

**Inducción de embriogénesis somática a partir
de vitrosegmentos nodales y vitroláminas
foliares durante el establecimiento *in vitro* de
camote (*Ipomoea batatas*)**

Abel Estuardo Solis Arriola

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Inducción de embriogénesis somática a partir
de vitrosegmentos nodales y vitroláminas
foliares durante el establecimiento *in vitro* de
camote (*Ipomoea batatas*)**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Abel Estuardo Solis Arriola

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2008

Inducción de embriogénesis somática a partir de vitrosegmentos nodales y vitroláminas foliares durante el establecimiento *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas*)

Presentado por:

Abel Estuardo Solis Arriola

Aprobado por:

Dinie Espinal de Rueda, M. Sc.
Asesor

Miguel Vélez, Ph.D.
Director Carrera de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

María Bravo, M.Sc.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador Área Fitotecnia

ABSTRACT

Solis Arriola, A. 2008. Induction of somatic embryogenesis from nodal segments and foliar *in vitro* explants in sweet potato (*Ipomoea batatas*). Special project as a requisite to obtain the Agronomist Engineering degree, Agricultural Science and Production Career, Zamorano, Honduras.

Sweet potato is one of the five most important food crops in the world along with rice, wheat, maize and potato, and among tuberous crops and roots it ranks second in world production after potato. The aim of this study was to develop a protocol for the induction of somatic embryogenesis, during the *in vitro* establishment of sweet potato, using *in vitro* established plants as a source of leaf blades (VLF) and nodal segments (VSN). The investigation was performed in two stages. In the first stage of somatic embryogenesis induction (EI), both types of explants were placed in a nutrient basal Linsmaier and Skoog medium during six weeks; in this medium three concentrations of the auxin 2,4-D (0.5, 1.0 and 2.0 mg/L) were assessed for both starting materials. Cultures remained in total darkness during the first 18 days after planting, before being transferred to a 16 hours photoperiod regime until the end of the evaluation (10 weeks). A Completely Randomized Design with a 2×3 factorial arrangement was used to measure the effect of the two types of explants (VLF and VSN) and the three concentrations of 2,4-D. In the second stage (EII) for growing and development of the somatic embryos, the explants were transferred to a fresh Linsmaier and Skoog basal medium without 2,4-D during four weeks. At the end of EI, the largest induction of callogenic tissue (CT) was obtained using VSN incubated in 1.0 mg/L 2,4-D. The largest formation of compact CT was obtained using VSN incubated in 1.0 and 2 mg/L of 2,4-D. The largest formation of friable CT was observed in VSN cultured with 0.5 mg/L of 2,4-D. In EI the VLF were the only explants regenerating embryogenic callus (EC) tissue, however there was no statistical difference in the induction EC for the different concentrations evaluated. At the end of EII the best response in the induction of TC as well as in the growing and proliferation of TC was observed in the VSN cultured in a medium supplemented with 0.5 mg/L (VSN0.5) and 1.0 mg/L (VSN1.0) of 2,4-D during EI. An increased presence of callogenic masses were also observed in VSN0.5 and VSN1.0. The highest induction of EC tissue was obtained in VLF incubated in 0.5 mg/L (VLF0.5) during EI. Direct somatic embryogenesis was obtained when using VLF0.5; the largest number of somatic embryos per explant was observed also using VLF0.5. Indirect somatic embryogenesis was obtained when using VLF incubated in 2.0 mg/L (VLF2.0) of 2,4-D during EI.

Keywords: Callogenic tissue, compact callus tissue, direct somatic embryogenesis, friable callus tissue, indirect somatic embryogenesis, embryogenic callus tissue, 2,4-D.

RESUMEN

Solis, A. 2008. Inducción de embriogénesis somática a partir de vitrosegmentos nodales y vitroláminas foliares en camote (*Ipomoea batatas*). Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano, Honduras. 21 p.

El camote es uno de los cinco cultivos alimenticios más importantes del mundo junto con el arroz, trigo, maíz y papa; entre los tubérculos y raíces ocupa el segundo lugar de producción mundial después de la papa. Objetivo del estudio fue desarrollar un protocolo para la inducción de embriogénesis somática durante el establecimiento *in vitro* de camote. Se utilizaron: vitroláminas foliares (VLF) y vitrosegmentos nodales (VSN), de vitroplantas ya establecidas y mantenidas en incubación. Para la primera etapa de inducción embriogénica (EI), ambos tipos de explantes fueron sembrados en un medio nutritivo Linsmaier y Skoog durante seis semanas, en el que se evaluó la auxina 2,4-D en concentraciones de 0.5, 1.0, y 2.0 mg/L. Durante los primeros 18 días los explantes permanecieron en oscuridad total y luego fueron transferidos a un régimen fotosintético de 16 horas luz hasta el final de la evaluación (10 semanas). En la segunda etapa (EII) de formación y desarrollo de embrioides, los explantes se transfirieron a un nuevo medio fresco Linsmaier y Skoog en ausencia de 2,4-D durante cuatro semanas. Al finalizar la EI la mayor inducción de tejido callogénico (TC) (91%) se obtuvo utilizando VSN incubados en 1.0 mg/L de 2,4-D. La mayor formación de TC compacto se obtuvo utilizando VSN incubados en 1.0 y 2.0 mg/L de 2,4-D (90% y 82% respectivamente) y para TC friable fue igualmente en VSN, pero incubados en 0.5 mg/L de 2,4-D (63%). Las VLF fueron los únicos explantes que formaron callo embriogénico (CE) al final de la EI aunque no hubo diferencia estadística en la inducción de callo embriogénico (CE) para las distintas concentraciones de 2,4-D. En la EII la mejor respuesta tanto en inducción de TC y en proliferación de TC, se observó en los VSN que estuvieron incubados en 0.5 mg/L (VSN0.5) y 1.0 mg/L (VSN1.0) de 2,4-D en la EI (98% y 97% en inducción de TC y 47% y 52% en proliferación de TC respectivamente). La mayor presencia de masas callogénicas se obtuvo en VSN0.5 y VSN1.0 en los que 52% y 43% de los explantes presentaron dos callos respectivamente. La mayor inducción de callo embriogénico (95%) se obtuvo en VLF que estuvieron incubadas en 0.5 mg/L (VLF0.5) en la EI. La mayor embriogénesis somática directa (57%) se obtuvo utilizando VLF0.5; la mayor embriogénesis somática indirecta (77%) se obtuvo utilizando VLF que fueron incubadas en 2.0 mg/L (VLF2.0) de 2,4-D en la EI. El mayor número de embrioides (8 a 10) por explante se obtuvo igualmente utilizando VLF0.5.

Palabras clave: callo compacto, callo friable, embriogénesis directa, embriogénesis indirecta, tejido callogénico, callo embriogénico, 2,4-D.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iv
Contenido.....	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
CONCLUSIONES.....	19
RECOMENDACIONES.....	20
LITERATURA CITADA.....	21
ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro		Página
1.	Medio básico Linsmaier y Skoog (1965) utilizado para la estimulación e inducción de embriogénesis somática en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	4
2.	Concentración de 2,4-D utilizado para la estimulación de embriogénesis somática en el establecimiento <i>in vitro</i> de Camote.....	5
3.	Variables evaluadas durante la primera etapa (EI) de inducción embriogénica durante el establecimiento <i>in vitro</i> de camote a partir de vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales.....	9
4.	Variables evaluadas durante la segunda etapa (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos durante el establecimiento <i>in vitro</i> de camote a partir de vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales.....	10
5.	Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción de tejido callogénico en vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales, durante la primera etapa de inducción embriogénica en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	11
6.	Efecto de la concentración de 2,4-D en la consistencia de tejido callogénico en vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales durante la primera etapa de inducción embriogénica en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	12
7.	Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción de callo embriogénico en vitroláminas foliares durante la primera etapa de inducción embriogénica en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	13
8.	Proliferación de tejido callogénico en vitrosegmentos nodales durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	15
9.	Presencia de masas callogénicas (%) por explante a la décima semana durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote a partir de vitrosegmentos nodales.....	16
10.	Inducción de embriogénesis somática en vitroláminas foliares durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	17

Cuadro	Página
11. Porcentaje de vitroláminas foliares que presentaron embriogénesis somática directa e indirecta durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento <i>in vitro</i> de camote.....	18
12. Número de embriones somáticos en vitroláminas foliares durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento <i>in vitro</i> de Camote.....	18
 Figura	
1. Inducción de tejido callogénico durante la inducción de embriogénesis somática de vitroláminas foliares utilizando tres concentraciones de 2,4-D (mg/L) en camote.....	14
2. Inducción de tejido callogénico durante la inducción de embriogénesis somática de vitrosegmentos nodales utilizando tres concentraciones de 2,4-D (mg/L) en camote.....	14
3. Inducción de callo embriogénico durante la inducción de embriogénesis somática de vitroláminas foliares utilizando tres concentraciones de 2,4-D (mg/L) en camote.....	16
 Anexo	
1. Categorización de inducción de tejido callogénico (ITC) en vitroláminas foliares (VLF) y vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa I (EI) de inducción embriogénica y etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.....	22
2. Categorización de consistencia del callogénico (CTC) en vitroláminas foliares (VLF) y vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa I (EI) de inducción embriogénica en camote.....	23
3. Categorización de la inducción de callo embriogénico (ICE) en vitroláminas foliares (VLF) en la etapa I (EI) de inducción embriogénica y etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.....	24
4. Categorización de proliferación de tejido callogénico (PTC) en vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.....	24
5. Categorización de presencia de masas callogénicas (PMC) en vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.....	25
6. Embriogénesis directa (ED) e indirecta (EInd) en vitroláminas foliares (VLF) en la etapa II de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.....	26
7. Embriones somáticos en vitroláminas foliares (VLF) en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.....	26

INTRODUCCIÓN

El camote, *Ipomoea batatas*, también conocido como batata, boniato, moniato o sweet potato, es una especie que pertenece a la familia de las convolvuláceas y cuenta con aproximadamente 50 géneros y 1200 especies (Gil Villacís 2005).

La demanda de camote para extraer el almidón es tan grande que ha dejado de ser un alimento básico y ahora se cultiva principalmente con ese propósito o para alimento de animales (Alban 2006). Aunque su uso como alimento ha disminuido, su producción ha aumentado.

China es el mayor productor mundial de camote. Su producción representa aproximadamente el 85% de la producción mundial (CIP 2004). En América latina se producen 2 millones de toneladas anuales (Zuloaga 2007). Es uno de los 5 cultivos alimenticios más importantes del mundo junto con el arroz, trigo, maíz y papa (Zuloaga 2007), y dentro de tubérculos y raíces ocupa el segundo lugar de producción mundial después de la papa (CIP 2004).

La planta de camote es perenne, pero se cultiva como anual. Su porte es rastrero, y su consistencia herbácea (Folquer 1978). Es de origen tropical y puede desarrollarse satisfactoriamente a una temperatura promedio de 22°C con pH desde 4.5 a 7.5 y fotoperiodos largos. Crece y produce en cualquier tipo de suelo, desde los arenosos hasta los arcillosos, profundos y friables (Alban 2006).

La forma mas fácil de propagación de camote es por vía asexual, utilizando esquejes o guías enraizados (Alban 2006). El camote está expuesto al ataque de una gran variedad de plagas y enfermedades micóticas y virales (CIAT 1991).

La técnica de cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida y masiva de materiales seleccionados, además de la conservación de germoplasma, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra (Lizárraga y Espinosa 1990). Esta técnica que garantiza material limpio para la siembra y el intercambio internacional de germoplasma ha motivado a numerosos investigadores a ensayar varios métodos para la propagación *in vitro* del camote, dentro de los que se puede mencionar el aislamiento y cultivo de protoplastos, cultivo de anteras, uso de ápices cortado o de meristemas y una combinación de este ultimo con el injerto de ápices *in vivo* y el tratamiento con calor de los materiales de siembra (CIAT 1991).

Dentro de las investigaciones en el área de cultivo de tejidos para realizar una rápida multiplicación en el camote se encuentra la embriogénesis somática, la cual abre nuevas áreas para la investigación. Por ejemplo, los embriones somáticos pueden encapsularse y sembrarse como semilla, asegurando así la obtención de colecciones uniformes y libres de virus. También se pueden emplear los embriones somáticos, deshidratados o criopreservados, para la conservación de germoplasma (CIAT 1991).

La utilización de hormonas sintéticas en el cultivo de tejidos proporciona un desarrollo adecuado del tejido vegetal. Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftaleneacético (ANA), ácido indoleacético (AIA); las citocininas que más se emplean son: Kinetina y 6-bencilaminopurina (BAP) (Montoya 1991).

En el laboratorio de cultivo de tejidos se realizó un estudio de micropropagación de vitroplantas de camote variedad Bush Bock establecidas a partir de meristemas, en el que se evaluó el uso de cuatro concentraciones de BAP (0, 0.5, 1 y 2 mg/L) en la estimulación de brotes durante la etapa de multiplicación. Los mejores resultados para la obtención de brotes se obtuvieron utilizando 0 mg/L de BAP (Gil Villacís 2005).

El objetivo de la investigación fue establecer un protocolo adecuado para la obtención de embriones somáticos a partir del uso de vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales de camote utilizando tres niveles de 2,4-D (0.5, 1.0 y 2.0 mg/L).

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó entre Agosto y Octubre de 2008 en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* (LCTRIV) de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, ubicada en el departamento de Francisco Morazán, Honduras, a 30 km de Tegucigalpa, temperatura promedio de 24°C, 800 msnm y 1100 mm de precipitación anual.

El **material vegetal utilizado** fue la variedad Bush Bock, importada de África en abril de 2007 a la EAP, la cual fue sembrada en los invernaderos del LCTRIV. A partir de estas plantas iniciales se aislaron meristemos para establecer un cultivo *in vitro* en el cuarto de crecimiento del LCTRIV en marzo de 2008. Estas vitroplantas de 5 meses de edad fueron utilizadas como plantas madre de las cuales se extrajeron los vitrosegmentos nodales y las vitroláminas foliares utilizados para esta investigación.

El **medio de cultivo básico** utilizado para estimular la formación de embriones somáticos fue Linsmaier y Skoog (1965). Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivo se utilizó agua destilada.

Para la **preparación del medio de cultivo de inducción embriogénica** se elaboraron 4 L de medio del cultivo en bikers de 250 y 500 100 ml. Estos se llenaron con agua destilada y se les agregó solución madre la cual contenía todos los macronutrientes y micronutrientes además de hierro (FeNa EDTA), tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, sacarosa e inositol en las cantidades recomendadas según la formulación básica recomendada (Cuadro 1). Luego se agregó la auxina 2,4-D (ácido diclorofenoaxiacético) de acuerdo con cada tratamiento (Cuadro 2). Posteriormente se ajustó el pH a 5.8 utilizando KOH o HCL según lo requería el medio. Finalmente se agregó el agente gelificante Gelrite a razón de 2 g/L.

El medio se dispensó a razón de 10 ml por tubo de ensayo. Finalmente los tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo fueron esterilizados en la autoclave durante 25 minutos a 120°C y 15 PSI (Vallejo Rendón 2007).

Cuadro 1. Medio básico Linsmaier y Skoog (1965) utilizado para la estimulación e inducción de embriogénesis somática en el establecimiento *in vitro* de Camote.

Componente	Fórmula	Nombre Común	Cantidad (mg/L)
Macronutrientes	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1,650.0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	440.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.0
	KNO_3	Nitrato de potasio	1,900.0
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.0
Micronutrientes	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto exahidratado	0.025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato cúprico pentahidratado	0.025
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso	27.8
	Na ₂ -EDTA		37.3
Vitaminas	Tiamina		0.4
	Piridoxina		0.5
	Ácido nicotínico		0.5
	Inositol		100.0
Otros	Sacarosa		70,000
	Gelrite		2,000
pH			5.8

Cuadro 2. Concentración de 2,4-D utilizado para la estimulación de embriogénesis somática en el establecimiento *in vitro* de camote.

Explante	2,4-D (mg/L)
Vitroláminas foliares (VLF)	0.5
	1.0
	2.0
Vitrosegmentos nodales (VSN)	0.5
	1.0
	2.0

Preparación y siembra del material vegetal:

Del cuarto de crecimiento se obtuvieron vitroplantas establecidas en marzo de 2008, las cuales se encontraban en medio de cultivo Linsmaier y Skoog (1965). Estas fueron extraídas de los tubos de ensayo en las cámaras de flujo laminar y se colocaron en platos petri estériles para preparar los explantes.

VITROSEGMENTOS NODALES (VSN):

Con este nombre se le conoce el aislamiento de una yema previamente establecida *in vitro* junto con una porción del tallo, para obtener un vástago a partir de la yema (Pierik 1990).

En la **preparación del material** para VSN se extrajeron las plantas madre de los tubos de ensayo del cuarto de incubación, luego en la cámara de flujo laminar se extrajeron las vitroplantas de los tubos de ensayo. Estas vitroplantas fueron colocadas en platos petri donde con bisturíes No 11 previamente esterilizados se removieron todas las hojas y las raíces. Las hojas fueron colocadas en platos petri para obtener las VLF de 1 cm de largo × 1.5 cm de ancho (1.5 cm²), del segundo experimento. De los tallos defoliados se eliminaron los meristemas apicales con ayuda de bisturíes, dejando únicamente los tallos con las yemas axilares. Estos tallos fueron seccionados en segmentos nodales de 2 cm cada uno.

Siembra del material: Los VSN nodales fueron colocados de manera polar (derechos, con su base fisiológica apoyada en el medio de cultivo) en forma individual en tubos de ensayo. Cada tubo de ensayo fue cerrado con un tapón de plástico y sellado utilizando parafilm.

Condiciones de incubación: Luego de la siembra, los tubos de ensayo fueron colocados en gradillas y trasladados al cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad por 18 días, a 25°C y una humedad relativa de 60%. Aunque una alta intensidad lumínica ha sido esencial para obtener embriogénesis somática en tabaco (*Nicotiana tabacum*); en zanahoria (*Daucus carota*), papa (*Solanum tuberosum*) y camote (*Ipomoea batatas*) es necesaria la oscuridad para la inducción de los embriones (CIAT 1991).

Luego de 18 días los explantes fueron colocados a luz directa, utilizando lámparas fluorescentes “daylight” de 2.4 m de largo espaciadas a 50 cm con una intensidad de 1000-3000 lux cada una. Durante toda la evaluación los explantes permanecieron bajo las mismas condiciones de temperatura (25°C) y humedad relativa (60%).

VITROLÁMINAS FOLIARES (VLF)

Con el paso de los años se han desarrollado algunos otros métodos, además del cultivo de meristemos, segmentos nodales y anteras, para propagar *in vitro* muchos cultivos, tal es el caso de láminas foliares a partir de hojas jóvenes y/o maduras (Pierik 1990).

De vitroplantas de camote variedad Bush bock sembradas en marzo de 2008 para su fase de establecimiento, se cosecharon VLF, contando de esta manera con material libre de contaminación y patógenos.

Preparación del material: En la cámara de flujo laminar y con ayuda de pinzas se extrajeron las vitroplantas y se colocaron en platos petri. Luego se removieron las raíces y las hojas con pecíolo, aislando las hojas del tallo con pinzas y bisturíes esterilizados.

Todas las hojas con un área foliar mayor a 1.5 cm² fueron almacenadas en otro plato petri, y se removieron los pecíolos utilizando un bisturí No. 11, dejando únicamente la lámina foliar. Luego se recortaron los bordes de manera paralela y perpendicular a la nervadura central dejando intacto el centro de las hojas, de esta manera se obtuvieron explantes uniformes con un área foliar de 1.5 cm².

Siembra de los explantes: Con pinzas se introdujeron explantes individuales en cada tubo de ensayo, con la superficie abaxial (envés) en contacto con el medio. Luego cada tubo de ensayo fue cerrado y sellado con parafilm. Los tubos de ensayo al igual que los VSN, fueron colocados en gradillas y trasladados al cuarto de crecimiento bajo condiciones de oscuridad por 18 días a 25°C y una humedad relativa de 60%.

Condiciones de incubación: Después de 18 días los explantes fueron expuestos a luz directa utilizando lámparas fluorescentes “daylight” de 2.4 m de largo espaciadas a 50 cm con una intensidad de 1000-3000 lux cada una (Vallejo Rendón 2007). Durante toda la evaluación los explantes permanecieron bajo las mismas condiciones de temperatura (25°C) y humedad relativa (60%).

Transferencia a medio etapa II de formación y desarrollo de embriones somáticos: Se necesita 2,4-D para la inducción de embriones somáticos, sin embargo la maduración de los embriones y la germinación no ocurre en presencia de ésta. En consecuencia hay que trasladar los explantes a un medio nutritivo sin auxina (CIAT 1991).

A los 50 días (semana siete) de haberse realizado la siembra, los VSN y las VLF se cambiaron de medio nutritivo, el cual contenía la misma solución básica recomendada sin el 2,4-D (Cuadro 1).

Para el **análisis estadístico** se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial (2×3) donde:

Factor A: Los dos tipos de material de inicio procedentes de VLF y VSN.

Factor B: Tres concentraciones de la auxina 2,4-D (0.5, 1.0 y 2.0 mg/L).

El experimento constó de seis tratamientos, cada tratamiento constó de tres repeticiones con 20 tubos de ensayo cada una, para un total de 360 tubos de ensayo. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS®, se realizó un ANDEVA, utilizando el modelo lineal general (GLM) y la prueba LSD para la separación de medias con una probabilidad $P \leq 0.05$. Para la transformación de datos expresados en porcentaje se utilizó Arco seno.

ETAPA I (EI) DE INDUCCIÓN EMBRIOGÉNICA (PRESENCIA DE 2,4-D)

Durante las primeras seis semanas de la evaluación, los explantes fueron sembrados en un medio de Linsmaier y Skoog (1962), en el cual se evaluaron las tres concentraciones de 2,4-D (0.5, 1.0 y 2.0 mg/L) tanto en VLF como para VSN. Durante este periodo los explantes permanecieron 18 días en oscuridad total al inicio de la siembra y posteriormente fueron expuestos a un fotoperiodo de 16 horas luz hasta el final de la investigación.

Para ambos explantes se evaluó:

Inducción de tejido callogénico (ITC-EI): El inicio de la formación de tejido callogénico (TC) se evaluó en la semana seis en ambos explantes (VLF y VSN) y se categorizó de acuerdo con su desarrollo, donde 0 indica que no hubo formación de TC y 1 indica presencia de TC (Anexo 1).

El TC se puede definir como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. La proliferación de callos se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal (Hurtado y Merino 1991).

Consistencia del tejido callogénico (CTC): A las seis semanas de haberse realizado la siembra del material de inicio (VLF y VSN) se evaluó la respuesta regenerativa que expresaron ambos explantes, en cuanto la formación de TC con dos tipos de consistencias (Anexo 2): compacto y friable en donde: 0 indica que no hubo respuesta regenerativa, 1 presencia de callo compacto y 2 presencia de callo friable.

Para vitroláminas foliares se evaluó:

Inducción de callo embriogénico (ICE-EI): Esta variable se evaluó en la semana seis, únicamente en VLF (Anexo 3), debido a que en VSN no hubo inducción de callo embriogénico, utilizándose dos categorías: 0 ausencia y 1 presencia de callo embriogénico.

ETAPA II (EII) DE FORMACIÓN Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS (AUSENCIA DE 2,4-D)

Para los vitrosegmentos nodales se evaluó:

Inducción de tejido callogénico (ITC-EII): En la EII la ausencia o presencia de TC se evaluó en la semana 10 únicamente en los VSN (Anexo 1), ya que en las VLF el TC fue reabsorbido a partir de la EII. Para evaluar esta variable se utilizaron las siguientes categorías: 0 indica ausencia y 1 presencia de TC.

Proliferación de tejido callogénico (PTC): Se categorizó la expansión o crecimiento de TC friable de los VSN, ya que en la EII solamente se observó callo friable, utilizando: 0 como ausencia de TC, 1 para el TC cubriendo un área menor al 50% del área total del explante inicial y 2 para el TC cubriendo un área mayor al 50% del área total del explante inicial (Anexo 4).

Presencia de masas callogénicas (PMC): después de 10 semanas de haber iniciado con la investigación se evaluó el número de callos por cada explante en donde: 0 indica ausencia de TC, 1 indica un callo por explante, 2 indica dos callos por explante y 3 indica la presencia de tres callos por VSN (Anexo 5).

Para vitroláminas foliares se evaluó:

Inducción de callo embriogénico (ICE-EII): La ausencia o presencia de embriogénesis somática se evaluó únicamente en las VLF en la semana 10, debido a que en VSN no hubo ICE y se usaron las siguientes categorías : 0 indica ausencia de callo embriogénico y 1 presencia del mismo.

Embriogénesis directa (ED) e indirecta (EInd): Al finalizar la etapa II se observó la formación de embriones somáticos directamente a partir del explante (ED) e indirectamente a partir de callo embriogénico (EInd), donde se categorizó 1 para ED y 2 para EInd (Anexo 6).

Número de embriones somáticos (NES): La presencia o ausencia de embriones somáticos se evaluó en la semana 10 a través de valores categorizados de acuerdo con el número de embriones somáticos observados, indicando 0 como la ausencia de embriones somáticos, 1 para una proliferación leve (1 a 3 embriones somáticos); 2 representando una proliferación intermedia (4 a 7 embriones somáticos) y 3 indicando una proliferación profusa (8 a 10 embriones somáticos) (Anexo 7).

Las variables fueron evaluadas en la Etapa I (EI) de inducción embriogénica al final de la sexta semana (Cuadro 3) y en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos a la décima semana de iniciada la investigación (Cuadros 4).

Cuadro 3. Variables evaluadas durante la primera etapa (EI) de inducción embriogénica durante el establecimiento *in vitro* de camote a partir de vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales.

Etapas I (EI) de inducción embriogénica en presencia de 2,4-D					
Explantes[¥]	Variable	Código	Descripción	Categorías	Anexos
	Inducción de tejido callogénico	ITC-EI	Formación de TC ^{Jb} en los bordes de las VLF	0, 1 ^L	1
VLF	Consistencia del tejido callogénico	CTC	TC compacto y TC friable en los bordes de las VLF	0, 1, 2 ^M	2
	Inducción de callo embriogénico	ICE-EI	TC con presencia de ES ^Σ	0, 1 ^N	3
	Inducción de tejido callogénico	ITC-EI	Formación de TC en la parte superior de los VSN	0, 1 ^L	1
VSN	Consistencia del tejido callogénico	CTC	TC compacto y friable en la parte superior de los VSN	0, 1, 2 ^M	2

¥ VLF= Vitroláminas foliares VSN= Vitrosegmentos nodales.

Jb= Tejido callogénico.

Σ= Embriones somáticos.

L: 0= ausencia de tejido callogénico, 1= presencia de tejido callogénico.

M: 0= Ausencia, 1= presencia de tejido callogénico compacto, 2= presencia de tejido callogénico friable.

N: 0= ausencia de callo embriogénico, 1= presencia de callo embriogénico.

Cuadro 4. Variables evaluadas durante la segunda etapa (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos durante el establecimiento *in vitro* de camote a partir de vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales.

Etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en ausencia de 2,4-D						
Explantos^Y	Variable	Código	Descripción	Categorías	Anexos	
	Inducción de callo embriogénico	ICE-EII	TC con presencia de ES ^Σ	0, 1 ^L	3	
VLF	Embriogénesis directa e indirecta	ED y Eind	Presencia de ES directamente a partir del explante o indirectamente a partir de TC ^{Jb}	1, 2 ^M	6	
	Número de embriones somáticos	NES	Número de embriones somáticos por explante	0, 1, 2, 3 ^N	7	
	Inducción de tejido callogénico	ITC-EII	Formación de TC	0, 1 ^O	1	
VSN	Proliferación de tejido callogénico	PTC	Expansión o crecimiento de TC	0, 1, 2 ^P	4	
	Presencia de masas callogénicas	PMC	Número de masas callogénicas por explante	1, 2, 3 ^R	5	

Y: VLF= Vitroláminas foliares VSN= Vitrosegmentos nodales **Jb**= Tejido callogénico. **Σ**= Embriones somáticos.

L: 0= ausencia de callo embriogénico, 1= presencia de callo embriogénico .

M: 1= embriogénesis directa, 2= embriogénesis indirecta.

N: 0= ausencia de embriones somáticos, 1= 1 a 3 embriones somáticos, 2= 4 a 7 embriones, 3= 8 a 10 embriones.

O: 0= ausencia de tejido callogénico, 1= presencia de tejido callogénico.

P: 0= ausencia de tejido callogénico, 1= tejido callogénico cubriendo un área mayor del 50% del área total del explante inicial, 2= tejido callogénico cubriendo un área menor del 50% del área total del explante inicial.

R: 1= una masa callogénicas, 2= dos masas callogénicas, 3= tres masas callogénicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El material experimental puede influir en el crecimiento y desarrollo *in vitro*, esto depende de la porción de planta que utilizada como explante, existiendo grandes diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración, incluso entre variedades de una misma especie. Además la concentración de promotores externos (hormonas) utilizados en el medio de cultivo da como resultado diferentes respuestas regenerativas (CIAT 1991).

ETAPA I (EI) DE INDUCCIÓN EMBRIOGÉNICA (PRESENCIA DE 2,4-D)

Inducción de tejido callogénico (ITC-EI): A partir de la semana seis se comenzó a observar la aparición de TC en ambos explantes evaluados: VLF y VSN (Anexo 1). Por lo general, la formación de callo toma de 3 a 8 semanas, dependiendo del tipo de explante y hormona utilizado (Hurtado y Merino 1991). El 2,4-D estimuló fácilmente la aparición de TC a la sexta semana de iniciada la investigación.

Los VSN cultivados en 1.0 mg/L fueron los que mostraron diferencia ($P < 0.05$) con respecto a las VLF cultivadas en 0.5 y 2.0 mg/L de 2,4-D. Ya que los VSN cultivados en 1.0 mg/L de 2,4-D obtuvieron 91% de ITC, mientras las VLF cultivadas en 0.5 y 2.0 mg/L obtuvieron 64% y 72% de ITC respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción de tejido callogénico en vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales, durante la primera etapa de inducción embriogénica en el establecimiento *in vitro* de camote.

Explante [‡]	2,4-D ^Ω (mg/L)	Inducción de tejido callogénico(%) ¹
VLF	0.5	64 ^b
	1.0	74 ^{ab}
	2.0	72 ^b
VSN	0.5	83 ^{ab}
	1.0	91 ^a
	2.0	84 ^{ab}

[‡] VLF= Vitroláminas foliares VSN= Vitrosegmentos nodales.

^{a y b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$. ^Ω 2,4-Diclorofenoxiacético.

¹ Porcentaje de explantes con presencia de tejido callogénico.

Consistencia del tejido callogénico (CTC): Para ambos explantes fue evidente la aparición de callos compactos y friables en presencia de 2,4-D a la sexta semana después de iniciado el cultivo (Anexo 2). El tejido callogénico compacto presentó masas celulares unidas, lisas, duras y color verde oscuro. El tejido callogénico friable presentó una apariencia esponjosa y color verde claro. La consistencia del tejido callogénico depende del tipo de hormona y del explante que se utilice (CIAT 1991).

En la inducción de embriones somáticos son evidentes callos friables y compactos, el primero es organogénico y el segundo puede producir embriones somáticos (CIAT 1991). En los VSN la formación del TC inició a partir de la parte superior del explante y en las VLF la formación de TC comenzó a partir de los bordes del explante.

Los VSN cultivados en medio con 1.0 y 2.0 mg/L de 2,4-D fueron los que presentaron mayor formación de callos compactos, con 82% y 90% de explantes con callos compactos respectivamente. Este TC compacto puede dar origen a embriones somáticos, mientras que el TC friable por lo general da origen a inducción organogénica. Las VLF cultivadas con 0.5 y 1.0 mg/L de 2,4-D presentaron el menor porcentaje de explantes con callos compactos, 39% y 42% respectivamente (Cuadro 6).

A una concentración de 0.5 mg/L de 2,4-D los VSN fueron los que presentaron mayor proporción de callos friables con 63% de los explantes. Los VSN incubados en 2.0 mg/L de 2,4-D fueron los que presentaron un menor porcentaje (10%) de explantes con callo friable (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la concentración de 2,4-D en la consistencia de tejido callogénico en vitroláminas foliares y vitrosegmentos nodales durante la primera etapa de inducción embriogénica en el establecimiento *in vitro* de camote.

Explante [‡]	2,4-D ^Ω (mg/L)	Consistencia del Tejido Callogénico (%) ¹	
		Compacto	Friable
VLF	0.5	39 ^b	61 ^{ab}
	1.0	42 ^b	58 ^{ab}
	2.0	63 ^{ab}	37 ^{bdc}
VSN	0.5	37 ^b	63 ^a
	1.0	82 ^a	18 ^{dc}
	2.0	90 ^a	10 ^d

[‡] VLF= Vitroláminas foliares VSN= Vitrosegmentos nodales.

^{a y b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a P< 0.05. ^Ω 2,4-Diclorofenoxiacético.

¹ Porcentaje de explantes con presencia de callo friable y/o compacto.

Inducción de Callo Embriogénico (ICE-EI): La hormona 2,4-D aparte de haber inducido a la formación de TC en los explantes, también dio origen a la formación de callo embriogénico (CE).

La formación de embriones somáticos comienza de cuatro a 10 semanas de haber sembrado los explantes con la desdiferenciación de células ya diferenciadas. Posteriormente inicia la división celular, las células son ricas en citoplasmas y se convierten en células embriogénicas por la influencia de alguna auxina (CIAT 1991).

En las VLF la ICE fue evidente en la semana seis (Anexo 3), ya que se observaron pequeñas estructuras de color blanco y de forma globular en la superficie de los explantes. No así en los VSN donde no se observó presencia de CE, sino únicamente formación de TC. Independientemente de la dosis utilizada de 2,4-D, no se encontró diferencia ($P < 0.05$) en la ICE en las VLF (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de la concentración de 2,4-D en la inducción de callo embriogénico en vitroláminas foliares durante la primera etapa de inducción embriogénica en el establecimiento *in vitro* de camote.

2,4-D ^Ω (mg/L)	Inducción de callo embriogénico (%) ¹
0.5	15 ^a
1.0	15 ^a
2.0	12 ^a

^a medias con igual letra no difieren estadísticamente a $P < 0.05$. ^Ω 2,4-Diclorofenoxiacético.

¹Porcentaje de explantes con presencia de callo embriogénico.

ETAPA II (EII) DE FORMACIÓN Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS (AUSENCIA DE 2,4-D)

Para estimular el crecimiento de los embriones somáticos, al inicio de la semana siete los explantes fueron trasladados a un medio de cultivo de Linsmaier y Skoog sin auxina 2,4-D, donde permanecieron cuatro semanas hasta la semana 10. De esta manera se estimuló el crecimiento y la maduración de los embriones somáticos, ya que la presencia de 2,4-D en el medio de cultivo inhibe el crecimiento de los embriones somáticos (CIAT 1991).

Inducción de tejido callogénico (ITC-EII): Durante las primeras seis semanas en presencia de 2,4-D, fue evidente la presencia de callos compactos y callos friables en los bordes de las VLF. Sin embargo al inicio de la semana cuatro se comenzó a observar una degradación del TC en VLF en ausencia de 2,4-D que fue más evidente a partir de la semana seis (Figura 1). Simultáneamente con la degradación del TC, en la misma semana cuatro, se comenzó a observar la aparición de callo embriogénico (CE), que fue más evidente en la EII a partir de la semana seis en ausencia de 2,4-D.

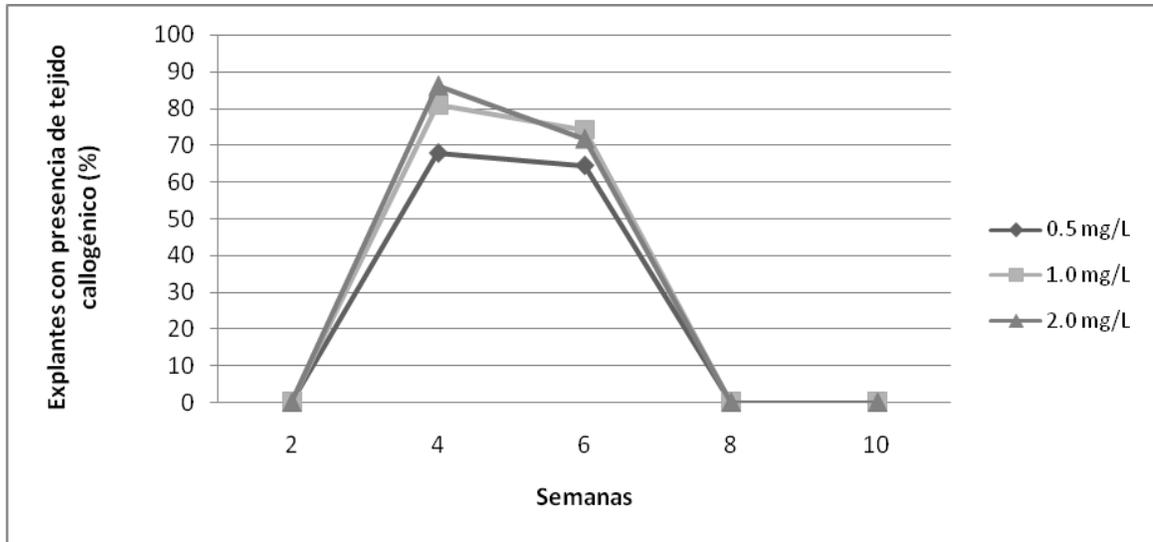


Figura 1. Inducción de tejido calogénico durante la inducción de embriogénesis somática de vitroláminas foliares utilizando tres concentraciones de 2,4-D (mg/L) en camote.

En los VSN a diferencia de las VLF, en la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos, siguió formándose TC. Sin embargo se observó que únicamente se formaron callos friables después de haber transferido los explantes a medio de cultivo libre de 2,4-D contrastando con las primeras seis semanas donde los explantes formaron callos compactos y callos friables.

Los VSN cultivados en 0.5 mg/L y 1.0 mg/L durante las primeras seis semanas fueron los que mostraron mayor porcentaje de TC al final de la décima semana, con el 98% y 97% respectivamente (Figura 2) (Anexo 1).

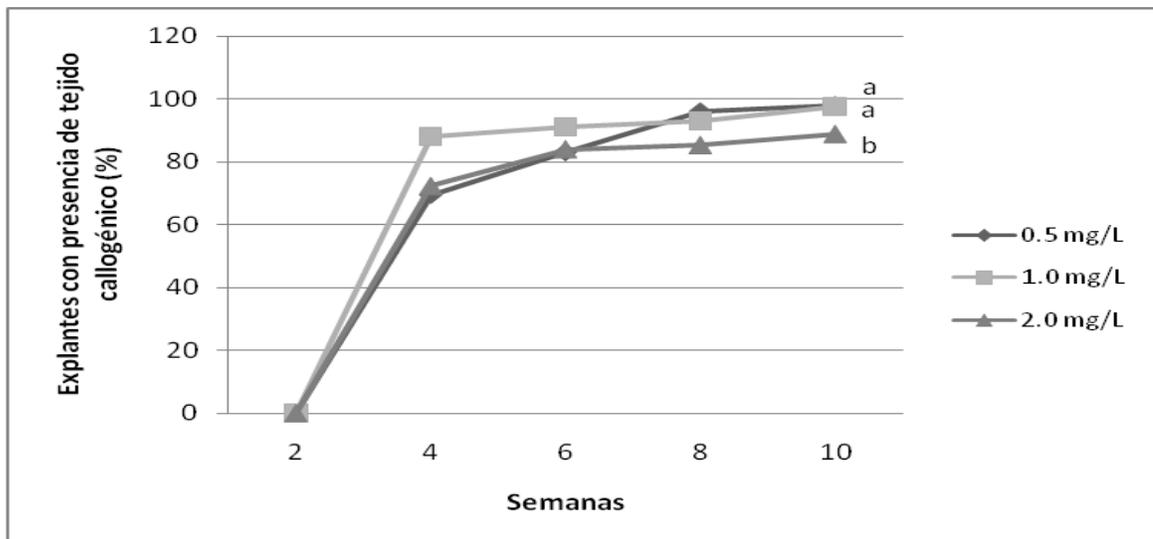


Figura 2. Inducción de tejido calogénico durante la inducción de embriogénesis somática de vitrosegmentos nodales utilizando tres concentraciones de 2,4-D (mg/L) en camote.

Proliferación de Tejido Callogénico (PTC): La concentración de auxina 2,4-D durante las primeras seis semanas y su remoción en las últimas cuatro semanas influyó significativamente en la PTC, debido a que las auxinas generalmente inducen a la expansión celular (Pierik 1990). Las células callogénicas presentan una proliferación continua y acelerada, dando origen a una apariencia desorganizada, que posteriormente se regenerará en órganos o en el crecimiento de tejido calloso (CIAT 1991).

Los VSN en ausencia de 2,4-D fueron los únicos explantes que presentaron una PTC en la EII a diferencia de los VLF que manifestaron presencia de TC únicamente durante las primeras seis semanas estando en presencia de 2,4-D; por lo tanto no presentaron PTC durante la EII (Figura 1).

En los VSN que fueron incubados en 0.5 y 1.0 mg/L de 2,4-D durante la EI el 47% y 52% respectivamente del total de explantes presentaban una PTC mayor al 50% del área total del explante inicial. Los VNS incubados en 2.0 mg/L de 2,4-D durante la EI en su mayoría solamente mostraron explantes con TC que cubrían un área <50% del explante inicial (78%) (Cuadro 8) (Anexo 4).

Cuadro 8. Proliferación de tejido callogénico en vitrosegmentos nodales durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento *in vitro* de camote.

Tratamiento ^z	Proliferación de Tejido Callogénico (%) ^e	
	< 50% ¹	> 50% ²
VSN0.5	53 ^b	47 ^a
VSN1.0	47 ^b	52 ^a
VSN2.0	78 ^a	22 ^b

^zVSN= Vitrosegmentos nodales cultivadas en diferentes dosis de 2,4-D en la etapa I.

^{a b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a P< 0.05

¹PTC < 50%= Porcentaje de explantes con presencia de tejido callogénico cubriendo un área menor del 50% del área total del explante inicial.

² PTC > 50% = Porcentaje de explantes con presencia de tejido callogénico cubriendo un área menor del 50% del área total del explante inicial.

^e Porcentaje de explantes con presencia de proliferación de tejido callogénico.

Presencias de masas callogénicas (PMC): En las VLF no se observó PMC, únicamente ICE, mientras que los VSN incubados en 0.5 y 1.0 mg/L de 2,4-D durante las primeras seis semanas el 52% y 43% presento dos callos por explante respectivamente. Los VSN incubados en 0.5 mg/L de 2,4-D en la EI fueron los únicos explantes que presentaron tres callos (4%) al final de la décima semana (Cuadro 9) (Anexo 5). Hay que tomar en cuenta que la cantidad de masas callogénicas y el tamaño del TC que se obtiene por explante incrementa la tasa de multiplicación *in vitro* al momento de subcultivar el TC (Pierik 1990).

Un callo puede formar brotes, raíces, embrioides, o simplemente continuar proliferando como callo, dependiendo de las cantidades relativas de auxinas y citocininas suministradas y lo mismo sucede con la cantidad y tamaño de los callos (Hurtado y Merino 1994).

Cuadro 9. Presencia de masas callogénicas (%) por explante a la décima semana durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento *in vitro* de camote a partir de vitrosegmentos nodales.

Tratamiento ^y	Un callo	Dos callos	tres callos
VSN0.5	44 ^b	52 ^a	4 ^a
VSN1.0	57 ^a	43 ^a	0 ^b
VSN2.0	62 ^a	38 ^b	0 ^b

^yVSG= Vitrosegmentos nodales cultivados en diferentes dosis de 2,4-D en la etapa I.

^{a b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a $P < 0.05$.

Inducción de Callo Embriogénico (ICE-EII): En la semana seis durante la EI se observó la aparición de tejido embriogénico; ya en la EII se observaron embriones somáticos en fase globular, acorazonado, torpedo y cotiledonal (Anexos 8a, 8b, 8c). En presencia de 2,4-D los embriones somáticos no se desarrollan perfectamente ya que el 2,4-D inhibe el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos, los cuales ocurren solamente en la ausencia de 2,4-D (CIAT 1991). Se debe de tener en cuenta que la tendencia embriogénica en los cultivos parece ser específica de cada especie al momento de utilizar diferentes porciones de plantas, algunas tienden a formar embriones y otros solamente TC (Montoya 1991).

En VLF en la semana cuatro se comenzó a observar, simultáneamente con la degradación del TC, la aparición de CE, el cual fue más evidente a partir de la semana seis en ausencia de 2,4-D (Figura 3). En VSN no se observó ICE, únicamente proliferación de TC friable tal y como se observó en la EI de inducción embriogénica.

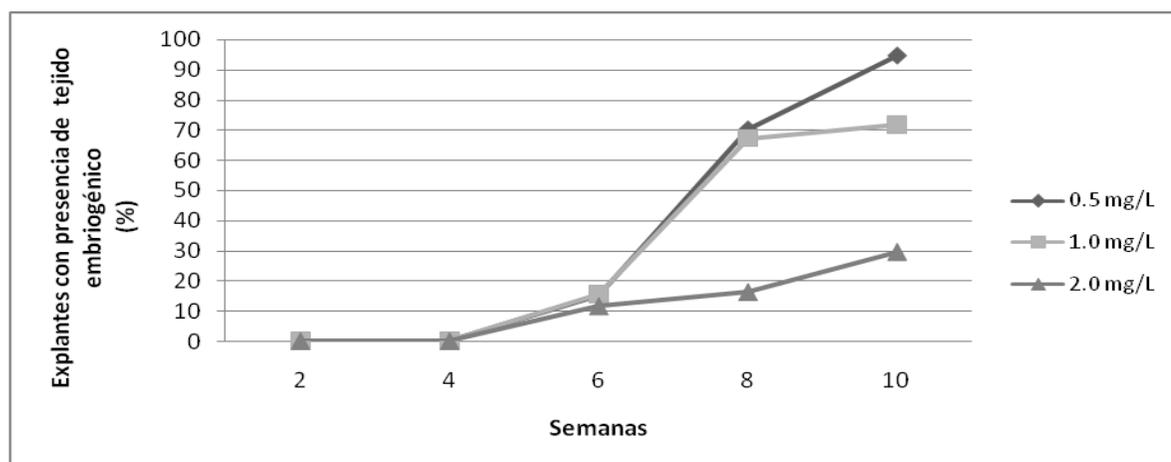


Figura 3. Inducción de callo embriogénico durante la inducción de embriogénesis somática de vitroláminas foliares utilizando tres dosis de 2,4-D (mg/L) en camote.

Las VLF que estuvieron cultivadas en 0.5 mg/L de 2,4-D durante las primeras seis semanas de cultivo mostraron ICE que las otras dos concentraciones, con 95% de presencia de CE (Cuadro 10) (Anexo 1). Las VLF que en la EI fueron cultivadas a 0.5 mg/L de 2,4-D presentaron un fenómeno denominado gemación, mediante el cual se obtiene la formación de embriones secundarios a partir de los embriones primarios a través de un proceso conocido como embriogénesis secundaria (Anexo 8d) (Pierik 1990).

Cuadro 10. Inducción de embriogénesis somática en vitroláminas foliares durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento *in vitro* de camote.

Tratamiento [‡]	Inducción de Callo Embriogénico (%) ¹
VLF0.5	95 ^a
VLF1.0	71 ^b
VLF2.0	30 ^c

[‡] VLF= Vitroláminas foliares cultivadas en diferentes dosis de 2,4-D en la etapa I.

^{a b y c} medias con diferente letra difieren estadísticamente a P < 0.05.

¹ Porcentaje de explantes con presencia de callo embriogénico.

Embriogénesis directa (ED) e indirecta (EInd): Así mismo en la décima semana la embriogénesis somática se categorizó en embriogénesis directa e indirecta, debido a que habían embriones que se originaron directamente del explante (ED) y también se observó embriones que se produjeron a partir de callos embriogénicos (EI) (Anexo 6).

En VLF se observó tanto ED como EInd (Anexo 6), no así en VSN, en los que solamente se obtuvo ITC durante la etapa II de formación y desarrollo de embriones somáticos. Las VLF mantenidas en 0.5 mg/L y 1.0 mg/L de 2,4-D durante las primeras seis semanas mostraron ED y fueron las que formaron mayor porcentaje de embriones somáticos directamente a partir del explante (57% y 54% respectivamente) (Cuadro 11).

En cuanto a la inducción de EInd los explantes que fueron sometidos en las primeras seis semanas a un nivel de 2.0 mg/L fueron los que presentaron mayor respuesta, ya que el 77% de los explantes mostró una formación indirecta de embriones a partir del TC (EI) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de vitroláminas foliares que presentaron embriogénesis somática directa e indirecta durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento *in vitro* de camote.

Tratamiento [‡]	Embriogénesis (%) ¹	
	Directa	Indirecta
VLF0.5	57 ^a	43 ^b
VLF1.0	54 ^{ab}	46 ^b
VLF2.0	23 ^b	77 ^a

VLF= Vitroláminas foliares cultivadas en diferentes dosis de 2,4-D en la etapa I.

^{a b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a P< 0.05.

¹Porcentaje del total de explantes con presencia de callo embriogénico.

Número de embriones somáticos (NES): El NES que presentó cada explante esta ligado a la concentración de auxinas a las que fueron expuestos durante las primeras seis semanas de cultivo. A mayor concentración de 2,4-D, menor fue la cantidad de embriones somáticos que se obtuvieron al finalizar la segunda etapa de la evaluación.

En VSN ni la etapa I de inducción embriogénica ni la etapa II de formación y desarrollo de embriones somáticos indujeron a la formación de embriones somáticos. Por el contrario en VLF, sí se observó la formación de embriones somáticos al final del proceso.

Las VLF expuestas a 0.5 mg/L de 2,4-D en las primeras seis semanas fueron las que presentaron mayor NES por explante, ya que el 59% de los explantes produjeron de 4 a 7 embriones somáticos, además fue el único tratamiento donde se observaron mas de 8 embriones somáticos por explante (10%) (Cuadro 12) (Anexo 7).

Cuadro 12. Número de embriones somáticos en vitroláminas foliares durante la segunda etapa de formación y desarrollo de embriones somáticos en el establecimiento *in vitro* de Camote.

Tratamiento [‡]	Embriones somáticos (%) ¹		
	1 a 3 ^{‡b}	4 a 7	8 a 10
VLF0.5	31 ^b	59 ^a	10 ^a
VLF1.0	95 ^a	5 ^b	0 ^b
VLF2.0	100 ^a	0 ^b	0 ^b

[‡]VLF= Vitroláminas foliares cultivadas en diferentes dosis de 2,4-D en la etapa I.

^{a b} medias con diferente letra difieren estadísticamente a P< 0.05.

^{‡b} Número de embriones somáticos/explante.

¹Porcentaje de explantes con presencia de embriones somáticos.

CONCLUSIONES

- En la etapa I (EI), la mayor inducción de tejido callogénico (TC) se obtuvo utilizando vitrosegmentos nodales (VSN) incubados en 1.0 mg/L de 2,4-D.
- La mayor inducción de tejido callogénico durante la etapa I en VLF se obtuvo utilizando 1.0 mg/L de 2,4-D.
- En la EI, la mayor formación de callos compactos se obtuvo utilizando VSN incubados en 1.0 y 2.0 mg/L de 2,4-D.
- En la EI, la mayor formación de callos friables se obtuvo utilizando VSN incubados en 0.5 mg/L de 2,4-D.
- En la EI, únicamente las vitroláminas foliares (VLF) formaron callo embriogénico.
- En la etapa II (EII) la mejor inducción de tejido callogénico (TC) se obtuvo utilizando los VSN que estuvieron incubados en 0.5 y 1.0 mg/L de 2,4-D en la EI.
- En la EII la mejor proliferación de TC se obtuvo utilizando los VSN que estuvieron incubados en 0.5 y 1.0 mg/L de 2,4-D en la EI.
- Una mayor presencia de masas callogénicas se observó en los VSN0.5 y VSN1.0.
- En la EII la tendencia de los VSN fue a una mayor formación de callos friables y no a formar indistintamente callos compactos y friables como se observó en la primera etapa.
- En la EII de formación y desarrollo de embriones somáticos, las VLF no continuaron regenerando TC. La tendencia fue la inducción de embriogénesis somática, donde las VLF que fueron incubadas en 0.5 mg/L en la EI, fueron las que presentaron mayor inducción de callo embriogénico (CE).
- La mejor respuesta en embriogénesis somática directa se obtuvo utilizando VLF que estuvieron incubadas en 0.5 mg/l de 2,4-D en la EI.
- La mejor respuesta en embriogénesis somática indirecta se obtuvo utilizando VLF que estuvieron incubadas en 2.0 mg/l de 2,4-D en la EI.

- La mayor cantidad de embrioides se obtuvo a partir de las VLF cultivadas en 0.5 mg/L de 2,4-D durante la etapa I.

RECOMENDACIONES

- Cosechar los embriones somáticos obtenidos de las VLF y continuar con su desarrollo incubándolos en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) en ausencia de auxina para su germinación.
- En VSN, evaluar el efecto de otro tipo de auxinas tales como ANA y AIA en concentraciones de 0.5 a 5.0 mg/L utilizando los medios de cultivo de Linsmaier y Skoog (1965) y Murashige y Skoog (1962) para inducir a la formación de embriones somáticos.
- Para la propagación masiva de TC obtenido a partir de VSN, subcultivar el TC cada dos a tres semanas utilizando el medio de cultivo de Linsmaier y Skoog, ya que la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del TC.
- EN VSN, otra opción para inducir organogénesis con fines de reproducción masiva a partir de TC friable, es establecer un cultivo de células en suspensión utilizando el medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog y utilizando de 2 a 5.0 mg/L de 2,4-D.
- Inducir a brotación el TC obtenido a partir de VSN, utilizando de 1.0 a 5.0 mg/L de citocininas, BAP o KIN o concentraciones de 1.0 a 10 mg/L de ANA o AIA utilizando como medio de cultivo el de Murashige y Skoog.

LITERATURA CITADA

Alban, A. 2006. Producción y usos de la batata (En línea). Consultado 7 de septiembre de 2008. Disponible en:

http://www.ciat.cgiar.org/training/pdf/061018_Sistemas_Produccion_Batata-A_Alban.pdf

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca,W; Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. Editorial XYZ. 970 p.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 2004. Alimentos, sustento y salud. Informe anual 2004 (en línea). Consultado el 6 de septiembre de 2008. Disponible en: http://www.cipotato.org/publications/annual_reports/2004spa/ar2004_03.asp

Folquer, F. 1978. La Batata (Camote): Estudio de la planta y su producción comercial. Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio sur. 144 p.

Gil Villacís, D. 2005. Micropropagación de vitroplantas de camote (*Ipomoea batatas*) Variedad Bush bock establecidas a partir de meristemas. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 25p.

Hurtado, D.; Merino, M; 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas. México, DF. México. 232 p.

Lizárraga, R.; Panta, A.; Espinoza, N.; Doods, J. 1990. Cultivo de tejidos de *Ipomoea batatas*: Micropropagación y conservación. Guía de investigación CIP 32. Lima, Perú. 22 p.

Montoya, L. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial EALON. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia 77 p.

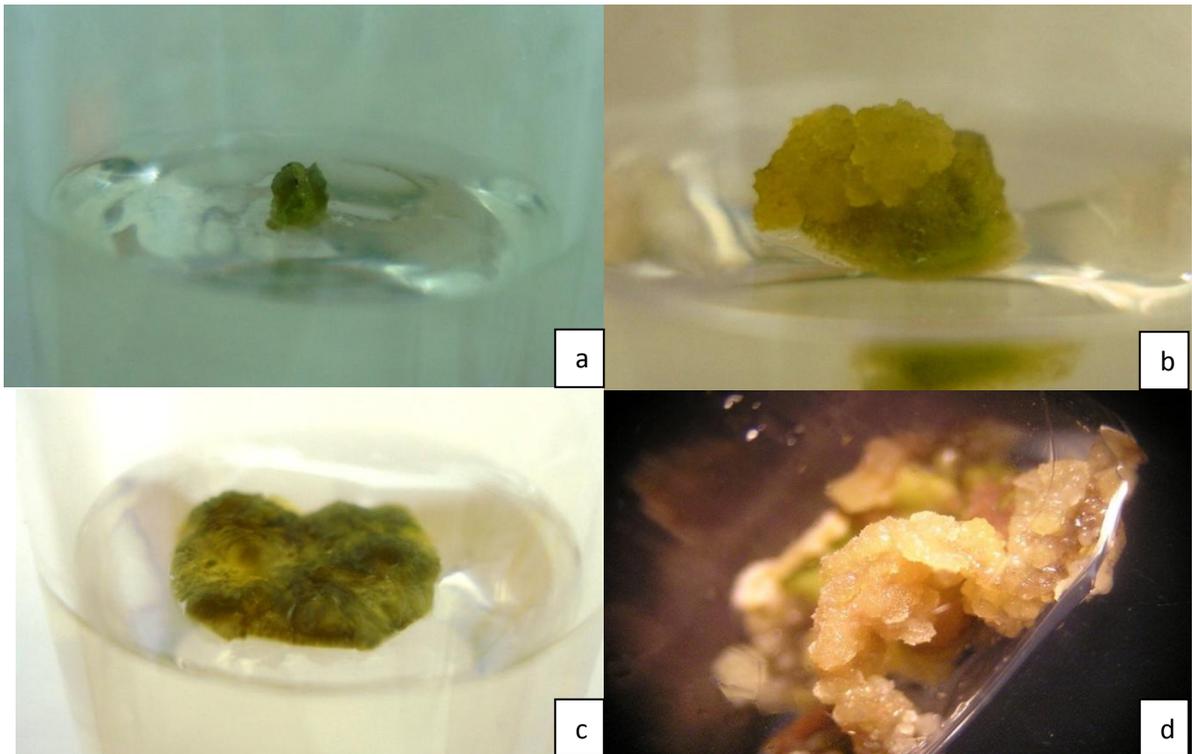
Pierik, L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3 ed. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 326 p.

Vallejo Rendón, C. 2007. Multiplicación *in vitro* de *sansevieria trifasciata* utilizando vitroláminas foliares y tejido callogénico. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 32 p.

Zuloaga R. 2007. Potencial Agro-industrial del Camote (En línea). Consultado 5 de septiembre de 2008. Disponible en: <http://www.minem.gob.pe/archivos/ogp/GVEP>

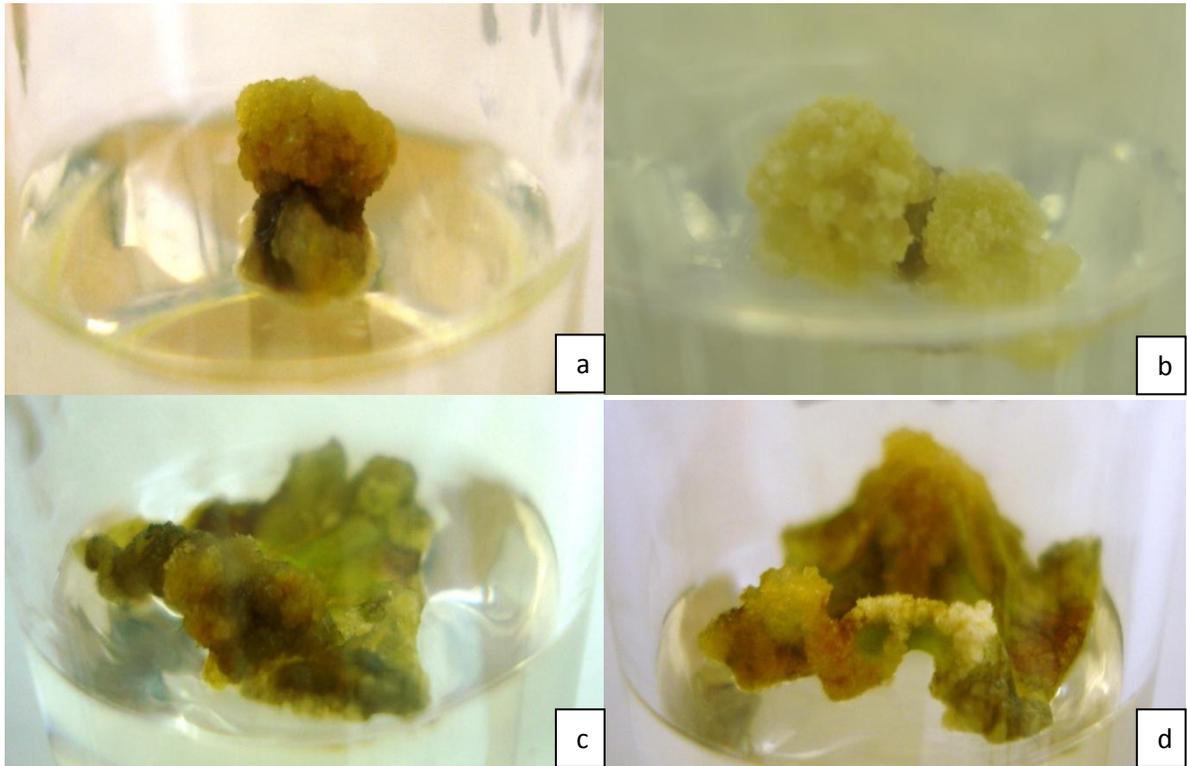
ANEXOS

Anexo 1. Categorización de inducción de tejido callogénico (ITC) en vitroláminas foliares (VLF) y vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa I (EI) de inducción embriogénica y etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.



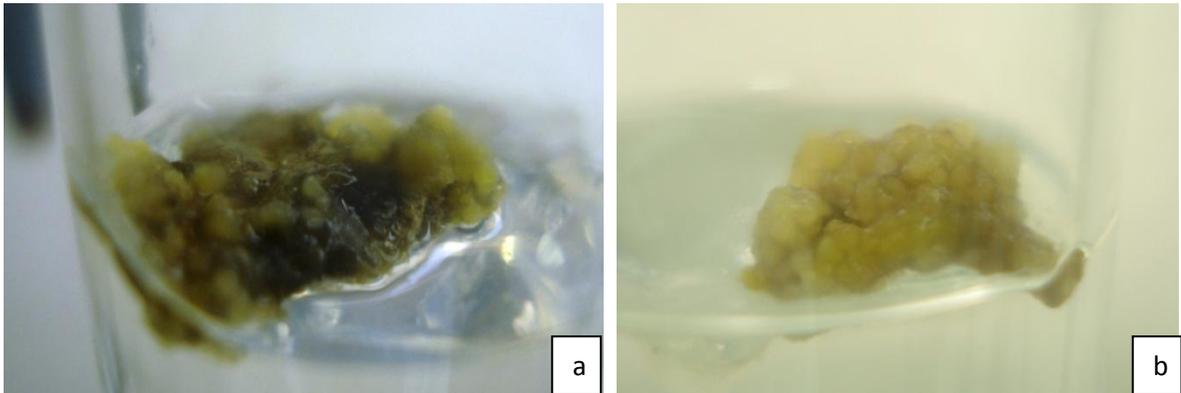
- a Ausencia de tejido callogénico en vitrosegmentos nodales.
- b. Presencia de tejido callogénico en la parte superior de vitrosegmentos nodales.
- c. Ausencia de tejido callogénico en vitroláminas foliares.
- d. Presencia de tejido callogénico en los bordes de vitroláminas foliares.

Anexo 2. Categorización de consistencia del tejido callogénico (CTC) en vitroláminas foliares (VLF) y vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa I (EI) de inducción embriogénica en camote.



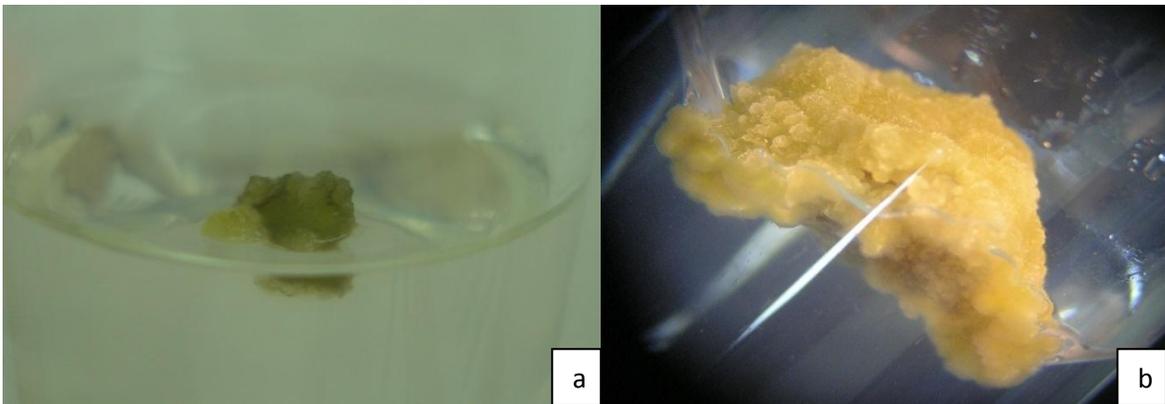
- a. Presencia de tejido callogénico compacto en la parte superior de vitrosegmentos nodales
- b. Presencia de tejido callogénico friable en la parte superior de vitrosegmentos nodales
- c. Presencia de tejido callogénico compacto en los bordes de las vitroláminas foliares.
- d. Presencia de tejido callogénico friable en los bordes de las vitroláminas foliares.

Anexo 3. Categorización de la inducción de callo embriogénico (ICE) en vitroláminas foliares (VLF) en la etapa I (EI) de inducción embriogénica y etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.



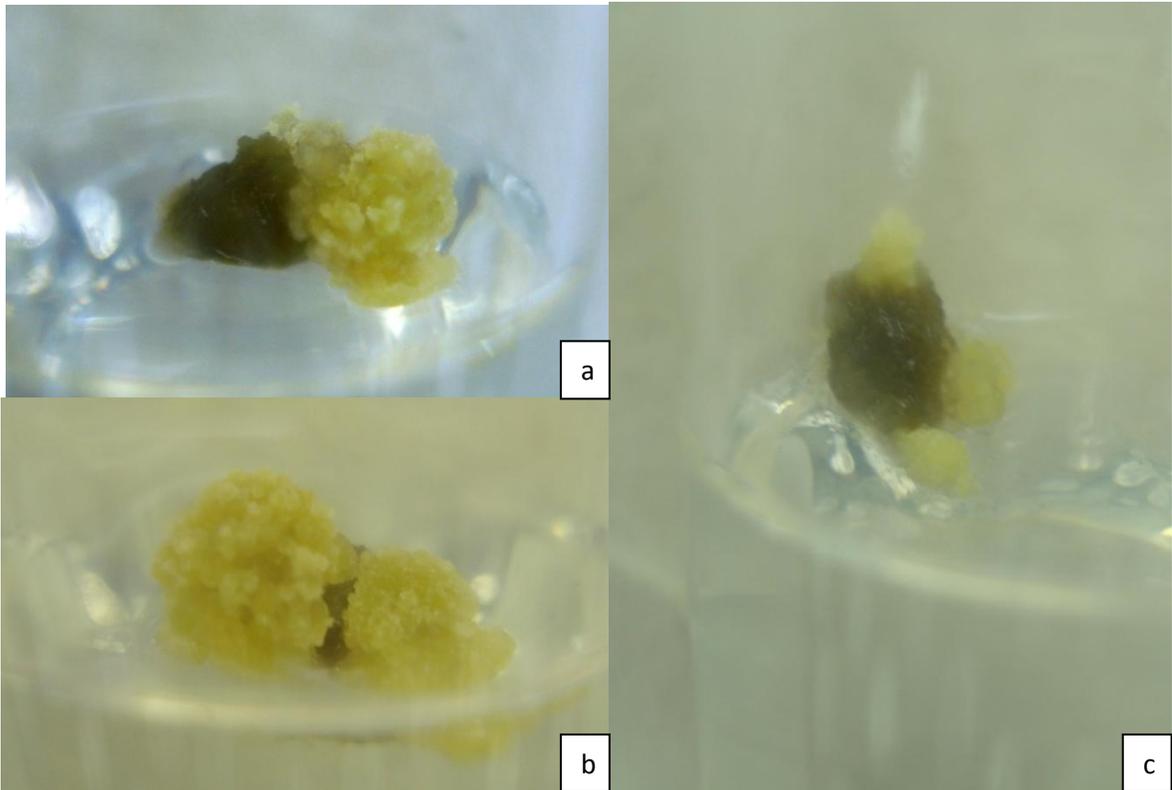
a. Callo embriogénico de vitroláminas foliares en la etapa I.
b. Callo embriogénico de vitroláminas foliares en la etapa II.

Anexo 4. Categorización de proliferación de tejido callogénico (PTC) en vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.



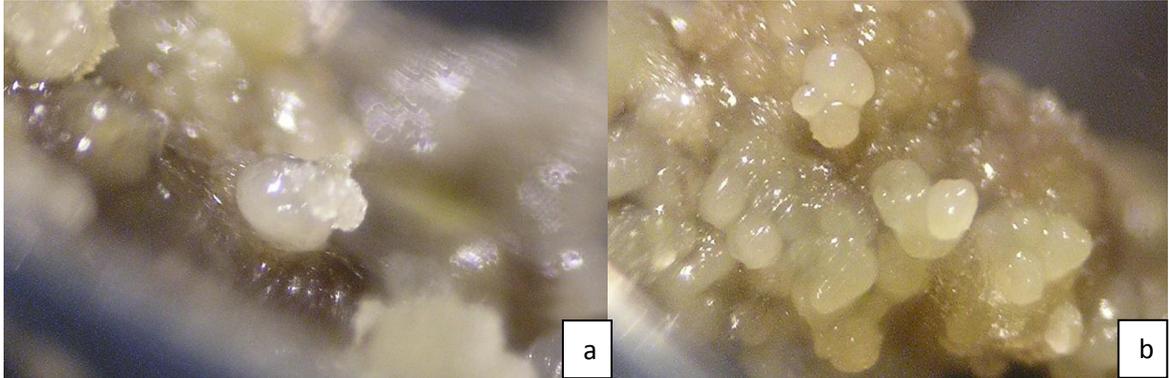
a. Proliferación de tejido callogénico cubriendo un área menor del 50% del área total del explante inicial.
b. Proliferación de tejido callogénico cubriendo un área mayor del 50% del área total del explante inicial.

Anexo 5. Categorización de presencia de masas callogénicas (PMC) en vitrosegmentos nodales (VSN) en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.



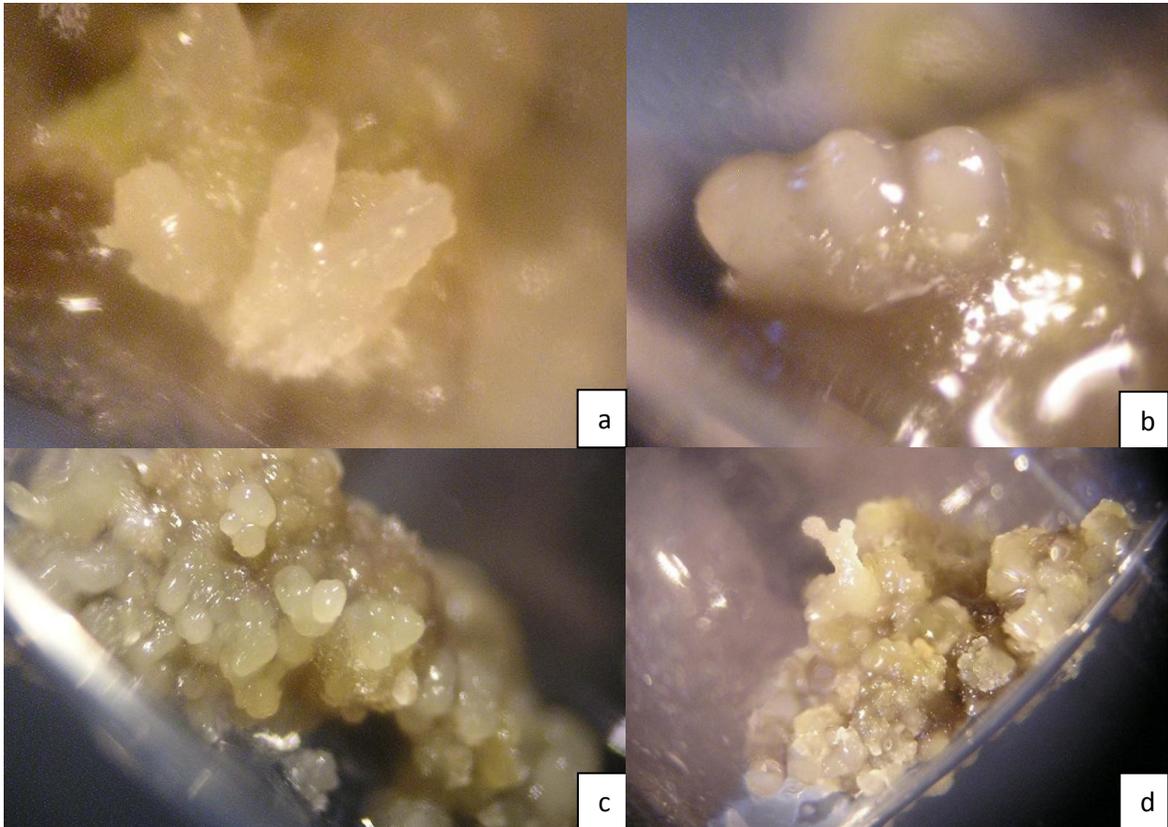
- a. Presencia de una masa callogénica en vitrosegmentos nodales.
b. Presencia de dos masas callogénicas en vitrosegmentos nodales.
c. Presencia de tres masas callogénicas en vitrosegmentos nodales.

Anexo 6. Embriogénesis directa (ED) e indirecta (EInd) en vitroláminas foliares (VLF) en la etapa II de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.



a. Formación de embriones somáticos directamente a partir de vitroláminas foliares (embriogénesis directa).
b. Formación de embriones somáticos indirectamente a partir de tejido embriogénico en vitroláminas foliares (embriogénesis indirecta).

Anexo 7. Embriones somáticos en vitroláminas foliares (VLF) en la etapa II (EII) de formación y desarrollo de embriones somáticos en camote.



a. Embriones somáticos en fase cotiledonal.
b. Embriones somáticos fusionados en fase acorazonada.
c. Embriones somáticos en fase globular.
d. Gemación en el proceso de embriogénesis somática secundaria en vitroláminas foliares de camote.

