

REGENERACIÓN IN VITRO DE MANÍ VARIEDAD GRANOLEICO, PRONTO Y TEGUA. UNA ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA OBTENER GENOTIPOS SUPERIORES

Faustinelli, P. C.^{1,2}; Soave, S. J.², Soave, J. H.², Buteler, M. I.²
1-Laboratorio de Biotecnología Universidad Católica de Córdoba ; 2- Criadero El Carmen
pfaustinelli@criaderoelcarmen.com.ar

Introducción

Maní (*Arachis hypogaea* L.) es una de las leguminosas más importantes en el mundo y su valor alimenticio radica, principalmente, en el elevado contenido de aceite y proteínas que aporta. La industria manisera argentina constituye una actividad importante para una economía regional cordobesa, dedicada casi exclusivamente a la exportación. La excelencia de sus productos han permitido a la Argentina haber alcanzado en 2010 el primer lugar como exportador mundial de maní.

El desarrollo y la productividad normales en el cultivo de maní se ven afectados frecuentemente por condiciones ambientales desfavorables. El estrés por deficiencia hídrica es la principal causa mundial de pérdida en la mayoría de los cultivos, pudiendo disminuir los rendimientos en más de un 50%. Así mismo, el estrés causado por patógenos es otra causa importante de la disminución de la producción, además de fuente de mayores costos por los productos terapéuticos que deben emplearse. En nuestra área manisera, los hongos patógenos del suelo y las enfermedades foliares son las amenazas más relevantes.

La biotecnología es una estrategia alternativa que permite obtener plantas resistentes/tolerantes a factores bióticos y/o abióticos, con la introducción de genes que estén directamente involucrados con estos eventos y que ya han sido estudiados en otras especies u organismos. Para esto se necesita poner a punto, protocolos de regeneración de plantas a partir de células individuales originadas por distintas técnicas, que si bien son de aplicación universal varían de un cultivar a otro, siendo necesario en todos los casos ajustar las condiciones para cada uno de los genotipos que se pretenden utilizar.

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas para inducir organogénesis, es decir, el desarrollo de yemas o brotes a partir de explantes obtenidos de gémulas de maní, en las variedades Granoleico, Pronto y Tegua.

Materiales y Métodos

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

Como explantes se utilizaron gémulas inmaduras de 2-5 mm de largo, extraídas asépticamente de semillas maduras de maní. Se cultivaron en medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con 8 combinaciones de Ácido α -naftalenacético (ANA) (0.1 y 1 mg l⁻¹) y 6-Bencilaminopurina (BA) (1, 3, 5 y 10 mg l⁻¹), durante la etapa de Establecimiento.

Para la etapa de Elongación, se utilizó como material inicial toda yema de más de 1 cm de altura, obtenidos de la etapa anterior. Estas yemas se transfirieron a un tubo de vidrio conteniendo medio de cultivo MS, con dos concentraciones de ANA, consideradas como "baja" a la de 0.01 mg l⁻¹ y como "alta" a la de 1 mg l⁻¹, cada una de las cuales constituyó un tratamiento.

En Enraizamiento, los brotes elongados de la etapa anterior fueron transferidos a tubos conteniendo medio de cultivo MS sin el agregado de hormonas y con 1 mg l⁻¹ de ANA.

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

Las plántulas enraizadas fueron repicadas en macetas rellenas con una mezcla de turba, vermiculita y perlita en una relación volumétrica 1:2:1. Inmediatamente después del trasplante, las plantas se cubrieron con frascos o vasitos descartables invertidos durante 1 semana, para favorecer un ambiente con elevada humedad relativa. Después de ese tiempo, esos frascos o vasitos fueron retirados paulatinamente por tiempos crecientes para permitir una disminución gradual de la humedad ambiente y para favorecer una mejor adaptación a las condiciones de invernadero.

Resultados

La regeneración de brotes ocurre en todas las combinaciones pero el máximo número de yemas por explante fue obtenido en la concentración de 1 mg l⁻¹ de ANA combinada con 1 y 3 mg l⁻¹ de BA, independiente de la variedad utilizada, aunque la eficiencia de regeneración de Tegua se destaca por sobre la de Granoleico y Pronto (Fig. 1 A).

En la etapa de Elongación, no se encontraron diferencias significativas entre las dos concentraciones de auxina evaluadas (0.01 y 1 mg l⁻¹). Se pudo observar que una dosis baja de ANA es suficiente para estimular que más del 50% de los brotes se alarguen, mientras que con 1 mg l⁻¹ resultó ser mayor al 80%, en las tres variedades de maní tratadas (Fig. 1 B).

La presencia de una auxina en el medio de Enraizamiento produjo un estímulo significativamente diferente si se lo compara con el medio basal sin hormonas. Los medios que contenían 1 mg l⁻¹ de ANA estimuló, con una eficiencia del 80%, el desarrollo de un sistema radicular "normal", es decir, raíces principales finas y largas al estilo cabellos, con un buen porcentaje de raíces secundarias y pelos absorbentes (Fig. 1 C).

Las plantas cuyo sistema radicular correspondía al del tipo "normal", pudieron exitosamente sobrevivir al transplante, sin observarse en su desarrollo ningún tipo de variación fenotípica (Fig. 1 D).



Figura 1: Proceso de regeneración *in vitro* vía organogénesis somática:

- A. Yemas inducidas a partir de explantes de hojas inmaduras.
- B. Brotes elongados en tubos de cultivo.
- C. Sistema radicular inducido en los brotes, del tipo "normal".
- D. Transplante a suelo y rusticación de brotes enraizados.

Conclusiones

Si bien el proceso de generación de nuevas variedades a través de los métodos convencionales ha sido muy útil y ha dado lugar a la generación de nuevas variedades que se cultivan hoy en día, las promesas de la biotecnología agrícola residen en aumentar la productividad y reducir costos, generar innovaciones y mejoras en los alimentos, y otorgar mayor resistencia a estrés del tipo biótico y abiótico.

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