

# INDUCCION DE CALLO EMBRIOGENICO FRIABLE (CEF) EN CLONES DE YUCA (*Manihot esculenta*, Crantz) Y MEJORAMIENTO DE LA REGENERACION DE PLANTAS USANDO EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL

D. López<sup>1</sup>, J. E. Montoya<sup>1</sup>, R. H. Escobar<sup>1</sup>, P. Chavariaga<sup>1</sup>, W. M. Roca<sup>2</sup> y J. Tohme<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT <sup>2</sup> Centro Internacional de la Papa -CIP, A.A 1558, Lima 12, Perú



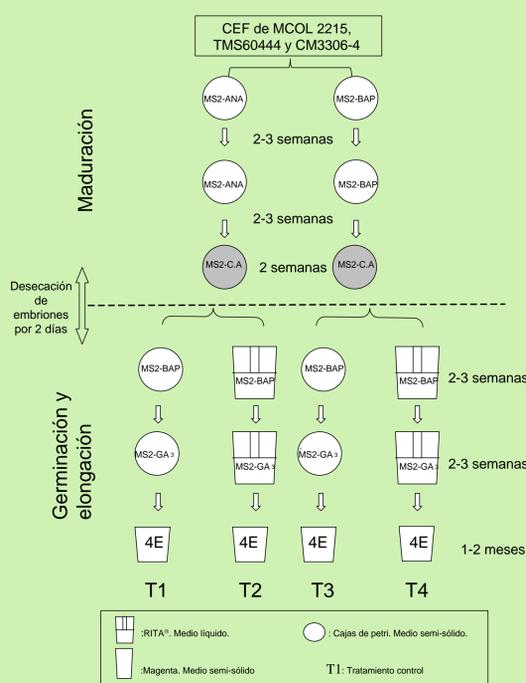
## Introducción

El CEF ofrece ventajas para la transformación genética de yuca (menos quimerismo, mayor número de embriones, entre otros), aunque la regeneración de plantas es aún subóptima. En este trabajo se resumen los logros en la obtención de CEF en clones comerciales de yuca, y la regeneración de plantas a partir de CEF usando medios semi-sólidos y líquidos (sistema de inmersión temporal RITA®). Reportamos una mejora significativa en la conversión de embrión a planta, lo que constituye un aporte al proceso de obtención de plantas transgénicas.

## Metodología

Se utilizaron estructuras embriogénicas de varios clones de yuca (Tabla 1), inducidas a partir de lóbulos de hojas inmaduras y yemas axilares en medio semi-sólido MS (Murashige and Skoog, 1962) más 2,4-D, las cuales se transfirieron a medio semi-sólido GD (Gresshoff and Doy, 1974) más picloram para inducir CEF (Taylor et al.1996). Con algunos de los clones, TMS60444, MCOL2215 y CM3306-4 en los que se indujo CEF, se evaluaron 4 tratamientos (Figura 1) de regeneración de plantas, que comprendían desde maduración de embriones con ANA y BAP, hasta la germinación y elongación de plantas de cada una de las variedades. El tratamiento 1 es el método convencional de regeneración en medios semi-sólidos, y es utilizado como control.

**Figura 1.** Maduración, elongación y germinación de embriones somáticos derivados de CEF de tres clones de yuca. Los tratamientos T1 a T4 indican los diferentes tratamientos de elongación y germinación usando medios semi-sólidos o líquidos en RITA®. También se muestra la duración (semanas o meses) del cultivo en cada medio.



## Resultados y Discusión

**Tabla 1.** Inducción de estructuras embriogénicas y CEF en diez clones de yuca.

Clon de Yuca	Número de hojas (h) o yemas axilares (y) utilizadas para inducción de estructuras embriogénicas (EE) (columna izquierda) y porcentaje de explantes produciendo EE		Número de grupos de EE (en paréntesis) usada para inducción de CEF, y porcentaje promedio de EE produciendo CEF	Tiempo (días) requerido para la aparición de CEF
	Número	%		
MTai8	(h) 144	64.5	(135) 50.3 <sup>2</sup>	24
	(y) 140	33.5		
CM3306-4	(h) 55	83.6	(93) 37.6 <sup>3</sup>	24
	(y) 82	50		
CM523-7	(h) 87	55.1	(45) 40 <sup>2</sup>	46
	(y) 64	62.5		
CM4574-7	(h) 63	33.3	0	-
	(y) 111	54		
CM6740-7	(h) 101	48.5	(41) 2.4 <sup>2</sup>	25
	(y) 144	39.5		
Mbra383	(h) 88	2.2	0	-
	(y) 84	13.1		
SM909-25	(h) 42	62	0	-
	(y) 48	60.4		
SM1219-9	(h) 69	33.3	(28) 53.5 <sup>3</sup>	44
	(y) 47	6		
Mcol 2215	(h) 60	96.0	(58) 13.7 <sup>2</sup>	40
	(y) ND	6		
TMS60444	(h) 60	38.0	(23) 4.7 <sup>2</sup>	80
	(y) ND	6		

(1) Los clusters de estructuras embriogénicas inducidos de hojas y yemas axilares fueron mezclados para inducción de CEF; (2) El CEF fue inducido pero no proliferado; (3) Se indujo y se establecieron líneas celulares de CEF; (N.D) no se hizo.

Todos los clones de yuca respondieron en diferente grado a la inducción de estructuras embriogénicas, con valores que fluctuaron entre 2.2 y 96%, resultando aparentemente más embriogénicos los lóbulos que las yemas (Tabla 1). La inducción y proliferación de CEF fue genotipo-dependiente, generando CEF siete de los diez clones estudiados, de los cuales se logró establecer líneas celulares en cuatro clones. Además se observaron diferencias en el porcentaje de estructuras embriogénicas que generaron CEF (53.5 – 2.4%), y en el tiempo empleado (24 – 80 días) para comenzar a producirlo (Tabla 1).

En la regeneración de plantas, Los análisis estadísticos del número de embriones maduros y el número de plantas regeneradas de CEF (Tabla 2), mostraron diferencias entre clones, con dependencia del tratamiento hormonal y el tipo de medio (semi-sólido o líquido).

**Figura 2.** Proceso de inducción de CEF hasta regeneración de plantas utilizando el sistema de inmersión temporal RITA®.



Los análisis de la relación entre clones y hormonas determinaron asociaciones significativas. El clon TMS 60444 produjo más embriones y más plantas con ANA, y los clones MCOL2215 y CM3306-4 lo hicieron con BAP (prueba X<sup>2</sup> con 2 df, a=95%, p=0,001) (Tabla 3). Independientemente del clon y la hormona utilizada, comparando el número de plantas obtenidas en medio líquido o semi-sólido (prueba X<sup>2</sup> con 1df, a=95%, p=0,215), el 79% de las plantas regeneradas provinieron de medios líquidos en RITA® (T2 y T4); además se obtuvieron plantas de aspecto más normal y vigoroso que las de medio semi-sólido (Figura 2). La interacción entre clones y el medio líquido o semi-sólido fue significativa (prueba X<sup>2</sup> con 2df, a=95%, p=0,012). Los mayores porcentajes de plantas recuperadas de cada clon siempre fueron en medio líquido en RITA® (Tabla 4).

**Tabla 2.** Respuesta del CEF de tres clones de yuca a tratamientos para conversión de embrión a planta (columna 3) y regeneración de plantas (columna 4) usando hormonas ANA y BAP en medio semi-sólido (S) o inmersión temporal en medio líquido (L) con RITA®. El número total de grupos de CEF por tratamiento (filas) fue de 27. Cada grupo de CEF pesaba aproximadamente 14 mg.

Clon de Yuca	Medio	Número total de embriones maduros recuperados	Plantas recuperadas	Tasa de conversión de embrión a planta (%)	Número de plantas recuperadas por 14 mg de CEF
CM3306-4	ANA (L)	40	13	32.5000	0.4815
Mcol2215	ANA (L)	0	0	0.0000	0.0000
TMS60444	ANA (L)	247	63	25.5061	2.3333
CM3306-4	ANA (S)	19	0	0.0000	0.0000
Mcol2215	ANA (S)	9	1	11.1111	0.0370
TMS60444	ANA (S)	190	24	12.6316	0.8889
CM3306-4	BAP (L)	162	69	42.5926	2.5556
Mcol2215	BAP (L)	46	7	15.2174	0.2933
TMS60444	BAP (L)	35	8	22.8571	0.2963
CM3306-4	BAP (S)	148	12	8.1081	0.4444
Mcol2215	BAP (S)	43	4	9.3023	0.1481
TMS60444	BAP (S)	29	2	6.8966	0.0741

**Tabla 3.** Efecto del clon y hormona (ANA o BAP) sobre el porcentaje de plantas recuperadas después de la maduración, germinación y elongación de embriones somáticos obtenidos de CEF. Se destaca en rojo el mayor porcentaje de plantas recuperadas de cada clon.

		CM3306-4	Mcol2215	Mnig11	Total de plantas (%)
NAA	# de plantas	13	1	87	101
	Columna (%)	6.40	0.49	<b>42.86</b>	(49.75)
BAP	# de plantas	81	11	10	102
	Columna (%)	<b>39.9</b>	<b>5.42</b>	4.93	(50.25)
Total	# de plantas	94	12	97	203
	Columna (%)	(46.31)	(5.91)	(47.79)	(100)

**Tabla 4.** Efecto del clon y el tipo de medio (líquido o semi-sólido) sobre el porcentaje de plantas recuperadas de los tres clones de yuca, después de la maduración, germinación y elongación de embriones somáticos obtenidos de CEF. En rojo, mayor porcentaje de plantas recuperadas de cada clon.

		CM3306-4	Mcol2215	Mnig11	Total de plantas (%)
Líquido	# de plantas	82	7	71	160
	Columna (%)	<b>40.39</b>	<b>3.45</b>	<b>34.98</b>	(78.82)
Semi-sólido	# de plantas	12	5	26	43
	Columna (%)	5.91	2.46	12.81	(21.18)
Total	# de plantas	94	12	97	203
	Columna (%)	(46.30)	(5.91)	(47.79)	(100%)

## Conclusiones

- La inducción y proliferación de CEF es dependiente del genotipo.
- La eficiencia del sistema de regeneración de plantas partiendo de embriones somáticos derivados de CEF es dependiente del genotipo.
- El sistema RITA® aumenta significativamente la conversión de embrión a planta.
- Los hallazgos tanto en la obtención de CEF en nuevas variedades, así como el refinamiento del proceso de regeneración de plantas a partir de este tipo de tejido, contribuyen a beneficiar los procesos de transformación genética en yuca.

## Referencias

- Gresshoff P, Doy C (1974) Z pflanzenphysiol 73:132-141
- Murashige T and Skoog F (1962) Physiol. Plant 15:473-497
- Schenk R, Hildebrandt A (1972) Can J Bot 50: 199-204
- Taylor et al (1996) Nature Biotechnol 14: 726-730