

**Inducción de callo embriogénico
en camote (*Ipomoea batatas* L.)
con ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

Benjamín Tapia Bernal

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Inducción de callo embriogénico en camote (*Ipomoea batatas* L.) con ácido 2,4-diclorofenoxiacético

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

Presentado por

Benjamín Tapia Bernal

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Inducción de callo embriogénico en camote (*Ipomoea batatas* L.) con 2,4-diclorofenoxiacético

Benjamín Tapia Bernal

Resumen. La embriogénesis somática indirecta es una técnica *in vitro* que permite la inducción de callo embriogénico, al establecer un explante en un medio de cultivo suplementado con fitohormonas en condiciones controladas y asépticas, con la finalidad de obtener la formación de embriones para la conservación de germoplasma libre de enfermedades. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del 2,4-D, en la inducción de callo embriogénico en láminas foliares con y sin peciolo de vitroplantas de camote. El medio de cultivo usado fue el de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0.00, 2.26, 4.52, 9.04 y 22.62 μM de 2,4-D. Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 5×2 , un análisis de varianza y una separación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). A los 12 y 26 días después del establecimiento de los explantes en el medio de cultivo se evaluó la formación, compactación, nodulación y friabilidad de los callos. En el testigo no se observó ningún cambio morfológico en los explantes, mientras que en el tratamiento con 2.26 μM se observaron los mejores resultados, en cuanto a nodulación, friabilidad y compactación de los callos formados en los explantes. Por otro lado, a concentraciones de 22.62 μM de 2,4-D se observaron callos friables, poco compactos y poco nodulares. Los explantes de lámina foliar con peciolo mostraron mejor formación de callos. La formación de callos compactos, nodulares y no friables depende de la presencia de las bajas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo.

Palabras clave: Embrión somático, embriogénesis somática, explante foliar, totipotencia.

Abstract. The indirect somatic embryogenesis is an *in vitro* technique that allows the induction of embryogenic callus, as a result of establish the explants in a culture medium supplemented with phyto-hormones under controlled and aseptic conditions, in order to obtain the development of embryos for conservation of disease-free germplasm. The objective of this study was to evaluate the effect of 2,4-D in the induction of embryogenic callus in leaves, with and without petiole of sweet potato *in vitro* plants. Murashige and Skoog (MS) culture medium was used, supplemented with 0.00, 2.26, 4.52, 9.04 and 22.62 μM of 2,4-D. A completely randomized design was used with a factorial arrangement of 5×2 , an analysis of variance and a separation of means by Tukey test ($P \leq 0.05$). Formation, compaction, nodulation and friability of the calluses were evaluated at 12 and 26 days after the explants establishment in the culture medium. The treatment without 2,4-D presented no morphological change in the explants, while in the treatment with 2.26 μM had the best results in terms of the formation, nodulation, friability and compaction of the corns formed in the explants. Furthermore, at concentrations of 22.62 μM of 2,4-D, the callus were, friable, slightly compacted and little nodulation. Leaf explants with petiole showed better callus formation. The formation of compact, nodular and non-friable calluses depends on the presence of low concentrations of 2,4-D in the culture medium.

Keywords: Somatic embryo, somatic embryogenesis, leaf explant, totipotency.

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.....	7
4. CONCLUSIONES.....	12
5. RECOMENDACIONES.....	13
6. LITERATURA CITADA.....	14

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado por Jarret (1991) para la inducción de callo embriogénico en camote var. Bushbuck.....	4
2. Dosis de 2,4-D para inducción de callo en explantes de lámina foliar con y sin peciolo en camote var. Bushbuck.....	4
3. Presencia, formación, nodulación, friabilidad y compactación de callos en láminas foliares con y sin peciolo en camote var. Bushbuck 26 días después del establecimiento <i>in vitro</i> en medio MS suplementado con 2,4-D.....	8
4. Efecto de las concentraciones de 2,4-D en la inducción de callo en láminas foliares con y sin peciolo de camote var. Bushbuck.....	9
5. Efecto del 2,4-D en la formación, nodulación, friabilidad y compactación de callos en explantes de lámina foliar con y sin peciolo de camote var. Bushbuck 26 días después del establecimiento <i>in vitro</i>	9
Figuras	Página
1. Formación de callos en explantes de camote var. Bushbuck en medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D.....	5
2. Nodulación y compactación de callos formados en explantes cultivados en medio de cultivo MS para inducción a callogénesis en camote var. Bushbuck.....	6
3. Friabilidad de callos en explantes de lámina foliar de camote cultivados en medio de cultivo MS para inducción a callogénesis en camote var Bushbuck.....	6
4. Explantes de camote 12 días después del establecimiento.....	7
5. Tipos de callo en explantes de lámina foliar con y sin peciolo.....	8
6. Callo oxidado (1) y necrosado (2), en explantes de camote var. Bushbuck 35 días después del establecimiento en medio MS con 2,4-D.....	11

1. INTRODUCCIÓN

El camote (*Ipomoea batatas* L.) es un cultivo originario de las zonas tropicales de América. Es una planta herbácea dicotiledónea de la familia de las *Convolvulaceae*, de hábito rastrero y con raíces que pueden alcanzar 1.60 m de profundidad (Cusumano y Zamudio 2012). En la actualidad se usa para la alimentación de humanos y ganado. En el año 2016 Honduras tuvo una producción de 7,735 toneladas equivalente a 1,218 ha (FAOSTAT 2018). El cultivo es propagado asexualmente por esquejes del tallo, meristemos apicales y raíces, de igual manera puede propagarse por técnicas *in vitro* (Manzanilla 2004).

Uno de los métodos más eficientes para poder producir de manera masiva material vegetal *in vitro* es a través de la inducción a callogénesis, a partir de la cual se puede obtener una embriogénesis somática indirecta, esta última busca generar embriones a partir de células somáticas vegetales sin que exista la unión de gametos (Gallegos 2013), dichos embriones se caracterizan por estar libres de enfermedades además de que pueden ser almacenados a largo plazo como fuente de germoplasma a través de técnicas de desecación, vitrificación, encapsulado – deshidratación, encapsulado – vitrificación y crioconservación (Sánchez y Jiménez 2010). Según George *et al.* (2008) esta técnica se basa en el principio de la totipotencia, el cual indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa.

La ESI inicia con la formación de un callo el cual es un tejido amorfo compuesto por una masa no organizada de células dediferenciadas no especializadas (George *et al.* 2008). Los callos son desarrollados de manera natural en las plantas al existir la presencia de una herida, sin embargo, su formación también puede ser inducida en condiciones *in vitro* al colocar en condiciones asépticas un explante, de preferencia juvenil, debido a que es morfo genéticamente más viable (George *et al.* 2008) en un medio de cultivo suplementado con bajos niveles de fitohormonas como las auxinas (Freire 2003).

La presencia de auxinas como el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el medio de cultivo es un factor importante en la inducción de la dediferenciación en el tejido y proliferación de callos, debido a una división celular acelerada, durante la cual, la diferenciación y especialización de las células es inhibida (Ramos *et al.* 1996). El callo formado y potencialmente embriogénico generalmente es de apariencia compacta, nodular, no friable, granular y de color crema o verde amarillento, el cual se mantiene en constante crecimiento, hasta inhibir la presencia del 2,4-D en el medio de cultivo (Jarret 1991), con la finalidad de que las células proembriónicas inicien su desarrollo embrionario (Nieves *et al.* 2006). Las células potencialmente embriogénicas presentes en el callo formado tienen la característica de ser pequeñas, con citoplasma denso, núcleo y nucléolo grande y vacuolas pequeñas con

gran cantidad de gránulos de almidón los cuales son formados por la sacarosa presente en el medio de cultivo y su acumulación es considerada como un prerequisite de la morfogénesis (Gómez *et al.* 2006).

Zimmerman (1993) y George *et al.* (2008) mencionan que el 2,4-D juega un rol importante en la mediación de la cascada de traducciones de señales que conducen a la reprogramación de las células a partir de la hipermetilación del ADN, siendo esta última una señal para distinguir y desorganizar los patrones diferenciadores de las células. Así mismo, el 2,4-D es considerado como inductor de inestabilidad celular, ejerciendo un efecto profundo en el control de la división celular, la respiración, el metabolismo, el consumo de azúcares y la transpiración (Abriata 2010).

Bajo este contexto el objetivo de este estudio fue:

- Evaluar el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en la inducción de callo embriogénico en explantes de láminas foliares sin y con peciolo de vitroplantas de camote var. Bushbuck, para posterior inducción a embriogénesis somática.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Ubicada en el Municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

Fuente de material vegetal

El material vegetal (explantes de láminas foliares y láminas foliares con peciolo) se obtuvo de vitro plantas de camote variedad Bushbuck disponibles en el laboratorio.

Inducción de callo embriogénico

Medio de cultivo. Para la inducción de callo embriogénico en camote, se usó el protocolo descrito por Jarret (1991) en el que utilizó medio de cultivo Murashige y Skoog (Cuadro 1), suplementado con cuatro concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2.26, 4.52, 9.04 y 22.62 μ M) (Cuadro 2). El pH del medio se ajustó a 5.8 con hidróxido de potasio (KOH) a 1.0 M, así mismo se solidificó con Phytigel® (1.8 g/L) y esterilizado a 121 °C por 20 minutos a una presión de 103.42 KPa.

Explantes de las láminas foliares (LF). A las hojas obtenidas de las vitroplantas se les eliminó el peciolo y posteriormente fueron cortados perpendicularmente a la nervadura central en forma de cuadro de 10 mm de ancho por 10 mm de largo.

Explantes de láminas foliares con peciolo (LFP). Se tomaron hojas con peciolo de vitroplantas, después estas fueron cortadas sin desprender el peciolo de la misma manera que los explantes de láminas foliares sin peciolo.

Establecimiento. Los explantes se establecieron en 20 mL de medio MS suplementado con 2,4-D contenido en frascos de cristal de 110 mL, en cada frasco se colocaron dos explantes con la superficie abaxial en contacto con el medio de cultivo.

Incubación. Los cultivos fueron incubados 26 días a una temperatura de 25 ± 1 °C, una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 2000 lux con 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog modificado por Jarret (1991) para la inducción de callo embriogénico en camote var. Bushbuck.

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Fuente de Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Fuente de Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Etilendiaminotetraacético	50.000
	Inositol		100.000
Vitaminas		Tiamina	0.400
Carbohidratos		Sacarosa	70000.000

Fuente: Jarret (1991).

Diseño experimental. Se usó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 5×2 (un testigo por explante, cuatro dosis de 2,4-D y dos explantes LF y LFP), para obtener un total de 10 tratamientos y 50 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 2. Dosis de 2,4-D para inducción de callo en explantes de lámina foliar con y sin peciolo en camote var. Bushbuck.

	Tratamientos				
	Testigo	1	2	3	4
Concentración (μM)	0.00	2.26	4.52	9.04	22.62
mg/L	0.00	0.50	1.00	2.00	5.00

Fuente: elaboración propia.

Análisis estadístico. Se utilizó un análisis de varianza con separación de medias Tukey con un nivel de significancia ($P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico Statistix® 8.1.

Para obtener una distribución normal se realizó una transformación de cada uno de los valores de las escalas utilizadas con la siguiente fórmula: $\sqrt{X + 0.5}$, donde X es igual a cada uno de los números de las escalas.

Variables medidas. Se evaluó la formación, nodulación, compactación y friabilidad de los callos generados en cada uno de los explantes (LF y LFP) cultivados en medio de cultivo MS para callogénesis en camote.

Escalas. A continuación, se describen las escalas usadas para la toma de datos 26 días después del establecimiento de los explantes (lamina foliar con y sin peciolo) en distintas concentraciones de 2,4-D.

1. Escala formación de callo. La formación de callos se evaluó con la escala descrita a continuación (Figura 1). Esta escala está basada en la propuesta de Santana (1982), modificada para camote.

1 – No hay formación de callo.

2 – Ligera formación de callo: se observó una débil proliferación de callo en el borde del explante y peciolo en el caso de las láminas foliares con peciolo.

3 – Formación de callo: se observó una proliferación de callo en los bordes del explante, en la nervadura principal y nervaduras secundarias, así mismo en peciolos en el caso de las láminas foliares con peciolo, esto sin llegar a formar una masa.

4 – Abundante formación del callo: formación de una masa voluminosa de callos en todo el explante.

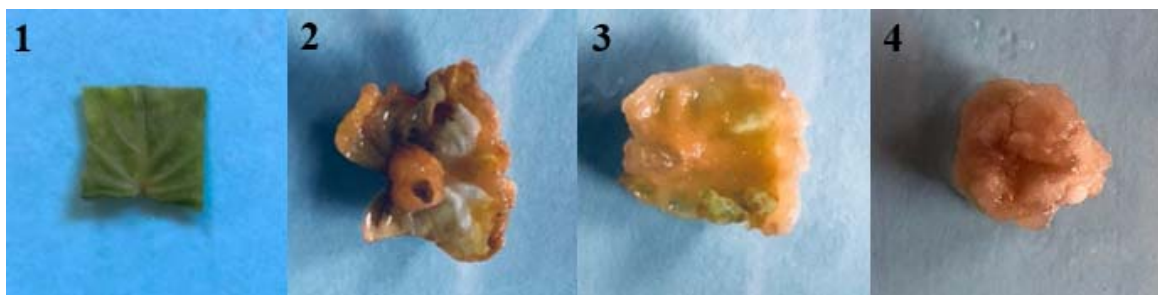


Figura 1. Formación de callos en explantes de camote var. Bushbuck en medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D. Sin formación de callo (1), Ligera formación de callo (2), formación de callo (3), Abundante formación de callo (4).

2. Escala de nodulación. Para la presencia de nodulaciones se usó la siguiente escala (Figura 2):

1 – Callo nodular.

2 – Callo poco nodular.

3 – Callo no nodular.

3. Escala de compactación. Para determinar la compactación de los callos se usó la siguiente escala (Figura 2):

1 – Callo compacto.

2 – Callo poco compacto.

3 – Callo no compacto.

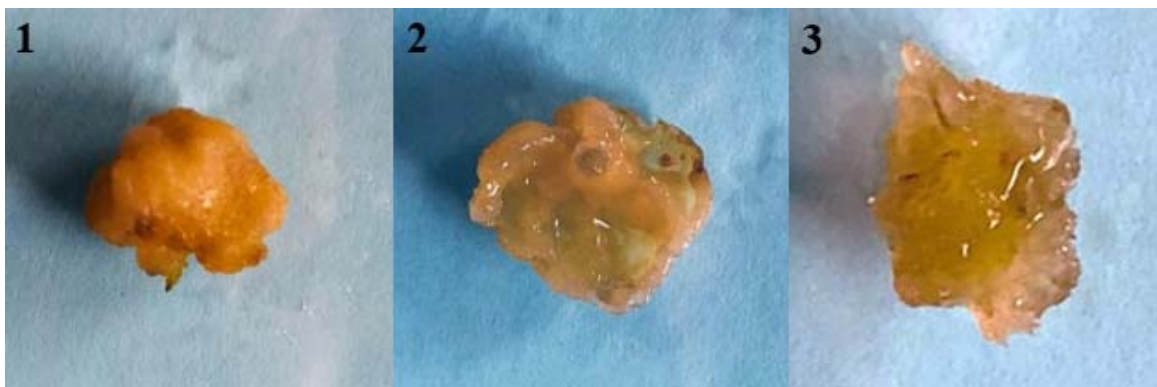


Figura 2. Nodulación y compactación de callos formados en explantes cultivados en medio de cultivo MS para inducción a callogénesis en camote var. Bushbuck. Callos nodulares y compactos (1), callos poco nodulares y poco compactos (2) y callo no compacto y no nodular (3).

4. Escala de friabilidad. Para el grado de friabilidad se usó la siguiente escala (Figura 3):

- 1 – Callo no friable.
- 2 – Callo poco friable.
- 3 – Callo friable.

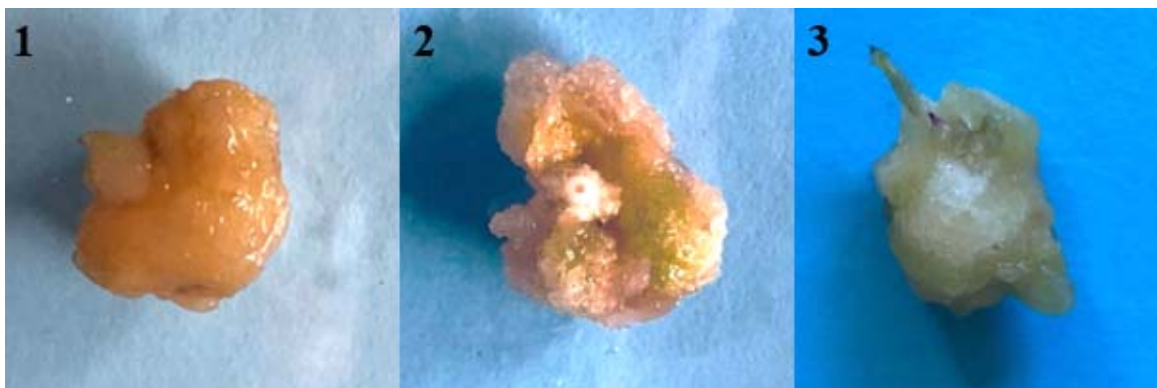


Figura 3. Friabilidad de callos en explantes de lámina foliar de camote cultivados en medio de cultivo MS para inducción a callogénesis en camote var. Bushbuck. callos no friables (1), poco friables (2) y friables (3).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 12 días después del establecimiento los explantes cultivados en ausencia de 2,4-D permanecieron sin cambio morfológico evidente (Figura 4), mientras que aquellos cultivados en presencia de esta hormona se tornaron de color amarillo y apariencia clorótica seguido de un arrugamiento de la lámina foliar (Figura 4) y engrosamiento de peciolo (explantes de lámina foliar con peciolo). En el tratamiento con 2.26 μ M de 2,4-D se notó una mayor formación de callos en comparación al tratamiento con 22.62 μ M donde se observó un menor desarrollo, por otro lado, los tratamientos con 4.52 y 9.04 μ M presentaron similitud en la formación de callos.



Figura 4. Explantes de camote 12 días después del establecimiento. Explante sin 2,4-D (1), explante en presencia de 2,4-D (2).

Así mismo, para el día 26 se comenzó a observar la formación de callos en ambos explantes evaluados: lamina foliar con y sin peciolo. Según Jarret (1991) la formación de callos toma de 2 a 4 semanas, dependiendo del tipo de explante y la concentración de la hormona utilizada. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos en cuanto a la presencia y formación de callos, siendo el tratamiento de láminas foliares con peciolo el que evidenció una mayor inducción de tejido callogénico, altamente nodular, compacto y no friable (Figura 5), coincidiendo de esta manera con Guevara *et al.* (2012) quienes observaron que los explantes de lámina foliar con peciolo tienden a formar mayor cantidad de callos, esto se debe a que en los peciolo, al igual que en otras zonas de la planta donde existe una activa división celular hay una elevada concentración de auxinas endógenas que regulan este proceso, y entre otros como el plagiotropismo de las hojas (McSteen y Zhao 2008), por cuanto a esto al exponer el explante en un medio con auxinas exógenas y en presencia de una herida se intensifica la división celular generando de esta manera un callo abundante, nodular y compacto (Cuadro 3).

Cuadro 3. Presencia, formación, nodulación, friabilidad y compactación de callos en láminas foliares con y sin peciolo en camote var. Bushbuck 26 días después del establecimiento *in vitro* en medio MS suplementado con 2,4-D.

Tratamiento	Variables			
	Formación de callo	Nodulación	Friabilidad	Compactación
Lamina foliar sin peciolo	1.71 b	1.56 b	1.55 a	1.56 b
Lamina foliar con peciolo	1.79 a	1.62 a	1.51 b	1.62 a
R ²	0.61	0.62	0.53	0.61
CV	13.32	10.17	11.67	10.33

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0.0001$).

En cuanto a los tratamientos de 2,4-D se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa a los 26 días del establecimiento donde se observó una mayor formación y desarrollo de callos nodulares, no friables y compactos en el tratamiento con 2.26 μM (Cuadro 4), además de que el crecimiento de los callos se extendió por toda la superficie y extremos de los explantes, logrando cubrir parcialmente todo el explante hasta formar una masa callosa de color amarillo crema (Figura 5), esto coincide con Guevara *et al.* (2012) quienes observaron la presencia de callos no friables, compactos y nodulares 21 días después del establecimiento de los explantes a concentraciones bajas de 2,4-D, así mismo Espinosa *et al.* (2012) evidenciaron a los 30 días la formación de tejido calloso, de color crema y consistencia no friable en *Morus alba* L. con bajas concentraciones de 2,4-D. En cuanto a los explantes expuestos a 22.62 μM de 2,4-D formaron callos no embriogénicos con un alto grado de friabilidad y baja compactación (Figura 5).

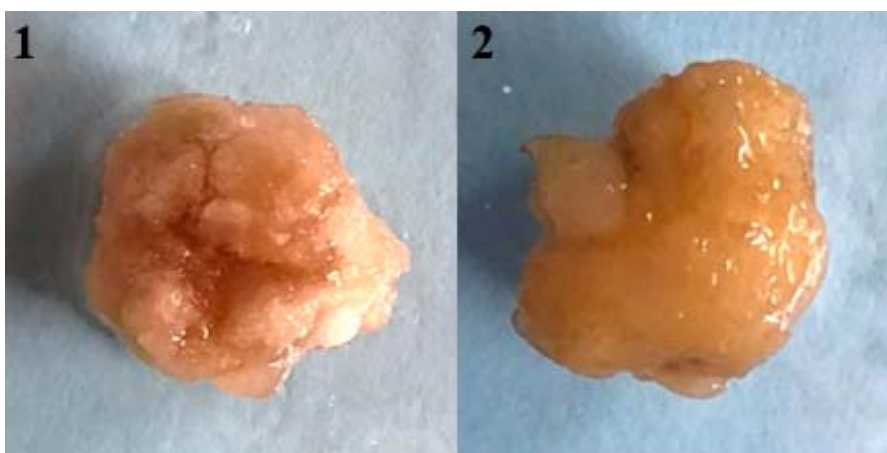


Figura 5. Tipos de callo en explantes de lámina foliar con y sin peciolo. Callo embriogénico (1) y callo no embriogénico (2).

Cuadro 4. Efecto de las concentraciones de 2,4-D en la inducción de callo en láminas foliares con y sin peciolo de camote var. Bushbuck.

Tratamiento (μ M)	Variables			
	Formación de callo	Nodulación	Friabilidad	Compactación
Testigo	1.27 d	1.28 d	1.83 a	1.28 d
2.26	2.02 a	1.80 a	1.35 d	1.80 a
4.52	1.89 b	1.70 b	1.43 c	1.70 b
9.04	1.86 b	1.64 b	1.48 c	1.64 b
22.60	1.70 c	1.55 c	1.57 b	1.54 c
R ²	0.61	0.62	0.53	0.61
CV	13.32	10.17	11.67	10.33

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0.0001$).

De acuerdo al análisis factorial para las láminas foliar con peciolo se obtuvo un mayor efecto del 2,4-D en cuanto a la formación, compactación, friabilidad y nodulación de los callos. Además de que se evidenció una mejor presencia de callos con potencial para la formación de embriones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del 2,4-D en la formación, nodulación, friabilidad y compactación de callos en explantes de lámina foliar con y sin peciolo de camote var. Bushbuck 26 días después del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento (μ M)	Explante	Variables			
		Formación de callo	Nodulación	Friabilidad	Compactación
Testigo	LF	1.23 f	1.23 e	1.86 a	1.23 e
2.26		1.94 b	1.74 b	1.38 de	1.74 b
4.52		1.92 de	1.73 bc	1.38 de	1.73 b
9.04		1.78 cde	1.58 cd	1.54 bc	1.58 cd
22.62		1.67 e	1.54 d	1.59 b	1.53 d
Testigo	LFP	1.32 f	1.33 e	1.79 a	1.32 e
2.26		2.07 a	1.86 a	1.32 e	1.86 a
4.52		1.87 bcd	1.67 b	1.47 cd	1.67 bc
9.04		1.95 ab	1.71 b	1.42 de	1.70 b
22.62		1.73 de	1.56 d	1.54 bc	1.56 d
R ²		0.61	0.62	0.53	0.61
CV		13.32	10.17	11.67	10.33

Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0.0001$).

LF=Lámina foliar sin peciolo.

LFP=Lámina foliar con peciolo.

Formación de callo. Al finalizar los 26 días del experimento se encontró una diferencia estadísticamente significativa, siendo el tratamiento con 2.26 μM de 2,4-D y láminas foliares con peciolo donde se obtuvo una mayor formación de callos grado cuatro en comparación con los explantes de LF y LFP expuestos a concentraciones de 4.52 y 9.04 μM donde solo se formaron callos grado tres, así mismo en concentración de 22.62 μM solo se observó la formación de callos grado dos para ambos explantes, coincidiendo con Guevara *et al.* (2012) quienes observaron que la mayor inducción de callo potencialmente embriogénicos ocurre cuando los explantes foliares son cultivados en concentraciones bajas de 2,4-D. Por otro lado, González *et al.* (2003) afirman que la mayor formación de callos grado cuatro y potencialmente embriogénicos en láminas foliares con peciolo se presenta a concentraciones bajas de esta fitohormona y que al aumentar la concentración solo se forman callos de grado dos.

Formación de nodulaciones. A los 26 días después del establecimiento de los explantes se encontró diferencia estadísticamente significativa, donde el tratamiento con una concentración de 2.26 μM y lamina foliar con peciolo obtuvo una mayor formación de nodulaciones al finalizar el experimento, en comparación con el tratamientos de LF y LFP expuestos a una concentración mayor de 2,4-D, esto coincide con González *et al.* (2011) quienes afirman tener mejor formación de nódulos con concentraciones bajas de esta fitohormona, debido a que, a mayor generación de callos mayor presencia de nódulos, ya que la formación de estos últimos depende directamente de la cantidad y tamaño de callos formados.

Friabilidad. Se encontró diferencia estadísticamente significativa, siendo el tratamiento con 2.22 μM de 2,4-D más LFP, el que mostro un menor grado de callos friables en comparación con el tratamiento de 22.62 μM más LF donde se obtuvo una mayor friabilidad, esto se debe a que a una mayor formación de callos el desmembramiento de los mismos es menor en comparación a aquellos que tienen un menor grado de desarrollo y compactación, acorde con Arzate y Mejía (2011) quienes mencionan que a concentraciones altas de 2,4-D en agave se obtiene una mayor proliferación de callo friable.

Compactación. El tratamiento con 2.26 μM de 2,4-D más LFP, mostró una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el tratamientos de 22.62 μM más LF y LFP los cuales formaron un menor grado de callos compactos, González *et al.* (2011) observaron la formación de callos compactos a los 30 días del establecimiento de los explantes a concentraciones bajas de 2,4-D, así mismo Hernández *et al.* (2013) evidenciaron la formación de callos compactos a bajas concentraciones de esta auxina en *Heliconia collinciana*; esto se debe principalmente a que a una mayor formación de callos mayor es el conjunto de células presentes en el explante cultivado, lo que implica la formación de una masa celular altamente densa y compacta.

Al finalizar el experimento los callos formados en ambos explantes sufrieron oxidación y muerte celular, esto pudo deberse a que fueron expuestos a 16 horas de luz durante todo el periodo de incubación (Figura 6). De acuerdo con Arzate *et al.* (2008) esto se debe a que en condiciones de luz el 2,4-D sufre una degradación rápida en comparación a condiciones

de obscuridad, implicando una oxidación y necrosis progresiva de los explantes. ICTA (2003), menciona que la oxidación de los explantes es debido a los cortes que se realizan previos al cultivo de tejidos provocando la muerte de las células embriogénicas e impidiendo la proliferación y crecimiento de las mismas, por tanto, se debe de colocar un antioxidante a el medio de cultivo y esperar que los instrumentos de disección se encuentre a temperatura ambiente ya que este pasa por un proceso de esterilizado a una temperatura de 250 °C antes de hacer los cortes de los explantes.

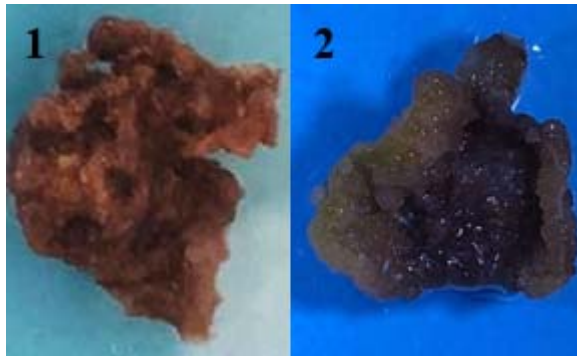


Figura 6. Callo oxidado (1) y necrosado (2), en explantes de camote var. Bushbuck 35 días después del establecimiento en medio MS con 2,4-D.

4. CONCLUSIONES

- La inducción de callo en láminas foliares y láminas foliares con peciolo es dependiente de la presencia de 2,4-D.
- El uso de 2,4-D a bajas concentraciones propicia una mayor formación de callos compactos, nodulares y potencialmente embriogénicos.
- Los explantes de hojas con peciolo tienen una mayor respuesta a la formación de callo embriogénico en presencia de 2,4-D.

5. RECOMENDACIONES

- Incubar los explantes en condiciones de obscuridad para evitar la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- Usar un antioxidante en el medio de cultivo para evitar la fenolización de los explantes.
- Después de la formación de los callos transferirlos a medio de cultivo desprovisto de fitohormonas, para estimular la inducción de embriogénesis somática.

6. LITERATURA CITADA

- Abriata LA *et al.* 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal. In: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. ArgenBio. Argentina. INTA. p. 231. [consultado 2018 agt 17]. eng. http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf.
- Arzate AM, Piña JL, Zavaleta HA. 2008. Inducción de Pro embriones Somáticos en Ave del Paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). Revista fitotec. México. [consultado 2018 agt 18]. 31(2):83-186. eng. <http://www.redalyc.org/pdf/610/61031212.pdf>
- Arzate AM, Mejía R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Fitotec. México. [consultado 2018 jul 31]. 34(2):101–106. eng. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/34-2/4a.pdf>
- Cusumano C, Zamudio N. 2012. Manual técnico para el cultivo de batata (camote o boniato) en la provincia de Tucumán (Argentina). 1^{er} ed. Argentina: INTA. [consultado 2018 jul 27]. eng. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-manual_batata.pdf
- FAOSTAT. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Freire M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biotecnología vegetal. [consultado 2018 mayo 13]. 3(4):195-209. eng. file:///D:/Downloads/263-971-1-PB%20(3).pdf.
- Espinosa A, Silva J, Sariego S, Cholo L, Delgado H. 2012. Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. Pastos y Forrajes. [consultado 2018 agt 18]. 35(4):407–416. eng. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000400006
- Gallegos P. 2013. Embriogénesis somática y regeneración de plantas de *Medicago arborea* L.: Valoración como forrajeras. [Tesis]. España: Universidad de Salamanca. 172 p. [consultado 2017 oct 28]. eng. https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/121462/1/DFV_GallegoNoguerasPiedad_Resumentesis.pdf.
- George F, Hall M, De Klerk GJ. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture Background. 3rd ed. Dordrecht, Netherlands. Springer. [consultado 2018 agt 18]. eng. 10.1007/978-1-4020-5005-3.

- Gómez C, Uribe M, Ríos D, Sánchez M. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. Interciencia. [consultado 2018 ago 17]. eng. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33912106>
- González OS, Hernández M, Silva JJ, Espinosa A. 2011. Evaluación de la dinámica del crecimiento *in vitro* en callos de *Ipomoea batatas* L. Biotecnol. [consultado 2018 ago 08]. 13(1):148–155. eng. file:///D:/Downloads/22988-79596-1-PB%20(2).pdf
- González OS, Milanés I, Silva JJ, Espinoza A y Acosta L. 2003. Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4-D y 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato. Biotecnol. [consultado 2018 mayo 18]. 3(1):25–29. eng. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/202>
- Guevara Y, Suárez I, Salgado J. 2012. Inducción y proliferación *in vitro* de tejidos celulares de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) en medio con 2,4-d. Temas agrarios. [consultado 2018 mayo 13]. 17(2):9–17. eng. file:///D:/Downloads/Dialnet-InduccionYProliferacionInVitroDeTejidosCelularesDe-4286376.pdf
- Hernández E, López MC, Estrada AA. 2013. Callogenesis de *Heliconia collinciana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. Rev. Mex. Cienc. Agríc. [consultado 2018 ago 18]. 4(8):1175–1186. eng. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000400006
- Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). 2003. Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de Pinabete *Abies guatemalensis redher* fase II. Guatemala. 30 p. [consultado 2018 ago 18]. eng. <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202000.30.pdf>
- Jarret RL. 1991. Cultivo de Tejidos de camote. In. Roca MW, Mroginski LA. Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. CIAT. 441–442 p.
- Manzanilla MG. 2004. Inducción de embriogénesis somática de tejido Nucelar de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.) [Tesis]. México: Universidad de Colima. 117 p. [consultado 2017 oct 28]. eng. http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Miguel_Angel_Manzanilla_R.PDF
- McSteen P, Zhao Y. 2008. Plant Hormones and Signaling: Common Themes and New Developments. Development cell. [consultado 2018 ago 21]. 14(4):467–473. eng. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.013>
- Nieves N, Poblete A, Cid M, Lezcano Y, González JL, Cabrera JC. 2006. Evaluación del pectimorf como complemento del 2,4-D en el proceso de la embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum spp*). Cultivos Tropicales. [consultado 2018 ago 18]. 27(1):25–30. eng. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215885004>

- Ramos N, Dinkova TD, Quintero M. 1996. La metilación del ADN y su manifestación en las plantas. CENIC. Cuba [consultado 2018 agt 18]. 28(3):3-6. eng. <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB%2029-1-%201998-003-006.pdf>.
- Sánchez N, Jiménez V. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía mesoamericana. [consultado 2018 sept 12]. 21(1):193-205. eng. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v21n01_193.pdf
- Santana N. 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callo en variedades de caña de azúcar (*Saccharum species*) *in vitro*. Cultivos tropicales. Cuba. 4(3):568–575.
- Zimmerman LJ. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. The Plant Cell. [consultado 2018 agt 17]. 5:1411-1423. eng. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160372/pdf/051411.pdf>.