

Embriogénesis somática en tres cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) a partir de diferentes explantes

Somatic embryogenesis in three manihot cultivars
(*Manihot esculenta* Crantz) from different explants

por

ALBARRÁN, J.¹; TRUJILLO, I.²; FUENMAYOR, F.¹; FERNÁNDEZ H.¹;
TORREALBA, M.¹; MARÍN, C.¹ y DÍAZ-LÓPEZ, A.¹

1 Unidad de Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA). Av. Universidad, zona universitaria, vía El Limón, Edificio 9, Campo Experimental, Maracay, Aragua. Código Postal 2105.

2 Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). Avenida Mara, Altos del Cují, Colinas de la Mariposa, Edificio IDECYT-UNESR, San Antonio de los Altos, Miranda, Venezuela. Código Postal 1204.

RESUMEN

La yuca, junto con el maíz y el arroz, constituyen las fuentes de energía más importantes de las regiones tropicales del mundo y una de las especies de mayor producción de carbohidratos en el trópico para consumo humano. La embriogénesis somática representa un método de propagación alternativo con alta producción de plantas de calidad. El objetivo de este trabajo fue determinar el potencial embriogénico de tres cultivares de yuca, seleccionados por sus características agronómicas: "PER-183", "Cubana" y "Criolla". Se utilizaron yemas axilares, ápices caulinares y hojas jóvenes (0,8-2,0 cm de longitud), provenientes de vitroplantas conservadas *in vitro*. El medio de cultivo consistió de MS; CuSO_4 0,474 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; sacarosa 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con cuatro concentraciones de 2,4-D y picloram: 0; 6; 8 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y Phytigel 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ o Agar 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se realizó análisis de varianza y prueba de medias de Tukey. El número de embriones somáticos fue significativamente superior ($p=0,05$) en PER-183 utilizando yema apical con 2,4-D 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en hoja con 8 y 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y picloram respectivamente y en yema axilar de la posición 4 con picloram 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para el resto de los clones, los resultados obtenidos fueron significativamente inferiores al compararlos con PER-183 con los mismos reguladores de crecimiento. Se demostró el efecto del genotipo y tipo de explante destacando la propagación del clon PER-183. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser empleados en procesos de mejoramiento del cultivo y disponibilidad de "semilla" de calidad para los productores.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología, propagación *in vitro*, embrión somático, *Manihot esculenta*, ápice caulinar, regulador de crecimiento.

ABSTRACT

Cassava, together with maize and rice, are the most important energy sources in the tropical regions of the world and one of the species of higher carbohydrate production in the tropics for human consumption. Somatic embryogenesis represents an alternative propagation method with high production of quality plants. The objective of this work was to determine the embryogenic potential of three cassava cultivars *in vitro* conserved plants, selected for their agronomic characteristics: "PER-183", "Cubana" and "Criolla". Axillary buds, shoot apices and young leaves (0.8-2.0 cm in length) were used, from vitroplants. The culture medium consisted of MS; CuSO_4 0.474 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Sucrose 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with four concentrations of 2,4-D and picloram: 0; 6; 8 and 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and Phytigel 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ or Agar 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Tukey test average and variance test were performed. The number of somatic embryos was significantly higher for $p = 0.05$ in PER-183 when using the dose of 2,4-D 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for apical bud, 8 and 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-D and picloram respectively for leaf and 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ picloram for axillary bud position 4. For the rest of the clones, the results obtained were significantly lower for $p = 0.05$ when compared to PER-183 with the same growth regulators. The effect of the genotype and explant type was demonstrated by highlighting the propagation of the PER-183 clone. The results obtained in this work can be used in processes of improvement of the crop and availability of "seed" of quality for the producers.

KEY WORDS: Biotechnology, *in vitro* propagation, somatic embryo, *Manihot esculenta*, caulinar bud, growth regulator.

INTRODUCCIÓN

La yuca junto con el maíz y el arroz constituyen las fuentes de energía más importantes de las regiones tropicales del mundo. Es una de las especies vegetales de mayor producción de carbohidratos en el trópico para el consumo humano, alimentando a más de 500 millones de personas en el mundo, especialmente de países en desarrollo (Ceballos 2002). Tradicionalmente, se ha trabajado por el mejoramiento genético convencional del cultivo y por mejorar las prácticas culturales en fincas de pequeños productores con bajos recursos económicos y bajos rendimientos, con fines de subsistencia familiar; sin embargo, actualmente debido a la demanda industrial por los productos y subproductos de la yuca y a la necesidad de suministrarle plantas sanas a nuestros agricultores, se requiere mayor tecnificación y escalamiento de la producción.

Considerando la importancia tradicional del cultivo de la yuca y su escaso desarrollo en Venezuela, donde en los últimos años se ha presentado una reducción considerable en cuanto a volumen de producción y superficie cosechada (FEDEAGRO 2016), el uso de la biotecnología para la propagación masiva de clones, impactaría en la producción de “semilla” sana, libre de las principales enfermedades que atacan al cultivo, incluyendo aquellas de baja incidencia, pero que constituyen una amenaza potencial para el desarrollo del cultivo en el país, como es el caso de la enfermedad de etiología viral denominada “cuero de sapo” ocasionada por al menos dos virus; uno de la familia *Reoviridae*, género no asignado y un fitoplasma (Carvajal-Yepes *et al.* 2014).

Esta tecnología puede promover una mejora en los rendimientos, en la productividad y accesibilidad a los productores rurales organi-

zados del país y la oportunidad de participar en la cadena de comercialización de la yuca como materia prima para el procesamiento industrial o para el consumo fresco, garantizando así un aumento en la producción de alimentos. La biotecnología puede contribuir en tal sentido, a la oferta de una “semilla” con la calidad requerida por nuestros agricultores, haciendo uso de las técnicas de cultivo de tejidos, marcadores moleculares e ingeniería genética (Fregene & Puonti-Kaerlas 2002). Mediante la propagación masiva por embriogénesis somática de genotipos seleccionados por sus características agronómicas, se pueden obtener plantas con buena condición fitosanitaria, genéticamente uniformes que beneficien a los productores de yuca del país. Con base en esta premisa se propuso como objetivo del presente trabajo determinar el potencial embriogénico de tres cultivares seleccionados por sus características agronómicas: PER-183, Cubana y Criolla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres clones de yuca conservadas *in vitro*: Cubana, seleccionado en la comunidad de Múcura del Municipio Zamora del estado Aragua, como un clon productivo; el clon Criolla, proveniente de la comunidad de Boconoito en el estado Portuguesa, señalando este clon como nativo de esa región, cuya superficie de siembra fue reducida por la introducción de un clon foráneo, conocido por “Armenia”, motivo por el cual los productores de dicha zona lo quieren recuperar para incrementar nuevamente su siembra; y un tercer clon, el PER-183, proveniente de Colombia (CIAT 2006), considerado productivo y resistente a la enfermedad viral conocida como “cuero de sapo”, el cual es conservado en

campo e *in vitro* en el banco de germoplasma de yuca del INIA-CENIAP, Maracay estado Aragua, el cual ha sido evaluado en campo presentando altos rendimientos, superando al rendimiento nacional (Marín *et al.* 2008).

El tipo de explante utilizado para la inducción embriogénica se representa en la **FIGURA 1**.

Los explantes fueron precultivados por una semana en medio de cultivo MS básico y posteriormente en diferentes tratamientos con dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones, como se esquematiza en el **CUADRO 1**.



FIGURA 1. Tipos de explantes utilizados para la inducción de embriogénesis somática en los tres clones de yuca evaluados. **(A)** Vitroplanta de yuca, se observa la yema axilar del tercer nudo (YAX 3) y del cuarto nudo (YAX 4), **(B)** yema apical (YA) y axilar vista en microscopio estereoscópico 4X. En **(C)** y **(D)** se muestra las yemas apical y axilar respectivamente, vistas en microscopio estereoscópico 10X.

CUADRO 1. Tratamientos aplicados en los diferentes tipos de explantes utilizados para la embriogénesis somática en los tres clones de yuca.

TIPO DE EXPLANTE	MEDIO DE CULTIVO BÁSICO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)	DURACIÓN (DÍAS)	CONC. 2,4-D (MG.L ⁻¹)	CONC. PICLORAM (MG.L ⁻¹)
Todos	1. MS/3 + sacarosa 45 g.L ⁻¹ + Agar 7 g.L ⁻¹ o Phytigel 3 g.L ⁻¹	7	0	0
1. Yema axilar posición 3			0, 4, 6, 8, 10	0, 4, 6, 8, 10
2. Yema axilar posición 4	2. MS + CuSO ₄ (0,74 mg.L ⁻¹) + Sacarosa 20 g.L ⁻¹ + Agar (6 g.L ⁻¹) o Phytigel 3 g.L ⁻¹	45	0, 4, 6, 8, 10	0, 4, 6, 8, 10
3. Yema apical			0, 4, 6, 8, 10	0, 4, 6, 8, 10
4. Hoja joven (0,8-1,2 cm)			0, 4, 6, 8, 10, 12	0, 4, 6, 8, 10, 12

Los explantes se cultivaron en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 25 ± 1 °C durante todo el proceso de inducción embriogénica.

El diseño experimental para el cultivo de ápices caulinares, consistió en un arreglo factorial 3x4x2 sobre un diseño completamente aleatorizado (3 clones, 4 concentraciones de reguladores de crecimiento (RC) y 2 tipos de RC con 3 réplicas, el cual generó 24 combinaciones de tratamientos. Para el cultivo de hojas, se empleó un arreglo factorial 3x5x2 sobre un diseño completamente aleatorizado (3 clones, 5 concentraciones de RC y 2 tipos de RC con 3 réplicas, el cual generó 30 combinaciones de tratamientos. Para las yemas axilares, se empleó un diseño factorial 3x4x2x2 (3 clones, 4 concentraciones de RC, 2 tipos de RC y 2 posiciones de yema axilar) con 3 réplicas, el cual generó 48 combinaciones de tratamientos. Todos los tratamientos se evaluaron a los 45 días de la siembra, determinando el número de callos embriogénicos (CE), número de embriones somáticos (ES), número de callos no embriogénicos y número de explantes contaminados.

Los datos obtenidos en los experimentos fueron tabulados utilizando el programa Excel 2003 para Windows. Se utilizó el programa INFOSTAT versión 1.0. para el análisis estadístico de los resultados: análisis de varianza y prueba de media de Tukey en las variables que resultaron estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CULTIVO DE YEMAS AXILARES DEL TERCER Y CUARTO NUDO DE LOS TRES CLONES SELECCIONADOS A PARTIR DE PLANTAS IN VITRO

En los **CUADROS 2A Y 2B**, se observa el efecto del cultivo de la yema axilar de la posición tres sobre el número promedio de CE y ES en los tres clones evaluados. El clon PER-183, presentó la mayor respuesta significativa en ambas variables con respecto a los clones Criolla y Cubana. Entre los tratamientos se observó que la mayor respuesta se obtuvo en el clon PER-183a la concentración de 8 mg.L⁻¹ de Picloram (CE = 3,67

CUADRO 2A. Número promedio de callos embriogénicos (CE) obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares de la posición 3, en tres clones de yuca con dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones.

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO							
	2,4-D (mg.L ⁻¹)				Picloram (mg.L ⁻¹)			
	4	6	8	10	4	6	8	10
PER-183	0,00 A e	3,00 A b	2,00 A c	2,67 A b	1,00 A d	2,33 A b	3,67 A a	2,67 A b
Criolla	0,00 A d	2,33 B a	2,00 A b	1,33 C c	0,00 B d	0,33 C d	2,67 B a	0,33 B d
Cubana	0,00 A d	1,67 C a	1,67 A a	2,00 B a	0,33 B d	1,00 B c	0,00 C d	0,33 B d

DMS ponderado: 0,49, según prueba de Tukey a un nivel de $p=0,05$. Letras mayúsculas indican diferencias entre clones y minúsculas entre tratamientos de RC.

CUADRO 2B. Número promedio de embriones somáticos (ES) obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares de la posición 3, en tres clones de yuca con dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones.

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO							
	2,4-D (mg.L ⁻¹)				Picloram (mg.L ⁻¹)			
	4	6	8	10	4	6	8	10
PER-183	0,00 A g	32,33 A b	14,33 A d	6,33 A e	1,00 A f	28,33 A b	43,00 A a	25,00 A c
Criolla	0,00 A d	14,33 B a	14,33 A a	7,33 A c	0,00 B d	0,33 C d	10,67 B b	0,33 B d
Cubana	0,00 A c	9,33 C a	3,67 B b	4,33 B b	2,00 A	5,67 B b	0,00 C c	0,33 B c

DMS ponderado: 1,67, según prueba de Tukey a un nivel de $p=0,05$

CUADRO 3A. Número promedio de callos embriogénicos (CE) obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares de la posición 4, en tres clones de yuca con dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones.

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO							
	2,4-D (mg.L ⁻¹)				Picloram (mg.L ⁻¹)			
	4	6	8	10	4	6	8	10
PER-183	0,00 A c	3,67 A a	3,00 A b	3,00 A f	3,00 A b	2,67 A b	3,67 A a	2,67 A b
Criolla	0,00 A e	1,33 C d	1,67 B c	2,00 B c	2,67 B b	2,67 A b	3,33 A a	1,67 B c
Cubana	0,00 A c	2,33 B a	1,67 B a	1,67 B a	2,00 C a	0,67 B b	1,67 B a	1,33 B a

DMS ponderado: 0,49, según prueba de Tukey a un nivel de $p=0,05$

CUADRO 3B. Número promedio de embriones somáticos (ES) obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares de la posición 4, en tres clones de yuca con dos reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones.

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO							
	2,4-D (mg.L ⁻¹)				Picloram (mg.L ⁻¹)			
	4	6	8	10	4	6	8	10
PER-183	0,00 A g	41,33 A b	23,67 A d	14,33 A e	27,00 A c	15,67 A e	62,00 A a	11,33 A f
Criolla	0,00 A e	27,00 B a	19,00 B b	11,00 B c	14,00 B b	16,33 A b	8,67 B d	2,33 B e
Cubana	0,00 A b	11,67 C a	9,67 C a	5,00 C b	4,67 C b	0,67 B b	9,33 C a	2,33 B b

DMS ponderado: 2,80, según prueba de Tukey a un nivel de $p=0,05$

y ES = 43), seguido por la de 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D (CE = 3 y ES = 32,33). En los clones Criolla y Cubana la respuesta fue inferior; sin embargo, en Criolla para la variable ES se obtuvo una buena respuesta con 2,4-D en concentraciones de 6 y 8 mg.L⁻¹ (14,3) y con Picloram a 8 mg.L⁻¹ (10,67).

En cuanto a la yema axilar de la posición cuatro, observamos una tendencia similar a lo ocurrido con la yema axilar en posición tres (CUADRO 3A Y 3B), pero con mayor número promedio de ES. El clon PER-183 mostró la mejor respuesta en cuanto a CE y ES, siendo significativamente mayor en el tratamiento con Picloram a la concentración de 8 mg.L⁻¹ (CE = 3,67 y ES = 62), seguido por el tratamiento 2,4-D 6 mg.L⁻¹ (CE = 3,67 y ES = 41,33). El clon Criolla fue el segundo con mayor formación de ES con 2,4-D 6 mg.L⁻¹ (27) y Picloram 4 mg.L⁻¹ (14) y 6 mg.L⁻¹ (16,33).

Con el clon Cubana se obtuvo la menor respuesta en cuanto a CE y ES en el cultivo de yemas axilares, tanto de la posición tres como cuatro al compararlo con los clones PER-183 y Criolla. La mayor formación de ES para este clon fue en 2,4-D 6 mg.L⁻¹ en yemas de la posición cuatro (11,67).

Es importante resaltar que, bajo las condiciones experimentales de cultivo, el número de ES fue superior en las yemas axilares de la posición cuatro que la posición tres. El 2,4-D y Picloram a las concentraciones de 6 y 8 mg/L respectivamente, fueron las concentraciones más efectivas en inducir el proceso embriogénico en los tres clones evaluados, aunque la respuesta fue superior en el clon PER-183.

Los mejores resultados obtenidos al emplear la yema axilar cuatro, se debió quizás a la condición fisiológica del explante, particularmente al gradiente hormonal presente desde el ápice

hacia la base, creado por los niveles endógenos y su acción sinérgica/antagónica con los niveles de los reguladores de crecimiento exógenos (Ravindran *et al.* 2014). En investigaciones realizadas con Álamo, se observó un efecto basípoto polar de respuesta morfogénica al cultivar segmentos internodales de diferentes posiciones, aumentando la respuesta desde el ápice hacia la base como consecuencia de dicho gradiente (Douglas 1984; Pitekelabou *et al.* 2015).

Al comparar la respuesta diferencial de los tres genotipos, el clon PER-183 demostró ser superior que el Criolla y Cubana bajo las mismas condiciones de cultivo, particularmente en lo relativo a reguladores de crecimiento y dosis utilizadas. En 2006, Attehnkeng *et al.*, demostraron el efecto del genotipo en la inducción de embriogénesis somática, al explorar el germoplasma de yuca africano, encontrando que, de 11 genotipos evaluados, solo 7 fueron competentes para la regeneración por embriogénesis somática.

Mongomake *et al.* (2015) regeneraron plantas de yuca a través de embriogénesis somática, cultivando meristemas apicales y lóbulos de hojas inmaduras como explantes en medio de Murashige & Skoog (1962), al emplear 33 o 50 µM de las auxinas Picloram (PIC), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Dicamba (Dic) y ácido α-naftalen acético (ANA). Los resultados indican que la frecuencia de la embriogénesis somática primaria y el promedio del número de embriones somáticos producidos, variaron considerablemente con el genotipo, el tipo de la auxina y su concentración. En la mayoría de los trabajos sobre embriogénesis somática en yuca, independientemente del tipo de explante utilizado, es la auxina 2,4-D el principal inductor del proceso embriogénico (Maillot *et al.* 2006), aunque se utilicen otros reguladores de crecimiento como

Picloram, Dicamba o Ácido Naftalen Acético. De manera similar, Ma & Xu (2002) demostraron que el 2,4-D es más eficiente en inducir la embriogénesis somática que el ANA, en el cultivo de hojas del cultivar de yuca 'Nanzhi 188'.

Por otro lado, en estudios realizados con ñame blanco fue eficiente el uso de Picloram a la concentración de 0,5 mg.L⁻¹ para la inducción de callos embriogénicos a partir del cultivo de yemas axilares y el uso de ANA solo permitió la formación de callos traslúcidos con raíces y brotes adventicios (Manoharan *et al.* 2016). En nuestro experimento utilizando cultivo de yemas axilares fue más eficiente el uso del Picloram (8 mg.L⁻¹) que el 2,4-D en las concentraciones utilizadas.

En la **FIGURA 2** se puede observar los diferentes tipos de callos obtenidos por cultivo de yemas axilares en el clon PER-183. En la **FIGURA 2A**, se pueden observar callos embriogénicos friables (CEF) de color beige con ES en estado globular y con alto potencial de multiplicación, que inician su formación a partir de los 15 días de cultivo. En la **FIGURA 2B**, se observan CE compactos con ES globulares y con menor potencial de multiplicación que los friables. En la **FIGURA 2C**, se observan CE friables en diferentes etapas de crecimiento, desde la etapa globular hasta la de torpedo, formados entre las 4 y 6 semanas de cultivo. En la **FIGURA 2D**, algunos CE al inicio son de color beige y posteriormente se tornan de color ámbar y aspecto hiperhídrico, los cuales se forman a partir del día 10 de cultivo constituyendo callos no embriogénicos.

En la **FIGURA 3**, se observan callos embriogénicos (CE) de color ámbar y no embriogénicos (CNE) en el clon Cubana (**FIGURA 3A**), así como embriones en forma de torpedo y cotiledonar (**FIGURA 3B**), los cuales ya pueden ser separados del callo y cultivados en medio de germinación.

Para el caso del clon Criolla, se observan callos embriogénicos compactos y algunas áreas de crecimiento de color verde (**FIGURA 4A**), así como callos con abundante formación de embriones globulares (**FIGURA 4B**).

Beena *et al.* (2014) encontraron en algunos cultivares de yuca africanos e indios, que al cultivar hojas jóvenes de más de 6 mm y con más de 3 semanas de edad, el callo adquiriría un aspecto hiperhídrico y posteriormente a los 15-20 días se tornaba marrón o ámbar y morían, mientras que en el cultivo de yemas axilares jóvenes alargadas se obtenían callos blanquecinos de apariencia algodonosa sobre los cuales aparecían los callos embriogénicos. En café se ha utilizado la coloración del callo como criterio de selección de embriogénicos y no embriogénicos; la coloración ámbar está relacionada con la potencialidad embriogénica y los de color amarillento, no embriogénicos (Quiroz *et al.* 2002).

Es importante resaltar que la aparición de células no embriogénicas en un callo embriogénico, puede estar relacionado con un efecto nodriza del suministro de factores de crecimiento, tales como glicoproteínas que son secretadas al medio de cultivo y que son utilizadas por las células embriogénicas (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006).

CULTIVO DE ÁPICE CAULINAR DE LOS TRES CLONES SELECCIONADOS A PARTIR DE PLANTAS IN VITRO

En los **CUADROS 4A Y 4B** se puede observar que el clon PER-183, es el que presenta significativamente la mayor respuesta embriogénica al compararlo con los clones Criolla y Cubana. El número de CE y ES fue mayor en el tratamiento de 2,4-D 6 mg.L⁻¹ para PER-183 (CE = 3,67 y ES = 82,00), seguido en significancia por el tratamiento con Picloram 4 mg.L⁻¹ (CE = 3 y ES = 66,3).

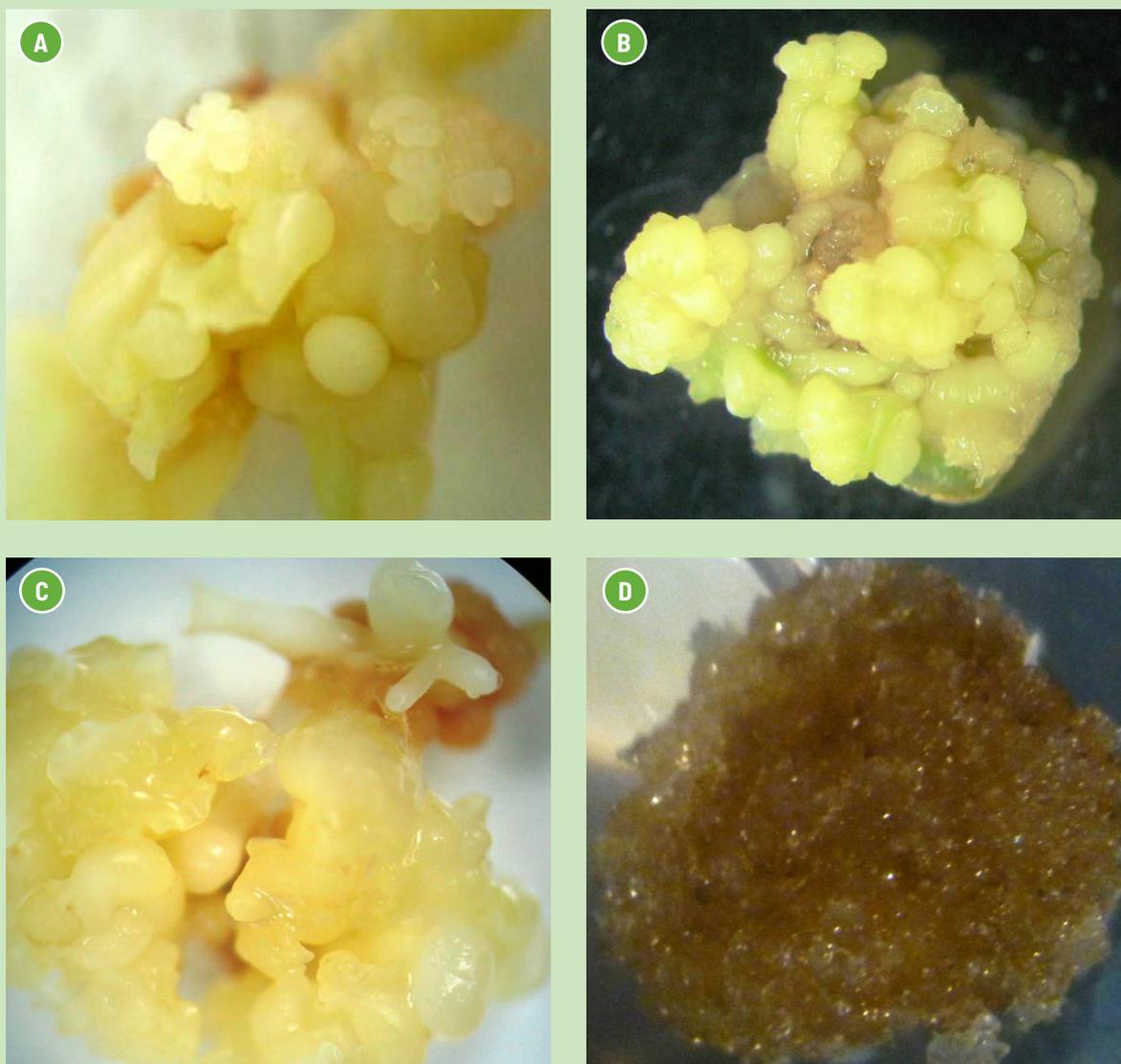


FIGURA 2. Diferentes tipos de callos obtenidos en cultivo de yemas axilares del clon PER-183. **(A)** Callo embriogénico friable (CEF) con gran cantidad de embriones globulares (10X), **(B)** CE compacto con ES globulares (10X), **(C)** CE friable en diferentes etapas de crecimiento desde globular hasta torpedo (10X), **(D)** callo no embriogénico necrosado e hiperhídrico.

En el clon Cubana se formaron CE y ES al emplear Picloram 4 mg.L^{-1} (CE = 2,33 y ES = 32,67) y en 2,4-D 8 mg.L^{-1} (CE = 2,67 y ES = 9,33).

En el clon Criolla, no hubo inducción embriogénica con 2,4-D, y una respuesta muy baja al emplear Picloram. Esta respuesta es contraria

a la obtenida con el cultivo de yema axilar, por lo que se podría explicar como un efecto referido al tipo de explante utilizado y el genotipo sobre la respuesta embriogénica obtenida.

El 2,4-D en las cuatro dosis evaluadas indujo la formación de ES en el cultivo de yemas apicales



FIGURA 3. Callos embriogénicos obtenidos en cultivo de yemas axilares del clon Cubana. **(A)** Callo embriogénico (CE) de color ámbar con embriones somáticos en la etapa de torpedo y cotiledonar, así como callo no embriogénico (CNE) (4X) y **(B)** embriones somáticos en etapa de torpedo (4X).



FIGURA 4. Se muestran **(A)** callos embriogénicos compactos y algunas áreas de crecimiento de color verde con embriones somáticos en el clon Criolla (4X) y **(B)** callo embriogénico con embriones somáticos globulares (10X).

del clon PER-183, observándose un aumento en el número de ES desde 4 mg.L⁻¹, con un máximo a 6 mg.L⁻¹ y una disminución en dosis superiores de 2,4-D, lo que sugiere una posible inhibición.

En árboles adultos de *Eucalyptus globulus* Labill y el híbrido *E. saligna* Smith × *E. maidenii*,

se indujo la embriogénesis somática a partir del cultivo de ápices del brote y explantes de hojas de los genotipos evaluados, obteniéndose frecuencias embriogénicas influenciadas significativamente por el tipo de especie, genotipo, auxina y tipo de explante. En este caso, el

CUADRO 4A. Valores promedios, de las variables número de callos embriogénicos obtenidos a partir del cultivo de yema apical.

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO							
	2,4-D (mg.L ⁻¹)				Picloram (mg.L ⁻¹)			
	4	6	8	10	4	6	8	10
PER-183	3,00 A b	3,67 A a	3,00 A b	2,33 A b	3,00 A b	2,67 A b	2,67 A b	0,67 A c
Criolla	0,00 B b	0,00 B b	0,00 C b	0,00 B b	1,00 C a	0,33 B a	0,33 B a	0,67 A a
Cubana	0,00 B b	0,00 B b	2,67 A a	0,00 B b	2,33 B a	0,67 B b	0,33 B b	0,67 A b

DMS ponderado: 0,36, según prueba de Tukey a un nivel de $p=0,05$

CUADRO 4B. Valores promedios, de las variables número de embriones somáticos obtenidos a partir del cultivo de yema apical.

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO							
	2,4-D (mg.L ⁻¹)				Picloram (mg.L ⁻¹)			
	4	6	8	10	4	6	8	10
PER-183	53,33 A c	82,00 A a	48,33 A d	53,00 A c	66,33 A b	8,00 A f	25,33 A e	0,67 A g
Criolla	0,00 B a	0,00 B a	0,00 C a	0,00 A a	1,67 C a	0,00 B a	0,33 B a	1,33 A a
Cubana	0,00 B d	0,00 B d	9,33 B b	0,00 A d	32,67 B a	0,67 B d	0,33 B	3,33 A c

DMS ponderado: 2,33, según prueba de Tukey a un nivel de $p=0,05$

Picloram fue el regulador de crecimiento más eficiente para la inducción de embriones somáticos en relación al ácido naftalen acético, con la más alta frecuencia de inducción en medio MS con 40 μ M Picloram y 40 mg.L⁻¹ de goma arábiga, donde 64 % de los explantes proveniente de brotes apicales y 68,8 % de los explantes provenientes de hoja, formaron embriones somáticos (Corredoira *et al.* 2015).

Los explantes mayormente usados en los experimentos de embriogénesis somática son hojas jóvenes, yemas axilares y con menor frecuencia yemas apicales o meristemas apicales; sin embargo, en yuca se lograron respuestas satisfactorias con hoja y yema apical (Opabode *et al.*, 2013). Medero *et al.* (2000) obtuvieron buenos resultados al cultivar meristemas apicales empleando 2,4-D y Picloram. Se ha determinado en algunos genotipos de yuca, que el uso de Dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), ha dado buenos resultados en comparación con

la respuesta producida por el 2,4-D y Picloram (Ochoa *et al.* 2012).

Feitosa *et al.* (2007) indujeron embriogénesis somática en los genotipos de yuca “Agua Morna” y “Rosinha”, a partir del cultivo de ápices agregándole Picloram. Se obtuvo una alta frecuencia de embriones somáticos y un gran número de embriones somáticos por explante.

CULTIVO DE HOJAS JÓVENES DE LOS TRES CLONES SELECCIONADOS A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO*

En los **CUADROS 5A Y 5B**, se señala el comportamiento promedio de las variables analizadas, considerando la significancia de la interacción (clon \times regulador \times dosis). La formación de CE y ES fue significativamente superior en el clon PER-183 en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento seguido por el clon Criolla con 2,4-D 12 mg.L⁻¹ y Cubana con 2,4-D 8 mg.L⁻¹.

CUADRO 5A. Número promedio de callos embriogénicos obtenidos a partir de hojas de los clones PER-183, Criolla y Cubana provenientes de plantas in vitro, evaluados a los 45 días de cultivo en diferentes concentraciones de 2,4-D y Picloram (T0= 0 mg.L⁻¹; T6= 6 mg.L⁻¹; T8= 8 mg.L⁻¹; T10= 10 mg.L⁻¹; T12= 12 mg.L⁻¹).

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO									
	2,4-D (mg.L ⁻¹)					Picloram (mg.L ⁻¹)				
	4	6	8	10	12	4	6	8	10	12
PER-183	2.33 A c	3.33 A b	3.67 A b	4.33 A a	1.33 A e	1.00 A f	1.67 A d	3.00 A b	2.33 A c	0.33 A g
Criolla	0,00 B d	0,00 B d	0,33 B c	0,67 B b	1,33 A a	0,00 C d	0,00 C d	0,00 A d	0,67 B b	0,00 B d
Cubana	0,00 B d	0,00 B d	1,67 B a	0,00 B d	0,00 B d	0,67 B c	1,00 B b	0,00 A d	0,00 C d	0,00 B d

DMS ponderada: 0,32, según prueba de Tukey a un nivel de p=0,05

CUADRO 5B. Número promedio de embriones somáticos obtenidos a partir de hojas de los clones PER-183, Criolla y Cubana provenientes de plantas in vitro, evaluados a los 45 días de cultivo en diferentes concentraciones de 2,4-D y Picloram (T0= 0 mg.L⁻¹; T6= 6 mg.L⁻¹; T8= 8 mg.L⁻¹; T10= 10 mg.L⁻¹; T12 = 12 mg.L⁻¹).

CLON	REGULADOR DE CRECIMIENTO									
	2,4-D (mg.L ⁻¹)					Picloram (mg.L ⁻¹)				
	4	6	8	10	12	4	6	8	10	12
PER-183	60,00 A b	36,33 A d	12,33 B f	84,33 A a	6,67 B g	13,33 A f	50,67 A c	82,33 A a	30,00 A e	0,33 A h
Criolla	0,00 B b	0,00 B b	0,33 C b	1,00 B b	14,67 A a	0,00 B b	0,00 C b	0,00 B b	1,00 B b	0,00 A b
Cubana	0,00 B c	0,00 B c	18,00 A a	0,00 B c	0,00 C c	0,67 B c	5,33 B b	0,00 B c	0,00 B c	0,00 A c

DMS ponderada: 2,14, según prueba de Tukey a un nivel de p=0,05

Comparando el efecto de los reguladores de crecimiento, se observa la mayor formación significativa de ES en PER-183 con 2,4-D 10 mg.L⁻¹ (84,33) y Picloram 8 mg.L⁻¹ (82,33) y la más baja producción de ES se observó tanto con 2,4-D como Picloram 12 mg.L⁻¹ (6,67 y 0,33) respectivamente. En el clon Criolla, se obtuvieron ES aunque en cantidades relativamente bajas al compararlas con PER-183 solamente en 2,4-D 12 mg.L⁻¹ (14,67). Para el clon Cubana, se obtuvieron ES significativamente mayor en 2,4-D 8 mg.L⁻¹ (18), seguido por Picloram 6 mg.L⁻¹ (5,33); el resto de los tratamientos presentaron valores iguales o próximos a cero. Nuestros resultados concuerdan con los de Vidal *et al.* (2014), quienes obtuvieron mayores frecuencias de callos embriogénicos y número de ES utilizando Piclo-

ram 8 mg.L⁻¹ al compararlo con los resultados obtenidos en 2,4-D en el cultivar Cigana Preta.

Los resultados obtenidos por Dhanya *et al.* (2017), confirman el efecto inductor del Picloram, ya que ellos produjeron callos embriogénicos estables y regenerables en cuatro cultivares indígenas de yuca: H226, H165, Sree Vijaya y Sree Sahya. Todos los cultivares produjeron de moderadas a óptimas estructuras embriogénicas organizadas (EEO) cuando los explantes de yemas axilares y hojas jóvenes se cultivaron en medio MS con Picloram 12 mg.L⁻¹ y las más altas frecuencias de inducción de EEO fueron de 97.49 % y 95.64 % en H226 y H165, respectivamente con cultivo de hojas jóvenes.

En el cultivo de hojas realizado en medio semisólido, se observaron las siguientes características o estructuras del clon PER-183 (**FIGURA 5**)

Criolla (**FIGURA 6**) y Cubana (**FIGURA 7**). En la Figura 5, se observan las diferentes etapas de inducción del callo embriogénico primario desde el explante en el día 0 (**FIGURA 5A**), inicio de la formación de callos embriogénicos a las 2 o 3 semanas

(**FIGURA 5B**), callos embriogénicos de alta frecuencia (CEAF) con gran cantidad de ES en estado globular (5C), hasta la formación de ES en estado cotiledonar y torpedado a los 45 días (5D). En la **FIGURA 6** se aprecia que el callo se formó en la

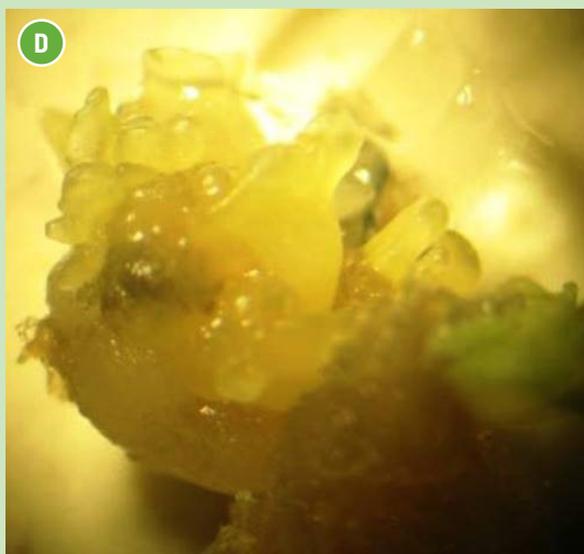
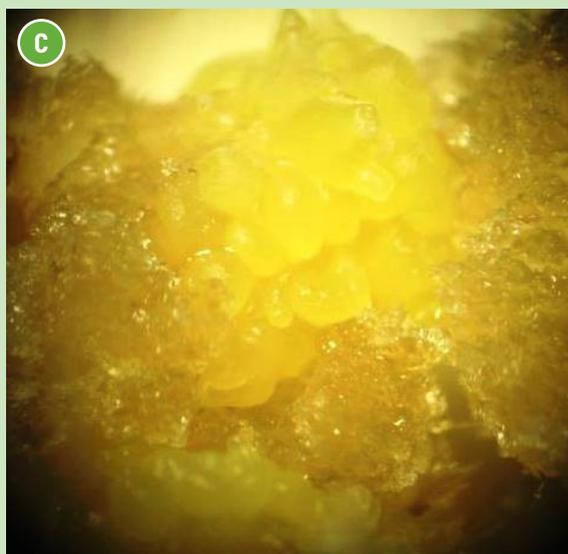
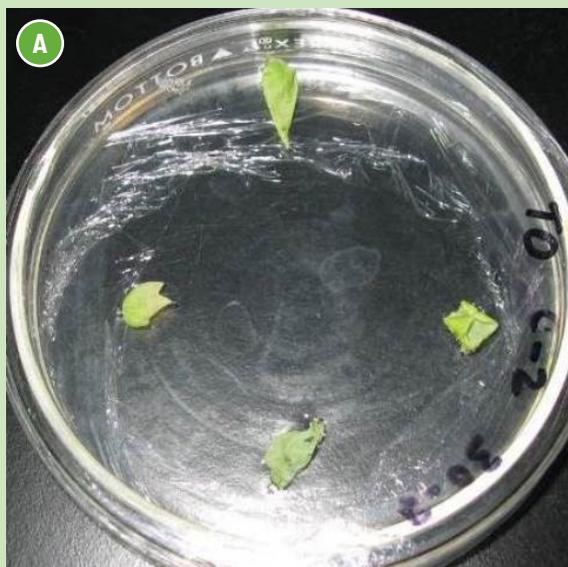


FIGURA 5. Formación de callos embriogénicos y embriones somáticos en cultivo de hojas del clon PER-183. **(A)** Explante de hoja extraída de la vitroplanta a tiempo cero (4X), **(B)** explantes de hoja con inicio de la formación del callo embriogénico (4X), **(C)** callo embriogénico de alta frecuencia con la formación de embriones somáticos globulares (10X) y **(D)** callo friable con ES en estado globular y torpedado a los 45 días (10X).

cara abaxial de la hoja, luego continuó creciendo a lo largo del nervio medio (**FIGURA 6A**). En los tres clones ocurrió el mismo comportamiento. En la **FIGURA 6B** (clon Criolla) se puede observar la germinación de los embriones somáticos y con-

versión de plantas (**FIGURA 6C Y D**). Sin embargo, en algunos CE los embriones somáticos germinaron formando estructuras foliosas o brotes con escasa formación de raíz (**FIGURAS 7A Y B**). Esta situación se presentó en los tres clones evaluados.



FIGURA 6. Formación de callos embriogénicos y embriones somáticos en cultivo de hojas del clon Criolla. **(A)** Explante de hoja donde se observa hacia la parte basal y asociado al nervio medio el inicio de la formación de un callo (10X), en **(B)** y **(C)** se observan la germinación de ES (4X) y **(D)** conversión de plantas (4X).



FIGURA 7. (A) Formación de brotes con escasa formación de raíces a partir del callo embriogénico (4X), **(B)** brotes con estructuras foliares en el clon Cubana (4X).

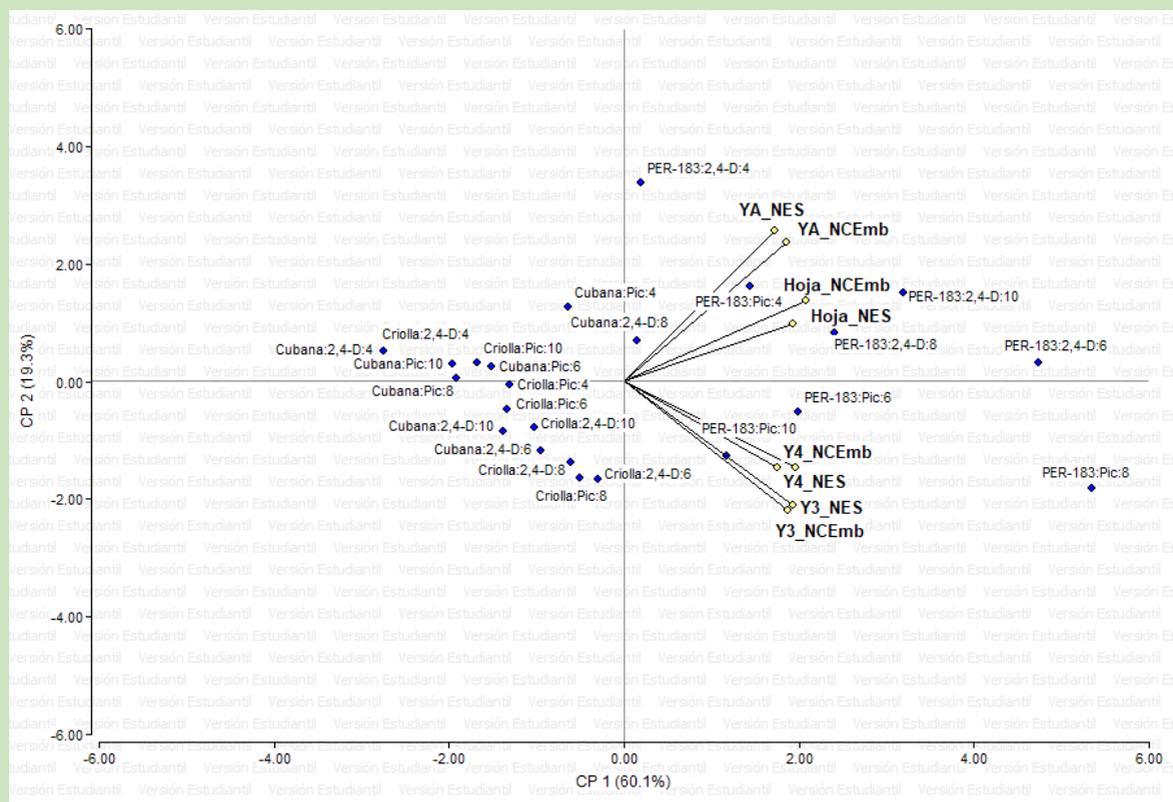


FIGURA 8. Representación de la asociación entre clones, medio de cultivo, dosis y variables seleccionadas.

Como lo demuestran los resultados, la posición del explante fue un factor importante para inducir callos embriogénicos en los clones de yuca utilizados. Ibrahim *et al.* (2008) obtuvieron respuesta embriogénica al cultivar la parte abaxial de hojas de yuca en contacto con el medio de cultivo. Contrario a lo expresado anteriormente, Beena *et al.* (2014) determinaron que, en los genotipos evaluados, la posición de la hoja (abaxial o adaxial) en contacto con el medio de cultivo, no afectaba la embriogénesis somática.

Es importante resaltar que los mejores resultados se obtuvieron con el clon PER-183, independientemente del tipo de explante utilizado, evidenciándose un efecto del genotipo. En diversas investigaciones, al utilizar hojas jóvenes, siempre se han obtenido ES en muchos genotipos de yuca americanos, asiáticos y africanos; sin embargo, las respuestas difieren entre genotipos (Opabode *et al.* 2013). Ubalua & Mbanaso (2014) indujeron embriogénesis somática a partir de hojas jóvenes de vitroplantas de dos cultivares nigerianos: “Sandpaper” y “TMS-60444”, utilizando el medio de cultivo DKW (Driver & Kuniyuki 1984), Picloram como regulador de crecimiento y condiciones de baja iluminación, obteniendo CEF asociados al genotipo. Opabode *et al.* (2017), obtuvieron mayores frecuencias de ES (42.7–49.2%) y mayor número de ES por explante (9.5–15.2) utilizando lóbulos foliares, comparado con los reportados por otros autores.

Algunos genotipos ofrecen características resaltantes como el PER-183, híbrido seleccionado en los valles interandinos de Colombia por su alto rendimiento y características culinarias (Ceballos, *et al.*, 2002), y también por su tolerancia a la enfermedad viral “Cuero de sapo” (Álvarez *et al.* 2015), enfermedad que ingresó

en el país desde el año 2001, según reportes de Chaparro-Martínez y Trujillo-Pinto (2001).

Se ha demostrado que, en la embriogénesis somática de muchas especies, la auxina activa genes que actúan sobre la expresión de las células competentes a los pocos minutos de contacto con la hormona (Hagen & Guilfoyle 2002) y se ha determinado igualmente, que compuestos unidos fuertemente o no a la pared celular tales como los oligosacáridos, influyen en la respuesta embriogénica (Quiroz-Figueroa *et al.* 2006). Los niveles de reguladores de crecimiento internos y externos, factores de estrés (shock osmótico, deshidratación del medio de cultivo, estrés hídrico, iones de metales pesados, alteración del pH del medio de cultivo, antibióticos), están igualmente involucrados (Zavattieri *et al.* 2010). De allí, que las señales que inducen la competencia y activan el desarrollo embriogénico no son fáciles de separar. La competencia está asociada con la desdiferenciación de la célula somática, que les permite luego responder a una nueva señal de desarrollo.

Es posible que, en el caso de los Clones Criolla y Cubana, la expresión genética mencionada está regulada por algún tipo de proteína que actúa sobre la inducción embriogénica y la activación de compuestos proteicos relacionados con la pared celular. Se debe considerar, además el uso de otras auxinas, con la finalidad de mejorar su respuesta embriogénica.

El uso del pre-cultivo a un tercio de la concentración de las sales minerales (MS/3) y sacarosa (45 g.L⁻¹) durante una semana, fue probablemente eficiente como factor de estrés para inducir la embriogénesis somática en diferentes explantes de yuca, particularmente en el Clon PER-183.

Como resumen del proceso de propagación por embriogénesis somática primaria, podemos observar en la Figura 8, que el análisis de componentes principales (CP) permitió separar los clones y el medio regulador en dos grupos bien definidos. El CP1 contribuyó a explicar el 60,1% de la variabilidad total observada, con mayor respuesta proveniente del número de callos embriogénicos formados en hoja y número de embriones somáticos en yema axilar de la posición 4. El CP2 contribuyó a explicar el 19,3% de la variabilidad observada, con mayor aporte de las variables: número de callos embriogénicos formados en yema apical y número de embriones somáticos formados en yema apical. El clon PER-183 presentó la mayor frecuencia de ES y número de ES en estado globular al compararlo con el resto de los genotipos.

La metodología de propagación *in vitro* a través de la inducción de embriogénesis somática fue eficiente en el sentido de producción de vitroplantas sanas y vigorosas, para ser entregadas a los productores de yuca del país. El clon PER-183 se puede entregar a productores de yuca como una alternativa, en los estados donde se ha diagnosticado la presencia del virus “cuero de sapo” como son los estados Bolívar y Anzoátegui.

YA-NES: número de embriones somáticos formados en yema apical; YA_NCEmb: número de callos embriogénicos formados en yema apical; Hoja_NCEmb: número de callos embriogénicos formados en hoja; Hoja_NES: número de embriones somáticos formados en hoja; Y4_NCEmb: Número de callos embriogénicos en yema axilar de la posición 4; Y4_NES: Número de embriones somáticos en yema axilar de la posición 4; Y3_NES: número de embriones somáticos en yema axilar de la posición 3; Y3_NCEmb: número de callos embriogénicos en yema axilar de la posición 3.

En cuanto a los clones locales como son Criolla y Cubana, de forma similar pueden ser ofrecidos a las localidades productoras del estado Aragua, Cojedes, Portuguesa y Anzoátegui, donde es necesario el suministro de “semilla” de yuca de buena calidad que contribuya al aumento de producción.

Esta vía de propagación puede ser el punto de partida para proponer un programa de mejoramiento genético por biotecnología, que involucre la búsqueda de rasgos de selección de interés agrícola como tolerancia a estrés biótico y abiótico, mayor contenido de almidón, raíces menos percederas en postcosecha y obtención de plantas haploides. Las técnicas utilizadas podrían ser la variación somaclonal, la inducción de mutaciones y el cultivo de anteras. Los embriones somáticos y suspensiones celulares, son potencialmente factibles para tales propósitos, una vez obtenido el protocolo de regeneración de plantas.

Se podrían realizar ciclos repetitivos de embriogénesis somática partiendo de los CEF para aumentar el número de plantas obtenidas, evaluando la estabilidad genética. Igualmente, se puede complementar la propagación de las plantas obtenidas mediante embriogénesis somática a través del cultivo de microestacas, tanto en medio de cultivo semisólido como en sistemas de inmersión temporal y de esta manera, contribuir con la demanda de “semilla” de calidad por parte de los productores.

CONCLUSIONES

La inducción de la embriogénesis somática en los clones PER-183, Cubana y Criolla fue indirecta y estuvo influenciada por el tipo de auxina exógena utilizada, el tipo de explante y

el genotipo. El número de callos embriogénicos y embriones somáticos fue significativamente superior en el clon PER-183 independientemente del explante utilizado. Para la yema axilar de la posición 4, la mejor respuesta se obtuvo con Picloram 8 mg.L⁻¹, en yema apical con 2,4-D 6 mg.L⁻¹ y para hoja 8 y 10 mg.L⁻¹ de 2,4-D y Picloram respectivamente. Seguidamente, pero con menor respuesta, se observó que en el clon Cubana la mejor respuesta embriogénica se obtuvo al cultivar la yema apical con Picloram 4

mg.L⁻¹ y para el clon Criolla, la yema axilar de la posición 4 en 2,4-D 6 mg.L⁻¹, donde los embriones somáticos obtenidos presentaron potencialidad de regenerar plantas normales en los tres genotipos estudiados.

Considerando la importancia tradicional del cultivo de la yuca y su escaso desarrollo en Venezuela, el uso de la biotecnología para la propagación masiva de clones impactaría en la producción de “semilla” sana y libre de las principales enfermedades que atacan al cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atehnkeng, J.; Adetimirin, V. & Ng, SYG. 2006. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. *African Journal of Biotechnology*. 5(14): 1324-1329.
- Álvarez, Elizabeth; Pardo, Juan Manuel; Mejía, Juan Fernando; Santos de Oliveira, Saulo Alves; Zacher, Marta; Cardozo, Lourdes; Gómez, Yannery. 2015. Manejo del ‘cuero de sapo’, enfermedad limitante de la yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 12 p. (Publicación CIAT No. 405). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10568/70086>
- Beena, M.; Winter, S.; Makesh Kumar, T. 2014. Influence of Age of Explants and Genotype on Somatic Embryogenesis in African and Indian Cassava Cultivars. *Journal of Root Crops*, Vol. 40 No. 2, pp. 21-27. Disponible en: <http://www.isrc.in/ojs/index.php/jrc/article/view/161>
- Carvajal-Yepes, M., Olaya, C., Lozano, I., Cuervo, M., Castano, M., & Cuellar, W. J. 2014. Unraveling complex viral infections in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) from Colombia. *Virus Research*, 186, 76-86.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2006. Breeding for disease resistance and development of alternative methods for their control. Project IP-3: Improving cassava for the developing world, Annual report 2006. Cap. 11. Consultado el 27 de marzo, 2009. Disponible en: www.ciat.cgiar.org/beans/pdfs/report_2006/contents.pdf
- Chaparro-Martinez, E. I., & Trujillo-Pinto, G. 2001. First report of frog skin disease in cassava (*Manihot esculenta*) in Venezuela. *Plant Disease*, 85(12), 1285-1285.
- Ceballos, H. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: Nuevas perspectivas para un cultivo milenario. En: La yuca en el tercer milenio. Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Ospina, B.; Ceballos, H.

- (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. Cap. 21. 13 p.
- Corredoira, E., Ballester, A., Ibarra, M., & Vieitez, A. M. 2015. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. *Tree Physiology*, 35(6): 678-690.
- Dhanya, J.; Leen, N.A.; Deepthi D. C.; Moushmi, M.; Beena, M. R.; Sheela, M. N.; Makeshkumar, T. 2017. Comparative Potential of Somatic Embryogenesis and Friable Embryogenic Callus Production in Farmer Preferred Indian Cassava Cultivars. *Journal of Root Crops*, Vol. 43 (1): 23-33.
- Douglas, G. C. 1984. Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus* spp. cultured in vitro on basal medium: influence of endogenous properties of explants. *Journal of Plant Physiology*, 116(4), 313-321.
- Driver, J. A. y A. H. kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of paradrox walnut rootstock. *Hortsci.* 19: 507-509.
- FEDEAGRO. 2016. Estadísticas agropecuarias. Consultado el 4 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.fedeagro.org>
- Feitosa, T.; Pinheiro, J.; Ferreira, L.; Lustosa, T.; De Paiva, F. 2007. Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from the Northeast of Brazil. *Brazilian archives of Biology and Technology. An International Journal.* 60 (2): 201-206.
- Fregene, M. & Puonti-Kaerlas, J. 2002. Cassava Biotechnology. En: Cassava Biology, Production and Utilization. Hillocks, R.; Thresh, J.; Belotti, A. (eds). CABI publishing, UK. Cap. 10. 29 p.
- Hagen, G. & Guilfoyle, T.; 2002. Auxin-responsive gene expresión: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Molecular Biology* 49: 373-385.
- Ibrahim, A.; Heredia, F.; Pinheiro, C.; Aragao, F.; Campos, F. 2008. Optimization of somatic embryogenesis and selection regimes for particle bombardment of friable embryogenic callus and somatic cotyledons of cassava. *African Journal of Biotechnology.* 7 (16): 2790-2797.
- Ma, G. & Xu, Q. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 70 (3): 281-288.
- Maillot, P., Walter, B., Kieffer, F. 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis: Journal of Grapevine Research*, 45(4): 185-189.
- Manoharan, R., Tripathi, J. N., & Tripathi, L. 2016. Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126 (3): 481-497.
- Marín, A., Perdomo, D., Albarrán, J. G., Fuenmayor, F., & Zambrano, C. 2008. Evaluación agronómica, morfológica y bioquímica de clones élites de yuca a partir de vitroplantas. *Interciencia*, 33(5), 365-371.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Medero, V.; Borroto, C.; Rodríguez, S.; Gómez, R.; López, J.; García, M.; Ventura, J.; Espinosa, L.; Cabrera, M.; Martínez, M.; Torres, M.; Torres, Y.; Alvarez, M.; García, J. 2000. Embriogénesis somática a partir de meristemos axilares en yuca. *Biotechnologia Vegetal*. 1: 21-26.
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., & Fondong, V. N. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus*, 4(1): 1.
- Ochoa, J.; Chavarriaga, P.; López, C. 2012. Embriogénesis somática y producción de callo embriogénico friable de dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14 (2): 20-27. Consultado el 02 de noviembre de 2013 Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37222/40404>.
- Opabode, J.; Oyelakin, O.; Akinyemiju, O.; Ingelbrecht, I. 2013. Primary somatic embryos from axillary meristems and immature leaf lobes of selected African Cassava varieties. *British Biotechnology Journal*. 3(3): 263-273.
- Opabode, J. T.; Akinyemiju, O. A. 2017. Somatic embryogenesis and regeneration of five multipurpose cassava landraces extensively integrated in African cropping system. *Journal of Crop Improvement*, 31(1): 56-71.
- Pitekellabou, R., Aidam, A. V., & Kokou, K. 2015. *In vitro* micropropagation of *Nauclea diderrichii* (de wild & t. Durand) Merrill: effect of nodes position on plantlets growth and rooting. *European Scientific Journal*, 11(21).
- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos & V.M. Loyola-Vargas 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 285-301.
- Quiroz-Figueroa, F.; Méndez-Zeel, M.; Sánchez-Teyer, F.; Rojas-Herrera, R.; Loyola-Vargas, V. 2002. Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea Arabica*. *Journal of Plant Physiology*, 159. 1267-1270.
- Ravindran, B. M., Winter, S., & Thangaraj, M. 2014. Influence of Age of Explants and Genotype on Somatic Embryogenesis in African and Indian Cassava Cultivars. *Journal of Root Crops*, 40 (2), 21-27.
- Ubalua, A. y Mbanaso, E. 2014. Somatic embryogenesis in two Nigerian Cassava cultivars (Sandpaper y TMS-60444). *Journal of Evolutionary Biology Research*. 6 (3): 9-12.
- Vidal, Á.; Costa, M.; Souza, A.; Almeida, W.; Souza, F. 2014. *In vitro* regeneration and morphogenesis of somatic embryos of cassava. *Revista Ciência Agronômica*, 45(3): 558-565.
- Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R., & Arnholdt-Schmitt, B. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 12-13.