

# ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA: UNA NECESIDAD PARA EL CONOCIMIENTO DE LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS Y LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD EN EL CULTIVO DEL BONIATO (*IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM.)

O. S. González Paneque<sup>1</sup>, O. Sam Morejón<sup>2</sup>, M. Hernández Espinosa<sup>3</sup>, M. J. Coronado<sup>4</sup> y J. J. Silva Pupo<sup>1</sup>

- 1 CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, UNIVERSIDAD DE GRANMA, APDO. 21, BAYAMO, GRANMA, CUBA, E-MAIL: ogpaneque@udg.co.cu
- 2 DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS.
- 3 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO DE LAS PLANTAS, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, GAVETA POSTAL 1, SAN JOSÉ DE LAS LAJAS, LA HABANA, CUBA.
- 4 CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, MADRID, ESPAÑA.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) ofrece diversas ventajas económicas para muchos países y en especial para Cuba, ya que se puede emplear en la alimentación humana y animal, así como en la industria.

Las técnicas de cultivo de tejidos son utilizadas para una rápida propagación de plantas, como una fuente importante de información genética en células vegetales y regeneración de algunas ca-

racterísticas (MAXIMOTA *et al.*, 2002; HITA *et al.*, 2003); siendo necesario conocer los aspectos de diferenciación celular y la histogénesis para poder entender mejor la organogénesis (VIEIRA & ESQUIBEL, 1998). La embriogénesis somática es altamente dependiente de la especie, el genotipo, el estado fisiológico de la planta donante, las condiciones de incubación, la composición del medio de cultivo, el estado de desarrollo del explante y la técnica de cultivo *in vitro* que se aplique (RISUEÑO, 2000).

En este sentido, la histogénesis ocupa un papel preponderante porque permite conocer la composición celular de los tejidos con estructuras organizadas; todo lo cual se refleja en un mejor conocimiento de la biodiversidad de los diferentes ecosistemas favoreciendo el estudio de las condiciones medio-ambientales.

Dentro de los procesos biotecnológicos, la embriogénesis somática es un medio de micropropagación que explota las totipotencialidades de las células vegetales, siendo empleada dentro de los métodos de propagación por su alto índice de multiplicación (TESTILLANO *et al.*, 2000).

En el cultivo del boniato con el empleo de la embriogénesis somática se abren nuevas áreas a la investigación científica y al estudio de la biodiversidad, representando una herramienta de gran utilidad para la multiplicación e introducción de nuevos clones. La utilización de la embriogénesis somática permite la obtención de un número elevado de plantas en corto tiempo y es de gran utilidad en los programas de multiplicación en diferentes cultivos de interés, en el boniato en particular constituye un aspecto de gran importancia en la agricultura moderna.

Para un mayor conocimiento y una mejor comprensión de los cambios estructurales que dan lugar a la embriogénesis somática, mediante la aplicación del cultivo *in vitro*, se ha hecho uso de las técnicas histológicas que han facilitado describir el proceso que conduce a un tejido a readquirir sus potencialidades embriogénicas y esto puede ser determinado para diferentes tejidos y plantas (RAMÍREZ *et al.*, 2000).

Es por ello que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar histológicamente el proceso de callogénesis y embriogénesis somática a partir de explantes de limbos foliares de boniato en el clon cubano INIVIT B 93-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de La Habana, en colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España. Se recolectaron raíces

tuberosas pertenecientes al clon cubano INIVIT B 93-1 y se efectuaron cortes histológicos en explantes de limbo foliar, callos, callos con estructuras embriogénicas y embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo.

En todo momento se empleó el medio de cultivo propuesto por MURASHIGE & SKOOG (1962), suplementado con Mioinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), Tiamina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), Vitaminas MS ( $10.0 \text{ mL L}^{-1}$ ), Sacarosa (3%) y Gelrite (0.2%). Los reguladores del crecimiento fueron incorporados al medio de cultivo en dependencia del objetivo planteado en cada experimento, el pH del medio fue ajustado a  $5.8 \pm 0.01$  en todos los casos, previo a la adición del agente solidificante y esterilizados en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  ( $1.2 \text{ Kg/cm}^2$  de presión) durante 20 minutos.

Para el estudio histológico se tomó una porción de  $2 \text{ mm}^3$  para los explantes de limbo foliar y de  $2 \text{ mm}^3$  para el resto de los materiales estudiados con tres repeticiones en cada muestra. Las muestras fueron fijadas en formaldehído (4%) en tampón fosfato a pH 7.1, durante veinticuatro horas a  $4^\circ\text{C}$ , posteriormente se lavaron tres veces con PBS (solución fosfo-salina tamponada) durante diez minutos, se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol y se pasaron a óxido de propileno/etanol hasta quedar en óxido de propileno puro para realizar la infiltración e inclusión en Epon, según la técnica empleada por RISUEÑO (2000).

Los cortes semifinos de  $1 \mu\text{m}$  de grosor se obtuvieron con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo LKB Nova (Upsala, Sweden). La tinción se realizó con azul de toluidina (0.01%) en agua, las secciones fueron fotografiadas en un microscopio Olympus con cámara digital acoplada.

Para los estudios histológicos se tuvieron en cuenta las siguientes etapas:

### *Formación del callo con estructuras embriogénicas.*

Se seleccionaron explantes de limbos foliares ( $1.0 \text{ cm}^2$ ), desinfectados con hipoclorito de sodio (1%), durante 15 minutos y sembrados en el medio de cultivo propuesto por MURASHIGE & SKOOG (MS) (1962), vitaminas MS ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), mioinositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa (3%), Gelrite (0.2%), 2,4-D ( $0.50 \text{ mg L}^{-1}$ ) y 6-BAP ( $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ), mantenidos en la oscuridad permanente

durante treinta días. Las muestras fueron fijadas a los tres, seis, nueve, catorce y veintidós días después de la siembra, y los callos no embriogénicos y con estructuras embriogénicas a los treinta días, para su posterior procesado para la inclusión en resina y obtención de cortes semilinos.

#### **Formación de los embriones somáticos.**

Se empleó el medio anteriormente mencionado conteniendo además tiamina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y el 2,4-D a una concentración de  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ , con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad durante treinta días; transcurrido este tiempo se les realizaron los cortes histológicos.

#### **Caracterización de los embriones somáticos.**

Se empleó el medio de cultivo anteriormente mencionado con ABA ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y se realizaron los cortes a los embriones somáticos en las etapas: globular, corazón, torpeda y cotiledonal.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Formación del callo con estructuras embriogénicas.**

En secciones transversales realizadas al limbo foliar, se observó la epidermis (adaxial y abaxial) y el parénquima clorofílico bien diferenciado en empalizada y el lagunar o esponjoso (Figura 1A), característica de estas plantas que las distingue dentro del ecosistema, permitiendo la identificación y conservación de la biodiversidad.

A partir de los tres días de sembrado el explante, ocurrió la inducción del callo donde las estructuras del limbo foliar se mantuvieron intactas y se observó la proliferación de células indiferenciadas en el parénquima esponjoso que dieron lugar a la calogénesis, originándose callos de cicatrización en los bordes del explante cercanos a la región del haz vascular y una disminución de la intensidad de la coloración verde.

A los seis días se observó un mayor engrosamiento del callo, dando lugar a un callo endógeno. El incremento en todas direcciones originó que se hiciera notable y luego se proyectó hacia el exterior a través de la epidermis; después, de los siete días se observó la aparición de pequeños callos de color amarillo-crema en los bordes del explante y se observó la presencia de

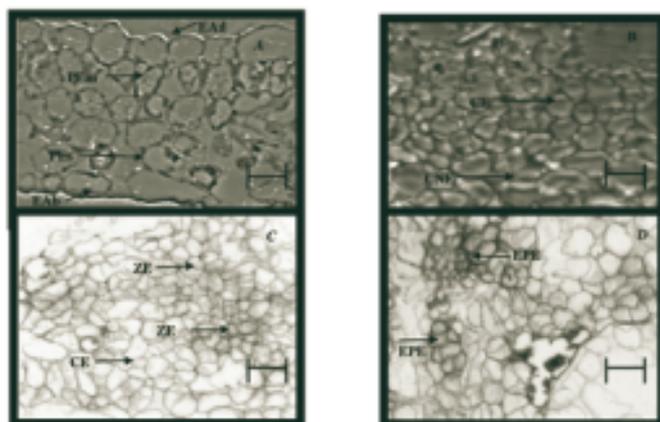
agrupaciones celulares similares a las que forman las células embriogénicas meristemáticas. No cabe duda que en este período el callo comenzó una etapa de división con una rápida multiplicación celular; todo lo cual coincidió con lo planteado por González y Ferrer (1996), quienes demostraron que a partir de los siete días después de la siembra, se observó en el callo de cicatrización y en las células meristemáticas divisiones periclinales del callo endógeno que a partir de los doce días se encontraba ocupando toda la superficie del explante.

A los veintidós días se observó el desarrollo pleno del callo de color crema-amarillo, con estructuras nodulares formado por células pequeñas y abundantes, y a los treinta días presentó una apariencia homogénea, predominando las células meristemáticas y textura friable (Figura 1B), presentándose una total decoloración del explante cubierto por el callo en su totalidad. Aunque se puede encontrar una sección del callo no embriogénico y se pudo observar que éste se caracterizó por presentar en su mayoría células alargadas, parénquimáticas (Figura 1B).

Conjuntamente con las células embriogénicas también se observaron células de tipo no embriogénicas altamente diferenciadas y vacuoladas, demostrándose que en un mismo callo pueden existir células con capacidad embriogénica y células no embriogénicas, y la formación de un tipo de callo u otro, depende del explante empleado y la formación de los proembriones puede ser influido por el genotipo como indicaron RIVAL (2000) y GOH *et al.* (2001).

Se ha demostrado que las células embriogénicas proceden de las células meristemáticas y el aumento en el número de éstas se debe casi enteramente a la división repetida en tejidos meristemáticos específicos que se hallan sólo en regiones limitadas y están formados por células permanentemente embrionarias según señalaron LAPARRA *et al.* (1997).

La capacidad morfológica de algunos tejidos puede no tomarse en consideración según lo planteado por CONCEPCIÓN *et al.* (2003), debido a la asociación de estos con tejidos diferenciados que están dentro de un sistema organizado y todo ello debe tenerse presente en la identificación del material vegetal y el manejo de la biodiversidad a partir de los estudios histológicos realizados.



**Figura 1.** Cortes histológicas del limbo foliar y de callos de boniato del clon INIVIT B 93-1.

(A): Secciones transversales del limbo foliar tomadas al momento de realizar la siembra. (B): Callo con 30 días de formado y con predominio de células pequeñas y abundantes. (C): Sección transversal de un callo con zonas embriogénicas después de los cinco días del subcultivo. (D): Sección transversal de un callo con estructuras proembriogénicas. Barras en las fotos: (A) = 100  $\mu$ m, (B) = 150  $\mu$ m, (C) y (D) = 200  $\mu$ m.

**Leyenda:** EAd: Epidermis Adaxial. EAb: Epidermis Abaxial. PEa: Parenquima en Empalizada. PEb: Parenquima Esponjoso. CE: Células Embriogénicas. CNE: Células No Embriogénicas. ZE: Zona Embriogénica. EPE: Estructura Proembriogénica.

#### *Formación de los embriones somáticos.*

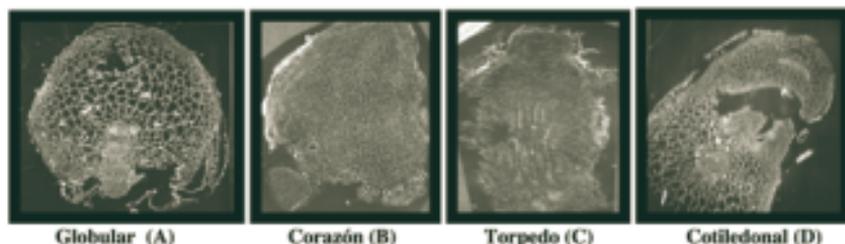
Después de los cinco días de colocados los callos en el medio de cultivo se observó el desarrollo de zonas embriogénicas (Figura 1C), que posteriormente dieron inicio a la formación de estructuras proembriogénicas (Figura 1D). En las zonas meristemáticas ocurren frecuentemente divisiones anticlinales y periclinales de las células y se han realizado observaciones donde se demuestra que en la organización incipiente de zonas embriogénicas se puede apreciar la presencia de diferentes tipos celulares (Risueño, 2000).

Pasados veinte días se observó una elevada presencia de embriones somáticos, principalmente en aquellas partes ubicadas en el centro y bordes del callo, los cuales se caracterizaron por presentar una morfología similar a los embriones cipóticos. A los veinticinco días, se pudo observar la emergencia de los embriones y en muchos casos se vio la presencia de estos en una misma zona del callo.

Las observaciones histológicas realizadas, al igual que el posterior desarrollo morfológico bipolar de los embriones somáticos al ser colocados en el medio de germinación, demostró la naturaleza embriogénica del proceso estudiado y esto posibilita garantizar la prospección del material vegetal a gran escala, contribuyendo con los ecosistemas vegetales y la biodiversidad a nivel mundial.

#### *Caracterización de los embriones somáticos.*

Las secciones longitudinales de los embriones somáticos mostraron la naturaleza bipolar propia de los mismos y la posterior diferenciación en embriones somáticos independientes. Se pudo observar la gran variación existente en cuanto a forma, tamaño y apariencia de los embriones somáticos. Lo anterior demuestra que es necesario realizar estudios histológicos detallados desde el inicio del callo hasta la completa formación y desarrollo de los embriones somáticos, lo que puede ser usado para conocer el



**Figura 2.** Secciones histológicas de los embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo.

tiempo de subcultivo de los mismos, optimizando la efectividad de las condiciones físicas y químicas de los cultivos durante la embriogénesis somática y esto corrobora lo planteado por algunos autores al referirse a la evolución histológica del desarrollo de los callos con estructuras embriogénicas (Concepción *et al.*, 2003).

Al estudiar el embrión en la etapa cotiledonal se observó que este presentó un meristemo apical y un meristemo radical conectados vascularmente; estas estructuras se formaron simultáneamente pasando los embriones somáticos por diferentes etapas de desarrollo, entre los cuales se encuentran: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonal (Figura 2).

Aunque todas las células de un organismo son consideradas del mismo genotipo, no todas responden a la formación de embriones somáticos de igual manera, debido a que solamente ciertas células parecen estar aptas a responder a la embriogénesis somática dado la influencia de los reguladores del crecimiento y una vez formadas las células embriogénicas, no todas están simultáneamente listas desde el punto de vista fisiológico para expresar su totipotencia, aún en un medio favorable para su desarrollo.

## CONCLUSIONES

La formación del callo se produjo a partir de las células del parénquima perivascular que posteriormente surgieron las estructuras embriogénicas, las cuales se dividieron activamente tomando un mayor desarrollo que ocasionó el rompimiento de la epidermis para así permitir la emergencia de las

células del callo y la aparición del callo exógeno donde posteriormente aparecieron los embriones somáticos caracterizados por presentar una morfología totalmente normal.

Con el presente trabajo se puede garantizar la multiplicación acelerada y en corto tiempo de plantas de interés y de aquellas en las que existen peligros de extinción, lo cual garantiza que no se produzcan pérdidas de la biodiversidad vegetal y se desarrolla una cultura sobre el uso de los recursos fitogenéticos valiosos para el hombre; unido a esto se puede contribuir con la conservación del material vegetal, garantizando gran número de recursos beneficiosos para el bienestar del hombre, siempre que los mismos se manipulen con la mayor efectividad posible.

## AGRADECIMIENTOS

Lisbeth Saldívar Reynaldo, Mirtha López Machado y Michel Martínez Cruz del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana (INCA). Marlyn Valdés de la Cruz de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Hildelisa Saralegui Boza del Jardín Botánico Nacional, La Habana.

## REFERENCIAS

- BUDIMIR, G. 2003. Developmental histology of organogenic and embryogenic tissue in *Picea omorika* culture. Brief Communication. *Biologia Plantarum*, 47 (3): 467-470.
- CONCEPCIÓN, O., NÁPOLES, L., TRUJILLO, R., PÉREZ, A. & PERALTA, N. 2003. Regene-

- ración de brotes en hojas de Guayaba (*Psidium guajava* L.) propagadas *in vitro*. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. (BioVeg 2003). Centro de Biotecnología Vegetal. Ciego de Ávila. Cuba.
- DLANGOU, J., HOCHER, V., FERREIÉRE, N., FULCHERI, C., MORARD, P., & ALEMANNO, L. 2002. Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. Endosperm during seed development. *Seed Science Research*, 12: 89-100.
- FARIAS, FR. 2000. Cultivo *in vitro* de *Anthurium schlotheimii* Kunth (*Anacard*), especie silvestre del estado de Veracruz, México. Tesis de Maestría (Master en Biotecnología de Plantas). Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Veracruz. 119 p.
- GOH, D., BON, M., ALIOTTI, F., ESCOUTE, J., FERREIRE, N. & MONTEVVIS, O. 2001. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus neriifolius* and *Calamus rotundifolius*. In vitro CELL. DEV. BIOL.-PLANT, 37: 375-881.
- GONZÁLEZ, M.E. & FERRER, M. 1996. Caracterización histológica de la calogénesis en *Coffea arabica* var. "Caturra" durante la embriogénesis somática. Resúmenes. Taller de Biotecnología Vegetal de las Provincias Orientales. P. 6. Cuba.
- HITA, O., GALLEGO, P., VILLALOBOS, N., LANAS, I., BLÁZQUEZ, A., MARTÍN, J.P., FERNÁNDEZ, J., MARTÍN, L. & GUERRA, H. 2003. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture*, 72 (1): 13-18.
- LAPARRA, H., BRONNER, R. & HAHNE, G. 1997. Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus scaberrimus* Heiser. *Protoplasma*, 196: 1-11.
- MAXIMOVA, S.N., ALEMANNI, L., YOUNG, A., FERRIERE, N., TRAORE, N. & GUILTIMAN, M.J. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origins of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.*, 38 (3): 252-259.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Planter.*, 15: 473-497.
- RAMÍREZ, C., TESTILLANO, P., PINTOS, B., MORENO, M., DOMENECH, J., GÓMEZ, A., MANZANERA, J., BUENO, M. & RISUEÑO, M. 2000. Cellular characterization of microspore embryogenesis in anther culture of *Quercus suber*. *Biotechnological Approaches for Utilization of Genetic Cells*. Cost 824, Bled, Slovenia. P. 1-5.
- RISUEÑO, M. 2000. Microspore-derived embryogenesis from *in vitro* cultures of heat-stressed anthers of *Capsicum annuum* involves a dedifferentiation followed by proliferation and further redifferentiation. *Plant Development and Nuclear Organization*. CSIC.
- RIVAL, A. 2000. Somatic embryogenesis in oil palm. In: Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (eds.). *Somatic embryos in woody plant*, Vol. 6, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers. P. 249-290.
- TESTILLANO, P., CORONADO, M., SEGUÍ, J., DOMENECH, J., GONZÁLEZ-MELENDI, P., RASHA, I. & RISUEÑO, M. 2000. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 129: 223-232.
- VIEIRA, R. & ESQUIBEL, M.D. 1998. Histogenesis of callus from stem explants of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Leandra*, (13): 45-55.