

Regeneración *in vitro* de plantas de *Arachis correntina* (Leguminosae) mediante organogénesis a partir de hojas inmaduras

Vidoz, María L. - Rey, Hebe Y. - Mroginski, Luis A.

Facultad de Ciencias Agrarias, IBONE- CC 209, Sargento Cabral 2131- Corrientes (CP: 3400), Argentina, subsidiado parcialmente por el CONICET y por la SGCyT (UNNE). E-mail: mlvidoz@agr.unne.edu.ar

Antecedentes

El género *Arachis* está compuesto por 69 especies originarias de América del Sur. El maní, *Arachis hypogaea*, es económicamente la especie más importante del género. *A. correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Gregory (2n=2x=20 cromosomas) es una especie perenne que vive en el noroeste de la provincia de Corrientes, en suelos arenosos profundos (Krapovickas & Gregory, 1994) como componente de las pasturas naturales.

El considerable interés por la búsqueda, rescate, multiplicación y caracterización del germoplasma de las especies silvestres de *Arachis* reside en el hecho de que contienen genes útiles para el mejoramiento del maní cultivado (Stalker & Moss, 1987). Además, varias especies perennes poseen una gran importancia como forrajeras y son muy buscadas por la creciente demanda de programas de agricultura sustentable (Valls, 1997), debido a que pueden ser usadas como cultivos de cobertura controlando la erosión de suelos.

El desarrollo de protocolos eficientes para la regeneración de plantas es uno de los principales pre-requisitos para el uso de la biotecnología en programas de mejoramiento genético y conservación de germoplasma. El cultivo de tejidos vegetales, se ha usado ampliamente como una herramienta útil en la propagación clonal rápida de genotipos selectos de especies cultivadas.

Si bien recientemente se consiguió la regeneración *in vitro* de *A. correntina* a través de organogénesis, mediante el cultivo de porciones de hojas empleando Thidiazurón (Mroginski *et al.*, 2004), hasta el presente no existen reportes donde se informe la regeneración de plantas de esta especie por organogénesis en medios compuestos por auxinas, con o sin la adición de una citocinina.

Objetivo

Desarrollar un protocolo que permita la regeneración *in vitro* de plantas de *Arachis correntina*, para ser utilizado en programas de fitomejoramiento y conservación de germoplasma.

Materiales y métodos

Se trabajó con plantas de *Arachis correntina* (Burkart) Krapov. & W.C. Gregory. Los explantes utilizados fueron hojas no desplegadas, menores a 5 mm, provenientes de plantas establecidas *in vitro*.

Los medios de cultivo utilizados estaban compuestos por las sales minerales, vitaminas y sacarosa de acuerdo con Murashige & Skoog (1962) (MS), suplementados con diferentes concentraciones (2; 5; 10 y 15 mg/L) de ácido naftalenacético (ANA) solo o combinado con 0,01mg/L de bencilaminopurina (BAP), o con diferentes concentraciones (2; 5; 10 y 15 mg/L) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) solo o combinado con 0,01mg/L de BAP. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes del agregado de 0,7% de agar Sigma® (A-1296). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 0,101 MPa durante 20 minutos.

Los explantes fueron colocados sobre 3 cm³ de medio de cultivo en tubos de vidrio de 11 cm³ de capacidad, los cuales se obturaron con Resinite AF 50. Los cultivos fueron incubados en un cuarto climatizado a 27 ± 2°C, con un fotoperíodo de 14 horas y una intensidad lumínica de 116µm/seg/m². Cada tratamiento se aplicó a 10 explantes y los experimentos fueron repetidos tres veces.

Resultados y Discusión

Luego de 50 días del cultivo de hojas no desplegadas, se observaron varias respuestas: algunas hojas se expandieron, otras dieron origen a callos friables, otras brindaron raíces pasando o no por la etapa de callo, y otras produjeron yemas que al elongarse y enraizar en el mismo medio posibilitaron la regeneración de plantas.

Se pudo apreciar que cuando el medio de cultivo contenía 2,4-D, sólo se originaron yemas usando la concentración más baja (2 mg/L) con o sin el agregado de 0,01 mg/L de BAP (Fig. 1). Esto concuerda con lo que sucede en *Arachis pintoi*, especie para la cual se reportó la organogénesis indirecta de yemas al emplear concentraciones de hasta 10 mg/L de 2,4-D (Rey *et al.*, 2000). Sin embargo, en *A. hypogaea*, existen varios reportes

sobre la embriogénesis somática en medios de cultivo conteniendo 2,4-D (Baker y Wetsztein, 1995; Chengalrayan *et al.*, 1998; Griga, 1999; Little *et al.*, 2000; Lakshmanan y Taji, 2000).

Cuando el medio de cultivo contenía ANA, fue posible la obtención de yemas utilizando varias concentraciones de esta auxina, con o sin la adición de BAP (Fig. 1). El porcentaje más alto de formación de yemas se logró cuando el medio estaba constituido por MS + ANA 2 mg/L + BAP 0,01 mg/L, llegando hasta el 12,5 %. Estos resultados son similares a los obtenidos en varias especies del género *Arachis*, donde fue posible la organogénesis empleando combinaciones de ANA y BAP en diversas concentraciones (Bajaj *et al.*, 1981; McKently *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1992; Mansur *et al.*, 1993; Rey *et al.*, 2000).

Si bien sólo en algunos medios de cultivo fue posible la diferenciación de yemas, en todos los medios ensayados se obtuvo organogénesis directa o indirecta de raíces. Además, cabe destacar que la elongación de las yemas y el enraizamiento de los vástagos obtenidos se produjeron en el mismo medio de origen, lográndose la regeneración de plantas sin necesidad de realizar subcultivos.

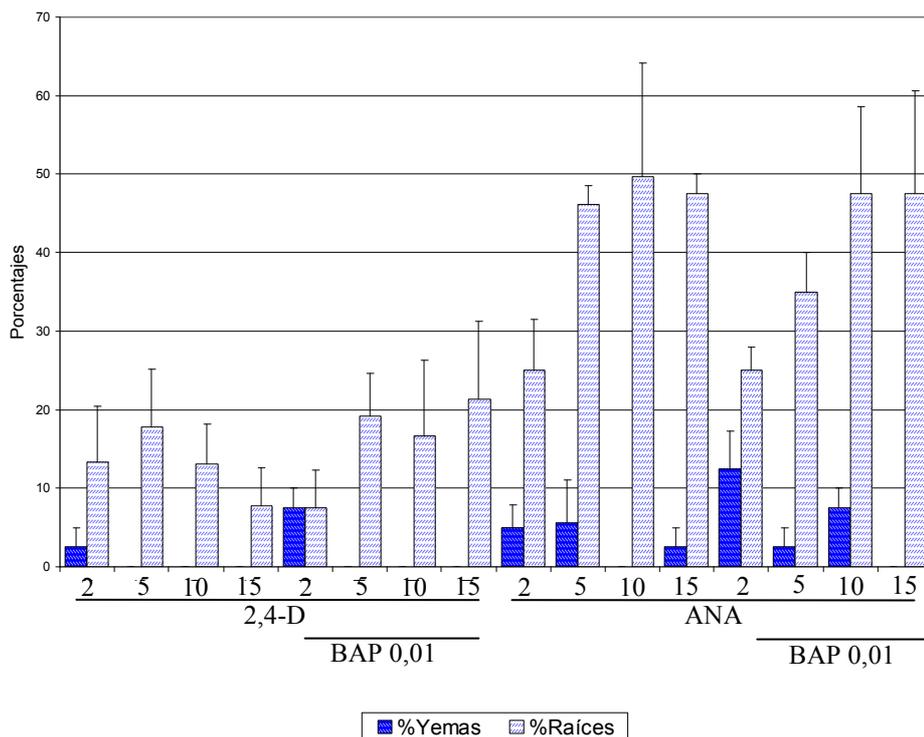


Fig. 1: Efecto de los 16 medios de cultivo empleados sobre la obtención *in vitro* de yemas y raíces a partir de hojas inmaduras de *A. correntina*, a los 50 días del cultivo (las hormonas están expresadas en mg/L).

Conclusión

Es posible regenerar plantas de *Arachis correntina* por organogénesis, para lo que se recomienda el cultivo de hojas inmaduras provenientes de plantas establecidas *in vitro* en el medio constituido por MS + ANA 2 mg/L + BAP 0,01 mg/L.

Bibliografía

- Bajaj, Y.P.S.; Ram, A.K.; Labana, K.S. & Singh, H. 1981. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. *Plant Science Letters* 23: 35-39.
- Baker, C.M. & Wetzstein, H.Y. 1995. Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-D. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 40: 149-254.
- Cheng, M.; Hsi, D.C.H. & Phillips, G.C. 1992. *In vitro* regeneration of Valencia-type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured petiolules, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Science* 19: 82-87.
- Chengalrayan, K.; Mhaske, V.B. & Hazra, S. 1998. Genotypic control of peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17: 522-525.
- Griga, M. 1999. Somatic embryogenesis in grain legumes. In: *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*, ed. by M. Strnad, P. Pec, E. Beck, Peres Publ., Prague: 223-250.
- Krapovickas, A. & Gregory, W. C. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (*Leguminosae*). *Bonplandia* 8: 1-186.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2004

- Lakshmanan, P. & Taji, A. 2000. Somatic embryogenesis in Leguminous plants. *Plant Biol.* 2: 136-148.
- Little, E.L.; Magbanua, Z.V. & Parrot, W.A. 2000. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. *Plant Cell Rep.* 19: 351-357.
- Mansur, E.; Lacorte, C; Rabello, A.C.G. & Cordeiro, A.R. 1993. *In vitro* regeneration of *Arachis villosulicarpa* Hoehne from cotyledon segments, leaves and cell suspension. *Pesq. Agropec. Bras.* 28 (10): 1143-1146.
- McKently, A.H., Moore, G.A. & Gardner, F.P. 1991. Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue. *Crop Sci.* 31: 833-837.
- Mroginski, E.; Rey, H.Y.; Gonzalez, A.M. & Mroginski, L.A. 2004. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (*Leguminosae*) via organogenesis. *Plant Growth Regulation*. En prensa.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473- 497.
- Rey, H.Y.; Scocchi, A.M.; Gonzalez, A.M. & Mroginski, L.A. 2000. Plant regeneration in *Arachis pintoii* (*Leguminosae*) through leaf culture. *Plant Cell Rep.* 19: 856-862.
- Stalker, H.T. & Moss J.P. 1987. Speciation, cytogenetics, and utilization of *Arachis* species. *Advances in Agronomy*, 41: 1-40.
- Valls, J.F.M. 1997. O género *Arachis* L (*Leguminosae*): importante fonte de proteínas na pré-história sul-Americana?. *Arqueologia em Conexão* No. 4. <http://www.arqueologia.arq.br/txvalls.htm>