



Efecto del explante y el picloram en la formación de callos embriogénicos en ñame (*Dioscorea cayenensis* subsp rotundata Poir), var. 'Blanco de Guinea'

Effect of explant and picloram on embryogenic callus formation in 'Blanco de Guinea' yam

Yanet Hernández-Jeréz*, Jorge Liusvert Pérez-Pérez, Juan José Silva-Pupo

Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, km 17.5, Peralejo, Bayamo, Granma. Cuba

RESUMEN: La escasez de material vegetal de plantación con calidad fisiológica y sanitaria continúa limitando la producción a gran escala del cultivo del ñame ya que los tubérculos, que constituyen la parte útil de la planta para la alimentación, también tienen que ser utilizados como material vegetal de plantación. El trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto del tipo de explante y la concentración de Picloram en la formación de callos embriogénicos en *Dioscorea cayenensis* subsp rotundata var. 'Blanco de Guinea'. Se tomaron como explantes, segmentos nodales, hojas inmaduras y segmentos de raíces provenientes de plantas *in vitro*. El medio de cultivo para la formación de callos contenía las sales MS y diferentes concentraciones de Picloram (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg L⁻¹). Se determinó el porcentaje de formación de callos para cada tipo de explante, el color y consistencia de los callos. Se alcanzó con empleo de 2,0 mg L⁻¹ de Picloram, un 80 % de segmentos nodales con formación de callos embriogénicos, de color pardo-amarillento, consistencia compacta y friables.

Palabras clave: auxinas, cultivo de tejidos, *Dioscorea*, *in vitro*.

ABSTRACT: The shortage of planting material of physiological and sanitary quality continues to limit the large-scale production of yam cultivation since the tubers, which constitute the useful part of the plant for food, also have to be used as planting plant material. The work was developed with the objective of evaluating the explant type effect and the concentration of picloram in the formation of embryogenic callus in *Dioscorea cayenensis* subsp rotundata cultivar Blanco de Guinea. Nodal segments, immature leaf and root segments from *in vitro* plants were taken as explants. The culture medium for callus formation contained the DM salts and different concentrations of Picloram (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg L⁻¹). The callus formation percentage was determined for each type of explant, the color and consistency of the callus. It was achieved with the use of 2.0 mg L⁻¹ of Picloram, 80% of nodal segments with embryogenic callus formation, yellowish-brown in color, compact and friable.

Keywords: auxins, tissue culture, *Dioscorea*, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp.) ocupa el cuarto lugar en la producción mundial de raíces y tubérculos, después de la papa (*Solanum tuberosum* L.), yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y el boniato (*Ipomoea batatas* L.) (1); además, existen más de 600 especies entre las que destacan *D. alata* y *D. rotundata* (2).

En este cultivo existen progresos en la producción de semillas por métodos tradicionales (3) y su conservación

por métodos biotecnológicos (4), pero su desarrollo extensivo ha estado limitado por la escasez de material vegetal con buena calidad fisiológica y sanitaria (5), debido a que los tubérculos son utilizados, tanto para la alimentación como material de partida para la plantación (6) y las pérdidas alcanzan hasta el 50 % durante la postcosecha y el almacenamiento, a causa de la susceptibilidad de los tubérculos a las bacterias, nemátodos y hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (7).

*Autor para correspondencia: yhernandezj@udg.co.cu

Recibido: 29/09/2021

Aceptado: 25/05/2022



De igual manera, la aplicación de la Ingeniería Genética se ha visto limitada por la ausencia de protocolos eficientes que permitan la regeneración de plantas y su transformación genética (5). Una alternativa es la embriogénesis somática, un proceso por el cual las células somáticas pueden desarrollar embriones somáticos hasta convertir en plantas (8).

A nivel internacional, los progresos en la embriogénesis somática en ñame, han sido descritos en un reducido número de especies y cultivares (5), con bajas frecuencias de inducción de embriones somáticos y variaciones entre genotipos (9). Sin embargo, la conversión de los embriones somáticos a plantas no se ha logrado eficientemente (10).

En *Dioscorea rotundata* existen limitantes en las diferentes fases de la embriogénesis somática, como porcentajes de inducción de masas pro-embriogénicas inferiores al 30%, bajos porcentajes de regeneración de plantas y protocolos no reproducibles en otros genotipos (5,7,9).

En Cuba, fue posible la regeneración de plantas vía embriogénesis somática en el cultivar 'Blanco de Guinea' (6,11), pero solo el 6,0 % de los callos obtenidos a partir de hojas con peciolo, lograron formar estructuras embriogénicas cuando fueron cultivadas con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y no se observó callogénesis en secciones de raíz, siendo necesario nuevos estudios que permitan incrementar esta respuesta.

Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del tipo de explante y la concentración de Picloram, en la formación de callos en ñame (*Dioscorea cayenensis* subsp *rotundata* Poir), var. 'Blanco de Guinea'.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG) de la Universidad de Granma (UDG), ubicado en Peralejo, Bayamo, Granma, Cuba.

Material vegetal

Plantas de *Dioscorea cayenensis* subsp *rotundata* Poir var. 'Blanco de Guinea', fueron mantenidas y multiplicadas *in vitro* a partir de segmentos nodales, cultivados en el medio de cultivo, que contiene las sales y vitaminas MS (12) 4,41 g L⁻¹, 6-benzilaminopurine 0,05 mg L⁻¹, ácido naftalenacético 0,02 mg L⁻¹, ácido ascórbico 25 mg L⁻¹, sacarosa 30 g L⁻¹ y Gelrite® 2,4 g L⁻¹.

Efecto del tipo de explante

Con el propósito de inducir la formación de callos con estructuras embriogénicas, se determinó el efecto de diferentes tipos de explantes (segmentos nodales, segmentos de raíz y hojas inmaduras colocadas sobre el medio de cultivo en posición adaxial/abaxial), procedentes de plantas *in vitro* de ñame 'Blanco de Guinea' cultivadas durante cinco semanas.

Los diferentes tipos de explantes fueron colocados en un medio de cultivo con las sales completas incluido las vitaminas MS (12) 4,41g L⁻¹; sacarosa 30 g L⁻¹, ácido ascórbico 25mg L⁻¹, Picloram 1,0 mg L⁻¹, pH 5,8 y Gelrite® 2,4 g L⁻¹.

Para determinar el inicio de la formación de callos, se realizaron observaciones semanales con un microscopio estereoscópico (Olympus, 10x) y se evaluó el color y consistencia de los callos; el porcentaje de formación de los callos se determinó a los 30 días de cultivo.

Efecto de la concentración de Picloram

Posteriormente, se utilizó el mejor tipo de explante determinado en el experimento anterior cultivado en diferentes concentraciones de Picloram (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg L⁻¹) incluido un tratamiento control sin regulador del crecimiento.

Se utilizaron 25 réplicas por tratamiento y se colocaron en frascos de vidrio que contenían 10 mL de medio de cultivo durante cuatro semanas de cultivo. Estas fueron colocadas en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25±2 °C, a los 30 días de cultivo

Análisis estadístico

Para verificar si los datos cumplían con los supuestos de normalidad de los datos, se utilizó la prueba de Shapiro Wilks y para la homogeneidad de varianza la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

El porcentaje de formación de callos (%) por tipo de explante se determinó según la expresión matemática: % FC=Total de explante con callo/Total de explantes x 100.

Las variables cualitativas se analizaron mediante estadística descriptiva y los datos expresados en porcentaje, mediante un análisis de comparación de proporciones con el paquete estadístico ComproPro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tipo de explante

En todos los explantes cultivados con Picloram 1,0 mg L⁻¹, se observó fenolización del tejido vegetal y engrosamiento de la yema axilar de los segmentos nodales, a partir de la segunda semana de cultivo (Figura 1).

Posteriormente, hubo una abundante proliferación de callos de color blanco y con estructuras nodulares, consistencia compacta y friables (Figura 1A); cuando se emplearon hojas inmaduras, estas se encorvaron y formaron callos en los bordes del explante y en la nervadura principal del limbo foliar (Figura 1B); en tanto, en los segmentos de raíces hubo una escasa formación de callos con tendencia a la formación de embriones somáticos aislados y de manera directa (Figura 1C).

Los callos de color blanco observados en la presente investigación, son comparables con los descritos por otros autores, que hicieron referencia a la presencia de callos no

embriogénicos semejante a motas de algodón en *Dioscorea rotundata* (5). En otros estudios se han descrito callos de apariencia cristalina y filamentosos, en algunos casos, asociados con masas pro-embriogénicas, los cuales estaban conformados por células no embriogénicas de forma alargada, desprovistas de núcleo y poco contenido citoplasmático (7).

Los explantes mostraron respuestas diferenciales a la formación de callo en presencia de Picloram 1,0 mg L⁻¹. La mayor respuesta se obtuvo en alrededor de la mitad de los segmentos nodales explantes empleados, con diferencias estadísticas significativas en comparación con los valores obtenidos en el resto de los tipos de explantes empleados (Figura 2).

Se observaron diferencias según la orientación abaxial y adaxial de las hojas sobre el medio de cultivo. En el lado adaxial de las hojas no ocurrió la formación de callos; por el contrario, el lado abaxial de las hojas y los segmentos de raíces respondieron con porcentajes inferiores al 7,0 % de formación de callos y sin diferencias estadísticas significativas entre estos tipos de explantes (Figura 2).

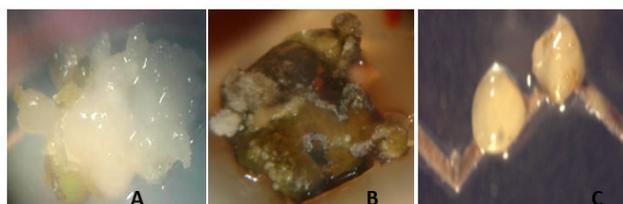
La respuesta observada a partir de los segmentos de raíces, difiere de lo informado en la literatura científica (11), donde no se observó callogénesis en este tipo de explante y el mismo genotipo, pero con 2,0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Además, pudiera estar relacionado con que las raíces son el principal sitio de síntesis de citoquininas en las plantas (13), y cuya concentración endógena al interactuar con la auxina adicionada al medio de cultivo, propició un balance hormonal adecuado para la ocurrencia de la embriogénesis somática.

Las diferencias en la respuesta de las hojas según su orientación sobre el medio de cultivo, pudiera estar ligado a la presencia de diferentes tipos de células en la epidermis de ambos lados de las hojas. Un estudio realizado sobre las diferencias en la arquitectura foliar de tres especies, *Dioscorea* sp., *D. glomerulata* y *D. haumanii*, reveló que todas presentan epidermis adaxial con células isodiamétricas de paredes rectas a curvas; la epidermis abaxial presenta abundantes estomas y células isodiamétricas excepto en *Dioscorea* sp., donde las células eran rectangulares (14).

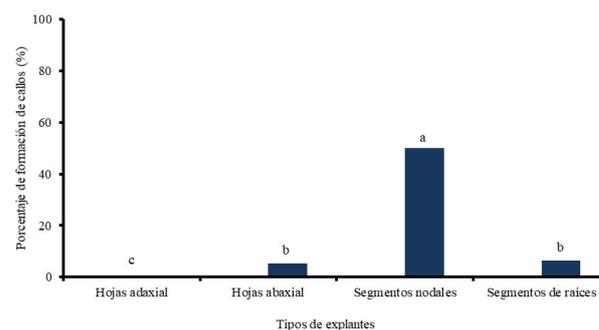
En tanto, se ha informado sobre la embriogénesis somática en *D. rotundata* var. 'Blanco de Guinea' al utilizar los explantes hojas con peciolo obtenidas de plantas *in vitro*. A las dos semanas se observó la formación de masas proembriogénicas con la mayor presencia en el tratamiento 1,0 mg L⁻¹ de Picloram; el uso de sacarosa, incrementó el desarrollo de los embriones somáticos y favoreció la conversión a planta (15).

Los segmentos nodales mostraron una mejor respuesta para la formación de callo, este resultado puede ser debido a que, al encontrarse la yema axilar en el segmento nodal, hay mayor cantidad de sustancias de reserva y de tejido meristemático, por tanto, al añadir el Picloram estimuló el proceso de formación de callos, ya que las auxinas tienen acción sobre la elongación celular, expansión de los tejidos, división celular y formación de raíces adventicias.



A) Callos embriogénicos a partir de segmentos nodales, B) Hojas inmaduras en posición abaxial, C) Segmentos de raíces con embriones somáticos

Figura 1. Explantes con formación de callos en *Dioscorea rotundata* var. 'Blanco de Guinea' cultivados en la oscuridad con Picloram 1,0 mg L⁻¹ durante 30 días



Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según la comparación de proporciones ($p \leq 0,05$)

Figura 2. Respuesta de formación de callos en diferentes tipos de explantes con 1,0 mg L⁻¹ de Picloram a los 30 días de cultivo

Los resultados con empleo de los segmentos nodales son comparables con los obtenidos por otros investigadores en esta misma especie (7), pero con el uso de otro tipo de explante, quienes utilizaron hojas con peciolo y obtuvieron más de un 66% de formación de callos bajo el efecto del Picloram 2,0 mg L⁻¹ en *D. rotundata* var. 'Alemán'.

Estos resultados indican la necesidad de seleccionar adecuadamente el tipo de explante, para la inducción de callo y la embriogénesis somática, particularmente en especies de plantas monocotiledóneas, donde las células se diferencian rápidamente, seguida de la pérdida de la capacidad mitótica y morfogenética.

Efecto de la concentración de Picloram

Los explantes de segmentos nodales cultivados en diversas concentraciones de Picloram, mostraron respuestas diferenciales a la formación de callo, con diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. En todos los tratamientos se evidenció formación de estructuras callos, excepto en el tratamiento control que no incluyó la presencia del regulador de crecimiento. A medida que se incrementó la concentración de la auxina, aumentó la formación de callos hasta alcanzar la mayor respuesta con 2,0 mg L⁻¹ de Picloram (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de formación de callos con diferentes concentraciones de Picloram a partir de segmentos nodales de ñame a los 30 días de cultivo

Tratamientos	Picloram (mg L ⁻¹)	Segmentos nodales
1	0,0	0 ^e
2	0,5	28 ^d
3	1,0	50 ^c
4	1,5	65 ^b
5	2,0	80 ^a

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de comparación de proporciones ($p \leq 0,05$)

En la máxima concentración de Picloram, se observaron masas embriogénicas de color amarillo (Figura 3A y B), así como embriones somáticos en etapa globular, que fueron separados con facilidad al no existir conexión vascular con el tejido materno (Figura 3C).

Estos resultados difieren de los obtenidos por otros autores (16), donde abordan que el empleo de 2,4-D, ANA y Picloram (1,0 mg L⁻¹), indujo la formación de callos en los explantes hojas y peciolas; sin embargo, para los segmentos nodales de *D. alata* variedades 'Kinampay y 'VU-2', después de seis semanas en la oscuridad, se comportó de manera similar, logrando un 78% de formación de callos, mientras que en peciolas y hojas los callos eran de consistencia blanda y con más del 50% de su área necrosada, debido a los compuestos fenólicos exudados de las zonas de los cortes.

Los resultados de la presente investigación contrastan con los publicados previamente, donde al utilizar mayores concentraciones de Picloram 9,0 mg L⁻¹, se obtuvieron resultados inferiores al 43 % en brotes axilares (5). Por tal razón, se plantea que, en algunas especies vegetales, se requiere combinar el Picloram con otras auxinas como 2,4-D para inducir la formación de callos embriogénicos (17).

El Picloram se ha empleado con éxito para la inducción de callos embriogénicos friables en cultivos de raíces y tubérculos, especialmente yuca (*Manihot esculenta*), boniato (*Ipomoea batatas*) y ñame (12,16). En este sentido, se demostró que es posible inducir masas pro-embriogénicas en ñame espino, con un porcentaje superior al 90 %, a partir de hojas con peciolo bajo el efecto de una concentración de 2 mg L⁻¹ de Picloram (18).

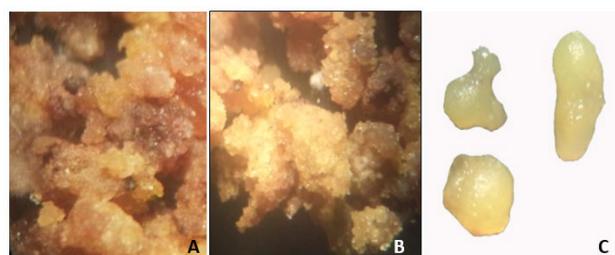
Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente experimento demuestran el papel imprescindible que desempeña el Picloram en la formación de callos, obteniéndose los mejores resultados en los explantes procedentes de segmentos nodales.

CONCLUSIONES

Se alcanza el 80 % de segmentos nodales con formación de callos embriogénicos, de color pardo-amarillento, consistencia compacta y friables, con empleo de 2,0 mg L⁻¹ de Picloram en *Dioscorea rotundata* var. 'Blanco de Guinea'

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero y material aportado por el programa de la Secretaría de Educación



AB) Callos con masas de embriones somáticos de ñame. C) Embriones somáticos en etapa globular

Figura 3. Callos embriogénicos de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir var. 'Blanco de Guinea' en medio de cultivo MS con Picloram 2,0 mg L⁻¹ a los 30 días de cultivo

Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de Bélgica (VLIR), coordinado por la Universidad de Gent, en el marco del proyecto «Biotecnología *in vitro* de plantas para el incremento de la seguridad alimentaria en la región oriental de Cuba», que se desarrolla en la Universidad de Granada

BIBLIOGRAFÍA

- González JE, Rodríguez Y. Yam's Potentials as Basis of Nutritional Security Programs in Underdeveloped Tropical Regions. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 2019;20(4):15149-53. doi: 10.26717/BJSTR.2019.20.003474.
- Ywih H, Kor K, Bin S. Influence of miniset size of purple yam (*Dioscorea alata*) towards the seedling emergence and growth rate in production of seed yam. International Journal of Applied Research. 2017;3(4):367-70. Available from: <https://www.allresearchjournal.com/archives/?year=2017&vol=3&issue=4&part=F&ArticleId=3562>.
- Walsen A, Polnaya F, Lesilolo MK, Rehatta H, Lawalata IJ. The appropriate of plant propagation technology of yam (*Dioscorea alata* L) to reduce multiplication ratio. In: The 5th International Conference on Basic Sciences. IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series. 2020;1463:012029. doi:10.1088/1742-6596/1463/1/012029.
- Rayas A, López L, Medero VR, Basail M, Santos A, Martínez M. Conservación *in vitro* de cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.) bajo condiciones de crecimiento mínimo. Revista Agricultura Tropical. 2020;6(1):33-40. Available from: <http://ojs.inivit.cu/index.php?journal=inivit&page=rt&op=metadata&path%5B%5D=133&path%5B%5D=0>.

5. Manoharan R, Nath J, Tripathi L. Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *PlantCellTissOrganCult.* 2016;123(3):481-97. doi: [10.1007/s11240-016-1017-2](https://doi.org/10.1007/s11240-016-1017-2)
6. Rodríguez D, López J, Bermúdez I, Montano N, Rayas A, Basail M, et al. Regeneración de plantas de *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* Poir cultivar 'Blanco de Guinea' a partir de embriones somáticos. *Biología Vegetal.* 2018;18(3):175-80. Available from: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/591/pdf>.
7. Polanco H, Díaz LC, Carmona OE, Durango E, Beltrán JD, Suárez IE. Efecto del genotipo, tipo de explante y el Picloram en la inducción de la embriogénesis somática en *Dioscorea rotundata*. En: Durango ED, de Hoyos KM, Gomezcaeres LC, Polanco H, Beltrán JD, Suárez IE, et al., editores. *Biología aplicada al sector agropecuario en el departamento de Sucre. Núcleo Innovación y desarrollo de productos biotecnológicos (bioinsumos, bioproductos, bioprocesos) y biorremediación.* CECAR; 2019. p. 37-55. Available from: <https://es.scribd.com/document/435485944/Biologia-Aplicada-Al-Sector-Agropecuario-en-El-Departamento-de-Sucre>.
8. Rodríguez D, López J, Montano N, Rodríguez D, Oviedo N, Santos A, et al. Conversión a plantas de embriones somáticos de ñame cultivar 'Blanco de Guinea'. *Revista Agricultura Tropical.* 2019;5(2):46-51. Available from: <http://ojs.inivit.cu/index.php?journal=inivit&page=rt&op=captureCite&path%5B%5D=116&path%5B%5D=0>.
9. Chukwunalu O, Balogun M, Maroya N, Asiedu R. YIFSWA Research Brief: Improving Yam Micropropagation Series 2. Development of micropropagation system for yam (*Dioscorea* spp.) using somatic embryogenesis. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture. 2018.8 p. doi: [10.13140/RG.2.2.17246.38726](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17246.38726).
10. Kumar A, Chand S, Lata C, Sharma N, Dhansu P, Parshad J. Rapid, efficient direct and indirect regeneration protocol of *Dioscorea deltoidea* Wall. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 2017;40(4):237-40. doi: [10.1007/s40009-017-0562-5](https://doi.org/10.1007/s40009-017-0562-5).
11. Rodríguez D, López J, Montano N, Rayas A, Basail M, Beovides Y, et al. Formación de callos con estructuras embriogénicas en *Dioscorea rotundata* Poir cv. 'Blanco de Guinea'. *Biología Vegetal.* 2014;14(3):185-88. Available from: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/81/452>.
12. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum.* 1962;15(3):473-97. doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
13. Suárez L, Hernández MM. Efecto del Pectimorf® en el cultivo de ápices de plantas *in vitro* de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), clones 'CMC-40' y 'Señorita'. *Cultivos Tropicales.* 2015;36(4):55-62. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000400007&lng=es&tlng=es.
14. Asesor PN, Albornoz PL, Bulacio E. Evidencias del origen de una posible nueva entidad de *Dioscorea* (*Dioscoreaceae*) de las Sierras de Calilegua, Jujuy (Argentina). Un enfoque morfo-anatómico. *Lilloa.* 2019;56(2):1-17. doi: [10.30550/j.lil/2019.56.2/1](https://doi.org/10.30550/j.lil/2019.56.2/1)
15. Suárez IE, Torres LA, Litz R. Somatic Embryogenesis in Yam (*Dioscorea rotundata*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín.* 2011;64(2):6037-42. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472011000200001&lng=en&tlng=en.
16. Belarmino MM, Gonzales JR. Somatic embryogenesis and plant regeneration in purple food yam (*Dioscorea alata* L.). *Annals of Tropical Research.* 2008;30(2):22-33. doi: [10.32945/atr3022.2008](https://doi.org/10.32945/atr3022.2008).
17. Hernández E. Embriogénesis somática *in vitro* y aclimatación de plántulas obtenidas por organogénesis directa en *Heliconia* spp. [Tesis Doctoral]. [México]: Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas; 2013. 139 p. Available from: <https://1library.co/document/nzw521lz-embriogenesis-somatica-aclimatacion-plantulas-obtenidas-organogenesis-directa-heliconia.html>.
18. Torres MP, Durango E. Tolerancia al estrés salino en plantas de ñame espinoso (*Dioscorea rotundata* Poir). En: Durango ED, de Hoyos KM, Gomezcaeres LC, Polanco H, Beltrán JD, Suárez IE, et al., editores. *Biología aplicada al sector agropecuario en el departamento de Sucre. Núcleo Innovación y desarrollo de productos biotecnológicos (bioinsumos, bioproductos, bioprocesos) y biorremediación.* CECAR; 2019. p. 73-94. Available from: <https://es.scribd.com/document/435485944/Biologia-Aplicada-Al-Sector-Agropecuario-en-El-Departamento-de-Sucre>.