

9. ORTMAN, E.E.; PETERS, D.C. 1980 Introduction. In Breeding plants resistant to insects Ed. by F.G., Maxwell, P.R. Jennings. New York John Wiley p. 3-13
10. OSWALD, J.W.; HOUSTON, B.R. 1953 Host range and epiphytiology of the cereal yellow dwarf virus Phytopathology 43:309-313
11. PAINTER, R.H. 1951. Insect resistance in crop plants. Kansas, EE UU The University Press of Kansas. 520 p.
12. PIKE, K.S. 1978. Greenbug protection in seed-treated winter wheat. Journal of Economic Entomology 71:827-832
13. PIKE, K.S.; GLAZER, M. 1980 Compatibility of insecticide-fungicide wheat seed treatments with respect to germination, seedling emergence, and greenbug control. Journal of Economic Entomology 73:759-761.
14. RULES FOR testing seeds 1978. Association of Official Seed Analysis. Ed. by L.O. Copeland
15. RUPPEL, F.R. 1971 Effect of seed treatment with carbofuran and propoxur on germination of small grains. Journal of Economic Entomology 64:1 554-1556.
16. SMITH, H.C. 1967 The effects of aphid numbers and stage of plant growth in determining tolerance to barley yellow dwarf virus in cereals. New Zealand Journal of Agricultural Research 10:445-466
17. STERN, V.M. 1967 Control of the aphids attacking barley and analysis of yield increases in the Imperial Valley, California. Journal of Economic Entomology 60:485-490.
18. VAZQUEZ, G.M.; CARRILLO S, J.L. 1972. Efecto de diversos insecticidas sobre la fauna benéfica presente en el trigo en el Valle de Mexicali durante 1970-71. Agricultura Técnica en México 3: 145-149
19. WARD, C.R.; OWENS, J.C.; HUDDLESTON, E.W.; ASHDOWN, D.; BAILEY, C.F. 1972. Phytotoxic and residual properties of disulfoton used on wheat. Journal of Economic Entomology 65:561-563

Conservación de la Capacidad Caulogénica de Callos de *Arachis major* (Leguminosae) durante Prolongados Subcultivos¹

E.A. Prado*, A.N. Secchi*, L.A. Mroginski**

ABSTRACT

Anthers with uninucleated pollen grains of *Arachis major* Krap. and Greg. have been cultured on Murashige and Skoog medium (MS) containing different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) and benzyladenine (BAP). The best medium for callus induction was MS + NAA₁ (~β) X BAP 3 mg/l. The calluses that have been maintained – without cultures – for 7 or 9 months in the dark grew slowly, but did not develop shoots. This occurred when the calluses were exposed to light. The caulogenetic capacity was maintained during 15 transferences (24 months of incubation) in MS + NAA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l medium. The regenerated shoots transferred to a MS + NAA 1 mg/l kinetin 0.04 mg/l medium developed roots.

COMPENDIO

Anteras de *Arachis major* Krap. y Greg. conteniendo granos de polen uninucleados fueron cultivadas en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con diversas combinaciones entre ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilamino purina (BAP). El mejor medio para la inducción de callos fue MS + ANA 1 mg/l + BAP 3 mg/l. Los callos que fueron mantenidos – sin ser subcultivados – durante 1, 7 ó 9 meses en oscuridad crecieron lentamente pero no diferenciaron vástagos, lo cual ocurre cuando son expuestos a la luz. Sucesivos subcultivos de callos en MS + ANA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l posibilitan el mantenimiento de la capacidad caulogénica aún después de 15 transferencias (24 meses de incubación). Los vástagos obtenidos fueron enraizados mediante su cultivo en MS + ANA 1 mg/l + cinetina 0.04 mg/l

INTRODUCCION

La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* de protoplastos, células y tejidos, en el fitomejoramiento, requiere la utilización de sistemas que posibiliten la regeneración de plantas enteras. En las leguminosas, estos sistemas han sido desarrollados para

¹ Recibido para publicación el 27 de junio de 1987

* Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias (UNR) Santa Fe 2051, Rosario (2000), Argentina.

** Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), Instituto de Botánica del Nordeste, C.C. 209, Corrientes (3400), Argentina.

relativamente pocas especies (9). En el género *Arachis*, varios trabajos informan sobre la obtención de plantas *in vitro* de mani, *A. hypogaea* (1, 3, 8, 13, 16, 17), como de algunas especies silvestres de *Arachis* (1, 7, 13, 14, 17). Sin embargo, en la mayoría de estos casos, o bien se utilizaron explantos conteniendo estructuras meristemáticas preexistentes (ápices caulinares, embriones) o bien, la regeneración de plantas tuvo lugar en callos primarios cuya capacidad caulogénica decayó marcadamente luego de algunos subcultivos.

En este trabajo se informa acerca de un procedimiento que permite el mantenimiento de la capacidad regeneradora de vástagos a partir de callos de *Arachis major*. Existe la necesidad de la exposición a luz de los callos con el objeto de lograr la diferenciación de vástagos

MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con *Arachis major* Krap et Greg. Brasil, MS, 40 km S de Aquidauana (leg. Hammons *et al.* 559, $2n = 20$, que pertenece a la sección *Tetraecetoides* (4). Las plantas se mantienen cultivadas en terrenos de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE (Corrientes, Argentina); material herborizado de las mismas plantas está depositado en el herbario CTES. Las experiencias fueron iniciadas durante el verano de los años 1982 y 1983

Se seleccionaron botones florales cuyas anteras contenían granos de polen uninucleados. Para su determinación se empleó la técnica descrita por Mroginski y Fernández (6). Los botones florales fueron desinfectados con etanol 70° durante un minuto, seguido de NaOCl al 20% de la solución comercial con 80 g de cloro activo por dm^3 (10 min) y luego enjuagados tres veces con agua bidestilada esté-

Cuadro 1. Efecto del ANA y BAP en la inducción de callos de anteras de *Arachis major* cultivadas *in vitro* durante 45 días. En todos los casos, se utilizó como medio M.S.

Reguladores de crecimiento (mg/l)		Número de anteras cultivadas	Número de anteras con callo	% de anteras que forman callos
ANA	BAP			
0.01	3	220	14	6.3*
0.1	3	220	22	10.0
1	3	184	35	19.0
3	3	208	37	17.7
2	0.5	208	35	16.8

* Las diferencias son significativas. $X^2 = 10.16$; $p < 0.05$

ril. Las anteras fueron cultivadas en tubos de ensayo (15 x 1.5 cm) de vidrio, conteniendo 5 ml de medio de cultivo y 4 anteras por tubo. Los tubos fueron obturados con papel de aluminio e incubados en oscuridad a $25 \pm 1^\circ C$ durante 1, 7 ó 9 meses, según experiencia.

Los medios de cultivo consistían de las sales minerales, vitaminas y sacarosa, de acuerdo con Murashige y Skoog (10), agar al 1% (todos estos componentes son denominados en adelante MS) y diferentes combinaciones entre ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencil amino purina (BAP) que se consignan en el capítulo de resultados. El pH de los medios fue ajustado, antes del agregado del agar, a 5, 8 con HCl y/o con NaOH. Los tubos, conteniendo los medios, fueron esterilizados en autoclave durante 20 min. a 1 atm. Para la inducción de callos a partir de las anteras se cultivaron un mínimo de 60 tubos de cada uno de los medios.

Con el objeto de estudiar el efecto de la incubación en oscuridad sobre la capacidad caulogénica, 10 callos originados en MS + ANA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l y 10 callos originados en MS + ANA 3 mg/l + BAP 3 mg/l fueron cultivados, sin ningún subcultivo a medios frescos, durante uno, siete o nueve meses, en condiciones de oscuridad y a $25 \pm 1^\circ C$. Al cabo de dichos periodos, los callos fueron transferidos a frascos de vidrio conteniendo 20 ml de medio e incubados a $27 \pm 1^\circ C$, con un fotoperíodo de 16 h (aproximadamente, 50 ueinst/ m^2 s suministrados por dos lámparas fluorescentes Gro-lux y una lámpara fluorescente "blanco niveo"). En todos los casos, aproximadamente la mitad de los callos fueron transferidos a medio fresco mientras que la otra mitad, contenida en los tubos originales, también fue sometida a las mismas condiciones de iluminación.

En otro experimento, 10 callos fueron cultivados en cinco medios diferentes (Cuadro 2) en oscuridad, a $25 \pm 1^\circ C$, durante nueve meses. Al cabo de este periodo, del total de los callos la mitad se mantuvo en los medios originales (a) y la otra mitad se transfirió a medio fresco (b). La mitad de estos callos transferidos se mantuvo sin nuevos subcultivos (c) y la otra mitad se volvió a transferir a los 30 días (d). Este procedimiento se repitió hasta la 15a transferencia. (Fig. 1). En todos los casos, los callos fueron incubados a $27 \pm 1^\circ C$ con un fotoperíodo de 16 h.

RESULTADOS

Después de 15 días de incubación, aparecieron, en algunas de las anteras cultivadas, pequeñas masas callosas, de consistencia friable y de color blanco amarillento que, luego de aproximadamente tres meses de

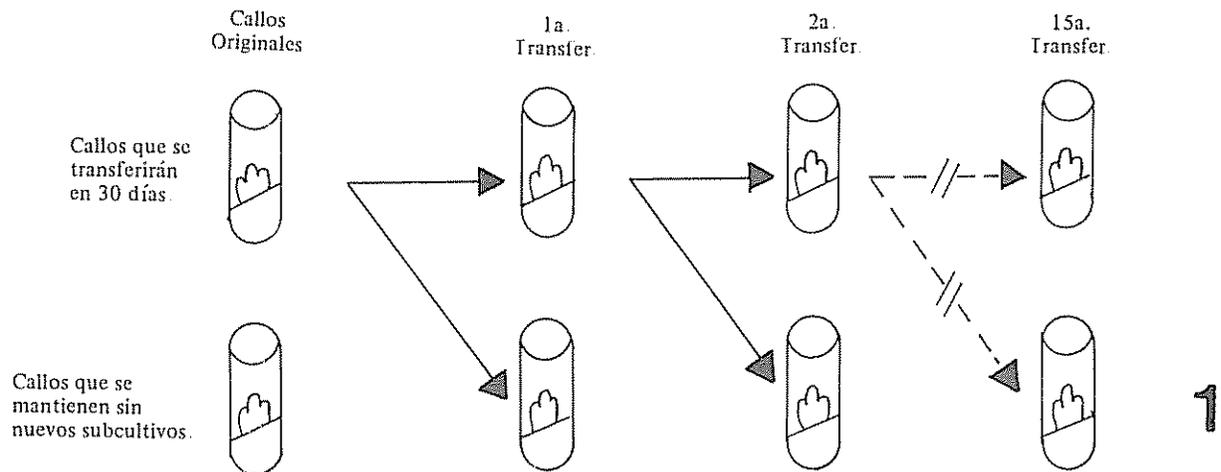


Fig. 1. Esquema de transferencias llevadas a cabo en el experimento para probar el mantenimiento de la capacidad de regeneración de los callos subcultivados

cultivo, alcanzaban a cubrir enteramente la superficie. En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos a los 45 días de incubación de las anteras en cinco medios de cultivo, resultantes de la combinación entre diferentes concentraciones de ANA y BAP. Si bien hubo inducción de callos en todos los medios ensayados, el mayor porcentaje fue obtenido en MS + ANA 1 mg/l + BAP 3 mg/l. No obstante, es de destacar que en este medio sólo el 19% de las anteras incubadas formaron callos.

Los callos iniciados en MS + ANA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l o en MS + ANA 3 mg/l + BAP 3 mg/l, mantenidos en oscuridad durante uno, siete o nueve meses, no mostraron, en general, ningún signo de diferenciación de vástagos. Sin embargo, independientemente del lapso en que crecieron en oscuridad, aproximadamente a los 15 días de que los callos fueran transferidos a la luz (en los dos casos, la mitad subcultivada a medio fresco o la mitad que permanecía en el medio original), presentaron áreas pigmentadas de verde. En estas áreas, a partir de los 60 días de incubación, se diferenciaron primordios foliares y vástagos (Fig. 2). Este proceso de diferenciación se adelantó 10 días en los callos subcultivados a medios frescos en relación con los callos que permanecían en el medio original.

En otro experimento, se comprobó el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la capacidad caulogénica de los callos que crecieron durante nueve meses en oscuridad y luego fueron sucesivamente subcultivados 15 veces. Los resultados (Cuadro 2) muestran que el mantenimiento de la capacidad caulogénica de los callos está estrechamente relacionada con las concentraciones de reguladores de crecimiento empleadas. Al aumentar la concentración de ANA

con respecto a BAP, se obtuvieron vástagos durante un mayor número de transferencias. En los medios con ANA 0.01 y 0.1 ó 1 mg/l en combinación con BAP 3 mg/l, se obtuvieron vástagos únicamente hasta la tercera o cuarta transferencia. Luego, los callos subcultivados solamente crecieron —triplicando su volumen en el término de un mes— pero no regeneraron vástagos (Fig. 3). Estos callos fueron friables y las áreas verdes desaparecieron progresivamente. En cambio, los callos subcultivados en MS + ANA 3 mg/l + BAP 3 mg/l mantuvieron la capacidad de regenerar vástagos hasta la sexta transferencia, mientras que los subcultivados en la relación de ANA: BAP más alta (MS + ANA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l) posibilitaron la regeneración de vástagos aún luego de 15 transferencias, lo cual, sumado al período inicial de incubación en oscuridad, significa 24 meses a partir del establecimiento de los cultivos

En muy pocas ocasiones los callos diferenciaron simultáneamente vástagos y raíces. Cuando ello ocu-



Fig. 2. Primordios foliares (izq.) y caulinares (der.) regenerados en medio MS + ANA 2 mg/l + BAP 0.5 mg/l en la 7a. transferencia (X 9.5)

Cuadro 2. Vástagos* obtenidos en los sucesivos repiques mensuales.

Reguladores en mg/l		Transferencias mensuales														
ANA	BAP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0.01	3	3		2												
0.1	3		5	14	7											
1	3			5												
3	3			15	25	2	4									
2	0.5	15	2	15	27	11	13	1	1		7	17	3	21	12	15

* Únicamente fueron considerados los vástagos de más de 0.5 cm de longitud.

rió, se originaron en lugares diferentes (Fig. 4). Por este motivo y con el objeto de obtener plantas, los vástagos de más de 5 mm de longitud fueron transferidos a medios diferentes. De un total de seis medios ensayados, únicamente se consiguió el enraizamiento de los vástagos en MS + ANA 1 mg/l + cinetina 0.04 mg/l. En este medio, el 11.6% de los vástagos formó raíces a partir de los 30 días de incubación (Fig. 5).

DISCUSION

La obtención de plantas, a partir de callos de anteras de *Arachis major*, comprende tres etapas: 1) inducción de callos; 2) regeneración de vástagos a partir de callos y 3) enraizamiento de los vástagos. En la primera etapa, si bien se puede conseguir con el empleo de varias combinaciones entre ANA y BAP, el porcentaje de anteras que forman callos es relativamente bajo y en el mejor de los casos (MS + ANA 1 mg/l + BAP 3 mg/l), alcanzó al 19%. Estos resultados concuerdan con lo informado para esta especie por Mroginski y Fernández (7) y son similares a los obtenidos con anteras de *A. hypogaea* y *A. villosa*

(1), mediante el uso de otros reguladores de crecimiento

Un aspecto interesante en lo que respecta a la regeneración de vástagos, a partir de callos, es el requerimiento de su exposición a luz. Los callos en oscuridad crecen lentamente pero la diferenciación de vástagos, independientemente de la composición de los medios ensayados, es prácticamente nula, inclusive luego de nueve meses de incubación. La caulogénesis únicamente se hace evidente cuando los callos, mantenidos en el medio original o subcultivados a medio fresco,

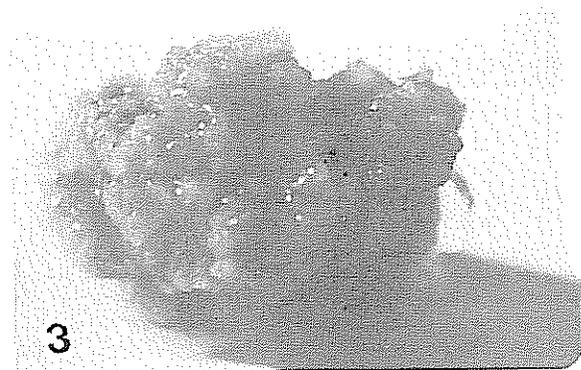


Fig. 3. Callo que ha perdido la capacidad regenerativa en medio MS + ANA 3 mg/l + BAP 3 mg/l en la 10a transferencia



Fig. 4. Callo con raíces y áreas verdes en medio MS + ANA 3 mg/l + BAP 3 mg/l en la 2a transferencia (X 8.5)

son expuestos a la luz. Respuestas similares han sido observadas en el cultivo de hojas inmaduras de *A. hypogaea* (información personal de Mroginski, I.Bo. NE., Corrientes, 1983) y de *Pisum sativum* (15), como en especies de *Stylosanthes*, género que está estrechamente relacionado con *Arachis*. Callos de *S. hamata* (18) y de *S. guyanensis* (5), si bien proliferaron mejor en oscuridad, sólo regeneraron vástagos al ser expuestos a la luz. Aunque la información existente acerca del papel de la luz en la organogénesis es aún incompleta, es probable que promueva caulogénesis por sus efectos sobre los fenómenos morfogénicos y no a través de la fotosíntesis (2, 11, 19).

La caulogénesis, si bien se produce en las mismas condiciones químicas que la iniciación de callos, es más profusa al aumentar la concentración de ANA y más aún si se reduce el nivel de BAP. Asimismo, los callos incubados en estas condiciones conservan la capacidad caulogénica durante un mayor número de transferencias (15 transferencias).

El mantenimiento de la capacidad de regeneración de vástagos dependería de las concentraciones relativas de la auxina y la citocinina y no de sus cantidades absolutas. Probablemente, un nivel de citocinina que supere determinada relación con la concentración de auxina de callos resulte inhibitoria para la diferenciación y/o ulterior crecimiento de vástagos. Esta relación se alcanzaría más rápidamente cuando el aporte exógeno de auxinas sea bajo, en relación con el de citocininas (medios conteniendo ANA a razón de 0.01 y 0.1 mg/l, en combinación con 3 mg/l de BAP, pero se demora a medida que aumenta la concentración de ANA (medios conteniendo 1 y 3 mg/l de ANA, en combinación con 3 mg/l de BAP) y quizás no se produzca cuando el contenido de ANA del medio supere al de BAP (medio con ANA 2 mg/l y BAP 0.5 mg/l).

El enraizamiento, si bien en baja frecuencia, de los vástagos regenerados *in vitro* fue logrado mediante su cultivo en MS + ANA 1 mg/l + cinetina 0.04 mg/l. Este resultado concuerda con lo informado por Narasimhulu y Reddy (12) con vástagos obtenidos a partir de secciones de plántulas de *A. hypogaea*.



Fig. 5. Raíz regenerada a partir de un vástago cultivado en medio MS + ANA 1 mg/l + cinetina 0.04 mg/l (X 8.5).

LITERATURA CITADA

1. BAJAJ, U.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 Sci Lett* 23:35-39.
2. HUGHES, K.W. 1981. *In vitro* ecology: Factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Env. and Exptl Bot.* 21:281-288.
3. KARTHA, K.K.; PAHL, K.; LEUNG, N.L.; MROGINSKI, L.A. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. *Canadian Journal of Botany* 59:1671-1679.
4. KRAPOVICKAS, A. 1973. Evolution of the genus *Arachis*. In *Agricultural genetics* Ed by Rom Moav Jerusalem 135-151.
5. MEIJER, E.G.M.; BROUGHTON, W.J. 1981. Regeneration of whole plants from hypocotyl-root, and leaf derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. *Physiol. Plant* 52:280-284.
6. MROGINSKI, L.A.; FERNANDEZ, A. 1979. Cultivo "in vitro" de anteras de especies de *Arachis* (*Leguminosae*). *Oleagineux* 34:243-248.

7. MROGINSKI, L.A.; FERNANDEZ, A. 1980. Obtención de plántulas por cultivo "in vitro" de anteras de especies silvestres de *Arachis* (*Leguminosae*). *Oleagineux* 35:89-92.
8. MROGINSKI, L.A.; KARIHA, K.K.; SHYLUK, J.P. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by "in vitro" culture of immature leaves. *Can J. Bot* 59:826-830.
9. MROGINSKI, L.A.; KARIHA, K.K. 1984. Tissue culture of legumes for crop improvement. *Plant Breeding Reviews* 2:215-264.
10. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15:473-497.
11. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann Rev. Plant. Physiol* 25:135-166.
12. NARASIMHULU, S.B.; REDDY, G.M. 1983. Plantlet regeneration from different callus cultures of *Arachis hypogaea* L. *Plant Science Letters* 31:157-163.
13. PITTMAN, R.N.; BANKS, D.S.; KIRBI, J.S.; MITCHELL, E.D.; RICHARDSON, P.E. 1983. *In vitro* Culture of immature peanut (*Arachis* spp) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration. *Peanut Science* 10:21-25.
14. PITTMAN, R.N.; JONHSON, B.B.; BANKS, D.J. 1984. *In vitro* differentiation of a wild peanut, *Arachis villosulicarpa* Hoehne. *Peanut Science* 11:24-27.
15. RUBLUO, A.; MROGINSKI, L.A.; KARIHA, K.K. 1982. Morphogenetic responses of pea leaflets cultured *in vitro*. *Proceedings. In Intl Cong Plant Tissue and Cell Culture* p. 151-152.
16. RUSSO, S.L.; VARNELL, R.J. 1978. *In vitro* responses of peanut tips to 2,4 D and Kirretin. *Proc. Soil and Crop Sci. Florida* 37:34-36.
17. SASIRI, D.C.; NALINI, M.S.; MOSS, J.P. 1981. Tissue culture and prospects for improvement of *Arachis hypogaea* and other oil seed crops. *In Proc. Costed Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants* p. 42-57.
18. SCOWCROFT, W.R.; ADAMSON, J.A. 1976. Organogénesis from callus culture of legume *Solanum hamato*. *Plant Sci Lett* 7:39-42.
19. SEIBERT, M.; KADKATE, P.G. 1980. *In vitro* Plant tissue culture as a source of biochemicals p. 123-141.