Evaluación del uso de vermiculita y perlita como alternativas al Phytagel® en la propagación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.)

Bryan Guilibaldo Ruano Orellana

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Evaluación del uso de vermiculita y perlita como alternativas al Phytagel® en la propagación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.)

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

Presentado por

Bryan Guilibaldo Ruano Orellana

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Evaluación del uso de vermiculita y perlita como alternativas al Phytagel® en la propagación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.)

Bryan Guilibaldo Ruano Orellana

Resumen. La variedad de medios de soporte en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es amplia y cada uno presenta distintos beneficios. El objetivo del estudio fue evaluar el uso de vermiculita y perlita en dos diferentes etapas de la propagación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.) dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano. Se utilizaron 3 g de vermiculita expandida y 4 g de perlita expandida por frasco de 110 mL. Como tratamiento testigo se utilizó el agente gelificante Phytagel®. Se propagaron segmentos nodales de vitroplántulas de camote en tercera etapa de multiplicación (subcultivo tres) y penúltima etapa (enraizamiento). Estas plántulas fueron establecidas previamente en el laboratorio a partir de domos meristemáticos. Se usó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, 50 repeticiones y dos unidades observacionales por repetición. Cada etapa fue evaluada por separado. Después de 21 días se midieron las siguientes variables: número de nudos, raíces principales, peso fresco y seco. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la cantidad de raíces principales formadas para los tres tratamientos en ambas etapas del estudio. Los mejores resultados en formación de nudos de vitroplántulas en la etapa de multiplicación subcultivo tres se alcanzaron con el tratamiento Phytagel® a diferencia de la etapa de enraizamiento donde vermiculita y Phytagel® presentaron los mejores resultados.

Palabras clave: Gelificante, propagación, segmentos nodales, sustratos.

Abstract. The variety of supporting systems in tissue culture is wide and each one provides its own benefits. The aim of the study was to evaluate the use of vermiculite and perlite in *in vitro* propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) at Zamorano´s Tissue Culture Laboratory. Three grams of vermiculite and four of perlite were used per 110 mL jar. Gelling agent Phytagel® was used as the control. Nodal segments from sweet potato vitro plants in third stage of multiplication and rooting stage were propagated. This plants were previously stablished from meristematic domes in laboratory. A completely randomized design with three treatments, 50 repetitions, and two observational units per repetition was held. Each phase was evaluated separately. After 21 days the variables number of nodes, main roots, fresh, and dry weight were evaluated. There were no significant differences in the quantity of main roots developed by vitro plants in the three treatments of both phases of the experiment. Phytagel® treatment showed the best results in nodes formation for the third phase of multiplication but vermiculite and Phytagel® presented the best results for the rooting phase.

Key words: Gelling agent, propagation, nodal segments, substrates.

CONTENIDO

Portadilla……..... i
Página de firmas…….. ii
Resumen…….. iii
Contenido……..... iv
Índice de Cuadros y Figuras……. v

1 INTRODUCCIÓN..... 1

2 MATERIALES Y MÉTODOS..... 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 5

4 CONCLUSIONES..... 10

5 RECOMENDACIONES..... 11

6 LITERATURA CITADA..... 12

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros Página

1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para la multiplicación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.). 3
2. Número de nudos formados por vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Bushbuck en multiplicación subcultivo tres en respuesta a tres sustratos usados como soporte..... 5
3. Comparación de medias de características evaluadas en vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Bushbuck al finalizar la etapa de multiplicación subcultivo tres..... 6
4. Número de nudos formados por vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard en etapa de enraizamiento en respuesta a tres sustratos usados como soporte..... 7
5. Comparación de medias de características evaluadas en vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard en etapa de enraizamiento..... 9

Figuras Página

1. Formación de raíces de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard en frascos después de 21 días usando A) perlita B) vermiculita C) Phytagel® como soporte. 8
2. Protección de raíces de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard brindada por sustratos inertes. A) Raíces cubiertas con vermiculita. B) Raíces cubiertas con perlita..... 8

1. INTRODUCCIÓN

El camote (*Ipomoea batatas* L.) es una planta herbácea, dicotiledónea de la familia de las Convolvuláceas. Su hábito de crecimiento es rastrero y las raíces pueden alcanzar 1.60 metros de profundidad (Cusumano y Zamudio 2013). Es originaria de las zonas tropicales de América y fue llevada a lo largo del Pacífico por civilizaciones antiguas antes de la llegada de Colón (Tay 2013).

El camote es una planta muy fácil de manejar que puede presentar resistencia a climas adversos como sequías, humedad relativa y temperaturas altas. Este es un cultivo que genera grandes retornos debido a su costo de producción bajo y a los rendimientos elevados. Los productos más usados del camote son las raíces tuberosas y las hojas (Lim 2012). El camote es una de las plantas con mayores rendimientos en cuanto a energía producida por unidad de área y tiempo (kcal/ha/día). Cultivada como un monocultivo en toda América los productos de esta planta son destinados a mercados locales, exportación y autoconsumo (Fuentes y Chujoy 2009).

La propagación asexual es la manera convencional de siembra de camote en el campo. Para esta práctica se pueden utilizar esquejes de los tallos, meristemos apicales y raíces con brotes (Gaba y Singer 2009). Los esquejes que se recomiendan para la siembra son los que contengan los meristemos apicales o principales ya que estos aceleran el crecimiento del material vegetal. El tamaño de los esquejes a sembrar es de 30-40 cm y la profundidad de siembra es de 7-8 cm (Lardizábal 2003).

Otro de los sistemas utilizados es la propagación *in vitro* de meristemos axilares cultivados en medios de cultivo solidificados con agentes gelificantes como el Phytagel®. Este producto está compuesto por un sustrato bacterial que contiene glucosa, ramnosa y ácido glucurónico. Es un solidificante que provee una claridad óptica superior y una menor autoflourescencia que otros gelificantes. Además esta claridad permite identificar fácilmente cualquier tipo de contaminación (Jaeger et al. 2015).

El uso de sustratos inertes como medio de sostén para explantes *in vitro* ha surgido como una técnica para reemplazar agentes gelificantes de alto costo. Ejemplo de ello son la vermiculita y perlita. La vermiculita es un silicato hidratado de aluminio cuya fórmula es: $K\ (Mg, Fe)_3\ [(Si, Al)_4\ O_{10}]\ [OH]_2\ 4H_2O$ (Castro et al. 2011). La enciclopedia de los polímeros define vermiculita como "Silicato hidratado de magnesio, aluminio y hierro con capacidad de expandirse de seis a veinte veces el volumen del mineral no expandido cuando es calentado alrededor de los 1100°C" (Gooch 2011).

La perlita es un vidrio volcánico hidratado que al someterse a altas temperaturas y altas presiones de vapor de agua, reduce su viscosidad y empieza a perder agua. La pérdida de agua inicia desde el centro hacia la periferia del mineral. Este proceso provoca grietas y porosidad en las partículas formadas las cuales son muy friables (Varuzhanyan 2006).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales engloba mano de obra especializada y altos costos. Es ahí donde está la importancia de este estudio el cual es mejorar protocolos existentes con el uso de medios de sostén que nos brinden ventajas como el incremento del desarrollo vegetativo de vitroplántulas. La transición de Phytagel® a vermiculita o perlita como medios de soporte podría significar una reducción de los costos de producción y probablemente aumentaría la eficiencia del proceso de trasplante a los invernaderos.

El objetivo del estudio fue evaluar el uso de vermiculita y perlita en dos diferentes etapas de la propagación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio. El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de Zamorano, Carrera de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle de Yeguare, Honduras.

Preparación del medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog MS modificado por Jarret (1991) (Cuadro 1). El medio de cultivo fue el mismo para los tres tratamientos del estudio siendo la diferencia el sustrato que se utilizó como sostén para los segmentos nodales y el solidificante en uno de ellos. Se ajustó el pH a 5.8 con HCl y/o KOH. Todos los frascos fueron tapados con aluminio y esterilizados a 120°C por 20 minutos a 15 PSI en el autoclave ("Market Forge Sterilmatic STM – E").

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado para la multiplicación *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas* L.).

Componentes	**Fórmula**	**Nombre Común**	**mg/L**
Macroelementos	$CaCl_2.2H_2O$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO_3	Nitrato de potasio	1,900.000
	$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
	$CoCl_2.6H_2O$	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	$MnSO_4.4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes orgánicos		Myo-inositol	100.000
		Tiamina-HCl	1.000
		Sacarosa	70,000.000

Fuente: (Jarret 1991)

Tratamiento Vermiculita. Se colocó tres gramos de vermiculita expandida (Therm-O-Rock East, Inc.) por frasco de 110 mL y 20 mL de medio de cultivo (Cuadro 1).

Tratamiento Perlita. Se colocó cuatro gramos de perlita expandida (Therm-O-Rock East, Inc.) por frasco de 110 mL y 20 mL de medio de cultivo (Cuadro 1).

Tratamiento Pyhtagel®. Se agregó 1.8 g/L del gelificante al medio de cultivo (Cuadro 1), se mezcló en un agitador magnético y se calentó en un microondas hasta observar que el Phytagel® estuviese completamente disuelto. Se colocaron 20 mL de la mezcla por frasco de 110 mL.

Material vegetal y etapas del estudio. Se utilizaron segmentos nodales de vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Bushbuck en etapa de multiplicación subcultivo dos y de la variedad Beauregard en última etapa de multiplicación (subcultivo cinco). Estas plántulas fueron establecidas a partir de domos meristemáticos previamente en el laboratorio.

La extracción y siembra de los segmentos nodales se realizó en una cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70%. Las herramientas se esterilizaron a 250°C en un esterilizador de calor seco antes y después de dividir cada vitroplántula en segmentos nodales. Con la ayuda de un bisturí y pinzas se cortaron los segmentos nodales de plántulas de camote y se sembraron dos explantes en cada uno de los 50 frascos de los tres tratamientos. Los frascos se taparon y sellaron con Parafilm®. Los tratamientos se incubaron por 21 días a 22 °C, con humedad relativa de 60-70%, a 2000 Lux con un fotoperiodo de 16 horas procedente de lámparas fluorescentes tipo “Silvanya Daylight Incandescent”.

Luego de 21 días una muestra de las unidades experimentales de la etapa de multiplicación subcultivo tres variedad Bushbuck que respondieron a los tratamientos fue extraída de los frascos para la toma de datos. El resto de vitroplántulas continuó el proceso de multiplicación.

Una muestra de las vitroplántulas variedad Beauregard en etapa de enraizamiento fue extraída para la toma de datos. El resto se trasplantó a bandejas múltiples con el medio PROMIX HP® colocándose dentro de un invernadero para su aclimatación.

Variables evaluadas. De cada unidad observacional de ambas etapas se evaluó el número de nudos producidos cada siete días durante 21 días. A los 21 días se evaluó el número de raíces primarias, peso fresco y seco por plántula de una muestra de cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se usó un diseño completamente al azar con tres tratamientos. Cada tratamiento con 50 repeticiones y dos unidades observacionales por repetición. Se realizó un análisis de varianza y una separación de medias con prueba Duncan exigiendo un nivel de significancia ($P \leq 0.05$). Para el análisis estadístico se usó el programa SAS 9.3. Cada etapa del estudio fue evaluada por separado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación de camote subcultivo tres. Al final de los 21 días de la etapa de multiplicación subcultivo tres se observó una mortalidad menor al 5% en todos los tratamientos. La mortalidad de los explantes se puede atribuir a factores de viabilidad de las yemas y no a factores como medio de cultivo. Se observó que las vitroplántulas bajo el tratamiento con Phytagel® presentaron los mejores resultados en cuanto a formación de nudos a los 21 días (Cuadro 2) seguido de ambos sustratos inertes los cuales no tuvieron diferencias significativas entre sí.

Cuadro 2. Número de nudos formados por vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Bushbuck en multiplicación subcultivo tres en respuesta a tres sustratos usados como soporte.

Tratamientos	Unidades observacionales (n)	Promedio del número de nudos		
		7 días	14 días	21 días
Vermiculita	97	0.65 b	2.82 b	4.92 b
Perlita	99	0.53 b	2.47 c	4.88 b
Phytagel®	95	0.93 a	4.17 a	7.19 a
R^2		0.05	0.23	0.30
CV		42	32	36

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Desarrollo de raíces principales. El desarrollo de raíces se observó seis días después de siembra. Al finalizar los 21 días del experimento no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al promedio de raíces principales formadas por los segmentos nodales (Cuadro 3). Esto concuerda con lo reportado por Martínez Hernández et al. (2006) quienes no obtuvieron diferencias significativas en el desarrollo radicular de cítricos cultivados *in vitro* sobre sustratos inertes como medios de sostén.

Peso fresco y seco. Las vitroplántulas sembradas sobre el medio Phytagel® presentaron los mejores resultados en peso fresco y seco con respecto a los dos tratamientos con sustratos inertes (Cuadro 3). Esto es un resultado esperado ya que el número de nudos formados por las mismas fue significativamente mayor al de los demás tratamientos como se detalla en (Cuadro 2). Resultados reportados por Afreen Zobayed et al. (2000) muestran un promedio de 1.174 hasta 1.348 g de peso fresco en vitroplántulas de camote usando vermiculita como medio de sostén. Esto difiere a los datos de este estudio los cuales son menores. Los resultados pueden diferir por la variedad de camote, la fase de multiplicación y el medio nutritivo que evaluaron Afreen Zobayed et al. (2000).

El mineral vermiculita tiene alta superficie específica de la cual entre el 85-95% es interna. Cuando decimos interna se refiere a los espacios entre las placas que se forman después del proceso de expansión del mineral. Dentro de esos espacios podría quedar agua retenida con cierto contenido de nutrientes disueltos los cuales serían poco disponibles para que el segmento nodal los aproveche. La perlita al ser muy porosa retuvo cierto porcentaje de solución nutritiva en sus microporos los cuales reducen la disponibilidad de nutrientes y agua para el segmento nodal. Este factor pudo ser clave para la reducción en peso fresco y seco de las vitroplántulas en estos tratamientos.

Cuadro 3. Comparación de medias de características evaluadas en vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Bushbuck al finalizar la etapa de multiplicación subcultivo tres.

Tratamientos	Unidades observacionales (n)	No. de Raíces	Peso fresco (g)	Peso Seco (g)
Vermiculita	29	4.9	0.749 b	0.057 b
Perlita	29	4.3	0.671 b	0.050 b
Phytagel®	30	4.7	0.970 a	0.077 a
R^2		0.167	0.284	0.322
CV		38	44	42

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Etapa de enraizamiento. Para esta etapa se tuvo una mortalidad de explantes de hasta 66% en los tres tratamientos. Esto al igual que en la etapa en subcultivo tres se puede atribuir a la baja capacidad de regeneración de tejidos que puede presentar el material vegetal después de varias repeticiones de multiplicación. Cabe recalcar que la etapa de enraizamiento es la última fase de propagación del camote antes de ser aclimatado.

En cuanto al promedio de nudos formados a los 21 días, los tratamientos de vermiculita y Phytagel® presentaron los mejores resultados no mostrando diferencias significativas entre sí (Cuadro 4). Resultados similares han sido reportados por Martínez Hernández et al. (2006) donde no se presentan diferencias estadísticas en formación de brotes de cítricos *in vitro* comparando agar contra vermiculita.

Resultados obtenidos por Romay et al. (2006) indican que no hubieron diferencias significativas en el número de nudos formados por microesquejes de yuca usando almidón modificado de yuca como alternativa al Phytagel®. Esto nos dice que la única función de los gelificantes y sustratos inertes es brindar sostén al material vegetal sembrado. Las vitroplántulas en el tratamiento con Phytagel® tuvieron mayor elongación al final del periodo sin embargo esto no afectó al número de nudos formados.

Cuadro 4. Número de nudos formados por vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard en etapa de enraizamiento en respuesta a tres sustratos usados como soporte.

Tratamientos	**Unidades observacionales (n)**	**Promedio del número de nudos**		
		7 días	**14 días**	**21 días**
Vermiculita	51	0.31	1.26 ab	3.70 a
Perlita	57	0.37	1.02 b	2.83 b
Phytagel®	34	0.35	1.50 a	4.06 a
R^2		0.04	0.16	0.29
CV		59	54	35

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Formación de raíces. Para la variable formación de raíces se obtuvieron promedios similares en los tres tratamientos al final de los 21 días sin mostrar diferencias significativas (Cuadro 5). Resultados similiares fueron reportados por Martínez Hernández et al. (2006) propagando cítricos *in vitro* y Romay et al. (2006) propagando yuca donde demuestran que no existen diferencias significativas en la formación de raíces de explantes cuando se utilizan medios de sostén como alternativas a gelificantes. Con estos resultados podemos decir que los sustratos inertes pueden ser una alternativa que reemplace el gelificante Phytagel® en la etapa de enraizamiento.

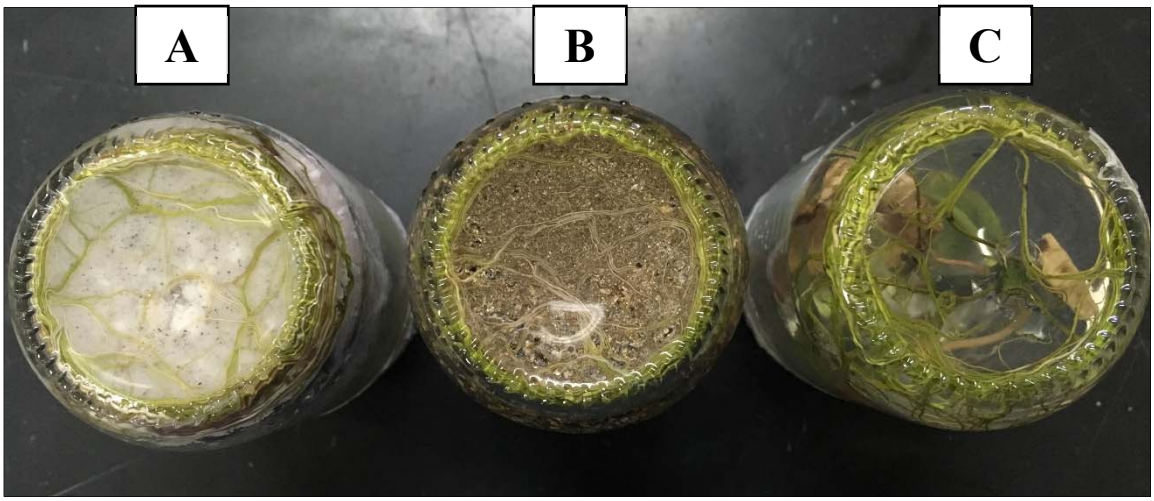

Figura 1. Formación de raíces de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard en frascos después de 21 días usando A) perlita B) vermiculita C) Phytagel® como soporte.

Se pudo observar un recubrimiento de vermiculita y perlita sobre las raíces de las vitroplántulas al finalizar la etapa de enraizamiento (Figura 2). Esto podría crear una protección de las mismas para su etapa de aclimatación. Al momento de sacar las plantas de los frascos para su posterior aclimatación estas solo se sumergen en agua y la cubierta de ambos sustratos permanece en las raíces. Someter a las vitroplántulas a un crecimiento en sustratos inertes usados en la agricultura las prepara para las condiciones de aclimatación y siembra definitiva en campo.

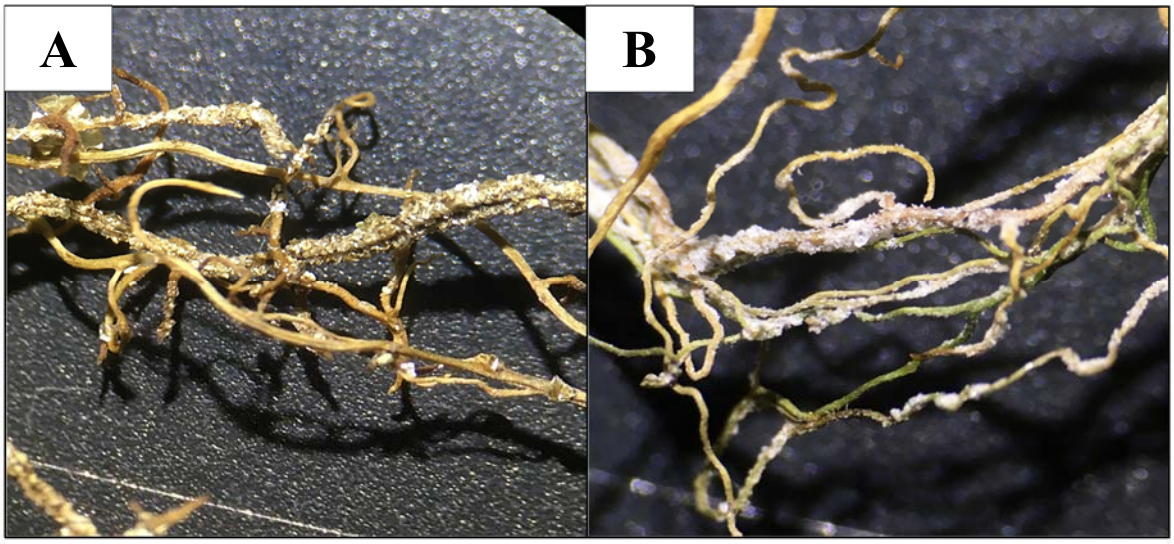

Figura 2. Protección de raíces de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard brindada por sustratos inertes. A) Raíces cubiertas con vermiculita. B) Raíces cubiertas con perlita.

Peso fresco y seco. Se determinó que para las variables de peso fresco y peso seco de vitroplántulas de camote, el tratamiento de Phytagel® presentó los mejores resultados con una media de 0.970 gramos. Este resultado fue significativamente diferente de los tratamientos con vermiculita y perlita (Cuadro 5). Podemos justificar este resultado debido a una mayor elongación en vitroplántulas del tratamiento Phytagel® comparadas contra las de ambos tratamientos con sustratos inertes.

Cuadro 5. Comparación de medias de características evaluadas en vitroplántulas de camote (*Ipomoea batatas* L.) variedad Beauregard en etapa de enraizamiento.

Tratamientos	**Unidades observacionales (n)**	**No. de Raíces**	**Peso Fresco (g)**	**Peso Seco (g)**
Vermiculita	29	2.2	1.018 b	0.092 b
Perlita	29	2.3	0.833 b	0.083 b
Phytagel®	28	2.7	1.475 a	0.150 a
R^2		0.259	0.452	0.699
CV		59	45	39

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- La vermiculita y perlita no son alternativas viables para ser usadas como medio de sostén en la propagación *in vitro* de camote en etapa de multiplicación subcultivo tres.

- El uso de vermiculita es una alternativa viable de medio de sostén en la propagación *in vitro* de camote en etapa de enraizamiento.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de vermiculita como medio de sostén en el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de camote en etapa de enraizamiento.

- No se recomienda el uso de vermiculita y perlita como medios de sostén en el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de camote en etapa de multiplicación subcultivo tres.

- Contemplar análisis económicos que demuestren una reducción en los costos de producción al usar vermiculita en la etapa de enraizamiento.

- Llevar el ensayo hasta la etapa de aclimatación y evaluar el efecto de ambos sustratos sobre la mortalidad y adaptabilidad de las vitroplántulas en invernadero.

- Realizar estudios usando vermiculita y perlita como medio de sostén en todas las etapas de la propagación *in vitro* de camote.

6. LITERATURA CITADA

Afreen Zobayed F, Zobayed S, Kubota C, Kozai T, Hasegawa O. 2000. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. Plant Science. 157:225–231.

Castro G, Díaz A, Sarquís P, Elizondo A. 2011. Aplicación de procesos físicos para la depuración de mineral de vermiculita de un yacimiento de Argentina. Revista de la Facultad de Ingeniería, UDA; [consultado 2016 Ago 08]. 26:1–10. http://www.revistaingenieria.uda.cl/Publicaciones/260001.pdf.

Cusumano C, Zamudio N. 2013. Manual técnico para el cultivo de batata (camote o boniato) en la provincia de Tucumán (argentina). 1era edición. Famaillá: INTA (vol.1); [consultado 2016 Ago 21]. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-manual_batata.pdf.

Fuentes S, Chujoy E. 2009. Sweetpotato in South America. En: Loebenstein G, Thottappilly G, editores. The sweetpotato. [Dordrecht]: Springer. p. 415–440; [consultado 2016 Ago 07]. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-9475-0_18

Gaba V, Singer S. 2009. Propagation of Sweetpotatoes, In Situ Germplasm Conservation and Conservation by Tissue Culture. En: Loebenstein G, Thottappilly G, editores. The sweetpotato. Dordrecht: Springer. p. 65–80; [consultado 2016 Ago 10]. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-9475-0_6

Gooch JW. 2011. Encyclopedic dictionary of polymers. 2nd ed. New York, London: Springer (Springer reference). [consultado 2016 Sep 03] http://link.springer.com/referencework/10.1007/978-1-4419-6247-8

Jaeger PA, McElfresh C, Wong LR, Ideker T. 2015. Beyond Agar: Gel Substrates with Improved Optical Clarity and Drug Efficiency and Reduced Autofluorescence for Microbial Growth Experiments. Appl Environ Microbiol. 81(16):5639–5649. eng. doi:10.1128/AEM.01327-15.

Jarret RI. 1991. Cultivo de tejidos de camote. In: Roca WM, Mroginski LA, editors. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia: CIAT. p. 422–437

Lardizábal R. 2003. Manual de producción de camote. Honduras: Fintrac CDA.[consultado 2016 Ago 17] https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/Manual_de_Produccion_de_Camote.pdf

Lim TK. 2012. Edible medicinal and non-medicinal plants. Dordrecht, London: Springer (Modified Stems, Roots, Bulbs; vol. 10). [consultado 2016 Ago 08]. http://link.springer.com/book/10.1007/978-90-481-8661-7

Martínez Hernández M, López A, Osorio-Acosta F, Gallardo F, López Moctezuma H, Mata M. 2006. Cultivo *in vitro* de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza, empleando sustratos inertes alternativos al agar. INCI; [consultado 2016 Sep 30]. 31(8):616–619. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800013&lng=es&tlng=es.

Romay G, Matehus J, Gerstl A, Rueda R, Santana M. 2006. Almidón de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medio de cultivo de tejidos vegetales. INCI; [consultado 2016 Oct 02]. 31:686–689. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000900012

SAS®, 2014. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc., Cary, N.C., United States of America

Tay D. 2013. Tropical and Subtropical Root and Tuber Crops. En: Normah MN, Chin HF, Reed BM, editores. Conservation of tropical plant species. New York, NY: Springer. p. 249–292. [consultado 2016 Sep 10] http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3776-5_12

Varuzhanyan AA. 2006. A Mechanism of Perlite Expansion. Academy of Sciences of Armenia; [consultado 2016 Ago 07]. 42:1140–1146. http://link.springer.com/article/10.1134/S0020168506090202.