

Regeneración de plantas de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar 'Blanco de Guinea' a partir de embriones somáticos

Dayana Rodríguez¹, Jorge López¹, I dalmis Bermúdez-Caraballosa², Nery Montano¹, Aymé Rayas¹, Milagros Basail¹, Arletys Santos¹, Yenisey Gutiérrez¹, Víctor Medero¹, Yoel Beovides¹

¹Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6. Santo Domingo. Villa Clara. Cuba. CP 53 000. e-mail: tculture.biotec@inivit.cu

²Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

A pesar de los progresos alcanzados en la producción de semilla de ñame (*Dioscorea* spp.), tanto por métodos convencionales como biotecnológicos, la escasez de material vegetal de plantación con calidad fisiológica y sanitaria continúa limitando la producción a gran escala de este cultivo. La embriogénesis somática constituye una alternativa para la propagación de material vegetal y una herramienta auxiliar para mejora genética. El presente trabajo se realizó con el objetivo de regenerar plantas de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar 'Blanco de Guinea' a partir de embriones somáticos. Se determinó el efecto de tres medios de cultivo en la maduración de los embriones somáticos y de diferentes combinaciones de 6-BAP y kinetina en medio de cultivo MS con el objetivo de germinar los embriones somáticos. El mayor porcentaje de embriones somáticos maduros (36.66%) se obtuvo en medio de cultivo MS con las sales al 50% de su concentración y sin reguladores del crecimiento vegetal, lo cual favoreció su posterior germinación (60%) en medio de cultivo MS con kinetina (1.0 mg l⁻¹) y 6-BAP (2.0 mg l⁻¹). Los embriones somáticos germinados se caracterizaron por la presencia de hojas abiertas, tallos bien definidos con una coloración verde oscura y pequeñas raíces de color blanco. Estos continuaron su diferenciación hasta formar plantas completas a los 60 días de cultivo.

Palabras clave: 6-bencilaminopurina, embriogénesis somática, kinetina, mejora genética, ñame

Plant regeneration of *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea' from somatic embryos

ABSTRACT

Despite the progress made in the production of yam (*Dioscorea* spp.) seed by both conventional and biotechnological methods, the low availability of planting material with physiological and sanitary quality continues to limit the production of this crop on a large scale. Somatic embryogenesis is an alternative for the propagation of plant material and an auxiliary tool for its genetic improvement. The present work was carried out with the aim of to regenerate *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar 'Blanco de Guinea' plants from somatic embryos. The effect of three culture media on the maturation of somatic embryos and different combinations of 6-BAP and kinetin in MS culture medium for germinating somatic embryos was evaluated. The highest percentage of mature somatic embryos (36.66%) was obtained in MS culture medium with the salts at 50% of their concentration and without plant growth regulators, which favored their subsequent germination (60%) in MS culture medium with kinetin (1.0 mg l⁻¹) and 6-BAP (2.0 mg l⁻¹). The germinated somatic embryos were characterized by the presence of open leaves, well-defined stems with a dark green coloration and small white roots, which they continued their differentiation until forming complete plants at 60 days of culture.

Keywords: 6-benzylaminopurine, somatic embryogenesis, kinetin, genetic improvement, yam

INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp.) es un cultivo de gran importancia para la seguridad alimentaria ya que posee excelentes características nutricionales y gran adaptabilidad a diferentes condiciones edafoclimáticas, lo cual contribuye a su productividad (Borges *et al.*, 2017). Dentro de las más de 600 especies del género *Dioscorea*, *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* es una de las más cultivadas en el mundo debido a su alto valor nutritivo y gran aceptación de la población para su consumo fresco y en forma procesada (Manoharan *et al.*, 2016). Sin embargo, su desarrollo extensivo ha estado limitado entre otras causas, por la poca disponibilidad de material vegetal de plantación con buena calidad fisiológica y sanitaria debido a que los tubérculos subterráneos constituyen la parte útil de la planta para la alimentación y son utilizados como material vegetal de plantación (Balogun y Gueye, 2014).

La embriogénesis somática constituye una alternativa para la propagación de material vegetal y una herramienta auxiliar para el mejoramiento genético (Nyaboga *et al.*, 2015). A pesar de los progresos alcanzados en el desarrollo de la embriogénesis somática en otros cultivares comestibles de ñame (Nagasawa y Finer, 1989; Shu *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2011), estos no son reproducibles para *D. rotundata* debido al efecto del genotipo en esta especie. Autores como Suárez *et al.* (2011) y Manoharan *et al.* (2016) obtuvieron embriones somáticos de *D. rotundata* pero con bajos porcentajes de regeneración de plantas por esta vía morfogénica. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se realizó con el objetivo de regenerar plantas de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar 'Blanco de Guinea' a partir de embriones somáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Material vegetal

Se emplearon embriones somáticos de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar

'Blanco de Guinea' obtenidos a partir del explante inicial hojas jóvenes cerradas con peciolo, según el protocolo propuesto por Rodríguez *et al.* (2014).

Maduración de los embriones somáticos

Con el objetivo de madurar los embriones somáticos formados, se determinó el efecto de tres medios de cultivo: Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) (50%) y vitaminas MS, sales MS (100%) y sales MS (100%) con 6-bencilaminopurina (6-BAP) (2.0 mg l⁻¹) y ácido 1-naftalenacético (ANA) (0.1 mg l⁻¹). En todos se adicionaron vitaminas MS, sacarosa (30 g l⁻¹), Phytigel (2.5 g l⁻¹) y el pH se ajustó a 5.8, basado en estudios realizados por Shu *et al.* (2005) en *D. zingiberensis*.

Se utilizaron 30 embriones somáticos en etapa globular por tratamiento y se colocaron en placas de Petri (80 x 15 mm) que contenían 15 ml de medio de cultivo por tratamiento durante 30 días, estas se sellaron con Parafilm® y se colocaron en la oscuridad a 27 ± 2.0 °C.

Para determinar el estado de maduración de los embriones somáticos, fue evaluada su germinación a los 30 días de ser transferidos al medio de cultivo de germinación propuesto por Asha y Nair (2009) con menor concentración de kinetina (0.5 mg l⁻¹). Como control del experimento se utilizó la misma cantidad de embriones somáticos sin pasar por el medio de cultivo de maduración.

Germinación de los embriones somáticos

Con el objetivo de incrementar la germinación de los embriones somáticos en relación con el medio de cultivo utilizado para evaluar la maduración de los embriones somáticos (Asha y Nair, 2009), se realizó un experimento en el cual se determinó el efecto de la combinación de dos concentraciones de kinetina (0.5, 1.0 mg l⁻¹) y 6-BAP (2.0 mg l⁻¹) en medio de cultivo con las sales y vitaminas MS, ácido ascórbico (10.0 mg l⁻¹), pH 5.8 y Phytigel (2.5 g l⁻¹).

Se utilizaron 30 embriones somáticos maduros por tratamiento (caracterizados a partir de su evaluación visual) provenientes del medio de cultivo de mejores resultados del experimento anterior. Estos se colocaron en placas de Petri que contenían 15.0 ml de medio

de cultivo de cada tratamiento descrito anteriormente, las cuales se incubaron durante 30 días en cámara de cultivo a 27 ± 2.0 °C e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes, con régimen de 16 horas de luz a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $62-68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete SPSS versión 15. Los resultados se compararon mediante el análisis de varianza no paramétrico H de Kruskal-Wallis, según los resultados de la comprobación previa de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza donde estos no se cumplieron. Para hallar los grupos con diferencias estadísticas significativas se utilizó la prueba U de Mann Whitney con un nivel de significación $p < 0.05$. Los experimentos fueron repetidos dos veces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Maduración de los embriones somáticos

A los 30 días de incubados los embriones somáticos en los diferentes medios de cultivo para su maduración, el mayor porcentaje de embriones somáticos germinados (36.66%) se alcanzó en el medio de cultivo con las sales reducidas al 50% de su concentración y sin reguladores del crecimiento vegetal, sin diferencias significativas con el medio de

cultivo que contenía las sales al 100% de su concentración y sí con el resto de los tratamientos (Tabla 1).

En este experimento se comprobó la necesidad de colocar los embriones somáticos a madurar para lograr su posterior germinación. En el control utilizado con embriones somáticos sin previa maduración, no se logró su germinación.

Varios autores han referido la influencia del medio de cultivo sin reguladores del crecimiento vegetal en la maduración de los embriones somáticos. Nagasawa y Finer (1989) obtuvieron embriones somáticos maduros de ñame cv. 'Nagaimo' (*D. opposita*) transcurridos dos meses en medio de cultivo líquido sin reguladores del crecimiento vegetal. Estos autores concluyeron que el período de maduración fue necesario para incrementar la germinación de los embriones somáticos en los cultivares estudiados. De igual forma, Enríquez-Valencia (2013) al evaluar el desarrollo de la embriogénesis somática en los cultivares de plátano 'Manzano' y 'Dátil' (*Musa AA*), obtuvo porcentajes de embriones maduros por encima del 70% en medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento vegetal. También, Moreno *et al.* (2016) obtuvieron embriones somáticos maduros de los cultivares de ñame 'Criollo Colombiano' y 'Diamante 22' (*D. alata* L.) transcurridas siete semanas y media en medio de cultivo MS, libre de reguladores del crecimiento vegetal.

Tabla 1. Influencia del medio de cultivo en la maduración de embriones somáticos en el cultivar de ñame 'Blanco de Guinea' a los 30 días de cultivo.

Tratamientos	Número de embriones	
	somáticos germinados (%)	Rangos Medios
Sales MS (50%)	36.66	66.67 a
Sales MS (100%)	20.00	57.50 a
Sales MS (100%) + (6-BAP 2.0 mg l ⁻¹ , ANA 0.1 mg l ⁻¹)	3.33	48.33 b
Control (embriones somáticos sin pasar por la fase de maduración)	0.00	46.50 c

Rangos medios con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según pruebas H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney

Los embriones somáticos maduros (Figura 1) mostraron una invaginación de forma circular con el centro opaco y la presencia de una zona meristemática densa similar a lo descrito por Ammirato (1984) alrededor del primer primordio foliar de embriones somáticos maduros de *D. floribunda*. Manoharan *et al.* (2016) nombraron la invaginación circular collar cotiledonar, y la consideraron como la primera señal de maduración de los embriones somáticos del cultivar de ñame *D. rotundata*. Estos autores observaron la apertura gradual del collar cotiledonar de los embriones, a partir de la cual brotaron las primeras hojas.

Similares resultados en la caracterización de la maduración de los embriones somáticos fueron obtenidos por Moreno *et al.* (2016) en los cultivares de ñame 'Criollo Colombiano' y 'Diamante 22' pertenecientes a la especie *D. rotundata*.

Germinación de los embriones somáticos

El mayor porcentaje de embriones somáticos germinados (60%) se obtuvo a los 30 días en medio de cultivo MS con 1.0 mg l⁻¹ de kinetina y 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP. Cuando la kinetina se redujo a la mitad el porcentaje de germinación disminuyó tres veces, lo cual evidenció la importancia de este regulador del crecimiento en la germinación de los embriones somáticos en este cultivar de ñame (Tabla 2).

Ammirato (1984), planteó que la adición de citoquininas al medio de cultivo durante la fase de germinación, incrementa el desarrollo *in vitro* de los brotes en especies pertenecientes al género *Dioscorea*, lo cual coincide con los resultados en el cultivar objeto de estudio.

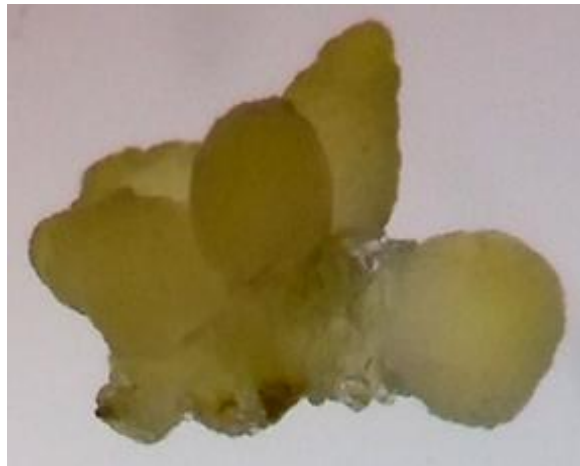


Figura 1. Embriones somáticos en fase de maduración del cultivar de ñame 'Blanco de Guinea' a los 30 días de cultivo en medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento vegetal.

Tabla 2. Influencia de la combinación de reguladores del crecimiento vegetal en la germinación de los embriones somáticos en el cultivar de ñame 'Blanco de Guinea' a los 30 días de cultivo.

Tratamientos	No. de embriones	
	somáticos germinados (%)	Rangos Medios (%)
Kinetina (0.5 mg l ⁻¹) + 6-BAP (2.0 mg l ⁻¹)	20	77.50 b
Kinetina (1.0 mg l ⁻¹) + 6-BAP (2.0 mg l ⁻¹)	60	107.50 a
Kinetina (0.5 mg l ⁻¹)	4	67.50 bc

Rangos medios con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según pruebas H de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney



Figura 2. Regeneración de plantas por embriogénesis somática del cultivar de ñame 'Blanco de Guinea'. A: Embriones somáticos en fase de germinación en medio de cultivo MS con 1.0 mg l⁻¹ de kinetina y 2.0 mg l⁻¹ de 6-BAP. B: Plantas regeneradas a partir de embriones somáticos a los 30 días en medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento vegetal.

También se ha señalado la importancia de la adición de 6-BAP en la germinación de embriones de ñame. En este sentido, Manoharan *et al.* (2016) en *D. rotundata* refirieron la presencia del collar cotiledonar como etapa previa a la germinación y a partir del cual comenzó el desarrollo y posterior elongación del hipocótilo del embrión, tras dos subcultivos en medio de cultivo MS con 0.4 mg l⁻¹ de 6-BAP. En otro cultivo como yuca (*Manihot esculenta* Crantz.), Nyaboga *et al.* (2015) alcanzaron 70% de germinación de embriones somáticos del cultivar 'TME14' cuando fueron cultivados por dos semanas en medio de cultivo MS con 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP seguido de la transferencia a medio de cultivo fresco con 0.4 mg l⁻¹ de 6-BAP, durante cuatro semanas adicionales. En este estudio, cuando se suprimió del medio de cultivo la germinación se redujo a menos del 5%.

Transcurridos 30 días de cultivo, se observó la germinación completa de los embriones somáticos los cuales se caracterizaron por la presencia de hojas abiertas, tallos bien definidos con una coloración verde oscura y pequeñas raíces de color blanco, los cuales continuaron su diferenciación hasta formar plantas completas a los 60 días de cultivo (Figura 2).

CONCLUSIONES

La maduración de embriones somáticos de *D. cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar

'Blanco de Guinea' en medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento vegetal y luego su transferencia a medio de cultivo con kinetina (1.0 mg l⁻¹) y 6-BAP (2.0 mg l⁻¹) permite alcanzar 60% de germinación y la regeneración de plantas.

REFERENCIAS

Ammirato PV (1984) Yams. En: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y (Eds). Handbook of plant cell culture 3, pp. 327–354. Macmillan, New York

Asha KI, Nair GM (2009) Standardization of Callus Induction and Shoot Regeneration in Twelve Species of *Dioscorea*. Indian Journal of Plant Genetic Resources 22(3): 270-280

Balogun M, Gueye B (2014) Status and Prospects of Biotechnology Applications to Conservation, Propagation and Genetic Improvement of yam. En: Ramawat KG, Mérillon JM (Eds). Bulbous Plant Biotechnology, pp. 92-113, Taylor and Francis Group, London

Borges M, Malaurie B, Meneses S, Gómez R, Verdeil J (2017) Anatomía comparada de plantas de *Dioscorea alata* L. clon 'Caraqueño' cultivadas en tres ambientes de crecimiento *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología 18(2): 112-118

Enríquez-Valencia AJ (2013) Transcritos involucrados en la maduración del embrión

- somático de *Musa*. Tesis en opción al Título de Máster en Ciencias, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México
- Manoharan R, Tripathi J, Tripathi L (2016) Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 126: 481-497
- Moreno ME, Durango R, Cabrita Y, Oropeza M (2016) Establecimiento y caracterización del banco de germoplasma *in vitro* de ñame (*Dioscorea* sp.). *Memorias del Instituto de Biología Experimental* 8: 129-132
- Nagasawa A, Finer J (1989) Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thumb.). *Plant Science* 60: 263-271
- Nyaboga EN, Njiru JM, Tripathi L (2015) Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration, and *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar 'TME14'. *Front Plant Sci.* 411(6): 1-13
- Rodríguez D, López J, Montano N, Rayas A, Basail M, Beovides Y, Santos A, Medero V, Gutiérrez Y (2014) Formación de callos con estructuras embriogénicas en *Dioscorea rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'. *Biotecnología vegetal* 14(3): 185-188
- Shu Y, Ying YC, Lin HH (2005) Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 80: 157-161
- Suárez IE, Torres LA, Litz R (2011) Somatic embryogenesis in yam (*Dioscorea rotundata*). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín* 64(2): 6037-6042

Recibido: 20-04-2018

Aceptado: 09-07-2018