987. Propagation of *Morus indica* L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds. *Plant Cell Reports* 6: 393-395.
- Barrueto Cid, L. P.; A. R. R. Cruz y L. J. C. B. Carvalho. 2009. Encapsulation of cassava nodal segments for germoplasm storage. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 245. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología. 11 p.
- Bates, S.; J. E. Preece; N. E. Navarrete; J. W. van Sambeek, J. E. y G. R. Gaffney. 1992. Thidiazuron stimulates shoot organogénesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 21-29.
- Bellotti, A.; W. Roca; J. Tohme; P. Chavarriaga; R. H. Escobar y C. J. Herrera. 2002. Biotecnología para el manejo de plagas en la producción de semilla limpia. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 255-261 p.
- Bhagwat, B.; L. G. E. Vieira y L. R. Erickson. 1996. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and giberelic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 1-7.
- Bhattacharya, N. 1988. Enzyme activities during adventitious rooting. En: T. D. Davis; B. E. Haissig y N. Sankhla (eds.). Adventitious Root Formation in Cuttings. *Advances in Plant Sciences Serie 2*: 88-101.
- Bromees, V. F. y R. Lacon. 1995. Influence of medium components on hardening of cassava after micropropagation in liquid nutrient medium. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia. 210-219 p.
- Bruniard, E. 1999. Los regímenes hídricos de las formaciones vegetales. Aporte para un Modelo Fitoclimático Mundial. Ed. EUDENE. Resistencia, Argentina. 382 p.
- Buitrago, J. A. 1990. La yuca en la alimentación animal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 446 p.

- Cabral, C. B.; F. J. L. Aragao; K. Matsumoto; D. C. Monte-Neshich y E. L. Rech. 1993. Cassava tissue culture: multiple shoots and somatic embryogenesis. En: W. M. Roca y A. M. Thro (eds.) Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Cartagena, Colombia. 180-184 p.
- Carvalho, L. J. C. B.; C. R. B. Souza; J. C. Mattos Cascardo; C. B. Junior y L. Campos. 2004. Identification and characterization of a novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. *Plant Molecular Biology* 56: 643-659.
- Ceballos, H. 2002. La Yuca en Colombia y el mundo: Nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 1-13 p.
- Ceballos, H. y G. A. de la Cruz. 2002. Taxonomía y morfología de la yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 16-32 p.
- Ceballos, H.; N. Morante; F. Calle; J. I. Lenis; G. Jaramillo y J. C. Pérez. 2002. Mejoramiento genético de yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 295-325 p.
- Ceballos, H.; T. Sánchez; A. L. Chávez; C. Iglesias; D. Debouck; G. Mafla y J. Tohme. 2005. Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 589-593.
- Clostre, G. y M. Suni. 2007. Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio del medio de cultivo en el rendimiento y valor nutritivo de *Lemna gibba* L. (Lemnaceae). *Revista Peruana de Biología* 13: 231-235.
- Cock, J. H. 1989. La yuca, nuevo potencial para un cultivo tradicional. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 240 p.
- Connor, D. J.; J. H. Cock; y G. E. Parra. 1981. Response of cassava to water shortage. I. Growth and yield. *Field Crops Research* 4: 181-200.
- Da Silva, A. T.; M. Pasqual; J. S. Ishida y L. E. C. Antunes. 1995. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 30: 49-53.



- De Bernardi, L. A. 2001. Cadenas alimentarias: Fécula de mandioca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Buenos Aires, Argentina. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/horta/Fecula-Mandioca> [Fecha de consulta: 14/12/2006].
- De Klerk, G. J.; B. Arnholdt-Schmitt; R. Lieberei y K. H. Neumann. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39: 53-66.
- De Rezende, A. L.; A. B. Da Silva y M. Pascual. 2000. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. *Ciência e Agrotecnologia Universidade Federal de Lavras* 24: 9-12.
- Domínguez, C. E.; L. F. Ceballos y C. Fuentes. 1983. Morfología de la Planta de Yuca. En: Domínguez, C. E. (eds.) Yuca: investigación, producción y utilización. Documento N° 50, Programa Yuca. CIAT. Cali, Colombia. 29-49 p.
- Ekanayake, I. J.; D. S. O. Osiru y M. C. M. Porto. 1997. Morphology of cassava. International Institute of Tropical Agriculture (IITA) Research Guide N° 61. [http://www.iita.org/cms/details/trn\\_nat/irg61/irg61.html](http://www.iita.org/cms/details/trn_nat/irg61/irg61.html) [fecha de consulta: 25/09/09].
- El-Sharkawy, M. A. 2003. Cassava biology and physiology. *Plant Molecular Biology* 53: 621-641.
- El-Sharkawy M. A. y J. H. Cock. 1990. Photosynthesis of cassava (*Manihot esculenta*). *Experimental Agriculture* 26: 325-340.
- Escobar, E. H., O. Ligier; R. Melgar; M. Matteio y O. Vallejos. 1994. Mapa de suelos de los Departamentos de Capital, San Cosme e Itatí de la Provincia de Corrientes. Publicación del INTA-CFI-ICA. 125 p.
- Escobar, R. H.; C. M. Hernández; N. Larrahondo; G. Ospina; J. Restrepo; L. Muñoz; J. Tohme y W. M. Roca. 2006. Tissue culture for farmers: participatory adaptation of low input cassava propagation in Colombia. *Experimental Agriculture* 42: 103-120.
- Faisal, M. y M. Anis. 2009. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 125-132.

- FAO. 2008. Cassava for food and energy security. Food and Agriculture Organization. Roma, Italia. <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000899/index.html> [Fecha de consulta: 30/09/2009].
- FAO. 2009. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization. Roma, Italia. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx> [Fecha de consulta: 07/10/09].
- FAO/FIDA. 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. Food and Agriculture Organization/Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola. Roma, Italia. 59 p.
- Feitosa, T.; J. L. Pinheiro; L. Ferreira; T. Lustosa y F. de Assis. 2007. Somatic embryogenesis in cassava genotypes from Northeast of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 201-206.
- Fregene, M.; J. A. Ospina y W. Roca. 1999. Recovery of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants from culture of immature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 39-43.
- Fregene, M.; J. Tohme; W. Roca; P. Chavarriaga; R. Escobar y H. Ceballos. 2002. Biotecnología para la yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 377-405 p.
- Fuentes, S. R. L.; M. B. P. Calheiros; J. Manetti-Filho y L. G. E. Vieira. 2000. The effect of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 5-13.
- Galdeano, E; A. M. Scocchi y L. A. Mroginski. 1996. Efecto del cobre sobre la embriogénesis somática en mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. 161-162 p.
- Gamborg, O. L.; T. Murashige; T. A. Thorpe y I. K. Vasil. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 12: 473-478.
- Ganapathi, T. R.; P. Suprasanna; V. A. Bapat y P. S. Rao. 1992. Propagation of banana through encapsulated shoot tips. *Plant Cell Reports* 11: 571-575.
- Garsaball, J. A. L. y M. C. S. Cuevas. 2006. Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "Queresa Rosada" con hipoclorito de sodio. *Revista UDO Agrícola* 6: 60-66.

- Gerardeaux, E.; E. Saur; J. Constantin; A. Porté y L. Jordan-Meille. 2009. Effect of carbon assimilation on dry weight production and partitioning during vegetative growth. *Plant Soil* 324: 329-343.
- Gibson, S. I. 2004. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* 5: 253-264.
- Gou, L. Y. y Y. Q. Liu. 1995. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its application in rural districts in China. En: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia. 183-189 p.
- Grattapaglia, D. y L. Machado. 1990. Micropropagação. En: A. L. Torres y L. S. Caldas (eds.) Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas. Abctp/Embrapa, Brasil. 99-170 p.
- Guerra, M. P.; A. C. Torres y J. B. Teixeira. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. En: A. C. Torres; L. S. Caldas y J. A. Buso (eds.) Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB, 2: 533-568.
- Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 1-7.
- Guohua, M. y Q. Xu. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 281-288.
- Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sitzungsbericht Mat. Nat. Klu. Kais. Akad. Wiss. (Wien)* 111: 69-92.
- Hankoua, B. B.; S. Y. C. Ng; I. Fawole; J. Puonti-Kaerlas; M. Pillay y A. G. O. Dixon. 2005. Regeneration of a wide range of African cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 221-231.
- Hankoua, B. B.; N. J. Taylor; S. Y. C. Ng; I. Fawole; J. Puonti-Kaerlas; C. Padmanabhan; J.S. Yadav; C. M. Fauquet; A. G. O. Dixon y V. N. Fondong. 2006. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. *African Journal of Biotechnology* 19: 1700-1712.

- Huda, A. K. M. N.; M. Rahman y M. A. Bari. 2007. Effect of carbon source in alginate bead on synthetic seed germination in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Plant Sciences* 2: 538-544.
- Iglesias, C.; J. Mayer; L. Chávez y F. Calle. 1997. Genetic potential and stability of carotene content in cassava roots. *Euphytica* 94: 367-373.
- Ihemere, U. E. 2003. Somatic embryogenesis and transformation of cassava for enhanced starch production. Tesis Doctoral. The Ohio State University, 184 p.
- Ihemere, U. E.; D. Arias-Garzón; S. Lawrence y R. Sayre. 2006. Genetic modification of cassava for enhanced starch production. *Plant Biotechnology Journal* 4: 453-465.
- InfoStat 2002. Infostat versión 1.1. Grupo Infostat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Janssen, W. G. 1986. Market impact on Cassava's potential in the Atlantic coast region of Colombia. Cali, Colombia: CIAT. 357 p.
- Jennings, D.L. 1995. Cassava. En: J. Smartt and N. W. Simmonds (eds.), Evolution of Crop Plants. Longman Scientifics & Technical. Second Edition. New York, USA. 128-132 p.
- Jorge, M. A. B. 1996. Cassava acclimatization in Mozambique. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2: 216-219.
- Jorge, M. A.; A. I. Robertson; A. B. Mashingaidze y E. Keogh. 2000. How *in vitro* light affects growth and survival of *ex vitro* cassava. *Annals of Applied Biology* 137: 311-319.
- Joseph, T.; H. H. Yeoh y C. S. Loh. 1999. Cyanogenesis in somatic embryos and plantlets of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1071-1074.
- Kartha, K. K.; O. L. Gamborg; F. Constabel y J. P. Shyluk. 1974. Regeneration of cassava plants from shoot apical meristem. *Plant Science Letters* 2: 107-113.
- Kochba, J.; P. Spiegel-Roy; H. Neumann y S. Saad. 1982. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultures nucellar callus of *Citrus* cultivars. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 359-368.
- Konan, N. K.; R. S. Sangwan y B. S. Sangwan-Norreel. 1994a. Efficient *in vitro* shoot-regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Breeding* 113: 227-236.

- Konan, N. K.; R. S. Sangwan y B. S. Sangwan. 1994b. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 91-102.
- Konan, N. K.; C. Schöpke, C.; R. Carcamo; R. N. Beachy y C. Fauquet. 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary-bud derived meristems. *Plant Cell Reports* 16: 444-449.
- Konjing, C. 1989. Trends and prospects for cassava in Thailand. International Food Policy Research Institute (IPFRI). Working paper N° 6 on Cassava. Washington, D.C. IFPRI.
- Le, B. V.; B. L. Anh; K. Soyong; N. D. Danh y L. T. Anh Hong. 2007. Plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *Journal of Agricultural Technology* 3: 121-127.
- Li, H.Q.; J. Y. Guo; Y. W. Huang; C. Y. Liang; H. X. Liu; I. Potrykus y J. Puonti-Kaerlas. 1998. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 410-414.
- Litz, R. E. y R. L. Jarret. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (eds.), Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 143-171 p.
- López, J. 2002. Semilla vegetativa de yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 49-75 p.
- Marín, A.; D. Perdomo; J. G. Albarrán; F. Fuenmayor y C. Zambrano. 2008. Evaluación agronómica, morfológica y bioquímica de clones élites de yuca a partir de vitroplantas. *Interciencia* 33: 365-371.
- Mathews, H.; C. Schöpke; R. Carcamo; P. Chavarriaga; C. Fauquet y R. N. Beachy. 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports* 12: 328-333.
- Matsumoto, K.; C.Hirao y J. Teixeira. 1995. *In vitro* growth of encapsulated shoot tips in banana (*Musa sp*). *Acta Horticulturae* 370: 13-20.
- Medero, V. R.; C. Borroto; S. Rodríguez; R. Gómez; J. López; M. García; J. C. Ventura; L. S. Espinosa; M. Cabrera; M. Martínez; M. Torres; Y. Torres; M.

- Alvarez y J. García. 2000. Embriogénesis somática a partir de meristemas axilares de yuca. *Biotecnología Vegetal* 1: 21-26.
- Medina, R. D.; M. M. Faloci; V. Solís Neffa y L. A. Mroginski. 2003. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de cultivares de interés para Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* 32: 143-160.
- Mejía de Tafur, S. 2002. Fisiología de la Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT, Cali, Colombia. 34-45 p.
- Minocha, R. y S. M. Jain 2000. Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology. En: S. M. Jain y S. C. Minocha (eds.), Molecular Biology of Woody Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 315-339 p.
- Mok, M. C.; D. W. S. Mok; J. E. Turner y C. V. Muser. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22: 1194-1197.
- Mroginski, L. A. y W. M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (eds.), Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 19-40 p.
- Mroginski, L. A. y A. M. Scocchi. 1993. Somatic embryogenesis of argentine cassava varieties. En: Proceedings of First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. W. M. Roca y A. M. Thro (eds.). CIAT. Cartagena de Indias, Colombia. 175-179 p.
- Mukherjee, A. 1995. Embryogenesis and regeneration from cassava calli of anther and leaf. En: Cassava Biotechnology Network: Proceedings of the Second International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia. CIAT working document 150, 375-381 p.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mussio, I.; M. H. Chaput; I. Serraf; G. Ducreux y D. Sihachakr. 1998. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot*

- esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 205-211.
- Nweke, F. I.; E. C. Okorji; J. E. Njoku y D. J. King. 1994. Expenditure elasticities of demand for major food items in south-east Nigeria. *Tropical Agriculture* 71:229-234.
- Olsen, K. M. y B. A. Schaal. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88: 131-142.
- Pedroso de Oliveira, R.; T. Da Silva Gomes y A. Duarte Vilarinhos. 2000. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 2329-2334.
- Phillips, G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants - recent advances. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 40: 342-345.
- Piccioni, E. 1997. Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 255-260.
- Piccioni, E. y A. Standardi. 1995. Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 221-226.
- Pospíšilová, J; I. Tichá; P. Kadleček; D. Haisel y Š. Plzáková, 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.
- Pospíšilová, J; I. H. Synková; D. Haisel y S. Semorádová. 2007. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid (a review). *Acta Horticulturae* 748: 29-38.
- Puonti-Kaerlas, J. 1998. Cassava Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 15: 329-364.
- Puonti-Kaerlas, J.; A. Klöti y I. Potrykus. 1999 Biotechnological contributions to food security with cassava and rice. *Plant Biotechnology* 16: 39-48.
- Raemakers, C. J.; J. J. Bessembinder; G. Staritsky; E. Jacobsen y R.G.F. Visser. 1993a. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 151-156.
- Raemakers, C. J.; M. Amati; G. Staritsky; E. Jacobsen y R. G. F. Visser. 1993b. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Annals of Botany* 71: 289-294.
- Raemakers, C. J.; C. M. Schavemaker; E. Jacobsen y R. G. F. Visser. 1993c.

Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Reports* 12: 226-229.

- Raemakers, C. J. J. M.; E. Jacobsen y R. G. F. Visser. 1997. Micropropagation of *Manihot esculenta* Crantz (Cassava). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 39: 77-98.
- Rai, M. K.; Jaiswal, V. S. y Jaiswal, U. 2008. Encapsulation of shoot tips of guajava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germoplasm exchange. *Scientia Horticulturae* 118: 33-38.
- Rai, M. K.; P. Asthana; S. K. Singh; V. S. Jaiswal y U. Jaiswal. 2009. The encapsulation technology in fruit plants-A review. *Biotechnology Advances* 671-679.
- Rengifo, J.; J. Albarrán; A. Zambrano y F. Fuenmayor. 2006. Embriogénesis somática en dos clones de yuca de interés agronómico. En: R. Ortiz y N. M. A. Nassar (eds.) Cassava Improvement to Enhance Livelihoods in Sub-Saharan and Northeastern Brazil. First International Meeting on Cassava Breeding, Biotechnology and Ecology, Brasilia, Brasil. 48 p.
- Rey, H. Y. y L. A. Mroginski. 1978. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Phyton*, 36: 171-176.
- Roca, W. M. 1984. Cassava. En: W. R. Sharp; D. A. Evans; P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.), Handbook of Plant Cell Culture. Vol 2: Crop Species. MacMillan Publishing, New York, USA. 269-301 p.
- Roca W. y U. Jayasinghe. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. CIAT. Serie 04SC-02.05. Cali, Colombia. 47 p.
- Roca, W. M.; B. Nolt; G. Mafla; J. Roa y R. Reyes. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (eds.), Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 403-420 p.
- Rogers, D. J. y S. G. Appan. 1973. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae). *Flora Neotropica*. Monograph N° 13. Hafner Press, Nueva York, USA. 272 p.
- Saborio, F.; S. Torres y L. Gómez. 1998. Development of a clean-planting-material production system on tropical root and tuber crops, using *in vitro* propagated plants. *Acta Horticulturae* 461: 495-501.



- Sánchez, T. y L. Alonso. 2002. Conservación y acondicionamiento de las raíces frescas. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), *La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT, Cali, Colombia. 503-526 p.
- Sansberro, P.; H. Rey; A. Bernardis; C. Luna; M. Collavino y L. Mrogisnki. 2000. Plant regeneration of *Illex paraguariensis* (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. *Biocell* 24: 53-63.
- Scott, G. J.; R. Best; M. W. Rosegrant y M. Bokanga. 2000. Roots and tubers in the global food system. A vision statement to the year 2020. Report of the Committee on Inter-Centre Root and Tuber Crops Research (CICRTR). A co-publication of Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), International Food Policy Research Institute (IFPRI), International Institute for Tropical Agriculture (IITA), International Plant Genetic resources Institute (IPGRI) and the International Potato Centre (CIP). Lima, Peru. 111p.
- Segovia R. J.; A. Bedoya; W. Triviño; H. Ceballos; G. Gálvez y B. Ospina. 2002. Metodología para el endurecimiento masivo de "vitroplantas" de yuca. En: B. Ospina y H. Ceballos (eds.), *La Yuca en el Tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT. Cali, Colombia. 572-583 p.
- Singh, S. K. M. K. Rai; P. Asthana; S. Pandey; V. S. Jaiswal y U. Jaiswal. 2009. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* (L.) Murr., a medicinally important and herbal pesticidal plant species. *Acta Physiology Plant* 31: 649-653.
- Siritunga, D. S. 2002. Generation of acyanogenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz): transgenic approaches. Tesis doctoral. The Ohio State University, 201 p.
- Smith M. K.; B. J. Biggs y K. J. Scott. 1986. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 221-228.
- Sofiari, E.; C. J. Raemakers; E. Kanju; K. Danso; A. M. van Lammeren; E. Jacobsen y R. G .F. Visser. 1997. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50: 45-56.
- Stamp, J. A. y G. G. Henshaw. 1982. Somatic embryogenesis in cassava. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 105: 183-187.
- Stamp, J. A. y G. G. Henshaw, 1987a. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 227-233.

- Stamp, J. A. y G. G. Henshaw, 1987b. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava. *Annals of Botany* 59: 445-450.
- Strickland, S. G.; J. W. Nichol; C. M. McCall y D. A. Stuart. 1987. Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Science* 48: 113-121.
- Suárez, L. y M. M. Hernández. 2008. Efecto de la mezcla de oligogalacturónidos en la propagación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), var. CMC-40. *Cultivos Tropicales* 29: 47-52.
- Sudarmonowati, E. y G. G. Henshaw. 1993. The induction of somatic embryogenesis of recalcitrant cassava cultivars using picloram and dicamba. En: W. Roca y A. M. Thro (eds.). Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Working document 123. CIAT. Cali, Colombia. 128-133 p.
- Szabados, L.; R. Hoyos y W. Roca. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* 6: 248-251.
- Taylor, N.; M. Clarke y G. G. Henshaw. 1993. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and one South American cassava cultivars. En: W. Roca y A. M. Thro (eds.). Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Working document 123. CIAT. Cali, Colombia. 134-139 p.
- Taylor, N. J.; M. V. Masona; R. Carcamo; T. Ho; C. Schöpke y C. M. Fauquet. 2001. Production of embryogenic tissue and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120: 25-34.
- Thorpe, T. A. 2000. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *Korean Journal of Plant and Tissue Culture* 27:245-258.
- Thro, A. M.; W. M. Roca; J. Restrepo; H. Caballero; S. Poats; R. Escobar; G. Mafla y C. Hernández. 1999. Can *in vitro* biology have farmer-level impact for small-scale cassava farmers in Latin America? *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 35: 382-387.
- Tisserat, B.; E. B. Esan y T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in Angiosperms. *Horticultural Review* 1: 1-78.
- Tokuhara, K. y M. Mii. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 39: 635-639.

- Vila, S. K. 2006. Regeneración de plantas de paraíso (*Melia azedarach* L.) mediante el cultivo *in vitro* de tejidos. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. 131 p.
- Vila, S.; Rey, H. Y. y L. A. Mroginski. 2007. Factors affecting somatic embryogenesis Induction and Conversion in "Paradise Tree" (*Melia azedarach* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 268-277.
- Vilchez, J.; E. Ramírez; M. Villasmil; N. Albany; S. León de Sierralta y M. Molina. 2007. Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm.): Efectos del sustrato. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 24: 57-61.
- Villalobos, V. M. y T. A. Thorpe. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (eds.), Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 126-141 p.
- Wheatley C. C. y G. Chuzel. 1993. Cassava: the nature of the tuber and use as a raw material. En: R. Macrae; R. K. Robinson y M. J. Sadler (eds.), Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press, California, USA. 734- 743 p.
- Woodward, B. y J. Puonti-Kaerlas. 2001. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* 120: 1-6.
- Yeoh, H. H. y V. D. Truong. 1996. Protein contents, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for cassava roots. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 51-54.
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.
- Zimmerman, T. W.; K. Williams; L. Joseph; J. Wiltshire y J. A. Kowalski. 2007. Rooting and acclimatization of cassava (*Manihot esculenta*) *ex vitro*. *Acta Horticulturae* 738: 735-740.
- Zok, S.; L. M. Nyochembeng; J. Tambong y J. G. Wutoh. 1993. Rapid seedstock multiplication of improved clones of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) through shoot tip culture in Cameroon. En: W. M. Roca y A. M. Thro (eds.) Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Cartagena, Colombia. 96-104 p.