

BONPLANDIA

Tomo II

Enero de 1967

Nº 7

CRECIMIENTO IN-VITRO DE RAICES DE MANIHOT ESCULENTA EN DISTINTAS CONDICIONES DE ILUMINACION Y TEMPERATURA (*)

por J. D. Portuguese Arias e Isidoro Mogilner (1)

Se ha observado en muchas especies de plantas, lo mismo que en tejidos cultivados **in-vitro**, que la luz y la temperatura producen una inhibición o estimulación del desarrollo y/o crecimiento de éstos.

Scott, Carter y Street (10) encontraron un rango lumínico dentro del cual se producía una estimulación del crecimiento de raíces de trigo, que se reduce al variar este rango, como así también al hacer intervenir períodos de oscuridad. indican además que la inhibición de la luz decrece a los 7 días. Robbins y Maneval (1924) y Roberts (1954), citados por Scott, Carter y Street (10), observaron que la luz difusa prolongó la duración del crecimiento de raíces de maíz y **Lycopersicum pimpinellifolium**. Derbyshire y Street (3) observaron, en raíces de trigo, que tenían un crecimiento longitudinal mayor las que estaban en luz continua (300 luxes), que las que permanecían en oscuridad.

Gautheret (4, pág. 668-670), cita que tejidos de zanahoria, vid virgen y agallas de girasol, mostraban una temperatura óptima de crecimiento de 23° a 26° C para los tejidos que se hallaban en oscuridad y de 31° a 33° C para tejidos que se hallaban en luz continua, produciéndose una inhibición fuera de estos rangos. Cita además una observación realizada por Rier y Henderson, que en tejidos cultivados en estas condiciones se produjo una modificación permanente de sus propiedades fisiológicas y que éstos atribuyen a la acción de un fac-

(*) Trabajo realizado durante el año 1965 en el Instituto de Botánica Aplicada de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes con fondos provenientes de CAFPTA para el Plan Nº 608 y del CNICT.

(1) Ing. Agr. Ayudante de Investigación e Ing. Agr. Profesor Titular de Fisiología Vegetal, respectivamente.

tor intracelular. Ketellaper (5), en plantas de **Pisum sativum** var. Unica sometidas a distintas temperaturas (altas y bajas), encontró que se produce un cambio fisiológico en el material estudiado y en el de sus descendientes.

De acuerdo a estos antecedentes, se quiso observar los efectos de la luz y la temperatura en el crecimiento de raíces de **Manihot esculenta** (Crantz), obtenidas de estacas y de ápices caulinares, cuando eran cultivadas **in-vitro** y sometidas a distintas variaciones de los siguientes factores: luz continua, día natural, oscuridad y temperatura alta (29° C más o menos 5° C) y baja (17° C más o menos 2° C).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron tallos provenientes de plantas de **Manihot esculenta** cultivadas en el Instituto de Botánica Aplicada y extraídas en junio de 1964, eligiéndose las de mejor conformación y buen estado sanitario. Del tallo se utilizó sólo la parte media y basal, desechándose la parte apical.

1) Esterilización de las estacas: Los tallos elegidos se lavaron con agua corriente, se limpiaron con algodón embebido en alcohol y se seccionaron en trozos de 8-10 cm de largo que se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio al 5% durante 15-20 minutos. Luego se retiraron por medio de una aguja de 25 cm. de largo y se lavaron con agua estéril durante 20 minutos.

2) Esterilización de los ápices caulinares: Los tallos elegidos fueron seccionados en pequeños trozos de 20-30 cm de longitud, que se colocaron en bandejas de aluminio recubiertas con polietileno en las que corría agua por gravedad; a los doce días empezaron a brotar, creciendo así los ápices caulinares que eran extraídos y colocados en agua destilada. Con la mayor asepsia posible se homogeneizaban a una longitud de 1,5 cm y eran colocados en una caja de Petri conteniendo solución de hipoclorito de calcio al 1,5% durante un lapso de doce minutos, luego se lavaron dos veces con agua estéril también en cajas de Petri. El tiempo de duración de cada lavado fue de 15 minutos.

3) Medios de cultivo empleados para la obtención de raíces:

Los medios empleados fueron el de White modificado por Skoog y Tsui, y el de Torrey dado por Gautheret (4).

4) Tratamientos de iluminación y temperatura: Los tratamientos de iluminación y temperatura que recibieron las raíces de mandioca cul-

tivadas **in vitro**, se observan en la Tabla N° 1. Cada tratamiento tenía 10 repeticiones.

TABLA N° 1

Variantes Iluminación	Temperatura		Subvariante N°
	Día	Noche	
Luz continua (24 hs.)	Alta	Alta	I
	Alta	Baja	II
Día natural (luz 11 hs.) (osc. 13 hs.)	Alta	Alta	III
	Alta	Baja	IV
Oscuridad (24 hs.)	Alta	Alta	V
	Alta	Baja	VI

Durante el día (de 8 a 19 hs.), las raíces recibían luz solar con una iluminación, a la altura de los matraces, de 45.000 luxes y durante la noche (de 19 a 8 hs.), las variantes a luz continua recibían, a temperatura baja, luz proveniente de un fluorescente (luz de día) de 40 w. y una lámpara de filamento de 25 w. que daban 450 luxes; y a temperatura alta (en estufa), de un fluorescente (luz de día) de 15 w. y una lámpara de filamento con 293 luxes.

Las temperaturas altas eran dadas por el sol (29° C más o menos 5° C) y/o en estufas a 28° C, y las temperaturas bajas nocturnas, en cuartos o invernáculo (17° C más o menos 2° C).

RESULTADOS:

1) Obtención de raíces a partir de estacas: Las estacas de 8 a 10 cm de largo después de esterilizarse, se colocaron en tubos dispuestos en posición vertical y pendientes de una aguja, quedando entre 1 a 2 cm sumergidos en agua estéril, luego eran llevadas a estufa regulada a 28° C.

La emisión de raíces se realizó en forma favorable; posteriormente se infectaron, quizás porque en los nudos no se realizó una esterilización total, quedando algunos microorganismos que producían la contaminación; en consecuencia, se optó por desechar ese método.

2) Obtención de raíces de ápices caulinares: Los ápices esterilizados se colocaron con la mayor asepsia posible en matraces que contenían medio de White o de Torrey (sólidos) y pasaron a crecer bajo luz artificial de 5.400 luxes a la altura de los matraces durante 12 horas diarias, a una temperatura 27° C más o menos 2° C. La emisión de raíces se inició a los ocho días.

A los 26 días se observó una diferencia en el crecimiento de los ápices de ambos medios que consistía en: la parte aérea de los ápices de *Manihot esculenta*, que se encontraban en el medio de White habían adquirido un mayor desarrollo, en cambio la parte radicular emitió pocas raíces (promedio de 4), excepto algunas que llegaron a dar de 8 a 10 raíces por ápice, mientras que los ápices que se hallaban en el medio de Torrey la parte aérea se había desarrollado poco y la parte radicular había emitido muchas raíces (promedio de 8), con algunas que alcanzaron hasta 12 a 14 raíces por ápice.

3) Efectos de la luz y la temperatura en el crecimiento y peso fresco: Las raíces de los ápices que habían crecido en el medio de Torrey se extrajeron de los matraces con la mayor asepsia posible; se pasaron a una caja de Petri en la que se seccionó la parte apical y subapical, cada sección oscilaba entre 4-6 mm. de longitud, luego eran introducidas en matraces de 125 cc. de medio de Torrey (semisólido). * Cada 20 días se hicieron repiques. Después de ocho semanas se midió el crecimiento y el peso fresco de las raíces, los resultados pueden verse en los Cuadros N° 1 y N° 2.

Se ve para la variante 1 (luz continua) que el crecimiento longitudinal en mm. es superior a temperatura nocturna alta (Subv. N° I), mientras que con temperatura nocturna baja el crecimiento es muy pequeño (Subv. N° II). En la variante 2 (día natural) se obtuvo resultados semejantes al anterior (Subv. Nos. III y IV). Para la variante 3 (oscuridad), los resultados obtenidos muestran que temperaturas nocturnas bajas estimulan el crecimiento, aunque para uno u otro régimen de temperatura el crecimiento en completa oscuridad fue pequeño.

Cuadro N° 1. — Efecto de la luz y la temperatura en el crecimiento de ápices radiculares de *Manihot esculenta* (Crantz). Promedio de 10 repeticiones. Crecimiento en mm.

Temperatura	Variantes		
	Luz continua (LC)	Día natural (DN)	Oscuridad (0)
AA-	87,25 (I)	74,83 (III)	11,56 (V)
AB	10,89 (II)	8,40 (IV)	24,19 (VI)

(*) Dada por Gautheret (4, pág. 127), se utilizó 5 g. de agar.

Cuadro N° 2. — Efecto de la luz y la temperatura en el peso fresco.
Datos expresados en mg.

Temperatura	Variantes		
	Luz continua (LC)	Día natural (DN)	Oscuridad (O)
AA	30,59	27,92	5,37
AB	5,52	5,46	9,88

AA = Temperatura alta de día y alta de noche.

AB = Temperatura alta de día y baja de noche.

D I S C U S I O N

De acuerdo a los objetivos de este trabajo, se trató de obtener raíces estériles de **Manihot esculenta** para su posterior utilización. El mejor resultado se obtuvo trabajando con ápices caulinares que crecieron en medio de Torrey ya que las condiciones de iluminación y temperatura eran iguales tanto cuando se usó el medio de White como cuando se usó el medio de Torrey (9). Debido a que las raíces permanecerían un tiempo más o menos largo en el cultivo, se debió realizar una serie de repiques a fin de que siempre encontraran condiciones favorables para su crecimiento, porque en el medio, además de haber una disminución de elementos nutritivos, se podía producir una acumulación de productos metabólicos-tóxicos o que interfirieran la acción de otros. Slankis, Runeckles y Krotkov (11), trabajando con **Pinus strobus**, observaron que éste eliminaba por sus raíces productos metabólicos orgánicos y Caplin (2) en cultivos de tejidos de tubérculo de Topinambur y raíces de zanahoria, encontró que éstos crecían mientras se mantenían las condiciones óptimas de concentración de los nutrientes.

Los resultados de este trabajo indican que el crecimiento **in-vitro** de raíces de **Manihot esculenta**, depende aparentemente de la acción conjunta de la luz y la temperatura. Así las subvariantes que menos han crecido, han sido la II, IV, V y VI y las que han obtenido un mayor desarrollo han sido la I y III.

Datos obtenidos de estudios realizados sobre la acción de la luz y la temperatura actuando en forma individual indican que se produce una estimulación en el crecimiento en algunas especies, en cambio en otras especies la luz ejerce un efecto inhibitorio. De acuerdo a los datos obtenidos se vé que existe una inter-relación entre uno y otro factor, para cada tipo de iluminación existe un régimen de temperatura diurna-nocturna dentro del cual se obtiene el máximo crecimiento. Se realizaron solo dos rangos de temperatura, para una observación más mi-

nuciosa sería interesante que se realizaran variaciones continuas de temperatura e iluminación.

Para la primera variante, que se hallaba en luz continua, el factor preponderante para que se produzca el crecimiento, fue la temperatura nocturna. Este factor estaría directamente relacionado con los procesos metabólicos que se originan en la raíz, produciría un mayor crecimiento por un aumento de la respiración (8 pág. 507) y/o por influir en la síntesis de sustancias estimuladoras del crecimiento, una variación en los inhibidores endógenos del crecimiento de la raíz (7 y 8, pág. 326 y 353). Parecería de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, que la acción de la luz sobre estos factores, es menor cuando la temperatura es baja.

Para la segunda variante, que se hallaba sometida a luz y oscuridad, el factor al cual está ligado el crecimiento es también la temperatura. Quizás se deba a los mismos efectos que estimulan o inhiben la acción de ciertas sustancias que actúan sobre el crecimiento radicular. El crecimiento menor de la subvariante III con respecto a la I parece ser debido a la intervención de períodos de oscuridad (10).

En la tercera variante, que se hallaba durante las 24 horas en oscuridad, las raíces crecieron menos, tanto cuando la temperatura nocturna fue alta como baja. Esto parece ser debido a la ausencia de luz y no a la temperatura. Un efecto parecido fue observado por Scott, Carter y Street (10) y J. Miller y P. Miller (6). Además se observó un fenómeno contrario a las dos variantes anteriores y es que a temperatura nocturna baja, las raíces se habían desarrollado más que a temperatura alta.

La circunstancia de que los tratamientos hayan producido efectos más o menos detrimentales en unos y estimulantes en otros, nos indica que existe una inter-relación entre los factores extrínsecos y que variaciones de uno o de los dos factores, trae aparejado ciertas transformaciones fisiológicas en la raíz.

En las variantes que estaban a luz continua y día natural, se observó una leve coloración verde de las raíces atribuible a la clorofila (1). En cambio las que estaban en oscuridad, no presentaron esa tonalidad.

C O N C L U S I O N E S

1. — Por su elevado porcentaje de infección, la obtención de raíces a partir de estacas no dio buenos resultados.
2. — Se obtuvieron raíces de ápices caulinares con un bajo porcentaje de infección (15%). A los 26 días cada ápice había emitido ocho raíces de 2 cm. (como promedio).
3. — Los ápices que crecieron en el medio de White, se desecharon.

- por tener menor número de raíces que cuando se utilizó el medio de Torrey, que estimuló una mayor rizogénesis.
4. — La luz continúa y la temperatura alta produjeron un mayor crecimiento de las raíces de **Manihot esculenta** cultivadas **in-vitro** que las de día natural y oscuridad a iguales temperaturas.
 5. — Se demostró que el crecimiento radicular no sólo depende de la temperatura, sino también de la luz.
 6. — Se observó cierta coloración verde en las raíces que se hallaban bajo luz continúa y día natural. Se supone que sea clorofila.

R E S U M E N

Se determinó el crecimiento in-vitro de raíces de **Manihot esculenta** en condiciones de iluminación y temperatura diferentes.

Se utilizaron raíces obtenidas de ápices cultivados in-vitro en medio de Torrey (sólido), en cuartos, invernáculos y estufas, haciendo tres variantes: 1) — Luz continúa durante las 24 hs.; 2) — Día natural (de 11 hs. de luz y 13 hs. de oscuridad); 3) — Oscuridad durante las 24 hs. En cada variante se estudiaron dos subvariantes: a) — con temperaturas elevadas día y noche y b) — temperatura alta de día y baja de noche. La fuente de iluminación en la variante de luz continúa fue el sol durante el día y luz artificial de noche.

Se encontró que la composición del medio nutritivo influye en el crecimiento de los ápices y en la rizogénesis, dando mejor resultado el medio de Torrey que el de White; que la temperatura **Alta** de día y **Alta** de noche con luz continúa o a día natural, coadyuvan al crecimiento de las raíces cultivadas in-vitro. Además se encontró una coloración verde en las raíces, posiblemente debido a la formación de clorofila por efecto de la iluminación.

S U M M A R Y

"In vitro" growing of roots of **Manihot esculenta** was studied in different conditions of illumination and temperature.

Root obtained from "in vitro" cultivated apex in solid Torrey medium, were held in rooms, green house and stove, in three variants:

- 1) — Continuous light during 24 hours.
- 2) — Natural day (11 hours light and 13 hours darkness).
- 3) — Darkness during 24 hours.

Each of these variants had two subvariants:

- a) — High temperature during the day and night.
- b) — High temperature during the day and low temperature at night.

In the variant (1) the light sources were sun during the day and artificial light at night.

We found that the nutrient medium composition has influence over apex growing and ryzogenesis. Torrey medium is better than White's, and high

temperature during the day and night with continuous light or natural day, improves the growing of the roots.

Besides we found a green coloration in the roots, probably for the presence of chlorophyll formed by influence of the light.

B I B L I O G R A F I A

- 1.— BURSTROM, H. Influence of iron and gibberellic acid in the light sensitivity of roots. *Physiologia Plantarum* 13 (3): 597-615. 1960.
- 2.— CAPLIN, S. M. Effect of initial size on growth of plant tissue cultures. *American Journal of Botany* 50 (1): 91-94. 1963.
- 3.— DERBYSHIRE, E. and STREET, H. E. Studies of the growth in culture of excised wheat roots —V— The influence of light on nitrate uptake and assimilation. *Physiologia Plantarum* 17 (1): 107-117. 1964.
- 4.— GAUTHERET, R. J. La culture des tissus végétaux. *Techniques et réalisations*. Masson & cie., Editeurs, Paris. 1959.
- 5.— KETELLAPER, H. J. Temperature-induced chemical defects in higher plants. *Plant Physiology* 38 (2): 155-179. 1963.
- 6.— MILLER, J. H. and MILLER, P. H. The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the fern, *Onoclea sensibilis*. *American Journal of Botany* 48 (2): 154-159. 1961.
- 7.— PILET, E. P. Auxines et inhibiteurs radiculaires endogènes. *Physiologie Végétale* 1 (2): 171-190. 1963.
- 8.— PILET, P. E. Les phytohormones de croissance. Masson & Cie., Editeurs, Paris. 1961.
- 9.— SANDERS, M. E., FRANZKE, C. J. and ROSS, J. G. Influence of environmental factors on origin of colchicine-induced Trueu-Breeding diploid mutants in sorghum. *American Journal of Botany* 46 (2): 119-126. 1959.
- 10.— SCOTT, E. G., CARTER, J. E. and STREET, H. E. Studies of the growth in culture of excised wheat roots. III-The quantitative requirement for light. *Physiologia Plantarum* 14 (4): 725-733. 1961.
- 11.— SALNKIS, V., RUNECKLES, V. C. and KROTKOV, G. Metabolites liberated by roots of White Pine (*Pinus strobus* L.) seedling. *Physiologia Plantarum* 17 (2): 301-313. 1964.