

METODOLOGÍA PARA LA REGENERACIÓN DE PLANTAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL CLON DE YUCA 'INIVIT Y 93-4'.

Víctor R. Medero Vega*, Aymé Rayas, Sergio Rodríguez, Jorge López, Manuel Cabrera, Milagros Basail, Germán Rodríguez, Marilyn Martínez, Marlenys Torres, Diasnery Arce, Yanelis Bravo y Carmen Pons.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba.

* Autor para la correspondencia: vmedero@inivit.cu

INTRODUCCIÓN

En el Programa de Mejoramiento Genético del cultivo de la yuca en el INIVIT se han obtenido varios clones que forman parte de la estructura clonal vigente. Actualmente se encuentra en fase de generalización el clon 'INIVIT Y 93-4', que se caracteriza por presentar un porte bajo (inferior a 40 cm), alto potencial productivo (43.35 t.ha⁻¹) y además sus raíces logran un anclaje simétrico en la tierra (Rodríguez, 1999). Esta última característica y su menor altura posibilitan que ofrezca mayor resistencia a los vientos y por lo tanto constituye una alternativa para los productores ante el efecto nocivo de los huracanes que afectan con mucha frecuencia al país. Sin embargo, resulta necesario poner a punto las técnicas biotecnológicas como herramienta auxiliar para el mejoramiento genético del cultivar y lograr disminuir el contenido de ácido cianhídrico ya que en algunas regiones se afecta su calidad culinaria debido a un ligero sabor amargo. Además, estas técnicas de cultivo permiten la multiplicación acelerada y una mayor disponibilidad de material de alta calidad para entregar directamente al productor.

En los últimos años se ha avanzado significativamente en la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos para dar solución a diferentes problemáticas que se presentan en la agricultura. Dentro de estas, la embriogénesis somática y el cultivo de meristemos constituyen metodologías de alta eficiencia en el proceso de micropropagación, ya que ofrecen importantes ventajas en una especie de propagación vegetativa como la yuca. En el laboratorio de Biotecnología Vegetal del INIVIT se ha venido trabajando en la regeneración de plantas de yuca por embriogénesis somática (Medero, 1995; 2000 y 2006), pero se ha encontrado que existe alta dependencia del genotipo a la respuesta embriogénica *in vitro*.

Teniendo en cuenta lo anterior se realizó el presente trabajo con la finalidad de establecer una metodología para la regeneración por embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido del clon de yuca 'INIVIT Y 93-4'

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Se utilizó el clon de yuca 'INIVIT Y 93-4' procedente del banco de germoplasma.

La plantación de las estacas se realizó en bolsas con un sustrato formado por suelo Pardo con Carbonato y cachaza en una proporción de 3:1 y se colocaron en un aislador. Cuatro semanas después se cortaron los brotes con 3 ó 5 cm de tallos y se desinfectaron lavando previamente las yemas con agua corriente varias veces, posteriormente se sumergieron en etanol (70%) por 1 minuto, después en una solución de hipoclorito de sodio (2.5 %) por 5 minutos y finalmente se lavaron 5 veces con agua destilada estéril y se mantuvieron en un frasco con la misma agua.

En la cabina de flujo laminar los meristemos fueron extraídos y colocados sobre el medio de cultivo para la obtención de plantas completas, el cual estaba formado por: sales de Murashige and Skoog, (1962) (MS), tiamina (1 mg.L⁻¹), mioinositol (100 mg.L⁻¹), sacarosa (20 g.L⁻¹), 6-Bencilaminopurina (BAP) (0.04 mg.L⁻¹), Ácido Naftalen Acético (ANA) (0.02 mg.L⁻¹), Ácido giberélico (AG₃) (0.05 mg.L⁻¹), Agar (6.5 g.L⁻¹) y el pH fue ajustado a 5.7 antes de la

esterilización. Los explantes fueron colocados en cuartos de cultivo a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperíodo de 16 horas luz.

Para la inducción de callos se utilizaron como explante: meristemos apicales y meristemos axilares de plantas "in vitro". Se utilizó como medio de cultivo las sales MS, suplementadas con sacarosa (20 g.L^{-1}), CuSO_4 (0.474 mg.L^{-1}), 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (8 mg.L^{-1}), *Phytigel* (2 g.L^{-1}) y pH 5,8 y. Se incubaron en la oscuridad a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

La evaluación se efectuó a los 55 días, donde se tuvo en cuenta: porcentaje de formación de callos (%FC), porcentaje de formación de callos con estructuras embriogénicas (%FCEE), porcentaje de formación de callos con estructuras embriogénicas de alta frecuencia (%EEAF) y la coloración predominante en los callos formados (Beige, Beige Claro, Beige Oscuro).

Para la germinación de los embriones obtenidos se utilizó el medio de cultivo ME-3, constituido por con las sales MS (1962), vitaminas MS, mioinositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}), BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), ANA ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$), AG_3 (1 mg.L^{-1}), "phytagel" (3 g.L^{-1}) y pH 5,8. Las placas fueron colocadas a un fotoperíodo de 16 horas, con intensidad luminosa de 2 500 lux y a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. La evaluación se realizó a los 45 días de cultivo.

RESULTADOS

En los dos tipos de explantes evaluados se observó la formación de callos. En la tabla 1, se puede apreciar que el mayor porcentaje para la FC correspondió a los ápices de yemas apicales de plantas *in vitro* (100%); sin embargo los mayores porcentajes de formación de callos con estructuras embriogénicas (68.9) y estructuras embriogénicas de alta frecuencia (51.7) se lograron al utilizar los ápices de yemas axilares de plantas *in vitro*.

Se logró un 63,6% de germinación de los embriones somáticos obtenidos sobre el medio de cultivo ME-3 (Medero, 2006).

Tabla 1. Respuesta del tipo de explante a una concentración de 8 mg.L^{-1} de 2,4-D sobre la inducción de tejidos embriogénicos del clon 'INIVIT Y 93-4' a los 55 días de cultivo.

| Tipo de Explante | %FC | %FCEE | %FCEEAF | Color (%) | | |
|--|------|-------|---------|-----------|------|------|
| | | | | B | B.C. | B.O. |
| Ápice de yema apical de planta <i>in vitro</i> | 100 | 31.6 | 15.8 | - | 36.8 | 63.1 |
| Ápice de yema axilar de planta <i>in vitro</i> | 96.5 | 68.9 | 51.7 | 27.6 | - | 72.4 |

La elevada capacidad para la formación de callos con estructuras embriogénicas mostrada por los ápices de yemas axilares de plantas *in vitro*, constituye un resultado novedoso y una alternativa eficaz para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática. Los callos con estructuras embriogénicas de alta frecuencia observados pueden ser utilizados para el establecimiento de suspensiones celulares y además, su aplicación práctica creará las premisas para el mejoramiento genético y la propagación masiva *in vitro*, de este genotipo.

REFERENCIAS

- Medero, V. Regeneración por embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Tesis (Master of Science) Instituto de Biotecnología de las Plantas en la UCLV, 50p. 1995.
- Medero, V.; S. Rodríguez; C. Borroto; R. Gómez; J. López; M. García; J. Ventura; M. Cabrera; M. Torres y M. Álvarez. Sistema para la embriogénesis somática en clones cubanos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). En: L.J.C.B Carvalho, A.M. Thro y A. D. Vilarinhos (Eds.).

Proceeding IV International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Brasilia, p. 408-419. 2000.

Medero, V. Embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. 100 p. 2006.

Rodríguez, S. Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca, plátano y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos a la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe Final de Proyecto. Programa Nacional de Producción de Alimentos del CITMA. INIVIT, 60 p. 1999.