

RESCATE DE EMBRIÓN CIGÓTICO EN *Dioscorea cayenensis* subesp. *rotundata*

Aymé Rayas Cabrera*, Víctor R. Medero Vega, Yuniel Rodríguez García, Dayana Rodríguez González, Arletys Santos Pino y Marilyn Martínez Pérez.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo CP: 53000, Villa Clara, Cuba

*Autora para correspondencia: concerv.biotec@inivit.cu

Recibido: 15 de marzo de 2024; Aceptado: 12 de junio de 2024

RESUMEN

El término de "rescate de embriones" se refiere al cultivo *in vitro* de embriones híbridos que resulten de cruzamientos y de semillas de plantas con un periodo de latencia prolongado, con el propósito de reducir el tiempo de latencia de las semillas y promover el desarrollo de un embrión inmaduro en una planta viable. Además, esta técnica facilita el estudio en campo de los híbridos obtenidos, porque las plantas germinadas pueden almacenarse y multiplicarse *in vitro*, lo cual permite realizar agrupaciones de progenies según el diseño experimental a utilizar en campo y la planificación de su siembra. Todo lo cual hace que la germinación de las semillas *in vitro* (basada en el rescate de los embriones) juegue un rol importante en la generación de plantas híbridas. El presente trabajo se realizó con el objetivo de rescatar los embriones de las semillas obtenidas en el Programa de mejora genética de *Dioscorea* a partir de cruces entre progenitores conocidos. El procedimiento para su realización incluye cuatro etapas: selección y desinfección de semillas; establecimiento y germinación *in vitro* de embriones cigóticos; crecimiento de embriones cigóticos y aclimatización de las plantas. Se utilizaron 20 semillas obtenidas por hibridación en campo a partir de parentales conocidos de *Dioscorea cayenensis* subesp. *rotundata*, en el programa de hibridación del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Se obtuvieron cinco plantas a partir de semillas, solo un embrión cigótico se desarrolló hasta formar planta y mediante ocho subcultivos se obtuvieron 54 plantas *in vitro*, que se aclimatizaron con un porcentaje de sobrevivencia de 75%. Las plantas adaptadas se plantaron en montículos en condiciones semicontroladas para la producción de minitubérculos y posteriormente se sembraron en campo para el estudio agronómico.

Palabras clave: híbridos, mejoramiento genético, ñame

CYGOTIC EMBRYON RESCUE IN *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata*

ABSTRACT

The term "embryo rescue" refers to the *in vitro* cultivation of hybrid embryos resulting from crosses and seeds of plants with a prolonged dormancy period, with the purpose of reducing the dormancy time of the seeds and promoting the development of an immature embryo into a viable plant. In addition, this technique facilitates the field study of the hybrids obtained, because the germinated plants can be stored and multiplied *in vitro*, which allows grouping of progenies according to the experimental design to be used in the field and the planning of their sowing. All of which makes *in vitro* seed

germination (based on embryo rescue) play an important role in the generation of hybrid plants. The present work was carried out with the aim of rescuing embryos from seeds obtained in the *Dioscorea* breeding program from crosses between known parents. The procedure for its realization includes four stages: Selection and disinfection of seeds; Establishment and *in vitro* germination of zygotic embryos; Growth of zygotic embryos and Acclimatization of plants. Twenty seeds obtained by field hybridization from known *Dioscorea cayenensis* subsp. *rotundata* parents were used in the hybridization program of the Tropical Roots and Tuber Crops Research Institute. Five plants were obtained from seeds, only one zygotic embryo developed to form a plant and through eight subcultures 54 plants were obtained *in vitro*, which were acclimatized with a survival rate of 75%. The adapted plants were planted in mounds under semi-controlled conditions for the production of minitubers and subsequently planted in the field for agronomic study.

Keywords: hybrids, breeding, yams

INTRODUCCIÓN

Dioscorea L. (*Dioscoreaceae*) es un género distribuido en todo el mundo, que cuenta con alrededor de 650 especies que habitan las regiones templadas y tropicales, especialmente en el Neotrópico (Couto *et al.*, 2018). Se caracteriza por la predominancia de plantas dioicas (Waizel-Bucay, 2009), lo que hace que los Programas de mejoramiento del cultivo deban estar dirigidos a la polinización cruzada. Se atribuye la falta de producción natural de semillas sexuales de ñame a la pobre sincronización existente entre plantas femeninas y masculinas, a la ausencia de polinizadores naturales y a la práctica común de establecer un solo cultivar en áreas pequeñas (Rodríguez, 2000; González, 2012).

El fruto del ñame es una cápsula de 1-3 cm de largo, con tres compartimientos o lóculos (Monteiro y Peressin, 2002). En la unión de los lóculos se presentan alas planas, por donde, al secar el fruto se produce la dehiscencia o abertura del fruto, para dar paso a la dispersión de la semilla. Cada lóculo contiene dos semillas, pero en el campo una o ambas pueden fallar en su germinación.

Bakry y Horry (1992), asumen que la germinación de las semillas procedentes de polinizaciones controladas en condiciones de invernadero es muy baja (0-25%, según el tipo de cruzamiento), sin embargo, mediante el uso de la técnica del rescate de los embriones cigóticos *in vitro*, ha sido posible incrementar el porcentaje de germinación hasta un 95%, además del ahorro de tiempo que se logra.

La propagación de este cultivo por semilla sexual presenta dificultades ya que son plantas dioicas y con flores pequeñas (Acosta, 1987). Debido a su alta heterocigosidad, los cultivos y cultivares élite son propagados vegetativamente (Kadota y Niimi, 2004). Para esto, se emplean segmentos de tallos, bulbillos aéreos y tubérculos enteros o segmentos de los mismos.

El término "rescate de embriones" se refiere al cultivo *in vitro* de embriones híbridos que resulten de cruzamientos y de semillas de plantas con un periodo de latencia prolongado, con el propósito de reducir el tiempo de latencia de las semillas y promover el desarrollo de un embrión inmaduro en una planta viable (Litz, 1991). Además, esta técnica facilita el estudio en campo de los híbridos obtenidos, porque las plantas germinadas pueden almacenarse y multiplicarse *in vitro*, lo cual permite realizar agrupaciones de progenies según el diseño experimental a utilizar en campo y la

planificación de su plantación. Todo lo cual hace que la germinación de las semillas *in vitro* (basada en el rescate de los embriones) juegue un rol importante en la generación de plantas híbridas (Ortiz, 2013).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de rescatar *in vitro* los embriones de las semillas obtenidas en el programa de mejora genética de *Dioscorea* a partir de cruces entre progenitores conocidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de lograr la germinación de las semillas obtenidas en el Programa de mejora genética de *Dioscorea cayenensis* subesp. *rotundata* Poir., se realizó el procedimiento que incluye las etapas siguientes:

1. Selección y desinfección de semillas.
2. Establecimiento y germinación *in vitro* de embriones cigóticos.
3. Crecimiento de embriones cigóticos.
4. Aclimatización de las plantas.

Se utilizaron 20 semillas obtenidas por hibridación en campo a partir de parentales conocidos de *Dioscorea rotundata* Poir., en el Programa de fitomejoramiento del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales. Las semillas se llevaron al Laboratorio de Cultivo de Tejidos, se enjuagaron vigorosamente con agua corriente, se lavaron con detergente comercial y posteriormente se realizó su desinfección. Para esto se utilizaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (0,5 y 1,0 %), durante 20 minutos. Seguidamente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Con ayuda de bisturíes y microscopio estereoscopio se extrajo el embrión y se incubó en medio de cultivo MS (1962) sin hormonas.

Las plántulas obtenidas se multiplicaron por seccionado de los segmentos nodales con una yema axilar, se utilizó un medio de cultivo compuesto por las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), complementado con cisteína (20,0 mg.L⁻¹); 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa y 5,0 g.L⁻¹ de Agar-E (Biocen). El pH se ajustó a 5,7 con NaOH 0,5 N o HCl 0,5 N antes de la esterilización por 20 minutos en autoclave vertical (BK75). Las condiciones de cultivo fueron: temperatura 27 ± 2 °C y régimen de 16 horas luz por día (DFFF de 62-68 μmol m⁻²s⁻¹).

La aclimatización de las plantas *in vitro* se realizó en umbráculos o casas de cultivo destinadas para este fin, bajo condiciones semicontroladas de iluminación y riego. La plantación se realizó en el mes de abril, en bandejas de polietileno de 70 alvéolos de 120 cm³ de capacidad, como sustrato se empleó compost y se cubrió la bandeja con nylon transparente durante 15 días para evitar la acción del aire sobre las plántulas.

Con el objetivo de obtener minitubérculos, las plantas aclimatizadas se transfirieron a cámaras con malla de sombreo y se plantaron en montículos. Se les colocaron tutores para evitar el contacto de las hojas con el suelo y se mantuvieron durante seis meses, hasta la senescencia foliar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el establecimiento *in vitro* de las semillas híbridas se pudo apreciar alto nivel de contaminación por bacterias. Tres días después de la siembra se observó un exudado de color crema y aspecto viscoso alrededor de los embriones sembrados. A partir de las 20 semillas sembradas 15 se contaminaron, las tratadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5% se contaminó el 100% y al 1% el 50% (Tabla 1). Resultados

similares se obtuvieron por Vargas y Abdelnour (2010), quienes cultivaron *in vitro* embriones cigóticos de *Geophila macropoda*.

Tabla 1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio en la desinfección de las semillas.

Tratamientos	Semillas sembradas	Porcentaje de contaminación	Semillas germinadas
Desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5%	10	100	0
Desinfección con hipoclorito de Sodio (NaClO) al 1%	10	50	5

Los cinco embriones no contaminados germinaron, pero sólo un fue viable para la multiplicación (Figura 1)



Figura 1. Embrión cigótico obtenido: A. Germinación, B. Multiplicación, C. Evolución

Mediante ocho subcultivos se obtuvieron 54 plantas *in vitro*. Se plantaron 48 plantas, de ellas sobrevivieron 36, para un 75%. Las plantas adaptadas se plantaron en montículos para la producción de minitubérculos (Figura 2).



Figura 2. Plantas adaptadas del híbrido de *Dioscorea cayenensis* subesp. *rotundata* propagado por rescate de embrión cigótico, plantados en montículos para producción de minitubérculos.

Los minitubérculos obtenidos se clasificaron según su peso en cinco grupos (Tabla 2, Figura 3), se apreció mayor formación de minitubérculos pequeño, inferiores a 10 g de peso, por lo que se sugiere en próximos cultivos de embriones cigóticos, realizar la aclimatización a partir del mes de marzo para que la producción de minitubérculos sea más eficiente, ya que debido al carácter estacionario del cultivo de ñame invariablemente ocurrirá senescencia foliar a partir del mes de enero.

Tabla 2. Clasificación de los minitubérculos del híbrido obtenidos, según su peso.

Categoría	Rango de peso	Cantidad minitubérculos	Peso
I	≤ 3 g	26	37,49 c
II	3,1 – 5 g	24	93,19 b
III	5,1 – 10 g	22	153,55 a
IV	10,1 – 15 g	5	58,68 c
V	>15 g	6	141,00 a

* Medias con letras no comunes difieren significativamente por prueba de Tukey para $p < 0,05$.



Figura 3. Minitubérculos formados a partir de las plantas obtenidas *in vitro* por cultivo de embrión cigótico.

CONCLUSIÓN

La aplicación práctica del rescate de embriones cigóticos en el programa de mejoramiento genético clásico en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales de Cuba posibilitó la generación de un híbrido de la especie *Dioscorea rotundata*

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, E.M.C. 1987. El cultivo del Ñame *Dioscorea* spp. 2ª ed. TOA. Santa Fe de Bogotá, Colombia, 79 p.
- BAKRY, F. 2008. Zygotic embryo rescue in bananas. *Fruits* 63: 111-115 DOI: <https://doi.org/10.1051/fruits:2007053>.
- BAKRY, F.; HORRY, J.P. 1992. Tetraploid hybrids from interploid 3x × 2x crosses in cooking bananas. *Fruits* 4: 641-647.
- COUTO, R.S.; MARTINS, A.C.; BOLSON, M.; LÓPEZ, R.C.; SMIDT, E. and J.M., BRAGA. 2018. Time calibrated tree of *Dioscorea* (*Dioscoreaceae*) indicates four origins of yams in the Neotropics since the Eocene. *Botanical Journal of the Linnean Society* 188(2): 144-160. DOI: <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy052>.
- GONZÁLEZ VEGA, M.E. 2012. El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. Review. *Cultivos Tropicales* 33(4): 5-15 <http://www.ediciones.inca.edu.cu>.
- KADOTA, H. and NIIMI, Y. 2004. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. *Sci. Hort.* 102: 461-466.
- LITZ, R.E. 1991. Cultivo de embriones y óvulos. En: Roca WM, Mroginski LA (eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali p 296-312.
- MONTEIRO, D.A. and PERESSIN, V.A. 2002. Culture do inhame. In: Cereda, M. P. (Ed). Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas. Sao Paulo: Fundacao Cargil. p. 511-522.
- ORTIZ, R. 2013. Conventional Banana and Plantain Breeding. En: Bergh I, Amorin EP. Jonhson V Proceedings of the international ISHS- Promusa Symposium on bananas and plantain: Towards Sustainable Global Production and Improved Uses, *Acta Horticulturae* 986 ISHS.
- PÉREZ CAMACHO, J. and RAZ, L. 2017: *Dioscoreaceae*. – In: Greuter, W. & Rankin Rodríguez, R. (ed.), Flora de la República de Cuba, Ser. A, Plantas vasculares, Fasc. 22.
- RODRÍGUEZ, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana* 11(2): 133-152. [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
- WAIZEL-BUCAJ, J. 2009. El uso tradicional de las especies del género *Dioscorea*. *Revista de fitoterapia* 9(1): 53-67 www.fitoterapia.net.