

Fundada en 1951 por Founded 1951 by

Miguel Raggio & Nora Moro-Raggio

Editor Fundador: Dr. Miguel Raggio, Editor Ejecutivo: Dr. Carlos A. Busso

FUNDACION ROMULO RAGGIO

Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA), Argentina

54° ANIVERSARIO

2005: 181-186

54rd ANNIVERSARY

Conservación *in vitro* de germoplasma de *Arachis pinto* (Leguminosae)

(con 2 tablas)

Rey* HY, LA Mroginski

Abstract. Studies on *in vitro* storage of either the cytotype diploid ($2n=2x=20$) or triploid ($2n=3x=30$) of *Arachis pinto* were conducted to preserve germplasm under slow-growing conditions. Shoot tips (2-3 mm in length), excised from *in vitro*-grown plants, could be effectively maintained for 1 year- in Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 0.01 mg/L NAA. Plants and shoots were regenerated on 83% of the shoot tips cultured. Rooting of the regenerated shoots was achieved by reculturing them on MS + 0.01 mg/L NAA. Subsequent plantlets were then successfully transferred to pots in the greenhouse.

Key words: *Arachis pinto*, Leguminosae, nodal segment, shoot tips, tissue culture

Muchas especies silvestres del género *Arachis* se hallan en peligro de extinción debido a causas ambientales y a la acción del hombre (7). Estas especies han sido reconocidas como muy importantes para el mejoramiento genético del maní cultivado. Sin embargo su conservación en los bancos de semillas está limitada por el hecho que su viabilidad decrece marcadamente con el tiempo, y no germinan después de 1-3 años de almacenaje. Esto obliga a una constante renovación de las semillas conservadas (3, 6, 10). Este es el caso del "maní pinto", *Arachis pinto* (Sección *Caulorrhizae*), una importante planta forrajera en áreas tropicales y subtropicales del mundo (1, 9, 14). De esta especie se han detectado dos citotipos, uno diploide, $2n=2x=20$ cromosomas (5) y otro triploide $2n=3x=30$ (13). En ambos casos, la conservación de germoplasma ofrece dificulta-

Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), CC. 209, Corrientes (3400), Argentina. E-mail: heberey@agr.unne.edu.ar * autor para correspondencia. TE: 54-3783-427589 int. 154 Fax: 54-3783-427131

Los autores son Miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

Los autores agradecen la financiación recibida del CONICET, CABBIO, SGCyT (UNNE) y USDA.

Recibido 8.III.2005: aceptado 26.IV.2005

des. Las semillas del citotipo diploide se deterioran fácilmente y el citotipo triploide no produce semillas. Para la conservación de su germoplasma se deben mantener colecciones vivas a campo con los consiguientes inconvenientes que ello acarrea al estar expuestas a inclemencias climáticas y bióticas de diversa índole (20).

Las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos se han constituido en varias herramientas para la conservación –a mediano plazo– de germoplasma (4, 8, 18). Con este propósito se pueden emplear diversas estrategias. Algunas de ellas se basan en la prolongación al máximo del período de los subcultivos (entre 12 meses y 4 años) mediante la disminución de la temperatura de incubación, de la reducción de la concentración de los componentes del medio de cultivo, o de una combinación de ambos aspectos (16).

En algunas ocasiones se han utilizado procedimientos que involucran reducción en la temperatura e incubación en la oscuridad (12, 17, 20). Con estos métodos, actualmente se están conservando grandes colecciones de germoplasma de cultivos como ser papa, banana y mandioca (2).

En este trabajo se informa acerca de procedimientos que permiten la conservación de los citotipos diploide y triploide de *Arachis pintoi* mediante la utilización del cultivo *in vitro* de varios explantes (meristemas, ápices caulinares y segmentos nodales) en medios de composición salina reducida o incubados a 4 °C.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. El material vegetal fue obtenido de plantas adultas de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Gregory que crecieron en condiciones de invernadero. Las semillas del citotipo diploide ($2n=2x=20$) germinaron en una mezcla de suelo y arena (1:1). Estas semillas fueron obtenidas de plantas recolectadas por Antonio Krapovickas y Walton C. Gregory en Cruz das Almas, Bahía Brasil [Un ejemplar de herbario está depositado en (CTES) como Gregory y Krapovickas 12787]. Las plantas del citotipo triploide ($2n=3x=30$) fueron gentilmente cedidas por José F.M. Valls de EMBRAPA/CENARGEN, Brasilia, Brasil (Un ejemplar de herbario está depositado en CTES como Lavia 90). Ambos citotipos crecen en el jardín del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). Ápices caulinares de los mismos fueron utilizados para el establecimiento *in vitro* de plantas, para lo cual, los ápices fueron desinfectados por inmersión en 70% de etanol (30s) seguido por inmersión en 0,9% de NaClO (12 min) y posteriormente lavados, 3 veces, con agua destilada estéril. Finalmente, los ápices fueron cultivados en el medio consistente de las sales minerales y vitaminas sugeridas por Murashige y Skoog (11) con 3% de sacarosa y 0,65% de agar (Sigma A-1296). Este medio –en adelante, MS– fue suplementado

con 0,01 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y de benciladenina (BA). Este medio fue esterilizado en autoclave a 1,46 Kg.cm⁻² durante 20 min. Al cabo de 60 días de incubación en un cuarto climatizado, a 27 ± 2 °C, 14h de fotoperíodo con una irradiación de 116 μmol m⁻² s⁻¹ (provisto por tubos fluorescentes fríos Philips TLD 36W/840), los ápices caulinares regeneraron plantas de las que se cultivaron tres tipos de explantes:

1) Apices caulinares de 2-3 mm de longitud.

2) Meristemas caulinares (0,3 - 0,5 mm de longitud, conteniendo el domo y un par de primordios foliares).

3) Segmentos nodales (segmentos de tallo de 4-7 mm de longitud conteniendo un nudo y una porción de entrenudo).

Los explantes fueron cultivados en 3 cc de medio, contenidos en tubos de vidrio de 11 cc (1 explante/tubo). Los tubos fueron obturados con una doble capa de Resinite^a e incubados en las condiciones expuestas en "Resultados y Discusión".

Procedimientos para la conservación de los explantes. Se ensayaron dos procedimientos:

1) Almacenaje de los cultivos a 4 °C. Los explantes (meristemas, ápices caulinares y segmentos nodales) fueron cultivados en tres medios de cultivo: a) MS, b) MS + 0,01 mg/L de ANA y c) MS + 0,01 mg/L de ANA + 0,01 mg/L de BA. Los cultivos fueron incubados en oscuridad, en un refrigerador a 4 °C.

2) Reducción de los componentes del medio de cultivo. Los explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) fueron cultivados en ocho medios de cultivo (Tabla 2) consistentes de MS, MS reducido a la mitad (1/2MS), a un cuarto (1/4MS) ó a un octavo (1/8MS). Estos medios estuvieron desprovistos de reguladores de crecimiento o fueron suplementados con 0,01 mg/L de ANA. Los cultivos se incubaron en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C, 14 h de fotoperíodo (116 μmol cm⁻² s⁻¹ provistos por tubos fluorescentes). El experimento fue repetido 3 veces.

Pruebas de viabilidad de los explantes conservados in vitro.

En el caso de los explantes almacenados a 4 °C, cada tres meses, lotes de 10 tubos fueron extraídos del refrigerador y depositados en un cuarto climatizado a 27 ± 2 °C, 14 h de fotoperíodo (116 μmol cm⁻² s⁻¹ provistos por tubos fluorescentes). Al cabo de 30 días de cultivo se evaluó el número de explantes capaces de producir plantas y/o vástagos. En este último caso, se indujo su enraizamiento mediante su cultivo en MS + 0,01 mg/L de ANA.

En el caso de los explantes cultivados en medios con reducción de sus componentes, cada tres meses se evaluó el número de explantes que brindaron plantas.

Diseño experimental y análisis estadístico. En el caso del procedimiento que involucra el almacenamiento de los explantes a 4°C, se incubaron 50 de cada uno de los explantes por medio de cultivo y el experimento fue repetido 3 veces. En el caso del procedimiento con medios con reducción de sus componentes, se cultivaron 10 explantes por cada medio de cultivo y el experimento fue repetido 3 veces.

Los resultados obtenidos estuvieron sujetos al análisis de varianza (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas con el test de Comparación Múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

En los experimentos diseñados para observar el comportamiento morfogénico de los explantes conservados a bajas temperaturas se pudo observar (Tabla 1) que en los controles (sin la aplicación de frío) los meristemas, ápices caulinares y segmentos uninodales de ambos citotipos posibilitaron la regeneración de plantas y/o vástagos en porcentajes similares a los informados previamente (15). Sin embargo, cuando los explantes fueron conservados en el refrigerador se produce una caída brusca de los porcentajes de explantes que brindan plantas y/o vástagos, especialmente en el caso de los meristemas que, en ambos citotipos, a los tres meses en ninguno de los medios brindaron ni plantas ni vástagos. En cambio los

Tabla 1.- Conservación de tres tipos de explantes de *Arachis pintoi* (diploide y triploide) cultivados *in vitro* y conservados a 4 °C.

Cada valor es un promedio de 3 repeticiones con n=10. Letras distintas en las columnas dentro de cada explante indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Explantes	Meses	2n=2x=20				2n=3x=30			
		% Plantas y/o Vástagos*				% Plantas y/o Vástagos			
		0	3	6	9 12	0	3	6	9 12
Medios									
Meristemas	MS	4 ^a	0	0	0 0	0 ^a	0	0	0 0
	MS + 0,01 mg/L ANA	24 ^{ab}	0	0	0 0	23 ^b	0	0	0 0
	MS + 0,01 mg/L ANA + 0,01 mg/L BA	34 ^b	0	0	0 0	40 ^b	0	0	0 0
Ápices	MS	13 ^a	52 ^a	29 ^a	24 ^a 0	13 ^a	37 ^a	10 ^a	0 0
	MS + 0,01 mg/L ANA	33 ^b	57 ^a	33 ^a	24 ^a 0	30 ^{ab}	23 ^a	10 ^a	0 0
	MS + 0,01 mg/L ANA + 0,01 mg/L BA	40 ^b	48 ^a	33 ^a	25 ^a 0	36 ^b	23 ^a	16 ^a	0 0
Segmentos Nodales	MS	80 ^a	80 ^a	14 ^a	0 ^a 0	93 ^a	40 ^a	10 ^a	0 0
	MS + 0,01 mg/L ANA	90 ^a	81 ^a	33 ^{ab}	5 ^a 0	90 ^a	27 ^a	17 ^{ab}	0 0
	MS + 0,01 mg/L ANA + 0,01 mg/L BA	96 ^a	86 ^a	52 ^b	5 ^a 0	96 ^a	30 ^a	23 ^b	0 0

* Al cabo de 1 mes de subcultivo en MS + 0,01 mg/L de ANA, el 80% de los vástagos enraizaron.

ápices caulinares posibilitaron la obtención de plantas y/o vástagos aún luego de 6 meses de permanencia en 4 °C (en el caso del citotipo triploide) ó de 9 meses (en el caso del citotipo diploide). En estos dos casos no hay diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo empleados. Los segmentos nodales con porcentajes iniciales de regeneración de plantas y/o vástagos del orden de 80 a 96%, pierden rápidamente esa capacidad que, a los 9 meses, es de 0% para el citotipo triploide y de 5% para el diploide. Estos resultados son, en general, muy bajos y no permiten avizorar algún procedimiento para la conservación de germoplasma basado en la utilización de temperaturas de 4 °C, las que evidentemente son muy bajas para una especie cuya distribución natural ocurre en lugares cálidos, entre 10 y 20° de latitud S (19). Esta falta de tolerancia de *Arachis pintoi* a las bajas temperaturas explicaría también los fracasos en los intentos realizados hasta el presente con el objeto de desarrollar algún procedimiento que permita su crioconservación a temperaturas del nitrógeno líquido -196 °C (Rey no publicado) mediante la técnica de la vitrificación.

La Tabla 2 muestra los resultados de la conservación de ápices caulinares y segmentos nodales de ambos citotipos a 27 ± 2 °C. Se puede apreciar que aún luego de 1 año de permanencia en el medio original, y sin ningún subcultivo, los ápices caulinares de ambos citotipos permiten, cuando son cultivados en MS + 0,01 mg/L de ANA, que el 83% de las plantas y/o vástagos se mantengan vivos. Con los segmentos nodales, este valor es ligeramente inferior cuando se trata del citotipo diploide y

Tabla 2.- Conservación de ápices caulinares y de segmentos nodales de *Arachis pintoi* (diploide y triploide) cultivados *in vitro* en ocho medios de cultivo durante 12 meses.

Cada valor es el promedio de 3 repeticiones con n=10. Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias significativas (p<0,05)

Medios	2n=2x=20		2n=3x=30	
	Apices	Segmentos Nodales	Apices	Segmentos Nodales
	% Plantas + Vástagos ^a	% Plantas + Vástagos	% Plantas + Vástagos	% Plantas + Vástagos
MS + 0,01 mg/L ANA	83 ^b	53 ^a	83 ^b	47 ^b
1/2MS + 0,01 mg/L ANA	70 ^b	73 ^a	83 ^b	47 ^b
1/4MS + 0,01 mg/L ANA	63 ^b	47 ^a	73 ^b	40 ^{ab}
1/8MS + 0,01 mg/L ANA	7 ^a	67 ^a	13 ^a	40 ^{ab}
MS	63 ^b	50 ^a	66 ^b	43 ^b
1/2MS	60 ^b	60 ^a	73 ^b	50 ^b
1/4MS	50 ^b	60 ^a	66 ^b	47 ^b
1/8MS	0 ^a	50 ^a	0 ^a	27 ^b

* Al cabo de 1 mes de subcultivo en MS + 0,01 mg/L de ANA, el 80% de los vástagos enraizaron.

en el mejor de los casos es del 50% para los segmentos nodales del citotipo triploide. Estos resultados permiten concluir que se puede conservar germoplasma *in vitro* de *Arachis pinto* durante por lo menos 1 año, como ápices caulinares y en menor medida como segmentos nodales, en el mismo medio y condiciones recomendadas por Rey y Mroginski (15) como óptimas para la regeneración de plantas a partir de dichos explantes, es decir MS + 0,01 mg/L de ANA y condiciones de incubación de 27 ± 2 °C. En consecuencia, no hay necesidad de reducir la temperatura de incubación ni de modificar la composición del medio de cultivo.

REFERENCIAS

1. Argel PJ, A Ramírez (eds.), Experiencias Regionales con *Arachis pinto* y planes futuros de investigación y promoción de la especie en México. CIAT, Cali, Colombia (1996) 206
2. Ashmore SE, *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy (1997) 1
3. Dunbar KB, RN Pittman, JB Morris, *J Seed Technology* 17 (1993) 1
4. Engelmann F, *Euphytica* 57 (1991) 227
5. Fernández A, A Krapovickas, *Bonplandia* 8 (1994) 187
6. Gagliardi RF, GP Pacheco, SP Coculilo, JFM Valls, E Mansur, *Biodiversity and Conservation* 9 (2000) 943
7. Jarvis A, ME Ferguson, DE Williams, L Guarino, PG Jones, HT Stalker, JFM Valls, RN Pittman, CE Simpson, P Bramel, *Crop Sci* 43 (2003) 1100
8. Kameswara Rao N, *African J of Biotechnology* 3 (2004) 136
9. Krapovickas A, W Gregory, *Bonplandia* 8 (1994) 1
10. Morris JB, S Dunn, RN Pittman, *Peanut Sci* 22 (1995) 66
11. Murashige T, F Skoog, *Physiol Plant* 15 (1962) 473
12. Negri V, N Tosti, A Standardi, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62 (2000) 159
13. Peñaloza AP, MT Pozzobon, JFM Valls, *Revista Brasileira de Genética* 19 (1996) 129
14. Pizarro EA, A Rincón, In: Kerridge PC, B Hardy (eds.). *Biology and Agronomy of forage Arachis*. CIAT, Cali, Colombia (1994) 144
15. Rey HY, LA Mroginski, *Peanut Sci* (2004) 30 (2003) 75
16. Roca WM, DI Arias, R Chávez, In: Roca WM, LA Mroginski (eds.). *Cultivo de tejidos en la Agricultura*. CIAT, Cali, Colombia (1993) 697
17. Roca WM, R Chávez, ML Martin, DI Arias, G Mafa, R Reyes, *Genome*, 31 (1989) 813
18. Scocchi AM, HY Rey, In: Echenique V, C Rubinstein, L Mroginski (eds.) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. INTA, Bs.As. (2004) 179
19. Valls JFM, CE Simpson, In: Kerridge PC, B Hardy (ed) *Biology and Agronomy of forage Arachis*, CIAT, Cali, Colombia (1994) 1
20. Withers LA, F Engelmann, *In vitro conservation of plant genetic resources*. In: Altman A (ed.). *Agricultural Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc. New York (1998) 57