

FORMACIÓN DE CALLOS Y EMBRIONES SOMÁTICOS EN DOS VARIEDADES DE YUCA

Somatic embryos and callus development in two varieties of Cassava

Eder Durango Ballesteros¹; Ana Milena Suarez Gómez²; Yorsi Padilla Perez³;

Resumen

La embriogénesis somática constituye una técnica de cultivo de tejidos in-vitro con gran importancia en la biotecnología vegetal. En este trabajo se evaluó el efecto de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) a tres diferentes concentraciones en la formación de callos y embriones somáticos en dos variedades de yuca provenientes de parcela experimental del SENA, Centro Agroempresarial y Minero, Regional Bolívar. Las variedades seleccionadas fueron venezolana y Negrita. Des las cuales se obtuvieron explantes de peciolo que se sembraron en Murashige y Skoog (1962), que se diferenciaron por y tres concentraciones (0,0; 0,5 y 1 mg/L), suplementado con 3% de sacarosa, 0.4mg/l Tiamina, 100mg/l de M-inositol de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). la variedad venezolana obtuvo un porcentaje de callogénesis del 100 %, comparado con la variedad Negrita la cual solo alcanzó el 26%.

Palabras clave: Callos, embriogénesis Somática, Micropropagación, Yuca.

© 2019 Durango *et al.* Este es un artículo Open Access distribuido la bajo la licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-ncnd/4.0/>). No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, su distribución se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Abstract

La embriogénesis somática constituye una técnica de cultivo de tejidos in-vitro con gran importancia en la biotecnología vegetal. En este trabajo se evaluó el efecto de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) a tres diferentes concentraciones en la formación de callos y embriones somáticos en dos variedades de yuca provenientes de parcela experimental del SENA, Centro Agroempresarial y Minero, Regional Bolívar. Las variedades seleccionadas fueron venezolana y Negrita. Des las cuales se obtuvieron explantes de peciolo que se sembraron en Murashige y Skoog (1962), que se diferenciaron por y tres concentraciones (0,0; 0,5 y 1 mg/L), suplementado con 3% de sacarosa, 0.4mg/l Tiamina, 100mg/l de M-inositol de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). la variedad venezolana obtuvo un porcentaje de callogénesis del 100 %, comparado con la variedad Negrita la cual solo alcanzó el 26%.

Keywords: Callos, embriogénesis Somática, Micropropagación, Yuca.

© 2019 Durango *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). Commercial use of the original work of the possible derivative works is not allowed, its distribution must be done with a license equal to that which regulates the original work.

Recibido para publicación: 13 de Noviembre de 2019. Aceptado para publicación: 13 de Noviembre de 2019.

¹Instructor Investigador, Centro Agroempresarial y Minero, SENA Regional Bolívar. Correo de Correspondencia: Edurangob@sena.edu.co.

²Instructor Investigador Centro Agroempresarial y Minero, SENA Regional Bolívar. amsuarezg@sena.edu.co.

³Investigador, Centro Agroempresarial y Minero, SENA Regional Bolívar. padillaperez160990@gmail.com.

1. Introducción

En La yuca es un cultivo con gran importancia para la alimentación humana, animal y diferentes usos industriales, ocupa el noveno puesto después del arroz, el trigo, la caña de azúcar, el maíz, la soya, la papa, las legumbres y el aceite de palma, además de ser considerado como una importante reserva cuando hay malas cosechas de otros productos alimentarios". Aguilera (2012, Núm. 158). África, encabeza la lista con un 60% de la producción mundial. particularmente Nigeria con (57. 134,478 Toneladas). Le siguen en importancia el continente asiático, principalmente Tailandia (31,161,000 Toneladas) de hecho, India es el país de más altos rendimientos en el mundo 33.5 ton/ha. Finalmente, Brasil (20'891.532 Toneladas) encabeza los principales productores de yuca en América Latina y el Caribe, Según el Ministerio de Agricultura para el 2016 en Colombia se cultivó 106.943 ha. (FAOSTAT, 2016).

La planta de yuca crece en una variada gama de condiciones tropicales: en los trópicos húmedos y cálidos de tierras bajas; en los trópicos de altitud media y en los subtrópicos con inviernos fríos y lluvias de verano. Se siembra desde el nivel del mar hasta los 1 800 msnm, a temperaturas comprendidas entre 20 y 30 °C con una óptima de 24 °C, una humedad relativa entre 50 y 90 por ciento con una óptima de 72 por ciento y una precipitación anual entre 600 y 3 000 mm con una óptima de 1 500 mm. (FAO 2000).

Este cultivo es de propagación y crecimiento rápido, pero presenta problemas de diseminación de enfermedades, desfavoreciendo la producción. Debido a ello se ha incrementado las investigaciones científicas de esta plata para lograr un mejor aprovechamiento. Por lo ya mencionado el cultivo in vitro surge como una alternativa que Permite incrementar la producción de la yuca en corto tiempo, en cualquier época del año y libre de enfermedades.

Unas de estas técnicas de la propagación in vitro es la embriogénesis Es el proceso por el que las células del explantes comienzan a dividirse muy rápido y aumentar su volumen, fácilmente visible, y cambia de color, el cual puede ir de blanco, a un verde y café, esto vienen a ser los callos somáticos iniciales. Fernández-Guijarro (1997).

La formación del callo está determinada por el tipo de explante y de regulador de crecimiento y su concentración, del genotipo y del contenido endógeno de reguladores de crecimiento, siendo necesario en algunos casos adicionar auxinas, citoquininas o ambas. La Utilización de auxinas, en concentraciones de moderadas a altas han sido las más utilizadas para la formación de callos. La alta concentración de auxina y baja de citoquinina en el medio activa la proliferación celular en algunas especies, con la consecuente formación de callo. Las citoquininas más utilizadas son la Kinetina (Kin) y la Benciladenina (BA) y dentro de las auxinas, las más empleadas son ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) (Chawla 2002).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en tres concentraciones diferentes en embriogénesis in vitro de 2 variedades de yuca provenientes de parcela experimental del SENA, Centro Agroempresarial y Minero, Regional Bolívar.

2. Metodología

2.1 Selección de explantes.

Se tomaron explantes de pecíolos de plantas de yuca de 3 meses de edad, provenientes de la parcela experimental del SENA, Centro Agroempresarial y Minero, Regional Bolívar, ubicada a 10° 22'17,7" N. y 75°27'44,8" W, con precipitaciones anuales de 1500 mm y temperaturas promedias de 28°C.

2.2 Preparación y desinfección de explantes.

Se colectaron peciolo de hojas de dos variedades de Yuca: Venezolana y Negrita; los cuales se lavaron con detergente comercial más dos gotas de Tween 20 y se enjuagaron con abundante agua corriente, posteriormente los explantes se sumergieron en una solución de yodo al 3.75% por 10 min, Transcurrido el tiempo, se sumergieron en alcohol al 70% por 1 min., y luego se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 10 min. En cada paso se realizaron tres enjuagues con agua estéril para eliminar residuos del producto utilizado en la desinfección. Se realizó la defeción teniendo en cuenta el procedimiento utilizado por Buechse (2012), modificado.

2.3 Inducción de callogénesis.

Los explantes de peciolo, se cultivaron en cajas de petri, disponiendo 5 explantes por caja, conteniendo medio MS básico (1962), suplementado con 3% de sacarosa, 0.4mg/l Tiamina, 100mg/l de M-inositol y tres concentraciones (0,0; 0,5 y 1 mg/L) de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). Los explantes se incubaron en oscuridad durante 10 días, a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, hasta la iniciación o formación de callo (Twiford y Mantell, 1996). En cada caja de Petri se registró el número de explantes que forman callo, tiempo de formación y el % de callo formado.

2.4 Caracterización anatómica

Se realizaron cortes a mano alzada y la técnica del Squash, para observar las estructuras formadas y determinar la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro*. Los cortes anatómicos se observaron en un microscopio óptico a 10 X y 40 X, marca Advance optical, con pantalla digital integrada.

3. Resultados y Discusión

3.1 Callogénesis

En la formación de callo se observó una respuesta diferencial entre las variedades; encontrándose que la variedad Venezolana obtuvo un porcentaje de callogénesis del 100 %, comparado con la variedad Negrita la cual solo alcanzó el 26%. (Ver tabla 1); Callos que fueron desde el tipo organogénico hasta el embriogénico. La respuesta diferencial, se debe a la adición al medio de cultivo de las concentraciones de auxinas o citoquininas, en cada variedad, pudiendo aumentar la eficiencia en la formación de callos. (Manrique y Roca 1987). La respuesta de menor formación de callo en la variedad Negrita, puede atribuir a que la especie necesite una mayor concentración de reguladores en el explante seleccionado para activar el proceso de división celular.

Lo anterior implica que las concentraciones de 2,4-D utilizadas, no son las adecuadas para inducir la formación de callo en la variedad Negrita, resultado que es similar al obtenido por Manrin (2009), cuando usaron BAP en el desarrollo y la germinación de embriones en yuca.

3.2 Caracterización Anatómica.

Para caracterizar anatómicamente la formación de callos en yuca, se observaron masas de callo de color blanco opaco o crema, diferenciándose callos de tipo embriogénico y no embriogénico por ser este último de color blanco más transparente y de apariencia lisa. En los callos formados, se pudo observar células competentes embriogénicas con núcleos grandes y células no embriogénicas alargadas con deformaciones, obtenidas en el medio de cultivo a concentraciones de 1 mg/l de 2,4-D (Figura 2).

En cuanto a las 3 concentraciones de 2,4-D. Ensayadas, en la de 0,5ml después de los 15 días de cultivo, se observaron células isodiamétricas y amorfas en los callos formados procedentes de la variedad Venezolana. Muchas de estas células isodiamétricas se encontraban en división

celular (Figura 3), provistas de doble membranas, con gran número de plástidos y con núcleos definidos., mientras en la variedad negrita no se observó estructuras definidas. Posiblemente esta última variedad necesita una concentración mayor que un 1ml. De 2,4-D para la inducción de callos embriogénico.

Diversos estudios han evaluado varias auxinas sintéticas con fines de producción de embriones somáticos y han encontrado que 2,4-D presentan la mayor eficiencia con valores superiores al 50% (Groll *et al.*, 2001; Medero *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2003; Raemakers *et al.*, 1993).

Estos resultados surgieren es más eficiente para producir callos y embriones somáticos en la variedad venezolana que en la variedad Negrita requiere estudios por la deficiencia en la formación de estructuras embriogénicas.

Sin embargo, la alta heterocigocidad de la yuca implica que se observen diversas respuestas a nivel de cultivo de tejidos, por tal razón se hace necesario realizar modificaciones a los protocolos para que puedan ser adaptados a otros cultivares (Medero *et al.*, 2000).

Tabla 1. Efecto del 2,4-D en la formación de callos en yuca, de las variedades Venezolana y Negrita a los 15 días de cultivo.

2,4-D mg/L.	No Explates Formador de Callo		Callos formado (%)		Tiempo de formación de Callo (días)	
	Venezolana	Negrita	Venezolana	Negrita	Venezolana	Negrita
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0
0,5	15	0	100	0	10	0
1,0	15	3	100	26	7	10



Figura 1. a) Callo Embriogénico de yuca. b) callo organogénico de yuca obtenidos a partir del cultivo in vitro de peciols de yuca.

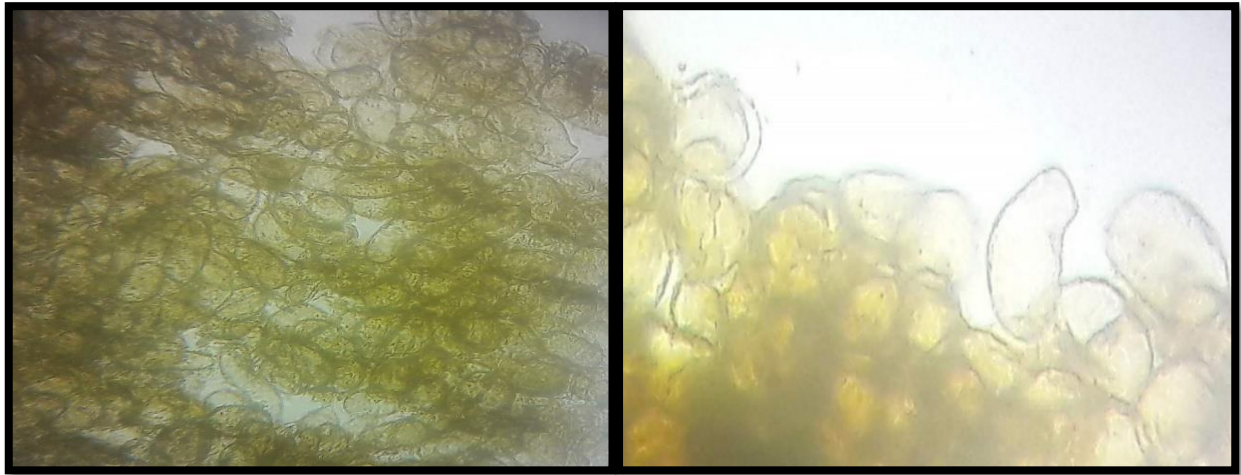


Figura 2. Células amorfas originadas en la concentración de 2,4-D a 1 mg/L.

4. Conclusiones

Es La variedad Venezolana tiene una respuesta eficiente en el porcentaje general de calogénesis, en las dos concentraciones 2,4-D. (0,5 y 1ml.), el tratamiento con mayor concentración (1ml.) Genero una producción de callos embriogénicos, se destaca los resultados obtenidos en el análisis anatómico ya que se pudieron observar estructuras celular es definidas (Figura 3) y se puede evidenciar que es correcto para esta variedad inducir a callo a partir del cultivo *in vitro* de peciolos.

Por el contrario, la variedad Negrita tuvo respuestas deficientes; en la inducción de callo, en las dos concentraciones 2,4-D. (0,5 Y 1ml.), el análisis anatómico no se observaron estructuras definidas. El Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en las concentraciones ya señaladas no fueron eficientes para el desarrollo de callos organogénico y embriogénicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo surgieren que la variedad Negrita debe ser evaluada en cuanto a sus reservas endógenas de reguladores (Auxina y citoquinina), y el tipo de explante más apropiado para el cultivo *in vitro*.

5. Bibliografía

Buechsel C.D. (2012). Establecimiento *in vitro* de yuca - variedad valencia- mediante domos meristemáticos y evaluación de tres medios de cultivo para la producción de brotes. Zamorano, Departamento de ciencias y producción agropecuaria, Honduras.

Chawla, H.S. (2002). Introduction to plant biotechnology. Science Publishers Inc., USA.

R.H. Escobar, L. Muñoz, J. E. Montoya, J. Tohme y W.M. Roca (2002). Implementación del sistema RITA® en la propagación a gran escala y en la embriogénesis somática de yuca R.H. * Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) - Cali-Colombia (*) Centro Internacional de la Papa-CIP, Lima, Perú

Fernández B., 1997. Embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.). Tesis Doctoral. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

Groll J., Mycock D., Gray V., Laminski, S. (2001). Secondary somatic embryogenesis of cassava on Picloram supplemented media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65 201-210.

Manrique y Roca (1987). Efecto del fotoperiodo y del medio de cultivo en la embriogénesis somática, y análisis histológico del proceso en la yuca manihot esculenta crantz. Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

Medero V. R., Borroto C., Rodríguez S., Gómez R., López J., García M., Ventura J., Espinosa J., Cabrera M., Martínez M., Torres M., Torres Y., Álvarez M., García J. (2000). Embriogénesis somática a partir de meristemos axilares en yuca. *Biotecnología Vegetal*. 1 21-26

Marín, A., J. G. Albarrán, F. Fuenmayor y D. Perdomo. (2009). Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración in vitro de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *UDO Agrícola*. Venezuela.

Medina R. D., Faloci M. M., Solís-Neffa V y Mroginski, V. (2003). Embriogénesis Somática y Regeneración de Plantas de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de Cultivares de Interés Para Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 32 (3): 143-160.

Raemakers C. J. J. M., Schavemaker C. M., Jacobsen E., Visser R. G. (1993). Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Reports*. 12 226-229.

Twyford, C; Mantell, S. (1996). Production of somatic embryos and plantlets from root of the greater yam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46(1):17-26.

Valderrama, S; Chico, J; Tejada, J; Vega, A. (2008) Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somática, a partir de hojas de fresa, *Fragaria virginiana*, utilizando ANA y BAP. Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Perú. *REBIOL*. 28(2):26-38