

EFFECTO DEL FOTOPERIODO Y DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA, Y ANALISIS HISTOLOGICO DEL PROCESO EN LA YUCA *Manihot esculenta* Crantz

Luciano Manrique S.*
William Roca **

COMPENDIO

Se evaluó el efecto de varios fotoperíodos en la formación de embriones somáticos en la yuca; se registró el efecto del BAP y del GA_3 en el desarrollo y la germinación de los embriones, y se realizó el análisis anatómico de la embriogénesis somática en la yuca. Fotoperíodos prolongados incrementaron notoriamente el número de explantes que formaron embriones somáticos; el BAP no fue básico en el desarrollo de los embriones somáticos mientras que el GA_3 fue fundamental en la germinación de los embriones y en su transformación en plantas. La inducción y diferenciación de las células embriogénicas se desarrolló en el promesofilo de las hojas inmaduras principalmente. La formación de los embriones somáticos siguió un patrón de origen multicelular.

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of different photoperiods on the formation of somatic embryos, assess the effect of BAP and GA_3 on embryo development and germination, and carry out an anatomical analysis of somatic embryogenesis of cassava. Prolonged photoperiods markedly increased the number of explants that formed somatic embryos. BAP was not basic to the development of somatic embryos, whereas GA_3 was fundamental to embryo germination and their transformation into plants. The induction and differentiation of the embryogenic cells involved the promesophyll of the immature leaves; in particular. Embryo formation in cassava follows a pattern of multicellular origin.

* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

** Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. A.A. 6713, Cali. Colombia.

1. INTRODUCCION

La embriogénesis somática in vitro, inducida por primera vez en 1958 por Steward cultivando explantes de la raíz de **Daucus carota**, se ha desarrollado en 32 familias, 81 géneros y 132 especies (Evans et al, 2); lo cual demuestra la amplia difusión de la embriogénesis asexual y que posiblemente sea una propiedad fundamental de las células somáticas vegetales.

La yuca ha sido una de las especies en las que la regeneración adventicia encontró inicialmente mayores dificultades. En 1978 Liu y Chen (7) y en 1979 Nair et al (11) intentaron infructuosamente regenerar plantas por medio del cultivo de callos, sólo en 1982 se logró la formación de embriones somáticos cultivando cotiledónes en el medio MS con 4 mg/l de 2, 4 - D (Stamp y Henshaw, 12) y en 1984 la formación y el desarrollo de embriones somáticos por medio del cultivo de hojas inmaduras (Stamp, 13).

Lo anterior representa la posibilidad de obtener plantas de yuca por medio de la embriogénesis somática in vitro. Si las plantas regeneradas presentan variabilidad genética, este sistema podría utilizarse en la selección de somaclones de yuca con atributos especiales; por el contrario, si las plantas permanecen fieles a su tipo, la técnica podría emplearse en la multiplicación de genotipos seleccionados.

A pesar de los avances logrados, aún persisten algunos problemas en la formación y desarrollo de los embriones somáticos en la yuca; el bajo porcentaje en la formación de embriones y de plantas regeneradas, y el desconocimiento de la anatomía del proceso, afectan la eficiencia de este sistema y no permiten la incorporación de otras técnicas de cultivo de tejidos.

Los objetivos del presente trabajo fueron la evaluación de diferentes fotoperíodos en la formación de embriones somáticos en la yuca; registrar el efecto de varias concentraciones de 6-benzylamino purina (BAP) y del ácido giberélico (AG₃) sobre el desarrollo y germinación de los embriones somáticos en la yuca; y caracterizar el proceso histológico de la embriogénesis somática en esta especie, con énfasis en el origen celular de los embriones somáticos.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. Efecto del fotoperíodo en la formación de embriones somáticos de la yuca.

En el trabajo, desarrollado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, hojas inmaduras de 3-7 mm de las variedades M-Col 22, obte-

nidas de plántulas desarrolladas in vitro por medio de ápices caulinares cultivados en el medio 4 E (CIAT, 1), se cultivaron en el medio Murashige y Skoog-MS (10) suplementado con 8 mg/l de 2, 4-D (Medio 1).

Los explantes se sometieron a los tratamientos: luz continua, doce horas de luz y doce horas de oscuridad, oscuridad continua y quince días de oscuridad seguidos de luz continua. La intensidad luminica (2000 lux) y la temperatura (28°C) permanecieron constantes.

Se utilizó un diseño completamente al azar, con diez repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por una caja de petrí con diez explantes. Se registró el número de explantes que formaron embriones somáticos. Se hicieron evaluaciones a 15, 20 y 25 días de incubación. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza y para la comparación de medias significativas de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan.

2.2. Efecto del BAP y el AG₃ sobre el desarrollo y la germinación de los embriones somáticos.

Explantes de la variedad M-Col 1505 se cultivaron en tres medios y se sometieron a diversas condiciones de incubación (Fig. 1). Los tratamientos se distribuyeron completamente al azar y se utilizaron 15 explantes con embriones somáticos en cada tratamiento.

Se evaluó el porcentaje de explantes con raíces y vastagos y el número promedio de estructuras foliares por tratamiento, después de 50 días de incubación en los medios con AG₃.

2.3. Histología de la embriogénesis somática.

Embriones inmaduros de la variedad M-Col 1505 se cultivaron en el medio 2 con 0.1 mg/l de BAP. Explantes incubados a luz continua durante 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 30 días se fijaron en AFA (ácido acético / formol/etanol, 5-90-5 v/v/v) durante 24 horas a 5°C.

Las muestras, embebidas en parafina, se cortaron transversalmente (5-8 micras) hacia el área de unión de los lóbulos, zona en la que proliferan los embriones somáticos, y se colorearon siguiendo el método de eosina-hematoxilina de Harris (Lee y Luna, 6). Para el montaje de las secciones coloreadas se utilizó el adhesivo sintético "Permaunt".

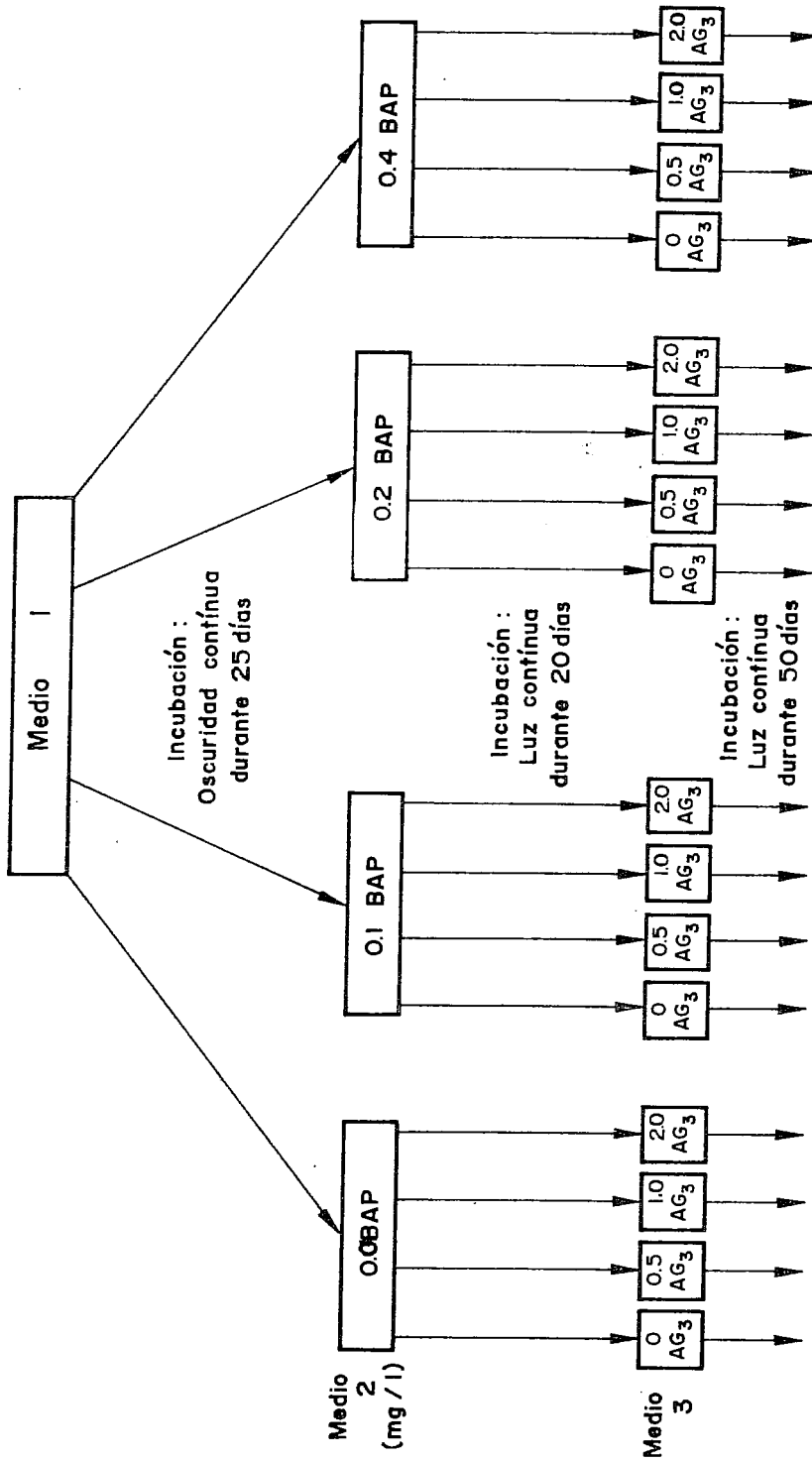


Fig 1. Etapas de evaluación del BAP y AG₃ en el desarrollo y germinación de embriones somáticos de la variedad M-Col 1505

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Efecto del fotoperíodo en la formación de los embriones somáticos.

La formación máxima de embriones inmaduros se presentó a los 15 días de incubación para los tratamientos de luz continua, 12 horas de luz y oscuridad continua. En el tratamiento de 15 días de oscuridad seguidos de luz continua, la máxima formación se registró a los 20 días de incubación.

Las dos variedades mostraron la misma tendencia, excepto el tratamiento de oscuridad continua en la variedad M-Col 22, en el cual la máxima formación de embriones ocurrió en el día 25.

Al tratamiento luz continua correspondieron los máximos valores, significativamente diferentes de los demás. En el tratamiento de oscuridad se presentó la mínima formación de explantes con embriones somáticos. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las variedades M-Col 22 y M-Col 1505.

La luz se ha considerado como el factor más importante para el cultivo de tejidos *in vitro* (Murashige, 10). Dado que el medio de cultivo contiene carbohidratos (sacarosa al 2 o/o), el efecto de la luz posiblemente no esté asociado con la fotosíntesis.

Hughes (4) ha sugerido que el efecto de la luz, sobre el desarrollo organizado de estructuras en la regeneración adventicia *in vitro*, sea fotomorfogénico; por lo cual su acción estaría determinada por la activación de pigmentos receptores apropiados, independientes de aquellos asociados con la fotosíntesis.

Aunque la luz no es factor indispensable en la formación de los embriones somáticos en la yuca, ya que éstos también se formaron en condiciones de oscuridad permanente, puede aumentar la eficiencia en la formación de los embriones cuando se utilizan fotoperíodos prolongados.

3.2. Efecto del BAP en el desarrollo de embriones somáticos de la yuca.

Algunos de los explantes cultivados durante 25 días en el medio 1 con 8 mg/l de 2, 4-D contuvieron embriones somáticos inmaduros; cuando estos embriones se transfirieron al medio 2 con diferentes concentraciones de BAP, continuaron su proceso de desarrollo hacia los estadios cotiledonares del embrión y la formación de estructuras amorfas parecidas a hojas.

El proceso de desarrollo fue más rápido en los medios que contenían mayores concentraciones de BAP (0.4 y 0.2 mg/l); sin embargo, los embriones

también se desarrollaron en el medio basal desprovisto de BAP.

Cuando los embriones en desarrollo se transplantaron medios de cultivos sin hormonas, en algunos casos ocurrió proliferación de estructuras amorfas parecidas a hojas; pero en ningún caso se diferenciaron plantas completas (Fig. 2). Los embriones desarrollados en el medio 2 sin BAP, no formaron ningún tipo de estructura.

Jacobsen (5) plantea que las citoquininas son importantes en el desarrollo de los estadios iniciales de embriones somáticos inmaduros. De acuerdo con Stamp (13) y CIAT (1) utilizando el medio de cultivo 2 con 0.1 mg / l de BAP, es posible regenerar plantas completas a partir de embriones inmaduros formados en el medio 1 con alta concentración de 2, 4 -D. Situación que no se registró en el ensayo debido posiblemente al corto período de incubación en este medio.

3.3. Efecto del AG_3 sobre la germinación de embriones somáticos de la yuca.

La presencia de AG_3 fue determinante para la germinación de los embriones somáticos y la formación de las plantas. En ausencia de AG_3 no ocurrió la germinación de los embriones.

No se presentaron grandes diferencias entre las concentraciones de AG_3 evaluadas con respecto a la formación de raíces, plantas y estructuras foliares amorfas, con excepción de la producción de estas últimas, que se redujeron casi a la mitad en el medio de cultivo con 2 mg/l.

Estos resultados sugieren que los embriones somáticos de la yuca, requieren del AG_3 para continuar su desarrollo y formación de las plantas (Fig. 2).

El modo de acción de las giberelinas en el cultivo de tejidos *in vitro* no está completamente claro; se supone que influyen en el crecimiento de los tejidos y en la formación de órganos en el cultivo de tejidos y que su efecto estaría asociado con el control del crecimiento y desarrollo de zonas meristemáticas (Jacobsen, 5).

La formación de las estructuras foliares amorfas se explica como el resultado de la desviación hacia una vía de desarrollo más limitada (Stamp, 13) y también ocurren sobre la superficie de hojas inmaduras de *Sorghum bicolor* cultivadas *in vitro* (Wernicke y Brettell, 15).

Concentración de BAP en el medio 2
(mg l⁻¹)

Concentración de AG₃ en el medio 3

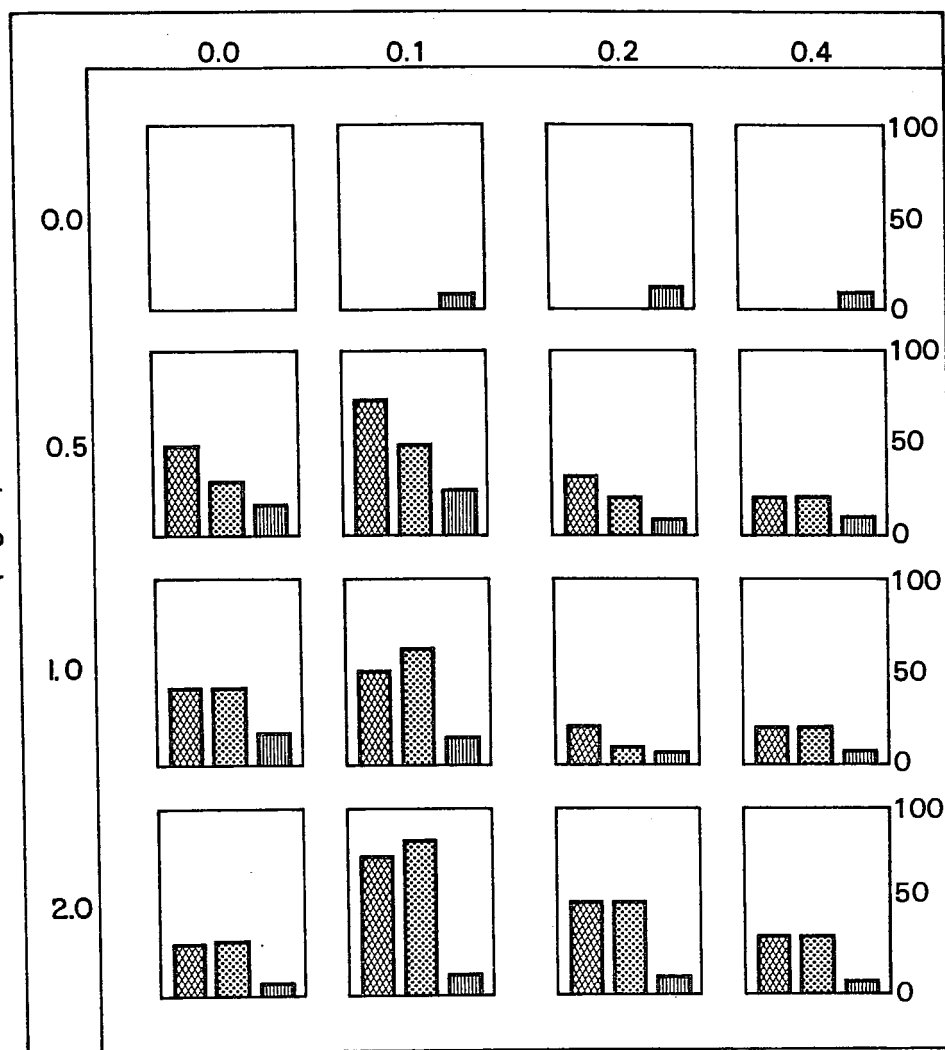


Fig 2. Efecto del AG₃ en la germinación de embriones somáticos de la variedad M-Col 1505, provenientes de diferentes concentraciones de BAP.



o/o explantes con raíces
o/o explantes con plántulas



No. promedio de estructuras foliares amorfas

Medio 1: MS + 8 mg/l de 2, 4-D

Medio 2: MS + 0.01 mg l de 2, 4-D + diferentes concentraciones de BAP

Medio 3: MS + diferentes concentraciones de AG

Nota: Los explantes se cultivaron inicialmente en el medio 1 para la formación de embriones somáticos inmaduros, en condiciones de oscuridad.

3.4. Interacción del BAP y el AG₃ en la germinación y desarrollo de embriones somáticos en la yuca.

Los embriones somáticos precultivados en el medio 2 con 0.1 mg/l de BAP y transferidos luego al medio 3 con diferentes concentraciones de AG₃, presentaron mayor formación de raíces y plantas. Sin embargo, cuando el nivel de BAP fue mayor de 0.1 mg/l se redujo la formación de raíces y plantas en los medios con AG₃ (Fig. 2).

La formación de raíces y plantas aumentó conforme se incrementaron los niveles de AG₃.

Como se discutió anteriormente, en este ensayo el BAP no resultó esencial para la germinación de los embriones somáticos y su transformación a plantas.

3.5. Análisis histológico de la embriogénesis somática en la yuca.

La embriogénesis somática en yuca (Cuadro 1) comprende la fase de inducción y diferenciación de las células competentes o embriogénicas (hasta el día 6-8 de incubación) y la fase de formación del embrión somático inmaduro (hasta el día 20-25 de incubación).

La formación de embriones somáticos involucra varias capas de células; este patrón de desarrollo está asociado con el origen multicelular de la embriogénesis somática (Fig. 3).

El patrón de formación de los embriones somáticos en la yuca es similar al seguido por embriones asexuales en *Triticum aestivum* (Ferguson *et al.*, 3), *Sorghum bicolor* (Wernicke y Brettell, 15) y *Pennisetum americanum* (Vasil, 14).

El origen multicelular de los embriones somáticos de la yuca y la presencia de estructuras organizadas asociadas con patrones de origen unicelular, requieren de la realización de estudios más específicos al respecto.

El uso potencial de la embriogénesis somática de origen multicelular podría ser el de proveer un sistema para la inducción de variantes somaclonales.

4. CONCLUSIONES

4.1. Los embriones somáticos tienden a aparecer en mayor proporción hacia los 15 y 20 días de incubación principalmente, independientemente

Cuadro 1

Anatomía y morfología de la embriogénesis somática a partir de hojas jóvenes de *Manihot esculenta* var. M-Col 1505

Morfología	Días Incubación	Anatomía
Hojas jóvenes de 3-7 mm, superficie adaxial verde brillante, superficie abaxial verde opaco.	0	Células grandes, uniformes, núcleo visible, uña epidermal y cuatro a cinco corticales; divisiones anticlinales y periclinales en forma regular.
No se observa variación sobre la superficie adaxial. En la superficie abaxial se observa la formación de callo friable.	4	Algunas divisiones anticlinales y periclinales hacia el promesofilo y la vena central. Células de estas zonas con citoplasma más denso; las células epidermales no revelan cambios.
El explante empieza a variar de tono a amarillo crema; se incrementa la formación de callo friable en la superficie abaxial.	6	Sectorios de divisiones activas hacia el promesófilo y zonas aledañas a la vena media; proliferación de células con citoplasma denso, núcleo grande prominente.
Formación de tejido embriogénico más organizado que el callo friable, sobre la superficie adaxial hacia el punto de unión de los lóbulos.	8	Divisiones anticlinales, periclinales y oblicuas. Las células involucradas con estas divisiones tienen núcleo grande, citoplasma denso y nucleolo prominente, siendo ahora más comunes.
La hoja se torna amarillo crema, estructuras embriogénicas sobre la superficie abaxial; crecimiento de callo friable.	12	Levantamientos o "protuberancias". Se observan agrupaciones celulares organizadas hacia el interior.
Se comienza a percibir la formación de embriones somáticos. También se observa proliferación de callo friable.	14	Las "protuberancias" se acentúan, involucrando varias capas de células.
Embriones somáticos en los primeros estados de desarrollo.	18-20	Las "protuberancias" conforman estados iniciales de embriones somáticos. Se observan los estados iniciales de cotiledones.
Embriones somáticos formados.	30	En los embriones somáticos se observan los cotiledones, el meristemo apical, la radícula y el tejido vascular.

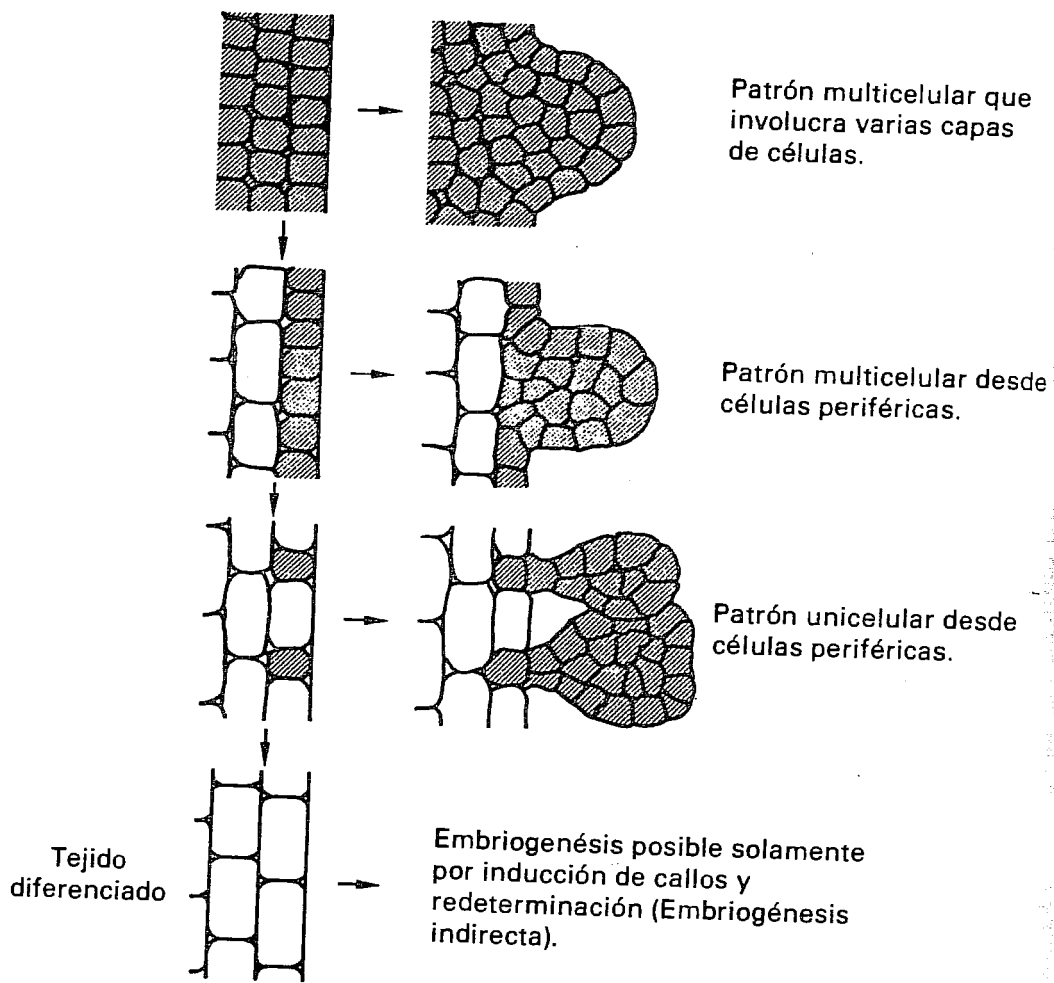


Fig 3. Probable relación de los patrones de origen multicelular y unicelular de la embriogénesis somática directa (Macheswaran y Williams, 8).
 Los sectores sombreados indican células embriogénicas.

te del fotoperíodo y la variedad utilizadas.

- 4.2. Fotoperíodos prolongados incrementaron notoriamente la formación de explantes con embriones somáticos.
- 4.3. El BAP no fue básico para el desarrollo de los embriones.
- 4.4. El AG₃ fue fundamental para la germinación de los embriones somáticos y su transformación en plantas.
- 4.5. La embriogénesis somática en la yuca se puede dividir en dos etapas secuenciales: inducción y diferenciación de las células embriogénicas hasta el sexto u octavo días de incubación y formación de embriones somáticos, hasta el 20 o 25 días de incubación.
- 4.6. La incubación y diferenciación de las células embriogénicas se desarrolla en el promesofilo de las hojas inmaduras, principalmente.
- 4.7. El patrón de formación de los embriones somáticos en la yuca sugiere un origen multicelular.

5. BIBLIOGRAFIA

- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Cassava annual report, 1985.
2. EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; FLICK, C. E. Growth and behavior of cells cultures: embryogenesis and organogenesis. En: THORPE, T. A. (ed.). Plant tissue culture methods and applications. New York, Academic Press, 1981. p. 45-113.
 3. FERGUSON, J. D.; McEWAN, J. M.; CARD K. A. Hormonally induced polyembryos in wheat. *Physiol. Plant (Dinamarca)* v. 45, p. 470-474. 1979.
 4. HUGHES, K. W. In vitro ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environ. Exp. Bot.* v. 21, p. 281-288. 1981.
 5. JACOBSEN, L. Biochemical mechanism of plant hormone activity. En: Evans D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V; Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. New York, McMillan, 1983. v. 1. p. 672-695.
 6. LEE, G.; LUNA, H. T. Manual of histological staining methods of armed forces institute of pathology. New York, McGraw Hill, 1968. p. 38-39.

7. LIU, M. C.; CHEN, W. H. Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers. *Can. J. Bot.* v. 56, p. 1287-1290. 1978.
8. MAHESWARAN, G.; WILLIAMS, E. G. Origin and development of somatic embryos of *Trifolium repens* in vitro. *Ann. Bot. (Inglaterra)* v. 56, p. 619-630. 1985.
9. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant (Dinamarca)* v. 15, p. 473-497. 1962.
10. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* v. 25, p. 135-165. 1974.
11. NAIR, N. G.; KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L. Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristems of cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and the culture of internodes in vitro. *Z. pflanzen physiol. (Alemania)* v. 95, p. 51-56. 1979.
12. STAMP, T. A.; HENSHAW, G. G. Somatic embryogenesis in cassava. *Z. Pflanzenphysiol. (Alemania)* v. 105. p. 183-187. 1982.
13. STAMP, J. A. In vitro plant regeneration studies with cassava, *Manihot esculenta* Crantz. Birmingham University, 1984. 359 p. (Ph D. Thesis).
14. VASIL, V. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet, *Pennisetum americanum*. *Ann. Bot. (Inglaterra)* v. 47, p. 669-678. 1981.
15. WERNICKE, W.; BRETTELL, R. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature (Inglaterra)*: v. 287, p. 138-139. 1980.