



Ministerio de Educación Superior

Universidad de Granma
Facultad de Ciencias Agrícolas
Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal
Bayamo. M.N



Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas
La Habana

**Establecimiento de una metodología de micropropagación mediante la
embriogénesis somática en el cultivo del boniato
(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

Autor: Ing. Orlando S. González Paneque

Tutor: Inv. Tit., Ing. María Margarita Hernández Espinosa, Dra. C.

Inv. Tit., Ing. Luis Manuel González Núñez, Dr. C.

Temática: Biotecnología Vegetal

La Habana

2006

Síntesis

El boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), se ha convertido en un alimento habitual sobre todo en la zona oriental de Cuba. Sin embargo, existen algunas limitantes para su introducción y extensión en las áreas agrícolas, una de las cuales es la poca disponibilidad de material de plantación; por lo cual, se desarrolló el presente trabajo con el objetivo de establecer una metodología que permita la obtención de abundante material a través de la micropropagación mediante la embriogénesis somática como una vía rápida para el establecimiento de bancos de "semilla" de calidad en caso necesario. Para ello se partió de explantes de limbos foliares, peciolo y entrenudos de brotes jóvenes de los clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1, Yabú-8 y Jewel. El mejor porcentaje de desinfección se logró con el empleo del hipoclorito de sodio al 1% con un tiempo fijo de inmersión de 15 minutos. El limbo foliar procedente de brotes de raíces tuberosas resultó el mejor explante para la formación de callos, determinándose además la procedencia, edad, zona del limbo foliar y la posición sobre el medio de cultivo más adecuada para este fin. La mayor efectividad para la formación de callos potencialmente embriogénicos, se obtuvo en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) con 2,4-D ($0,50 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$); la formación de los embriones somáticos se logró en este mismo medio con 2,4-D ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$), para la maduración de los mismos fue necesaria la adición de ABA ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) al medio basal y el TDZ ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) posibilitó los mejores resultados para la germinación. La conversión en plántulas se obtuvo con el empleo del GA₃ ($10,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Se logró la aclimatización de las vitroplantas con una supervivencia de un 83 a 100% y la plantación en condiciones de campo resultó exitosa; además, se realizaron estudios histológicos durante todo el proceso, así como análisis bioquímicos y moleculares para evaluar la estabilidad genética de las plantas obtenidas.

Abreviaturas y acrónimos empleados en el texto

°C: Grados Celsius.

2,4-D: Ácido diclorofenoxiacético.

6-BAP: 6-bencilaminopurina.

ABA: Ácido abscísico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIA: Ácido - 3 - indolacético.

AIB: Ácido -3- indolbutírico.

ANA: Ácido α - naftalen acético.

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.

EE: Error Estándar.

Epon: Resina (polímero) empleada en la fijación de muestras para estudios histológicos.

g.L⁻¹: Gramos por litro.

g: Gramos.

GA₃: Ácido giberélico.

Kin: Kinetina (6-furfuryl aminopurina).

mg.L⁻¹: Miligramos por litro.

MS (1962): Composición de los nutrientes inorgánicos del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962).

PAR: Radiación Fotosintética Activa.

PBS: Solución de Buffer Fosfato, compuesto por NaCl, KCl, KH₂PO₄ y Na₂HPO₄.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Picloram: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

RAPD: Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico.

TBE: Tris-HCl ácido bórico EDTA.

TDZ: Tiazurón (N-fenil-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea).

Vitaminas MS: Vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962), compuestas por: glicina, ácido nicotínico, piridoxina y tiamina.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo del cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), ofrece diversas ventajas económicas para muchos países, ya que se puede emplear en la alimentación humana y animal, así como en la industria y puede ser utilizado como forraje y abono verde (López y col., 2002). El área de siembra a nivel mundial es de 8 618 866 ha, con una producción de 127 139 553 t anuales y el 90,5% del área dedicada al cultivo se encuentra en el continente asiático, donde se obtiene el 91,0% de la producción mundial (FAO, 2004).

Las cualidades agronómicas de este cultivo hacen que sea muy tolerante a las condiciones climáticas, necesita pocos requerimientos nutritivos para su crecimiento y presenta un ciclo vegetativo corto, lo cual ha propiciado su extensión, especialmente, en países en vía de desarrollo y zonas tropicales (García, 2005). En Cuba, constituye un alimento importante para la población y la producción anual es de 269 582 t (Infoagro, 2003); con un área de siembra de 71 000 ha (FAO, 2004a); sin embargo, su extensión se ve con frecuencia afectada por la poca disponibilidad de material de plantación de alta calidad y afectación por plagas, lo cual trae consigo que la producción de boniato en Cuba se encuentre deprimida (Rodríguez y col., 1998).

Para darle solución a la problemática existente en lo referente a la escasez de material de plantación, se han empleado diversas técnicas y respecto a esto López y col. (2002), plantearon que la alternativa más promisoría para la propagación masiva de la especie, es el uso de las técnicas de cultivo de tejidos, entre ellas la embriogénesis somática, que permite una propagación clonal rápida en un período breve de tiempo, siendo el medio más poderoso de micropropagación con gran potencial para la agricultura del futuro y es el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Freire, 2002).

En la actualidad, la propagación de plantas *in vitro* a escala comercial se ha consolidado mundialmente y la embriogénesis somática se emplea en la propagación acelerada en muchas especies (Pérez y col., 1998), dada su eficiencia, por el elevado índice de multiplicación y la producción de material genéticamente estable (Posada y col., 2003; Molina y col., 2003).

Según Chée y *col.* (1992) y Espinosa y *col.* (2003), la embriogénesis somática en el cultivo del boniato ofrece una oportunidad única para la automatización, la multiplicación clonal rápida y la plantación de clones de interés.

En este cultivo a nivel mundial se han aplicado escasamente las técnicas biotecnológicas, especialmente en lo referente a la embriogénesis somática, existiendo informes de trabajos realizados por Jarret (1989) y Cantliffe (1993) en la Florida, Estados Unidos y de estudios efectuados en Cuba por López y *col.* (2002), los cuales obtuvieron bajos índices de conversión en plántulas y en la aclimatización de las mismas; por lo que no se estudiaron en condiciones de campo.

Teniendo en consideración que en la provincia Granma, el cultivo del boniato constituye uno de los de mayor demanda y se presentan problemas con la obtención de altos rendimientos ocasionados, fundamentalmente, por la carencia y calidad del material de plantación, las condiciones edáficas y climáticas de dicha zona y la afectación por plagas, se hace necesario contar con un sistema alternativo eficiente para la propagación acelerada de los clones más adaptados a estas condiciones.

Para dar respuesta a la problemática planteada, se propuso la siguiente hipótesis:

El establecimiento de una metodología de micropropagación basada en la embriogénesis somática, permitirá la producción de altos volúmenes de plantas genéticamente estables en clones de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).

Para dar cumplimiento a esta hipótesis, se propusieron los siguientes objetivos:

- Determinar el tipo de explante y la composición del medio de cultivo para la formación de callos potencialmente embriogénicos y embriones somáticos en diferentes clones de boniato.
- Inducir la maduración y germinación de los embriones somáticos, así como su conversión en plántulas.
- Caracterizar histológicamente las diferentes fases del proceso de formación de callos y embriones somáticos.
- Lograr la aclimatización y plantación en campo de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos en clones de boniato.

-
- Evaluar la estabilidad genética de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos, atendiendo a sus características morfológicas, análisis isoenzimáticos y de ADN.

Novedad científica

Se propone, por primera vez en Cuba, una metodología completa de micropropagación vía embriogénesis somática para la especie *Ipomoea batatas*, que incluye la fase de aclimatización de las plantas obtenidas y el establecimiento en el campo de las mismas, la caracterización histológica del proceso, así como el estudio de su estabilidad mediante análisis bioquímicos y moleculares.

Valor práctico

La metodología de micropropagación del boniato basada en la embriogénesis somática que se propone en la presente investigación, es una herramienta con la que podrá contar el país para el establecimiento de bancos de “semilla” de clones seleccionados; que posibilitará la obtención de abundante material de plantación de alta calidad para su empleo en la producción; además, puede ser útil para la conservación e intercambio de germoplasma y el establecimiento de protocolos de transformación genética en el cultivo.

2. Capítulo II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Origen, características e importancia económica del boniato.

Existen dos teorías sobre el origen del boniato, una lo considera oriundo del continente americano, situándolo en México y Centroamérica, en virtud de la división del material genético y por la evidencia arqueológica de la antigüedad de su cultivo. La otra teoría plantea su origen en China. Sin embargo, en la actualidad se acepta que es originario de América, al tener en cuenta que existe mayor cantidad de especies que en el continente Asiático, con alto potencial de rendimiento y mayor desarrollo vegetativo, favoreciendo la floración y fructificación.

Es una Convolvulácea que responde a la división Macrophyllphyta, clase Magnoliatae, subdivisión Magnoliophytina y orden Polemoniales. Es un hexaploide natural ($2n=6x=90$), a diferencia de la mayor parte de los miembros del género que son diploides ($2n=30$) o tetraploides (Andrey y col., 1994).

Es una planta anual, herbácea, rastrera, en ocasiones presenta ápices volubles, glabra o pubescente, con raíces adventicias y tuberosas. Se propaga vegetativamente por segmentos de tallos y raramente por raíces tuberosas y semillas (Scott, 1992).

Las hojas son simples, alternas, formadas por un limbo con una nerviación central y nerviaciones más pequeñas. Los peciolo se encuentran insertados de forma alternante en el tallo. Presenta inflorescencia tipo cima, situadas en las axilas de la unión del peciolo con el tallo. Las raíces son numerosas y se forman en los nudos y entrenudos del tallo, la mayoría engrosa en los primeros 15 cm de profundidad y en diferentes direcciones. La forma, color y número de raíces tuberosas varían en dependencia del clon (Huaman, 1992).

Según López y col. (1995), el tallo es rastrero, angular, liso y algunas veces veloso en su parte apical. El fruto es una cápsula redondeada de 3 a 7 mm de diámetro que contiene de 1 a 4 semillas que son glabras, brillantes y negruzcas (en ocasiones pardas).

El género *Ipomoea* tiene más de 400 especies. Desde el punto de vista económico, la única especie cultivada con destino a la alimentación es *Ipomoea batatas*, de la cual existe un gran número de clones (López y col., 1995).

Es uno de los cultivos tradicionales más antiguos y valiosos, sembrados ampliamente en los países en vías de desarrollo. Se destaca por su rusticidad y su alta productividad por unidad de área y de tiempo, es un cultivo rico en vitaminas y minerales. En muchos países su principal uso está dado en la alimentación humana, porcinos, bovinos, aves, ovinos y conejos (Ghislain y Trognitz, 1996).

Según Mortley (1999), se conoce de los efectos de toxicidad de determinados cultivos sobre animales y el hombre, pero en lo referente al boniato no se ha reportado toxicidad a pesar de ser una de las plantas más cultivadas en el mundo ocupando el séptimo lugar.

Morales y col. (1999), plantearon que si tenemos en cuenta que las producciones de plátano vianda y malanga en Cuba han disminuido considerablemente, debido al alto costo de producción, la aparición de enfermedades y que la papa tiene restringida su siembra a pocos meses del año, el boniato pasa a jugar un papel fundamental en la alimentación, siendo consumido en fresco de diferentes maneras y también es empleado en la industria.

2.2. Problemática actual del cultivo en Cuba y tendencias de la investigación.

Los cultivos que se propagan por raíces y tubérculos en Cuba no tuvieron desarrollo antes del triunfo de la Revolución en la aplicación de los adelantos científicos, ya que las condiciones de dependencia política y económica determinaban también la dependencia en el desarrollo científico (López y col., 1995).

Después del triunfo revolucionario, se dio merecida importancia al desarrollo de las raíces y tubérculos, con la finalidad de resolver las dificultades que éstas presentan en nuestras condiciones tropicales y se lograron resultados satisfactorios en centros como el Instituto Nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), en lo referente a la obtención y multiplicación de nuevos clones de interés comercial.

Diversos factores inciden en los bajos rendimientos reportados, a pesar de disponer de clones de alto potencial, entre los que se destacan: uso de semilla agámica de mala calidad, atenciones culturales deficientes que provoca despoblación, enyerbamiento, afectación por plagas, principalmente el tetuán (*Cylas formicarus*), poca disponibilidad de material de siembra y deficiencia en la cosecha, aunque se debe destacar que se cuenta con la existencia de una estrategia clonal, la cual ha sido estudiada y recomendada por el INIVIT, Villa Clara. Sin embargo, se continúa trabajando a través de los programas de

multiplicación de nuevos clones que presentan una mejor adaptación a las diversas regiones del país con altos rendimientos, dada las cualidades agronómicas que posee el cultivo del boniato de adaptarse a diversas condiciones climáticas y requiere de pocos recursos para su crecimiento, lo cual ha traído consigo que el mismo se haya extendido por diversas zonas del mundo y es cultivado en aquellas regiones de pobre desarrollo por una gran cantidad de personas con bajos recursos, especialmente, en países en vías de desarrollo; pero además, constituye un cultivo de interés en los países desarrollados y su extensión en ambos casos se encuentra limitada por la poca disponibilidad de material de siembra, dado a que se requiere de muchas plantas por unidad de área, de ahí la necesidad de la búsqueda de nuevas vías para la multiplicación acelerada de la especie.

La tendencia que existe en el ámbito mundial y en Cuba, en lo referente al cultivo del boniato, es la multiplicación de clones precoces de alta productividad de color amarillo, ricos en β -carotenos, que se adapten a las condiciones zonales de cada región, mejorar la calidad de la semilla y lograr resistencia a plagas y enfermedades.

El desarrollo actual de la agricultura ha traído consigo la propagación de nuevos cultivares comerciales de altos potenciales de rendimiento, los cuales han ido desplazando a los tradicionalmente utilizados (Sánchez y col., 1995).

En el cultivo del boniato se hace necesario la búsqueda de nuevas técnicas para la multiplicación acelerada y dentro de ella la embriogénesis somática como una vía alternativa, ya que la vía de propagación tradicional es por semilla agámica y se presentan problemas en la disponibilidad del material de siembra y la reproducción por semilla botánica es poco común; además, el material original puede presentar erosión genética, dificultando esto el empleo del mismo en sucesivas generaciones. En la actualidad, con la introducción de las técnicas *in vitro*, se ha dado un gran impulso a la propagación acelerada de diferentes cultivos y la multiplicación de nuevos clones de interés comercial.

En Cuba, se trabaja en diferentes esferas de la biotecnología, incluyendo el estudio de la genética de células de organismos superiores en diferentes cultivos de interés (Castro, 1992). Se trabaja intensamente en el desarrollo de las ciencias mediante la aplicación del cultivo de tejidos vegetales, aspecto en el que se han obtenido resultados muy alentadores y de aplicación social. Por ésta situación el uso de la biotecnología, como herramienta

auxiliar ofrece múltiples posibilidades para su empleo y solucionar problemas que aún existen en distintas especies vegetales (López y col., 2002).

La embriogénesis somática es reportada para diversos cultivos y no ha sido muy estudiada en Cuba en el cultivo del boniato, lo que justifica las investigaciones en este sentido.

Los avances biotecnológicos marcan nuevas pautas en las investigaciones y en la búsqueda de nuevas vías de propagación acelerada de diversos cultivos de interés; constituyen una herramienta más a la cual es posible sacarle mayor provecho, siendo de vital importancia el desarrollo de protocolos en el cultivo del boniato que presenten una gran importancia práctica y que demuestren la posibilidad de su aplicación a gran escala.

2.2.1. Principales resultados en la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro*.

El desarrollo alcanzado en el cultivo de tejidos, desde sus inicios hasta la fecha, ha dado un gran aporte a la agricultura y en la actualidad constituye una vía fundamental en la actividad científico tecnológica (Cevallos, 2000).

Las tendencias mundiales abren un espacio cada vez mayor al uso de la biotecnología, ya que la humanidad enfrenta el reto de cómo satisfacer las necesidades de una población creciente (Nichterlein, 2000), donde la biotecnología puede contribuir al aumento y al mejoramiento de la producción de alimentos (Sasson, 2001); mediante la cual esta tecnología permite obtener material de elevada productividad, justificando su inclusión en los programas agrícolas (Parrot, 2002).

A partir de los resultados obtenidos durante los últimos años, en una gran cantidad de especies vegetales se ha extendido la aplicación de las técnicas biotecnológicas y en el cultivo del boniato se hace necesario intensificar los esfuerzos en el establecimiento de metodologías de cultivo *in vitro* dada la importancia del mismo para la seguridad alimentaria de millones de personas en el mundo (García, 2005).

En Cuba, se emplean las técnicas en el cultivo de tejidos vegetales por distintas instituciones científicas en diversas especies, entre las cuales tenemos trabajos realizados por Castillo (2000) en caña de azúcar (*Saccharum* sp), González (1993) en arroz (*Oryza sativa* L.), Santana (1993), Cevallos (2000), De Feria (2001), González (2003) en café (*Coffea* sp), Escalona (1999), Benega y col. (2000) en piña (*Ananas comosus* (L.) Mer),

Barranco (2000) en plátano (*Musa* sp), Ramírez (2005) en tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), Hidrobo (2000), Castillo y col. (2004) en papa (*Solanum tuberosum*, L.), Medero y col. (2004) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz), entre otras.

Los métodos biotecnológicos aplicados a las plantas, conducen a una racionalización de los trabajos de multiplicación efectuados por vía tradicional y permiten la multiplicación de las especies en grandes cantidades y en corto tiempo (Sasson, 2001; Espinosa y col., 2003).

La especie *Ipomoea batatas* está conformada por un alto número de clones que difieren en valor alimenticio, tamaño, forma, color de las raíces tuberosas, producción, resistencia a plagas y enfermedades, y en los últimos años han sido introducidos en la producción agrícola nacional, mediante el empleo de métodos tradicionales de propagación, un grupo de clones comerciales de elevado potencial de rendimiento (Daza y Rincón, 1993).

Se han desarrollado evaluaciones y regionalizaciones de clones de boniato en diferentes partes del país, pero aún es deficiente el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en la propagación de nuevos clones de interés comercial, aún conociendo las ventajas de éstas técnicas.

La mayor parte de los esquemas de multiplicación utilizados en el boniato han estado basados, fundamentalmente, en la multiplicación agámica por la vía tradicional de los clones existentes y la introducción de otros foráneos, contándose actualmente con un gran número de clones. Así mismo, han sido realizadas investigaciones que apoyan y complementan los programas de establecimiento de variedades clonales por estas vías. No obstante, existen aspectos en los que se requiere un mayor esfuerzo y profundización en las investigaciones, fundamentalmente, las encaminadas a la multiplicación de nuevos clones con el empleo de las técnicas de avanzadas de cultivo de tejidos vegetales.

Según Cornide (2002), se impone la búsqueda de alternativas a los productos agrícolas de cultivos con alta capacidad instalada, que ayuden a afrontar la caída del valor de cambio y la inestabilidad del mercado internacional.

2.3. El cultivo de tejidos en la micropropagación de especies vegetales.

Hoy en día, es muy importante la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de especies vegetales en el cual se agrupan diversos aspectos relacionados

con el cultivo; cuya aplicación ha logrado elevar el rendimiento y disminuir las pérdidas considerablemente.

La biotecnología ofrece grandes posibilidades en la multiplicación de especies vegetales y los nuevos productos biotecnológicos deben ofrecer apoyo a los programas de propagación acelerada para los posibles efectos en el medio ambiente y su utilización ha propiciado avances más rápido en la obtención y multiplicación de genotipos (Omokawa y Anonuma, 2002). Con el surgimiento de las técnicas de cultivo *in vitro*, se abre una amplia perspectiva para su empleo en la micropropagación de especies vegetales de interés (Arencibia y Cornide, 1999).

Según Pérez y col. (2004), el cultivo de tejidos vegetales es una alternativa para la producción de semilla y juega un rol importante en el suministro de semillas de alta calidad.

La multiplicación *in vitro* de plantas aporta una esencial contribución a la propagación acelerada de los cultivos (Kim y col., 2001; Etienne y Berthouly, 2002).

En los últimos años la aplicación de las técnicas en el cultivo de tejidos vegetales han sobrepasado la fase de investigación y ésto ha traído como consecuencia el establecimiento de laboratorios que propagan masivamente muchas especies a gran escala (Jiménez, 1998a).

Según Borroto (2002), la propagación *in vitro* tiene muchas ventajas, en especial una mayor tasa en la multiplicación de material libre de plagas y enfermedades en espacio que permite la producción rápida y económica en cantidades muy grandes de plantas de alta calidad.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales están establecidas en algunos cultivos para la propagación clonal de genotipos selectos. Esta importante función del cultivo de tejidos ha aumentado con los adelantos que se han producido durante los últimos años en los métodos para la erradicación de organismos patógenos, micropropagación, manipulación genética, conservación y distribución de germoplasma (Acosta y col., 2002; Alvarado y col., 2003). Además, con la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se presenta la morfogénesis, que como proceso se manifiesta a través de la embriogénesis somática y la organogénesis; donde una u otra tienen en la actualidad grandes aplicaciones en el cultivo de tejidos vegetales (Walker y Parrot, 2001).

2.3.1. Papel de algunos reguladores del crecimiento.

Roca y Mroginski (1993), señalaron que el éxito que se obtenga en el cultivo de tejidos de plantas está influenciado, entre otros factores, por la composición química del medio de cultivo, que es el sustrato en el cual se desarrollan las células, tejidos y órganos, luego de ser aislados de la planta, donde se ha demostrado que la fórmula propuesta por Murashige y Skoog (1962) es un medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para el empleo de diferentes partes de la planta, donde la presencia y concentración de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo es un aspecto de gran importancia, cuyas exigencias varían con la especie, la naturaleza del tejido y el tipo de proceso estudiado.

Los reguladores del crecimiento son sustancias endógenas insustituibles para las plantas, pues en su interrelación deciden el crecimiento y las bases para su ulterior desarrollo (Tsatsakis y Schitilman, 1993). Se encuentran íntimamente relacionados con los centros de activo crecimiento en las plantas y son los encargados de desencadenar *in vitro* todos los procesos que se producen *in vivo* (Takahashi y col., 1995).

El papel de los reguladores del crecimiento sobre las células y tejidos ha sido enfatizado en la literatura. Sin embargo, la selección de uno u otro está en función de la interrelación entre éstos y su presencia en el tejido (García, 1998). De ahí se infiere que, el desarrollo del callo y de órganos a partir de tejidos escindidos, está definido por los reguladores del crecimiento aplicados al medio de cultivo y por los endógenos presentes en ese momento. Dentro de los reguladores del crecimiento vegetal, se encuentran las fitohormonas formadas por un grupo de sustancias de elevada actividad biológica, que generalmente, se desplazan desde su lugar de síntesis con cierta dirección y velocidad hasta el lugar de acción, causando un efecto de crecimiento específico o de diferenciación (González, 2003), entre los cuales se encuentran:

Auxinas: Son compuestos caracterizados por su capacidad para inducir alargamiento de las células del brote, el ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina natural más frecuente en las plantas y pueden actuar sobre otros procesos; además, del alargamiento celular (Vázquez y Torres, 1995).

Citoquininas: Se encuentran muy difundidas en el reino vegetal y en los microorganismos. Están distribuidas en la planta y su principal lugar de síntesis lo constituyen las hojas adultas. Promueven la división celular a bajas concentraciones y generalmente inhiben el crecimiento de las raíces y la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia y tienen un papel fundamental en la embriogénesis (Martín y col., 1993).

Entre las citoquininas se encuentra el tidiazurón (TDZ), que es una fenilurea con alta actividad como citoquinina. Este regulador del crecimiento de las plantas se ha utilizado para la regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* en especies recalcitrantes y en la micropropagación de un gran número de cultivos.

El uso del TDZ como fuente de citoquinina, es esencial para la germinación de los embriones somáticos, favoreciendo la aparición de órganos con elevada frecuencia en determinados cultivos (Nowack y Miczynski, 2002).

Giberelinas: Son activas en el crecimiento y en la división celular; la más conocida es el ácido giberélico y se emplean en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores (Hisamatsu y col., 1997; citados por García, 1998).

Acido Abscísico: Es un inhibidor natural del crecimiento presente en las plantas y se encuentra en todas las partes de ésta, pero las concentraciones más elevadas parecen estar localizadas en las semillas y los frutos.

Desempeña un papel fundamental en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos, tolerancia al estrés hídrico y cierre estomático (Ammirato, 1974). Interviene en la maduración de los embriones somáticos dado su efecto en la inhibición de la germinación precoz de los mismos (Nieves y col., 1999).

2.3.2. Organogénesis.

Según Jiménez (1998), la organogénesis es un evento morfogénico que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de ésta en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido que le dio origen, y constituye la base fundamental de la selección vegetativa.

La organogénesis se refiere al proceso donde las células pueden ser inducidas para formar plantas completas y se consideran: la rizogénesis o formación de raíces y la caulogénesis o formación de yemas (Litz y Jarret, 1993).

Ziv (1999) planteó que, el proceso organogénico se inicia con cambios en una célula del callo o un conjunto de éstas y solamente un pequeño porcentaje de las células del explante dan lugar a la formación de callos que luego regeneran en plántulas.

La capacidad organogénica de los callos puede disminuir cuando son mantenidos en subcultivos prolongados, lo que puede estar asociado con la tasa de crecimiento celular, friabilidad del callo, necesidad de nutrientes, entre otros (Jarret y Grawel, 1991).

Según Gómez (1998), la formación del callo está dada por el crecimiento desorganizado de células obtenidas a partir de un tejido y la inducción de este comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente sufren desdiferenciación ante la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo.

Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células, ya que el manejo de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, posibilitan el desarrollo de brotes, raíces y embriones somáticos, en dependencia del balance auxina-citoquinina en el medio de cultivo (Yoon y Choi, 2002).

El establecimiento de los callos, seguidos de organogénesis o embriogénesis, ha sido realizado en numerosas especies y la proliferación de un fragmento de planta para la regeneración puede estar influenciada por la especie y su estado de desarrollo (Nowack y Miczynski, 2002).

La formación de órganos a partir de callos se conoce como organogénesis indirecta y cuando se obtienen directamente del explante como organogénesis directa. Siendo la organogénesis indirecta una vía para obtener mutaciones en el material de partida, ya que se emplea la callogénesis como vía intermedia de la inducción de regenerantes, y el crecimiento y proliferación de las células en el medio de cultivo bajo la acción directa de los componentes del mismo (Sunpui y Kanchanapoon, 2002).

2.3.3. Embriogénesis somática.

Como embriones somáticos se han definido a los originados a partir de células, sin la necesidad de la fusión de gametos (Gómez, 1998). Son estructuras bipolares con un eje

apical y radical bien definido, no poseen conexión vascular con el tejido que le dio origen y pasan por los estadios de desarrollo: globular, corazón, torpedo y cotiledonal, con la capacidad de crecer y formar plantas (De Jong y *col.*, 1993).

La embriogénesis somática, es decir, la posibilidad de inducir la transformación de una célula no sexual y poco diferenciada en un grupo de células que sean capaces de originar un embrión, el cual posteriormente dará lugar a un vástago y una raíz, constituye un avance en el cultivo de tejidos vegetales y se ha obtenido en muchas especies (Merkle y *col.*, 1995; Motoike y *col.*, 2001).

Según Parrot (2002), cuando el nivel de auxinas en el medio de cultivo baja de cierto umbral, las células embriogénicas empiezan un proceso de histodiferenciación. Los embriones que se están histodiferenciando crecen debido a la división celular y pasan por las mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos. El transporte polar de auxinas endógenas es necesario para que un embrión somático en vía de desarrollo haga la transición a los diferentes estadios de desarrollo.

El balance interno de las auxinas puede ser alterado debido a la adición de auxinas exógenas y como resultado los embriones somáticos requieren del uso de reguladores del crecimiento antes de germinar y convertirse en plántulas (Morales y *col.*, 1999).

Las primeras etapas de la maduración se caracterizan por la acumulación de sustancias de reservas; mientras que, las siguientes etapas se caracterizan por la adquisición de tolerancia contra la desecación y son análogas a la madurez fisiológica de las semillas botánicas.

Virtualmente todos los tejidos tienen la capacidad para formar callos *in vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos potencialmente embriogénicos. La respuesta embriogénica del callo depende de varios factores, entre los cuales tenemos: el genotipo, el explante, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento, las condiciones de incubación, entre otros (Gómez, 1998).

En los momentos iniciales de la formación del callo la población celular es predominantemente meristemática; a medida que crece el tejido, las células se diferencian adquiriendo características semejantes a las parenquimáticas, ricas en reservas y se pueden observar grupos de células embriogénicas típicas, las que tienen una relación

núcleo citoplasma elevada, núcleo particularmente voluminoso, pared espesa, citoplasma poco vacuolado rico en proteínas y abundantes reservas de almidón (García, 1998). Según Freire y *col.* (2003), en la mayoría de las especies vegetales es necesario mantener los explantes por períodos prolongados en el medio de formación de callos.

El embrión somático es producido por cualquier órgano o tejido de la planta y éste no es observado cuando las plántulas se forman por la vía organogénica, donde el crecimiento de brotes y raíces se excluye entre sí (Gómez, 1998).

Morfológicamente, un embrión somático es muy similar a uno cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde proembrión hasta la fase cotiledonal o embrión maduro y el tamaño y la forma de los embriones somáticos es muy variable en dependencia de la especie que se trabaje (Parrot, 2002).

La asincronía es un fenómeno característico de la embriogénesis somática que se manifiesta cuando las poblaciones de embriones somáticos muestran típicamente un amplio rango de tamaño y estadios de desarrollo. Los embriones somáticos pueden ser comparados con los embriones cigóticos, ambos poseen ápices radiculares, caulinares y órganos cotiledonales; por ello pueden crecer plantas completas a partir de éstas estructuras (Liu y *col.*, 1998).

Según Sharp (1980), existen dos patrones de desarrollo de la embriogénesis somática:

- **Embriogénesis somática directa**: Los embriones somáticos se forman a partir del tejido del explante sin pasar por la fase de callogénesis. Esto ocurre a través de células proembriogénicas determinadas, donde las células están listas para iniciar el desarrollo embriogénico y necesitan solamente ser activadas.

- **Embriogénesis somática indirecta**: Tiene lugar la formación y proliferación de un callo antes del desarrollo de los embriones somáticos, ésta ocurre en células diferenciadas no embriogénicas o células inducidas embriogénicas determinadas.

La gran mayoría de los sistemas que forman embriones somáticos lo hacen mediante la llamada ruta indirecta, pudiendo ocurrir por medio de la llamada ruta directa, pero con menor frecuencia (Villalobos y Thorpe, 1993).

Entre las ventajas que ofrece la producción de embriones somáticos se encuentran el desarrollo de células somáticas que presentan la potencialidad de duplicar genotipos

específicos y producir una gran cantidad de embriones con las características de bipolaridad para producir plantas durante los procesos de germinación y conversión.

La propagación de plantas a través de la embriogénesis somática, representa el método más eficiente de multiplicación clonal que existe hasta la fecha y se emplea en especies que se reproducen por semillas y mediante propagación vegetativa (Gómez y col., 2000).

2.4. La embriogénesis somática en la multiplicación de las especies vegetales.

Los problemas que afrontan los trabajos de propagación vía tradicional, son básicamente la cantidad de material disponible y los altos costos, ya que se requiere de la manipulación de los mismos en condiciones naturales y de campo. Una alternativa a éstas dificultades son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (Salinas y col., 1991).

Un hecho muy particular del empleo de las técnicas *in vitro*, es la formación de embriones somáticos (Salinas y col., 1991a) y es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento.

El creciente interés por la obtención de embriones somáticos en diversos cultivos, se debe a que el proceso de embriogénesis somática facilita la propagación clonal a gran escala y el empleo de la semilla artificial (Alvarado, 1998).

El sistema de embriogénesis somática cuenta con la multiplicación de las plantas completas a partir de células individuales o un grupo de ellas y existe la necesidad de continuar con los avances para la multiplicación de plantas mediante el cultivo de células y tejidos, especialmente a través de un amplio rango de especies y genotipos (Cruz y col., 2003).

Uno de los aportes de las técnicas de cultivo *in vitro*, ha sido la de explotar en numerosas especies la potencialidad de formar embriones somáticos (Margara, 1988). Las técnicas biotecnológicas se aplican en una gran cantidad de cultivos y la proyección futura de los laboratorios puede concretarse a través de la producción vegetal (González y col., 2000).

Las especies cultivadas que se producen por medios asexuales, tienen una amplia posibilidad en la multiplicación a gran escala con el empleo de la embriogénesis somática

y el establecimiento de nuevas variedades, específicamente en lo relacionado con la aplicación de la propagación vegetal (García y col., 1998).

Se ha obtenido la embriogénesis somática en más de ciento cincuenta especies de plantas. Sin embargo, todavía quedan varias especies para las cuales nunca se ha realizado (Parrot, 2002). Aun para aquellas especies en las cuales es posible, los embriones somáticos generalmente, sólo se pueden obtener de ciertos tejidos en determinadas etapas de desarrollo, o de ciertos genotipos dentro de la especie. En la actualidad la embriogénesis somática es un hecho bien establecido en diversas especies de importancia agronómica (Jiménez, 1998).

En este sentido, cabe destacar los efectos beneficiosos que posibilita el uso de la embriogénesis somática como un método de propagación de plantas que puede facilitar la automatización del proceso y permitiría la siembra directa de los cultivos a diferencia de la propagación vegetativa convencional; es por ello que, varios autores señalan que la formación de embriones somáticos a partir de tejidos adultos (hojas) de plantas, ha hecho de la embriogénesis somática un sistema modelo para muchos cultivos y un elemento de interés económico (González, 2003).

2.4.1. Embriogénesis somática en el cultivo del boniato.

El boniato se encuentra entre las especies más extendidas y de mayor consumo en el mundo (López y col., 1995), a pesar de todo esto, los trabajos de propagación con la aplicación de los métodos biotecnológicos en este cultivo se encuentran muy restringidos y entre ellos la aplicación de la embriogénesis somática, por lo que se hace necesario la búsqueda de nuevos métodos con el empleo de diferentes técnicas para dar solución a problemas que aún existen con la disponibilidad de material de plantación de alta calidad y el establecimiento de los bancos de "semilla" que puedan satisfacer las demandas en las áreas productivas, dando solución de esta manera a uno de los problemas más importantes que se plantea en la especie, facilitando además la conservación del material vegetal, el intercambio de germoplasma y la aplicación de las técnicas de ingeniería genética.

Según Jarret y Grawel (1991), la capacidad de estimular la embriogénesis somática en el cultivo del boniato abre nuevas áreas en la investigación. Por ejemplo, los embriones

somáticos pueden encapsularse y sembrarse como semillas, asegurando además la conservación e intercambio de germoplasma.

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* han surgido en el campo de la embriogénesis somática perspectivas de aplicación con grandes posibilidades de éxito en éste cultivo, fundamentalmente, por las ventajas que ofrece para el aprovechamiento de la propagación a gran escala de las características favorables existentes en los clones de interés; es por ello que, los programas de multiplicación comprenden ensayos de variedades bajo condiciones representativas de las zonas ecológicas (Díaz, 1997).

La formación de callos en *I. batatas* ha sido desarrollada a partir de varios explantes: anteras (Tsai y Tseng, 1979); ápices de renuevo, tallos, raíces, hojas y peciolo (Liu y Cantliffe, 1984; Salinas y col., 1991) y el medio de cultivo más usado fue el propuesto por Murashige y Skoog (1962).

Según Salinas y col. (1990), una de las posibilidades de las técnicas del cultivo *in vitro* es la obtención de embriones somáticos, los cuales evitan el problema de inducción de la floración y de cruzamientos, sobre todo en especies de reproducción asexual, como es el caso del boniato.

En otros países se han presentado protocolos para estimular la embriogénesis somática en el cultivo del boniato y éstas técnicas son muy útiles porque facilitan la propagación rápida del material de siembra. Se han utilizado suspensiones celulares para examinar la síntesis enzimática y la producción de metabolitos secundarios. Aunque éstos estudios no están directamente relacionados con la propagación del cultivo, han ayudado a definir las condiciones para el cultivo continuo de las células de boniato, pero en estos trabajos de embriogénesis somática se han obtenido baja eficiencia en la conversión en plántulas y existen problemas con la aclimatización de las vitroplantas, todo lo cual hace que los protocolos presentados aun no sean capaces de dar respuesta a los problemas que existen en la multiplicación de la especie; de ahí que, en el laboratorio se llevó a cabo el estudio de la embriogénesis somática en el boniato, con la finalidad de establecer una metodología de trabajo que permita la obtención de plantas genéticamente estables, dando respuesta a la dificultad aun existente de disponibilidad de material de siembra para establecer los bancos de "semilla" en este cultivo, logrando resultados en la conversión en plántulas y la aclimatización de las mismas que superaron los protocolos

propuestos en el boniato por Jarret (1989); Cantliffe (1993) y López y *col.* (2002). En la metodología propuesta en el presente trabajo se emplearon limbos foliares obtenidos de brotes de raíces tuberosas colocadas en frascos con agua en condiciones semicontroladas a los cuales se les realizaron diferentes estudios para posibilitar la formación de embriones somáticos y la posterior conversión en plántulas en las que se llevó a cabo la aclimatización y plantación en condiciones de campo, todo lo cual trae consigo que constituya el primer reporte de embriogénesis somática en el cultivo del boniato en Cuba, donde se expone una metodología completa del proceso y la evaluación de la estabilidad genética de las plantas conjuntamente con los estudios histológicos, ya que los trabajos publicados anteriormente en Cuba y en el extranjero se encuentran dedicados fundamentalmente a la parte *in vitro* y con menores índices de conversión en plántulas que los obtenidos en este trabajo, pudiendo demostrar esta metodología su facilidad de repetición y las posibilidades de su aplicación en la multiplicación de la especie en clones de interés comercial.

2.4.2. Germinación y conversión en plántulas.

Con el empleo de la embriogénesis somática se hace necesario llevar a cabo el estudio detallado de las etapas de germinación y conversión en plántulas, ya que estas constituyen etapas críticas durante el proceso, siendo señalados diversos cultivos como recalcitrantes para lograr la germinación y conversión de los embriones somáticos en plántulas, entre los cuales podemos citar el boniato, ya que se han obtenido bajos índices en estas etapas, determinando la posterior eficiencia del proceso y en el presente trabajo se logró superar los porcentajes obtenidos por otros autores en este cultivo y el establecimiento de una metodología de trabajo que constituye una importante alternativa para la producción a gran escala del material vegetal deseado.

A lo largo de su desarrollo, la planta puede presentar una sucesión de características morfológicas y fisiológicas que son función de su edad y del estado de desarrollo. Cuando son colocados en cultivo *in vitro* embriones somáticos germinados, se pueden observar comportamientos diferentes en el crecimiento y el desarrollo del nuevo individuo según la especie y las condiciones de cultivo (Rodríguez y Mosqueda, 1996).

Se ha podido comprobar que en el embrión somático de muchas especies de plantas puede inducirse dormancia artificialmente y para romper la misma se emplean tratamientos con frío o aplicaciones de ácido giberélico, lo cual provoca una aceleración en la germinación y el crecimiento del embrión (Hidrobo, 2000). Mientras que, por otra parte Castillo (2000), planteó que en diversas especies en el embrión somático durante la maduración puede artificialmente inducirse dormancia y esto constituye un aspecto de gran importancia en la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos.

Según Desmond (2003), la germinación es muy importante en el proceso de embriogénesis somática y es diferente de la conversión, siendo necesario poder contar con un procedimiento adecuado para que se lleve a cabo exitosamente esta fase.

La conversión en plántulas a partir de los embriones somáticos se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación. Sin embargo, esa aplicación ha sido limitada en algunos cultivos donde los embriones somáticos se trasplantan a un medio de germinación y posteriormente al medio de conversión hasta formar plántulas, momento en que se consideran aptas para trasplantarlas a condiciones semicontroladas porque han alcanzado un desarrollo que posibilita la aclimatización de las mismas (Pilgrim, 2000).

Varios investigadores al subcultivar embriones somáticos directamente de las condiciones de formación de los mismos a la germinación han alcanzado pobres resultados, lo cual sugiere del empleo de tratamientos de maduración para mejorar la germinación de los mismos (Hidrobo, 2000), de ahí que resulte necesario continuar desarrollando estudios que permitan definir las mejores condiciones para la conversión y germinación de los embriones somáticos en plántulas y lograr una mayor eficiencia del proceso.

2.5. Estudios histológicos de la embriogénesis somática.

La regeneración de plantas en cultivo de tejidos es generalmente posible a través de dos formas diferentes (desde el punto de vista morfológico y anatómico), mediante la embriogénesis somática y la organogénesis de brotes y raíces (González, 2003).

La regeneración de plantas mediante los sistemas de cultivo *in vitro*, ha mostrado un mayor potencial mediante la embriogénesis somática y desde los primeros informes de éste proceso hasta la actualidad se han desarrollado numerosos trabajos para conocer

más a fondo este complejo proceso morfogénico, siendo de gran interés conocer el tejido o célula de la cual se originan los embriones somáticos (Cevallos, 2000).

Se plantea que después de sembrados los explantes, la mayoría de los mismos cambian morfológicamente, probablemente, por la acumulación de sustancias derivadas del metabolismo secundario y se ha demostrado que los embriones somáticos provienen de las células meristemáticas que son las precursoras del tejido embriogénico que da lugar a éstos.

Los tejidos procedentes de hojas han sido los más usados en la embriogénesis somática y es sobre éstos que se han realizado la gran mayoría de los estudios histocitológicos.

Según Sondahl y col. (1979), la continua división periclinal de las células originadas a partir de las células perivasculares provoca la ruptura de la epidermis apareciendo un callo exógeno y posteriormente comienza la formación de los embriones somáticos, los cuales siguen una secuencia única en su desarrollo, donde un tejido friable que emerge de un callo da lugar a estructuras globulares que se desarrollan asincrónicamente y a partir de ahí se originan los embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo.

Berthouly y Michaux-Ferriere (1996), destacaron que las células perivasculares que rodean los haces vasculares y algunas células del mesofilo próximas a la zona del corte del explante, son las primeras en dividirse y cuando el callo emerge del explante está compuesto por células parenquimatosas y grupos de células que podrían ser consideradas embriogénicas con alta relación núcleo citoplasma, citoplasma denso que contiene almidón y proteínas de reserva. Luego las células se separan y se dividen dando lugar a la desdiferenciación.

Por otra parte, Michaux-Ferriere y col. (1987), en un seguimiento histológico de la embriogénesis somática en cafeto (*Coffea canefora*), encontraron que el callo se deriva de las células perivasculares y que las células embriogénicas se forman en la periferia de ciertos lóbulos del callo y la transferencia a un segundo medio con diferente balance hormonal provocó que las células embriogénicas dieran origen a proembriones que evolucionaron a embriones somáticos perfectamente constituidos y absolutamente comparables, desde el punto de vista morfogénico, con los embriones cigóticos.

Para un mayor conocimiento y una mejor comprensión de los cambios estructurales que dan lugar a la embriogénesis somática en el cultivo *in vitro*, se ha hecho uso de las

técnicas histológicas que facilitan conocer los pasos que conducen al tejido a readquirir sus potencialidades embriogénicas y la selección de un apropiado procedimiento para la preservación de las estructuras embriogénicas (Ramírez y col., 2000). La descripción histológica del proceso de la embriogénesis somática conlleva al conocimiento de los pasos para la formación y desarrollo de los embriones somáticos.

2.6. Empleo de marcadores bioquímicos y moleculares en la caracterización de la estabilidad genética en plantas.

2.6.1. Marcadores bioquímicos.

Durante el desarrollo de las diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, es necesario realizar estudios de estabilidad y/o variabilidad genética del material propagado a fin de conocer el comportamiento del mismo, luego de haber sido sometido a este proceso, que a su vez está influenciado por diversos factores, entre los que se encuentran: genotipo, métodos y medios de cultivo, número de subcultivos y factores ambientales (González, 2003).

Según Ford-Llyod (2001), la identificación basada exclusivamente en marcadores morfológicos, aunque es la más tradicional y oficialmente aceptada, no es totalmente satisfactoria; lo cual ha motivado el desarrollo de métodos basados en la variación genética mediante las diversas técnicas. Dentro de los métodos utilizados para evaluar la estabilidad genética de las plantas regeneradas se encuentran los citogenéticos (Portieles y col., 2002), los isoenzimáticos (Warren y Christopher, 1999; Román y col., 2001) y los moleculares (Vargas y col., 2002), derivadas de la tecnología de ácidos nucleicos.

Los métodos electroforéticos, a diferencia de los morfoagronómicos brindan una información genética más directa, ya que por lo general son representativos de sistemas bastante simples (Nodal, 2001). De ahí que, la medición de la variabilidad de un cultivo, puede ser complementada por estudios más directos a través del empleo de la técnica de electroforesis de isoenzimas (Oliveira y col. 2002; Tapia, 2003).

Entre los marcadores bioquímicos los más utilizados son las isoenzimas y éstos constituyen los productos directos de los alelo, basta identificarlos para seleccionar la planta con el fenotipo deseado, que es producido por el alelo de interés (Vallejo y Estrada, 2002).

Con el uso de las isoenzimas se inició la era de los marcadores bioquímicos y moleculares en la genética y la electroforesis constituye una técnica de uso corriente en la genética bioquímica, que puede facilitar información acerca de la identidad y variabilidad almacenada en los bancos de genes (Orellana y Peña, 2003).

El empleo de las isoenzimas como marcadores es de gran utilidad en los últimos años, donde en numerosos trabajos se utilizan éstas técnicas, principalmente, para caracterizar variedades, progenies y clones.

Según Rodríguez *y col.* (2001), la actividad de las isoenzimas aparentemente se incrementa con la edad del material vegetal y se encuentran muy relacionadas con el desarrollo de los estados fisiológicos de la planta e influenciadas por el ambiente.

El descubrimiento de las isoenzimas favoreció el empleo de los marcadores genéticos, siendo más eficientes que los morfológicos, ya que permiten distinguir genotipos homocigóticos de los heterocigóticos; en otras palabras, permite igualar el fenotipo de un individuo con su respectivo genotipo. Las isoenzimas han sido frecuentemente empleadas a las plantas en los estudios de germoplasma (Bretting y Widrelechner, 1995; Nodal, 200; Tapia, 2003).

Las técnicas de electroforesis, pueden ser empleadas con éxito como una herramienta, para buscar diferencias en los patrones de expresión entre cultivares, variedades y plantas; lo cual indica que, los patrones son específicos para cada material genético, siendo ésta una vía que confirma que el método puede ser usado para evaluar las variaciones genéticas en las plantas (Rodríguez *y col.*, 2004).

Los estudios electroforéticos de diferentes sistemas isoenzimáticos constituyen una técnica válida y rápida para la detección de la variabilidad genética, por ser marcadores de expresión sujetos a la influencia ambiental y permiten distinguir los genotipos y establecer las relaciones filogenéticas entre ellos (González, 2002).

La mayoría de los autores están de acuerdo en considerar las isoenzimas con las siguientes características mínimas: son formas moleculares múltiples, se derivan de un mismo organismo y tienen al menos un sustrato en común. Sin embargo, las discrepancias son muchas, hay quienes consideran que debieran estar restringidas a formas moleculares enzimáticas derivadas de un mismo órgano o tejido, que tienen un

mismo origen genético y actividades catalíticas similares (Cornide y *col.*, 2002). En la actualidad las isoenzimas continúan utilizándose por muchos investigadores.

2.6.2. Marcadores moleculares.

La biotecnología vegetal, como herramienta de apoyo al mejoramiento genético de plantas, comprende una serie de técnicas tales como el cultivo de tejidos, ingeniería genética y uso de marcadores moleculares; estrategias que generalmente son interdependientes (Vallejo y Estrada, 2002; Oloriz y *col.*, 2002).

Con el desarrollo de los marcadores moleculares, que constituyen una herramienta moderna, se ha logrado potenciar la eficiencia de los programas de mejoramiento y abierto nuevas perspectivas en los estudios de la genética vegetal (León, 1998; Coto y Cornide, 2002).

Las técnicas de los marcadores pueden ser empleadas para hacer más eficiente la obtención de nuevas variedades; la utilidad de éstas ha sido demostrada; no hay dudas que serán usados en los arbitrajes de propiedad intelectual en un futuro (Cornide, 2002).

Las herramientas moleculares se están usando cada vez más en la genética para descifrar la base de caracteres agronómicos complejos y constituyen una alternativa potencial para la identificación de variedades y en las pruebas de semillas, especialmente con respecto a la determinación de la calidad y la sanidad de las mismas (Moré, 2000; Lara, 2005).

Rodríguez y Arencibia (2002), plantearon que los marcadores moleculares se clasifican en dos grandes grupos: marcadores detectados por hibridación, entre los que se encuentran el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), los minisatélites, entre otros y los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre los que se encuentran el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), microsátélites, entre otros.

Según Coto y *col.* (2005), los marcadores polimórficos del ácido desoxirribonucleico (ADN) o marcadores moleculares, son herramientas valiosas para los estudios genéticos de las plantas, entre los que se encuentran el empleo de los RAPD, que ha permitido realizar una caracterización genética más refinada de las colecciones de germoplasma.

La identificación de genotipos mediante RAPD ha sido posible en varias especies debido a que cada selección o cultivar produce un patrón reproducible de bandas de ADN amplificado y aun cuando las técnicas moleculares han sido útiles en la caracterización e identificación del germoplasma, ésta tecnología debe usarse como complemento de las evaluaciones morfológicas y agronómicas del material en estudio (Vera y col., 1999).

Los marcadores RAPD, obtenidos mediante una PCR, son cebadores cortos de secuencia arbitraria y tienen un gran potencial en la identificación varietal de especies cultivadas dado su elevado polimorfismo, donde el poder de ésta tecnología se pone de manifiesto cuando se utiliza para identificar variaciones en la secuencia de ADN entre individuos y esto la hace una poderosa técnica para el estudio de la diversidad en la caracterización de una población y la localización de genes. Según Díaz-Sala y col. (1995), requiere de pequeñas cantidades de ADN genómico y el proceso analítico es rápido y relativamente simple.

Es necesario destacar el amplio uso de los RAPD, los cuales constituyen marcadores moleculares que reducen sustancialmente el tiempo, las labores y el costo requerido para el mapeo molecular e involucran el uso del ADN simple mediante la amplificación de secuencias aleatorias y en la actualidad se han usado en varios cultivos con el propósito de estudiar las variaciones genéticas en poblaciones y especies, para la construcción de los mapas genéticos, para la identificación de cultivares, entre otras (Shu y col., 2003). En trabajos realizados por González (2003), señalaron que al emplear las técnicas de cultivo *in vitro*, es necesario realizar estudios de estabilidad y/o variabilidad genética del material propagado, a fin de conocer el comportamiento del mismo, luego de haber sido sometido a este proceso, que a su vez está influenciado por diversos factores.

Cornide (2001); Cornide y col. (2002), expresaron que entre las aplicaciones de los marcadores moleculares de uso más extendido, está la identificación de genotipos. En estos casos los descriptores moleculares, previamente determinados sobre la base de un estudio de caracterización de una colección amplia, constituyen un valioso método auxiliar al permitir un dictamen rápido y preciso de los resultados alcanzados. Diversos autores han planteado la utilidad del empleo de ésta técnica como marcador genético para monitorear la variabilidad originada en el cultivo *in vitro* (Castillo y col., 2004).

Los marcadores moleculares proporcionan una medida más exacta de la estabilidad genética que los marcadores bioquímicos, debido a que no son influidos por los factores ambientales y tienen el potencial de revelar niveles elevados de variación de todo el genoma (Ramírez, 2005). Las ventajas del uso de los marcadores moleculares son evidentes, ya que los resultados obtenidos permiten realizar una explotación más eficiente de progenitores promisorios (Coto y col., 2005). Siendo necesario destacar que, según González (2003), se han publicado pocos trabajos relacionados con esta temática en los últimos años, lo cual constituye un aspecto a tener presente en los trabajos de micropropagación; ya que contribuyen a garantizar una mayor seguridad en la multiplicación de las especies.

El conocimiento acerca de la diversidad genética entre los genotipos puede ser usado con muchos propósitos en el estudio de las plantas; de ahí que las técnicas de marcadores moleculares de ADN hayan sido desarrolladas y pueden ser empleadas para la identificación, caracterización y evaluación de la diversidad genética en las plantas (Ramírez y col., 2002).

El tejido foliar es el más ampliamente utilizado tanto por su disponibilidad como por la calidad del ADN que proporciona (Doyle y Doyle, 2001), los mejores resultados se obtienen en los tejidos jóvenes porque; además, de triturarse más fácilmente, presentan una mayor densidad de células y contienen menor cantidad de polisacáridos y metabolitos secundarios.

Los marcadores RAPD han sido empleados en la identificación de variedades, caracterización de clones y la construcción de mapas genéticos; además, han sido usados para los estudios de estabilidad genética de las plantas derivadas de la embriogénesis somática y regeneración de plantas (Martín y Pérez, 1994).

2.7. Aspectos de importancia en la aclimatización de las vitroplantas.

Es conocido la influencia que ejerce el clima sobre el crecimiento y la producción de los cultivos, que en casi la totalidad de ellos determina su distribución en las distintas regiones del planeta (Soto y Morales, 1996).

Según González (2003), la micropropagación constituye uno de los principales métodos biotecnológicos para la multiplicación acelerada de genotipos promisorios en diferentes

especies vegetales. Sin embargo, lograr un adecuado crecimiento y desarrollo en condiciones normales, de plantas obtenidas por esta vía, es una de las dificultades que más se presentan para el desarrollo exitoso del proceso. La transición del cultivo aséptico a condiciones no estériles, conocido como fase de aclimatización (Agramonte y col., 1998), constituye la mayor limitante para el desarrollo de plantas que se obtengan con el empleo de los métodos *in vitro*. Lo anteriormente expuesto se debe a que las plantas se desarrollan en condiciones especiales de permanencia en el laboratorio, alta humedad relativa, baja intensidad lumínica, acumulación de altas concentraciones de etileno, entre otras, que contribuyen a que las mismas sean susceptibles al ser trasladadas al lugar donde deben continuar su ciclo de vida (González, 2003).

Mientras que, el fenotipo de las plantas que crecen *in vitro* ha sido ampliamente descrito y está caracterizado por presentar, respecto a aquellas desarrolladas *ex vitro*, tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixótrofo; lo cual trae consigo que la etapa de aclimatización requiera de una especial atención para lograr la adaptación (Agramonte y col., 1998).

Por todo lo anterior, se puede plantear que las vitroplantas obtenidas *in vitro* requieren de una fase de aclimatización antes de ser llevadas a condiciones de campo, ya que el cambio a distintas condiciones trae como consecuencia que éstas sean muy susceptibles a diferentes estrés, debido a que no han desarrollado o adaptado sus órganos a las nuevas condiciones, por lo que necesitan responder con nuevas características morfológicas y fisiológicas (Preece, 1991).

Según Vega y col. (2000), la fase final de aclimatización de las vitroplantas es trascendental para la propagación, pues del resultado de ésta dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso.

Agramonte y col. (1998), plantearon que la aclimatización de las vitroplantas en condiciones ambientales, constituye una etapa muy crítica en la propagación masiva mediante el cultivo de tejidos vegetales, ya que se exponen a un estrés cuando son colocadas en las condiciones del ambiente natural.

Pocos son los trabajos que recoge la literatura con respecto a la aclimatización de las vitroplantas a campo (Ortiz y *col.*, 1998). En los últimos años, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han sobrepasado la fase de investigación, dando como resultado el establecimiento de laboratorios que producen masivamente muchas especies a escala comercial (Granada, 1990).

De manera general, las vitroplantas son sensibles a los cambios que puedan ocurrir en su medio, por lo que no es posible trasladarlas del laboratorio al suelo de forma directa y se requiere de un tiempo de adaptación en condiciones que les permitan alcanzar un crecimiento y vigor para ser plantadas definitivamente en el suelo (Terán y *col.*, 1996) y el esfuerzo invertido en el cultivo de tejidos se perdería, sí las plantas que se regeneran mueren cuando intenten desarrollarse en un ambiente que, en un comienzo, les resulta desfavorable (Segovia y Laing, 1993).

3. Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aspectos generales.

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma (CEBVEG), Bayamo y el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, La Habana.

En la figura 1 se expone el esquema general de trabajo desarrollado en esta investigación.

3.1.1. Selección de los clones.

Para la obtención del material de partida se recolectaron raíces tuberosas correspondientes a los clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1, Yabú-8 y Jewel, suministradas por el Instituto Nacional de Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Villa Clara y Camagüey. Su selección obedeció al hecho de ser clones comerciales y precomerciales de elevada producción y buenas características morfoagronómicas (Anexo 1).

3.1.1.2. Manipulación del material vegetal.

Las raíces tuberosas, de los cinco clones en estudio, se seleccionaron de plantas de 100 días de establecidas en el campo, con una masa promedio de 250 g; las mismas fueron trasladadas al laboratorio y lavadas con agua para eliminar los restos de suelo y otras suciedades, sumergiendo un tercio de la raíz tuberosa en frascos con agua, manteniéndose a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 75-80% y radiación fotosintética activa (PAR) de $72-90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ de intensidad radiométrica, equivalentes a 4000-5000 lx de intensidad fotométrica (McGree, 1972).

A los 25 días de emitidos los brotes, que poseían una longitud entre 11 y 14 cm con seis hojas como promedio, se procedió al corte para la disección de los explantes: limbos foliares, peciolos y entrenudos.

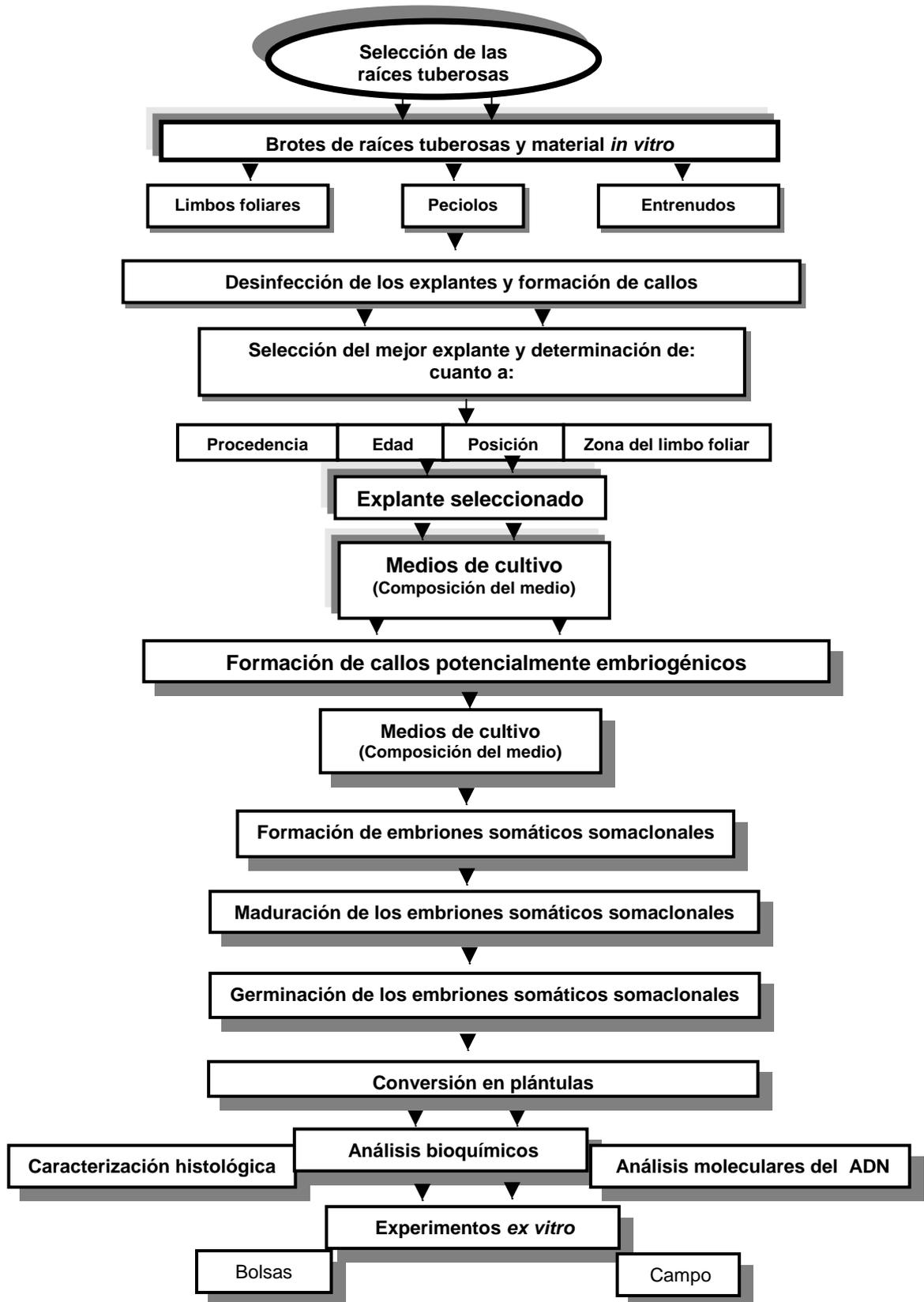


Figura 1: Etapas de trabajo desarrolladas durante la investigación.

Algunas características de las raíces tuberosas y los brotes se muestran en el anexo 2.

3.1.2. Medios de cultivo y condiciones de incubación.

Se emplearon las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962), como medio basal (Anexo 3). En todos los casos el medio de cultivo fue suplementado con Mioinositol (100 mg.L^{-1}), tiamina ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), sacarosa (3,0%) y solidificado con gelrite (0,2%). En los experimentos para la formación de callos y la germinación de los embriones somáticos, se añadieron además las vitaminas MS ($10,0 \text{ ml.L}^{-1}$). Los reguladores del crecimiento fueron incorporados al medio de cultivo en dependencia del objetivo planteado en cada experimento (Anexo 4). Las pesadas se realizaron en una balanza analítica (Sartorius) de 0,1 mg de precisión.

El pH del medio de cultivo fue ajustado a $5,8 \pm 0,01$ con un pH-metro (MV-88) y se distribuyó añadiendo 20 ml en frascos de 250 ml y 10,0 ml en tubos de ensayo de 10,0 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro, esterilizados en la autoclave a 121°C ($1,2 \text{ Kg/cm}^2$ de presión) durante 20 minutos.

En la condición de incubación en oscuridad la temperatura promedio fue de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y en la condición de iluminación el fotoperíodo fue de 16 horas luz a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y la radiación fotosintética activa (PAR) de $24\text{-}36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ (3 000-4 000 lx). El valor de la humedad relativa para ambos casos fue de 80-85%.

3.2. Experimento I: Desinfección del material vegetal.

Para la desinfección del material vegetal se empleó el hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0% v/v), seleccionadas sobre la base de experimentos previos realizados, con un tiempo fijo de inmersión de 15 minutos.

Los explantes usados fueron porciones de limbos foliares, peciolos y entrenudos de los clones evaluados; el tamaño de los explantes fue de 1 cm^2 para las porciones de limbo foliar y se procedió a aislar en toda su longitud la región central

(incluyendo la nervadura central), los peciolo y los entrenudos fueron de 1 cm de longitud y se colocaron a razón de cinco explantes por frasco; los explantes de limbos foliares fueron sembrados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo, lo cual se mantuvo en los experimentos siguientes; luego del tratamiento desinfectante, todos los explantes se incubaron en la condición de oscuridad en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) sin el empleo de reguladores del crecimiento.

A los 30 días de la siembra se determinó:

- Explantes desinfectados (libres de contaminaciones y sin daños aparentes, %).

Se empleó un tamaño de muestra de 50 explantes por tratamiento, con tres repeticiones para cada clon, el cual fue utilizado en todos los experimentos relacionados con el explante (3.3 y 3.4).

3.3. Experimento II: Determinación de la respuesta a la callogénesis en los diferentes explantes.

Para estudiar la respuesta a la callogénesis, se tomaron tres tipos de explantes: limbos foliares, peciolo y entrenudos.

Al medio de cultivo se le añadió ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ y 6-bencilaminopurina (6-BAP) a $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$, según Cantliffe (1993). Para el estudio del desarrollo del callo en cada tipo de explante, se empleó la escala propuesta por Santana (1982), la cual plantea:

Grado 0: No formación del callo.

Grado 1: Ligera formación del callo (débil proliferación en las zonas del borde del explante).

Grado 2: Formación del callo (proliferación celular por los bordes del explante, sin formar una masa).

Grado 3: Abundante formación del callo (masa voluminosa en todo el explante).

La incubación se llevó a cabo bajo la condición de oscuridad. A los 30 días de efectuada la siembra, se determinó el porcentaje de formación de callos de grado 3 para cada tipo de explante.

Se realizó además una evaluación cualitativa del callo en cuanto a:

- Color (amarillo, crema y blanco).
- Consistencia (compacto, friable y esponjoso).

3.4. Experimento III: Estudio del limbo foliar para la formación de callos.

En todos los experimentos se utilizó el medio de cultivo, la condición de incubación y las evaluaciones referidas en 3.3.

3.4.1. Procedencia.

Se emplearon como explantes para este experimento limbos foliares (1cm²) de dos procedencias: brotes a partir de raíces tuberosas y vitroplantas de 20 días, con una altura promedio de 5,7 cm, obtenidas de yemas axilares, siguiendo la metodología de Alguacil y col. (1996); las evaluaciones se realizaron a los 30 días posteriores a la siembra.

3.4.2. Edad fisiológica de la hoja.

Se emplearon segmentos de limbos (1cm²) de las cinco hojas más jóvenes enumeradas del ápice hacia la base, obtenidas de brotes de raíces tuberosas pertenecientes a los clones estudiados y a los 30 días se realizaron las evaluaciones.

3.4.3. Posición en el medio de cultivo.

Se utilizaron explantes de los limbos foliares 3^{ro} y 4^{to} de brotes procedentes de raíces tuberosas, para estudiar el efecto de la posición de éstos en la formación de callos en los diferentes clones estudiados al ser colocados con la superficie adaxial y abaxial en contacto con el medio de cultivo. Se evaluó además, la respuesta a la formación de callos en los explantes cuando se les produjeron o no cortaduras a la superficie, en número de seis como promedio, como ha sido propuesto por Salinas y col. (1991a) y a los 30 días se evaluó el experimento.

3.4.4. Zona del limbo foliar.

La región central del limbo foliar se dividió en tres zonas (basal, media y apical), de donde se tomaron los explantes (1cm^2), que fueron colocados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo.

A los 30 días se evaluó su efecto en la formación de callos.

3.5. Experimento IV: Selección del medio de cultivo para la formación de callos potencialmente embriogénicos.

3.5.1. Efecto del 2,4-D combinado con 6-BAP.

Explantos pertenecientes a la zona basal de los limbos foliares procedentes de los cinco clones en estudio, fueron colocados en frascos de 250 ml, conteniendo 20 ml de medio de cultivo. Se colocaron cinco explantes por frasco; las diferentes combinaciones de 2,4-D y 6-BAP aparecen en la tabla 1, éstas se basaron en los resultados de un estudio preliminar realizado en el laboratorio (Anexo 5), donde se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo para la formación de callos potencialmente embriogénicos, los que fueron descritos por Jarret (1989) y Cantliffe (1993).

Tabla 1. Combinaciones de 2,4-D y 6-BAP utilizadas para la formación de callos.

Medios	2,4-D (mg.L^{-1})	6-BAP (mg.L^{-1})
M ₁	0,25	0,25
M ₂	0,50	0,25
M ₄	1,0	0,25
M ₄	2,0	0,25
M ₅	2,5	0,25
M ₆	0,25	0,50
M ₇	0,50	0,50
M ₈	1,0	0,50
M ₉	2,0	0,50
M ₁₀	2,5	0,50
M ₁₁	0,25	1,0
M ₁₂	0,50	1,0
M ₁₃	1,0	1,0
M ₁₄	2,0	1,0
M ₁₅	2,5	1,0

A los 30 días se evaluó:

- Porcentaje de formación de callos de grado 3 según la escala propuesta por Santana (1982).

- Porcentaje de callos potencialmente embriogénicos.

Se realizó una evaluación cualitativa del callo en cuanto a:

- Color (amarillo, crema y blanco).
- Consistencia (compacto, friable y esponjoso).

Se realizaron muestreos de los callos a partir de los 20 hasta los 40 días y se evaluó el porcentaje de callos potencialmente embriogénicos para determinar el momento óptimo para efectuar el subcultivo de los mismos.

La incubación se realizó bajo la condición de oscuridad y el tamaño de muestra empleado fue de 50 explantes por tratamiento con tres repeticiones para cada clon.

3.6. Experimento V: Formación de embriones somáticos.

Para inducir la formación de embriones somáticos, se utilizaron callos de los cinco clones evaluados, provenientes del medio de cultivo M₂ compuesto por 2,4 (0,50 mg.L⁻¹) y 6-BAP (0,25 mg.L⁻¹), los cuales fueron colocados en el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) con diferentes concentraciones de 2,4-D (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de 2,4-D utilizadas para la formación de embriones somáticos.

Medios	2,4-D (mg.L ⁻¹)
MI ₁	0,05
MI ₂	0,1
MI ₃	0,2
MI ₄	0,25

Los callos fueron mantenidos en fotoperíodo de 16 horas luz y a los 30 días, con el empleo de un microscopio estereoscopio Carl Zeiss Jena (10X), se evaluó:

- Número de embriones somáticos por callo.
- Número de embriones somáticos por estadios de desarrollo (globular, corazón y torpedo).
- Color de los embriones somáticos (amarillo, crema y verde).

En callos del clon INIVIT B 93-1, se determinó el tiempo transcurrido en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular, corazón y torpedo), para ello se seleccionó una zona del callo en la que fueron marcados los

embriones somáticos en estadio globular y se observaron diariamente con el empleo del microscopio estereoscopio Carl Zeiss Jena (10X); para cada evaluación se tomaron tres callos.

3.7. Experimento VI: Caracterización histológica del proceso de embriogénesis somática.

En colaboración con el Departamento de Fisiología Vegetal del INCA y el Grupo de Organización Molecular de las Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España, se realizó el presente experimento en el clon INIVIT B 93-1, seleccionado sobre la base de los resultados obtenidos anteriormente.

Se realizaron muestreos del limbo foliar en el momento de la siembra y a los tres, seis, nueve, catorce y veintiún días después de efectuada la misma, así como se realizaron cortes en callos no embriogénicos y potencialmente embriogénicos a los 30 días, en callos con embriones somáticos a los 30 días de formados y a los embriones somáticos en los estadios de desarrollo globular, corazón, torpedo y cotiledonal. Se tomó una porción de 2 mm² para los explantes del limbo foliar y de 2 mm³ para los callos y los embriones somáticos, con tres repeticiones en cada muestreo. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4,0% en buffer fosfato a pH 7,1 durante veinticuatro horas a 4°C, posteriormente, se lavaron tres veces con solución de buffer fosfato (PBS) durante diez minutos y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol, pasadas de óxido de propileno/etanol a óxido de propileno puro para realizar la infiltración e inclusión en Epon (Risueño, 2000).

Los cortes semifinos de 1 µm de grosor, se obtuvieron con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo LKB Nova (Upsala Sweden). La tinción se realizó con azul de toluidina en agua al 0,01%. Las secciones fueron fotografiadas a 25X en un microscopio Olympus con cámara digital acoplada.

3.8. Experimento VII: Efecto del ABA en la maduración de los embriones somáticos.

Para evaluar el efecto del ácido abscísico (ABA) en la maduración de los embriones somáticos, fueron tomados embriones en estadio de torpedo, los cuales

se colocaron en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) suplementado con diferentes concentraciones de este regulador del crecimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de ABA utilizadas para la maduración de los embriones somáticos.

Medios	ABA (mg.L ⁻¹)
MM ₁	0
MM ₂	1,0
MM ₃	2,0
MM ₄	2,5

Se consideraron embriones somáticos maduros aquellos que mostraron un incremento del tamaño con la aparición de los cotiledones y cambio de su coloración de crema-amarillo a verde, según Litz y Jarret (1993). Los embriones somáticos se colocaron en fotoperíodo de 16 horas luz. A los 30 días se evaluó:

- Embriones somáticos maduros (%).
- Embriones somáticos necrosados (%).

Se emplearon 50 embriones somáticos por cada tratamiento, con tres repeticiones cada uno; tamaño de muestra que será utilizado en los próximos experimentos.

3.9. Experimento VIII: Germinación de los embriones somáticos.

Se utilizaron cinco tubos de ensayos con diez embriones somáticos cada uno en estadio cotiledonal, procedentes de los cinco clones evaluados, que contenían 10,0 ml del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), al cual se le añadieron las vitaminas MS (10,0 ml.L⁻¹) y se colocaron en fotoperíodo de 16 horas luz. Los diferentes medios de cultivo empleados aparecen en la tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo utilizado para la germinación de los embriones somáticos.

Medios	NO ₃ ⁻ (%)	Tidiazurón (mg.L ⁻¹)	6-BAP (mg.L ⁻¹)	Kinetina (mg.L ⁻¹)
MG ₁	50	--	--	--
MG ₂	100	--	--	--
MG ₃	100	0,1	--	--
MG ₄	100	0,25	--	--

Medios	NO ₃ ⁻ (%)	Tidiazurón (mg.L ⁻¹)	6-BAP (mg.L ⁻¹)	Kinetina (mg.L ⁻¹)
MG ₅	100	0,4	--	--
MG ₆	100	--	0,5	--
MG ₇	100	--	1,0	--
MG ₈	100	--	2,0	--
MG ₉	100	--	--	0,5
MG ₁₀	100	--	--	1,0
MG ₁₁	100	--	--	2,0

NO₃⁻ = KNO₃ y NH₄NO₃ (macroelementos del medio propuesto por Murashige y Skoog, 1962).

A los 45 días se evaluó el porcentaje de embriones somáticos germinados.

La germinación se consideró cuando existió elongación del hipocótilo y emisión de la radícula (Alemanno y col., 1997).

3.10. Experimento IX: Conversión en plántulas.

Se emplearon embriones somáticos germinados, pertenecientes a los clones INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1 y Jewel, sembrados cinco de éstos por tubo de ensayo, conteniendo 10,0 ml del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) y diferentes concentraciones de ácido giberélico (GA₃), como se muestra en la tabla 5, seleccionadas sobre la base de experimentos previos realizados.

Tabla 5. Concentraciones de GA₃ empleadas para la conversión de los embriones somáticos en plántulas.

Medios	Concentraciones de GA ₃ (mg.L ⁻¹)
MC ₁	5,0
MC ₂	10,0
MC ₃	15,0

Los mismos fueron colocados en fotoperíodo de 16 horas luz y se evaluó a los 10 días el porcentaje de embriones somáticos convertidos en plántulas.

La conversión en plántulas ocurrió cuando el ápice del brote se desarrolló y aparecieron las hojas verdaderas (Alemanno y col., 1997).

A los 20 días, en el momento de pasarlas a bolsas, se evaluaron las siguientes variables:

- Altura de las plántulas (cm).
- Número de hojas por plántula.

- Longitud de las raíces (cm).

3.11. Experimento X: Análisis bioquímicos y moleculares.

3.11.1. Análisis bioquímicos.

En colaboración con el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana (UH), fueron establecidos los patrones de bandas de los sistemas peroxidasas (Px), esterasas (Est) y anhidrasa carbónica (AC), para lo cual se tomaron al azar muestras de tejido foliar de los diferentes clones estudiados y en el clon INIVIT B 93-1 fueron evaluados callos no embriogénicos y potencialmente embriogénicos con 30 días de formados; callos con embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo y vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos. Para la extracción de la muestra, se pesaron 5 g de los materiales anteriormente mencionados y fueron macerados en un mortero frío con diez gotas de solución de sacarosa (20,0%). Los extractos se filtraron en tela de gasa doble, envasados en frascos de cristal y mantenidos a una temperatura de -15°C hasta su posterior utilización.

Las corridas electroforéticas se realizaron en gel de poliacrilamida (8,5%) según la técnica descrita por Davies (1964), adaptada a electroforesis en lámina vertical por Raymond (1964) y modificada en el Laboratorio de Isoenzimas de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana por Chapel y *col.* (1974). El frente de corrida se visualizó por la presencia de la banda de Kohlarusch (González y González, 1981) y el tiempo de duración fue de 4 horas. Se realizaron tres repeticiones para cada sistema isoenzimático.

Después de efectuada la separación, se llevaron a cabo las tinciones específicas para la caracterización de cada uno de los sistemas estudiados, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Sistemas isoenzimáticos estudiados y métodos de tinción utilizados.

Tipo de enzima	Sistema isoenzimático	Método de tinción
Oxidorreductasas	Peroxidasas (Px)	Iglesias y <i>col.</i> (1974)
Hidrolasas	Esterasas (Est)	González y González (1981)
Liasas	Anhidrasa Carbónica (AC)	Brewer y Singn (1979)

Los geles, después de lavados con agua destilada, se conservaron en una solución de ácido acético glacial al 10,0% hasta el momento de la confección de los zimogramas y los fenotipos isoenzimáticos de cada individuo se establecieron sobre la base del número, grosor y posición de las bandas (González y González, 1981).

A partir de los resultados obtenidos en los zimogramas de los sistemas isoenzimáticos analizados, se evaluaron las semejanzas entre los materiales con el empleo del paquete de programas MAT-GEN (Sigarroa y Cornide, 1995) por el índice de Jaccard, teniendo en cuenta los patrones de bandas característicos de cada clon, así como los callos y vitroplantas del clon INIVIT B 93-1, realizándose con la matriz de datos obtenida, un análisis de conglomerados (Cluster), empleando el programa STATISTICA (1998) versión 6.0 sobre sistema Windows. El umbral de corte se realizó a la distancia de 0,86.

3.11.2. Análisis moleculares del ADN.

En colaboración con el Laboratorio de Fisiopatología del Departamento de Fitopatología perteneciente al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria de la Habana (CENSA) y con la finalidad de evaluar la utilización de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD) para estudiar la estabilidad del material propagado, se tomaron al azar muestras de tejido foliar de brotes de raíces tuberosas y vitroplantas con 20 días pertenecientes al clon INIVIT B 93-1.

Se extrajo el ADN genómico total, según el método descrito por Dellaporta y *col.* (1983). La concentración de ADN de cada muestra fue determinada por espectrofotometría y se estimó la medición a la intensidad óptica de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Ultrasepec Plus Spectrophotometer Pharmacia LKB). La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 uL que contenía: 10 mM Tris- HCL a pH 8,3; 50 mM KCL, 2 mM MgCL₂, 0,001% de gelatina; 100 uM de cada dNTPs, 5 pmoles de los cebadores Kits OPA y OPF de la firma comercial Operon Technologies Alameda California, 5 ng de ADN genómico y 2 u de taq ADN polimerasa (Amplicen).

Se usaron diez cebadores arbitrarios que fueron los siguientes: OPF-15, OPF-14, OPA-13, OPF-13, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPF-03, OPA-12 y OPF-05; los cuales han sido usados con anterioridad para este tipo de estudio en diferentes cultivos por otros autores (Peteira y col., 1999; Peteira y col., 2001).

La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador marca Techme de la firma comercial Progene y la reacción de amplificación se realizó durante 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C y un ciclo de 10 minutos a 72°C (Peteira y col., 1999). Los productos de la amplificación (PCR), separados mediante electroforesis vertical en gel de agarosa al 1,5% en solución amortiguadora de Tris-HCL ácido bórico EDTA (TBE) 0,5X a 110 volts, fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg.mL^{-1}) y visualizados en un transiluminador ultravioleta.

Se evaluaron las bandas existentes en el donante y el regenerante de forma binaria por su presencia (1) y ausencia (0), visualizándose a través de fotografías. Los resultados se expresaron en porcentajes de monomorfismo.

3.12. Experimento XI: Aclimatización de las vitroplantas.

Vitroplantas de 20 días, pertenecientes a los clones INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1 y Jewel, obtenidas a partir de embriones somáticos, fueron sembradas en bolsas de nylon de 8 cm de diámetro y 21 cm de alto que poseían, aproximadamente, 1 kg de la mezcla de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado Típico (Hernández y col., 1999) y materia orgánica (cachaza), en proporción 3:1 (p/p), siendo empleado un control para cada clon con vitroplantas de 20 días, obtenidas mediante la multiplicación *in vitro* de yemas axilares, según la metodología de Alguacil y col. (1996).

Se evaluaron 100 vitroplantas a razón de una por bolsa, con tres repeticiones para cada clon y el control empleado. Las bolsas fueron situadas en forma aleatoria en un área sombreada (umbráculo), cubiertas con una campana de cristal durante los primeros siete días, para protegerlas de la acción del aire; la temperatura promedio fue de $30,3 \pm 2^\circ\text{C}$, la humedad relativa de 80-90% y la PAR de 90-108 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$, equivalente a una intensidad luminosa de 6 000-8 000 lx. Se

mantuvo la humedad del suelo añadiendo cada dos días 100 ml de agua por bolsa.

A los diez días se evaluó el porcentaje de supervivencia en las vitroplantas.

A los 20 días se evaluaron las variables siguientes:

- Altura de las plantas (cm).
- Número de hojas por planta.
- Longitud y ancho de las hojas (cm).
- Longitud de las raíces (cm).
- Longitud de los peciolo (cm).
- Vigor (según Huaman, 1991).

Se realizó una evaluación cualitativa de las plantas en cuanto a:

- Color de las hojas.
- Morfología de las plantas (normal o atípica).
- Forma de las hojas (lobulada, cordada y hastada), según Huaman (1991).
- Pubescencia (según Huaman, 1991).

A partir de este momento se procedió a la siembra del material en condiciones de campo.

3.13. Experimento XII: Evaluación en condiciones de campo.

Se tomaron esquejes de 20-25 cm de longitud del clon INIVIT B 93-1 y para ello se procedió al corte de la punta y prepunta del tallo, los cuales fueron plantados y atendidos en el campo, siguiendo las indicaciones del Instructivo Técnico del Boniato (CUBA. MINAGRI, 1998), con la finalidad de evaluar el crecimiento y la producción de raíces tuberosas, empleando un total de 500 esquejes y utilizando un control obtenido por la vía tradicional, siendo plantados dos surcos de 50 metros de longitud cada uno, en un suelo Ferralítico Rojo Lixiviado Típico (Hernández y col., 1999) ubicado en el área experimental del INCA, cuyas características fueron descritas por Borges (2004) y se expresan en el anexo 6, la toma de muestras se realizó a los 20 centímetros de profundidad (anexos 6,1; 6,2 y 6,3). En estas condiciones, la temperatura promedio fue de $30,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, la

humedad relativa de 75-85% y la PAR de 108-115 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$, equivalente a una intensidad luminosa de 10000- 15000 lx.

A los 60 días se evaluaron las variables siguientes:

- Longitud de las plantas (cm).
- Número de hojas por planta.
- Longitud y ancho de las hojas (cm).
- Longitud de los pecíolos (cm).
- Vigor (según Huaman, 1991).

La cosecha fue realizada a los 120 días después de plantado el material en el campo y para la calibración del tamaño de las raíces tuberosas se empleó la escala propuesta por Bertolí y col. (1994), en la cual se definieron como pequeñas: menores de 60 mm de diámetro ecuatorial; medianas: mayores de 60 mm y menores de 100 mm; grandes: mayores de 100 mm y aceptadas como comerciales todas las que superaron los 60 mm de diámetro; la cual se realizó a quince plantas tomadas al azar y se evaluó:

- Número de raíces tuberosas por planta.
- Raíces tuberosas no comerciales por planta.
- Masa promedio de la raíz tuberosa (kg).
- Masa de raíces tuberosas por planta (kg).
- Longitud de las raíces tuberosas (diámetro polar, cm).
- Ancho de las raíces tuberosas (diámetro ecuatorial, cm).
- Forma (redondo y ovoide), según Huaman (1991).

3.14. Análisis estadísticos.

Para el procesamiento estadístico de los datos, fue comprobada la normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov y se realizó la prueba de homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett.

Los datos de la desinfección del material vegetal, se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación doble con arreglo factorial por genotipo, donde los factores fueron las concentraciones del producto desinfectante y los tipos de explantes, para el procesamiento estadístico de los datos se realizó la

transformación arcoseno raíz cuadrada del porciento. A la variable formación de callos de grado 3 para cada tipo de explante (limbos foliares, peciolos y entrenudos), fue aplicada la prueba de Kruskal-Wallis (1952) y de encontrarse diferencias significativas, se procedió a realizar la comparación de las medias mediante la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) para $p \leq 0,05$.

Los datos obtenidos en la formación de callos de las variables procedencia de los limbos foliares, edad fisiológica de la hoja, posición del limbo foliar en el medio de cultivo, zona del limbo foliar y efecto del 2,4-D combinado con 6-BAP, expresados en porcentajes de callos formados pertenecientes al grado 3 de la escala propuesta por Santana (1982), fueron procesados mediante un análisis de comparación de proporciones, según el paquete estadístico diseñado para ese fin en el Departamento de Matemática Aplicada del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de la Habana.

Al número de embriones somáticos, estadios de desarrollo, número de embriones somáticos maduros, necrosados, germinación, conversión en plántulas a los diez días, diferentes variables analizadas en la aclimatización de las vitroplantas a los 20 y 60 días, y a la producción de raíces tuberosas y sus componentes, se les aplicó un análisis de varianza de clasificación simple.

A las variables altura de las plántulas, número de hojas por plántula, longitud y ancho de las hojas, y longitud de las raíces, evaluadas en el epígrafe referente a la conversión en plántulas a los 20 días, fue realizado un análisis de varianza con arreglo factorial, donde los factores fueron los clones evaluados y la concentración del regulador del crecimiento. Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA (1998) versión 6.0 sobre sistema Windows.

En todos los casos, de existir significación entre las medias fue aplicada la prueba de comparación de Rangos Múltiples de Duncan para $p \leq 0,05$.

4. Capítulo IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Experimento I: Desinfección del material vegetal.

Como se observa en la tabla 7, existió interacción en todos los clones entre el tipo de explante y la concentración de hipoclorito, resultando el tratamiento consistente en el limbo foliar con el hipoclorito de sodio al 1,0% significativamente superior al resto, lográndose entre un 92,0 y 96,0% de desinfección, con excepción del clon Yabú-8, en el que no se observó diferencia significativa entre los distintos explantes para esta concentración del agente desinfectante.

De acuerdo con la respuesta de los clones, la concentración de 0,5 mg.L⁻¹ parece resultar muy baja, obteniéndose los menores valores de desinfección; mientras que, la concentración de 2 mg.L⁻¹ pudo haber resultado excesiva causando necrosis en los explantes, lo cual indica que a partir de esta concentración comienza a dañarse el tejido por la acción del agente desinfectante sobre el mismo.

Tabla 7. Efecto de las concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de los explantes en los diferentes clones evaluados.

Clones	Explantes	Concentración de hipoclorito de sodio (%)							
		0,5		1,0		1,5		2,0	
		Datos Transf.	\bar{X}	Datos Transf.	\bar{X}	Datos Transf.	\bar{X}	Datos Transf.	\bar{X}
	Limbos F.	27,9 g	21,9	78,5 a	96,1	54,3 d	66,0	54,0 d	64,5
CEMSA	Peciolos	27,9 g	21,9	71,6 b	90,1	59,4 c	74,0	40,4 f	42,0
78-354	Entrenudos	21,9 h	13,9	68,2 b	86,0	43,8 e	48,0	38,0 f	38,0
	C V (%)	= 4,29	ES (±) =	1,81***					
	Limbos F.	27,9 g	21,9	78,5 a	96,0	56,8 c	70,0	50,8 d	60,0
INIVIT	Peciolos	27,9 g	21,9	71,6 b	90,1	56,8 c	70,0	45,0 e	50,0
B 90-1	Entrenudos	26,5 g	20,0	71,6 b	90,1	52,3 cd	62,6	39,2 f	40,0
	C V (%)	= 7,76	ES (±) =	2,77***					
	Limbos F.	30,6 g	26,0	78,5 a	95,3	62,0 c	78,0	47,3 de	54,0
INIVIT	Peciolos	27,9 g	22,0	71,6 b	90,1	59,5 c	72,0	43,8 e	48,0
B 93-1	Entrenudos	26,6 g	20,0	68,1 b	86,1	50,8 d	60,0	35,7 f	34,0
	C V (%)	= 4,48	ES (±) =	1,59***					
	Limbos F.	32,9 e	29,6	73,6 a	92,0	53,1 b	64,0	47,3 c	54,0
Yabú-8	Peciolos	27,9 f	22,0	71,6 a	90,0	48,5 c	56,0	42,7 d	46,0
	Entrenudos	18,3 g	9,9	71,6 a	90,0	48,5 c	56,0	38,0 d	38,0
	C V (%)	= 5,47	ES (±) =	1,59***					
	Limbos F.	38,0 e	38,0	78,5 a	96,0	48,5 cd	56,0	40,4 e	42,0
Jewel	Peciolos	38,0 e	38,0	71,6 b	90,1	50,8 c	60,0	45,0 d	50,0
	Entrenudos	27,9 f	21,9	71,6 b	90,1	48,5 cd	56,0	40,4 e	42,0
	C V (%)	= 4,65	ES (±) =	1,64***					

Valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

Numerosos son los autores que han empleado el hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes de diferentes especies vegetales, así Salas y col. (2003) obtuvieron un 92,0% en la desinfección de limbos foliares de morera (*Morus alba* L.) empleando el hipoclorito de sodio al 1,2% (v/v) con un tiempo fijo de inmersión de 15 minutos. Por otra parte, Andrade y col. (2002) lo utilizaron al 1,0% (v/v) con un tiempo de 20 minutos logrando hasta 83,0% en la desinfección de yemas de árboles frutales.

Hernández y col. (1998), en la desinfección de yemas apicales y axilares de malanga (*Xanthosoma* sp.); Silva y col. (2002) en la desinfección de semillas de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan.), emplearon el hipoclorito de sodio al 2,0% (v/v) con un tiempo fijo de inmersión de 10 minutos, alcanzando hasta el 88,0 y 90,0%, respectivamente, lo cual demuestra que este agente desinfectante resulta eficaz en diferentes especies y diversos tipos de explantes.

Marulanda (2000), en explantes de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*, Benth), alcanzó sólo 60,0% de explantes libres de contaminación con el empleo del hipoclorito de sodio al 1,0%.

En trabajos realizados por Finalé y col. (2002) y Alvarado y col. (2003), plantearon que la desinfección del material vegetal requiere de un análisis minucioso, teniendo en cuenta las condiciones en que se desarrolló la planta donante. La existencia de poblaciones bacterianas y fungosas en los explantes constituye un factor responsable de las mayores pérdidas por contaminación en el cultivo *in vitro* de plantas (Herrera y col., 2001; Leifert y Cassells, 2001; Carrazana y col., 2003) y continúa siendo uno de los principales problemas que afectan la aplicación de las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (González y Barrios, 2003).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, el hipoclorito de sodio al 1,0%, con un tiempo fijo de inmersión de 15 minutos, resultó el tratamiento adecuado para la desinfección de los explantes de limbo foliar, alcanzando hasta un 96,1% de explantes desinfectados en los clones de *Ipomoea batatas* estudiados, por lo que el mismo se empleará en los experimentos posteriores.

4.2. Experimento II: Determinación de la respuesta a la callogénesis en los diferentes explantes.

Los explantes de limbos foliares presentaron los mayores valores (entre 90,0 y 93,0%) para la formación de callos de grado 3 de la escala, difiriendo significativamente del resto en todos los clones. No se detectaron diferencias significativas entre los peciolo y entrenudos en los clones CEMSA 78-354 e INIVIT B 90-1, resultando este último explante superior significativamente en el INIVIT B 93-1 y Jewel (47,0 y 46,0%, respectivamente); mientras que, en el clon Yabú-8 el explante de peciolo resultó significativamente superior al entrenudo (Tabla 8).

Tabla 8. Respuesta del tipo de explante en la formación de callos de grado 3 en los clones de boniato estudiados.

Tipo de explante		Formación de callos de grado 3 de la escala de Santana (1982)				
		Clones evaluados				
		CEMSA 78-354	INIVIT B 90-1	INIVIT B 93-1	Yabú-8	Jewel
Limbos foliares	P K-W	1575,0 a	1563,0 a	1566,0 a	1554,0 a	1575,0 a
	CF (%)	93,0	91,0	92,0	90,0	93,0
Peciolo	P K-W	575,0 b	592,5 b	489,0 c	701,0 b	525,0 c
	CF (%)	34,0	35,0	29,0	41,0	31,0
Entrenudos	P K-W	700,0 b	694,5 b	795,0 b	595,0 c	750,0 b
	CF (%)	41,0	41,0	47,0	35,0	46,0
Estadístico de K-W	(H)	56,60 ***	53,90 ***	59,39 ***	54,60 ***	62,82 ***

Medias con letras iguales no difieren entre sí según la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p \leq 0,05$). P K-W: Prueba de Kruskal-Wallis. CF (%): Callos Formados (valores originales).

Según Suksa-Ard y col. (1999), la formación del callo y la embriogénesis somática depende considerablemente del órgano usado como explante. Diversos autores han destacado la importancia del tipo de explante para el éxito del proceso de embriogénesis somática en especies vegetales, entre los que podemos citar a Castillo (2000) y Usatorres y col. (2002).

De acuerdo con González (1993), las diferencias en la respuesta de los explantes pueden deberse a variaciones en el contenido endógeno de hormonas y a las características anatómicas de los mismos, ya que la estructura laminar del limbo foliar favorece el contacto con el medio de cultivo y puede ser un factor determinante en la respuesta. Jiménez y col. (2005), consideraron que altos niveles endógenos de auxinas en los explantes son necesarios para la proliferación celular y favorecer los procesos embriogénicos, siendo responsables de la ocurrencia de la embriogénesis somática, estando directamente correlacionado el contenido de hormonas endógenas con la capacidad embriogénica del explante.

Según González y col. (2002); Rodríguez y col. (2004), el estado de desarrollo de la planta madre, el tipo y la edad fisiológica del explante, son de gran importancia en el éxito del cultivo *in vitro*; en la mayoría de las investigaciones realizadas en la embriogénesis somática se han obtenido los mejores resultados con el empleo del limbo foliar y en la presente investigación los callos formados a partir de este tipo de explante fueron de color crema-amarillo, nodulares y consistencia friable.

En el presente trabajo, en todos los casos, el crecimiento del callo comenzó en los bordes de los explantes (callo de cicatrización) y las características de los callos obtenidos a partir de peciolo fueron menos favorables, formándose callos de color amarillo, nodulares y compactos.

Liu y Cantliffe (1984) y Salinas y col. (1991), utilizaron limbos foliares para la formación de callos en boniato y señalaron que el limbo foliar fue el tipo de explante que proporcionó los mejores resultados, con un 82,3 y 86,4%, respectivamente, encontrándose los resultados mostrados por encima de éstos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el limbo foliar será el explante empleado en los siguientes experimentos.

4.3. Experimento III: Estudio del limbo foliar para la formación de callos.

4.3.1. Procedencia.

Como se observa en la figura 2, en los clones CEMSA 78-354 e INIVIT B 90-1, los explantes procedentes de brotes de raíces tuberosas resultaron significativamente superiores en cuanto a la formación de callos de grado 3 (92,0 y 96,0%,

respectivamente) al ser comparados con los de vitroplantas (60,0 y 72,0%, respectivamente), no así en el resto de los clones (INIVIT B 93-1, Yabú-8 y Jewel), en los que no existieron diferencias significativas entre ambos materiales.

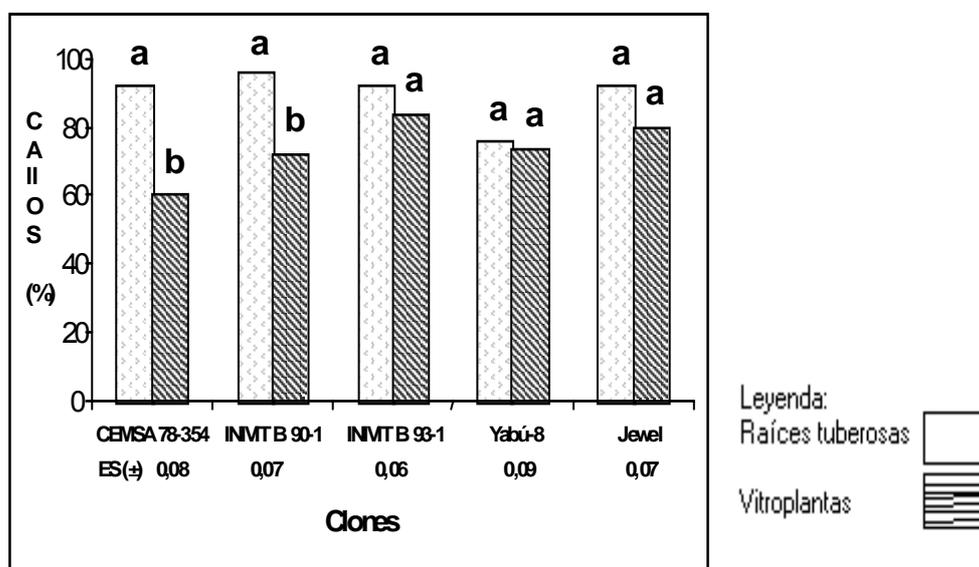


Figura 2. Efecto del explante sobre la formación de callos de grado 3.
(Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan, $p \leq 0,05$)

Los callos formados a partir de limbos foliares de raíces tuberosas fueron de color crema-amarillo, nodulares y consistencia friable, resultando adecuados en cuanto a las características morfológicas para el desarrollo de estructuras embriogénicas.

Cantliffe (1993), a partir de limbos foliares de vitroplantas de boniato en otros clones de interés comercial, logró callos de color crema, nodulares y consistencia friable, los cuales fueron de tamaño pequeño, siendo superados por los alcanzados en el presente trabajo y esto denota la obtención de callos con diferentes procedencias del limbo foliar.

Según González (2003), un factor de gran importancia en el cultivo *in vitro* es el genotipo y unido a esto, las características del explante en función de la fuente de donde proceda el mismo, ya que la respuesta puede ser diferente para cada una de las especies y para los diferentes clones dentro de la especie; sin embargo, como se observa en la figura 2, la tendencia general para la formación de callos de grado 3 estuvo a favor de los

explantes procedentes de raíces tuberosas, aunque las diferencias sólo resultaron significativas en los clones CEMSA 78-354 e INIVIT B 90-1.

La procedencia de los explantes es un aspecto determinante en la embriogénesis somática, ya que el proceso se encuentra influido por el contenido de hormonas endógenas y las características anatómicas del órgano a partir del cual se seleccionan los explantes para la formación de los callos (Dodds *y col.*, 1992).

La respuesta encontrada probablemente se debe a que las vitroplantas se desarrollan en condiciones especiales de permanencia en el laboratorio, que contribuyen a que las mismas presenten en los limbos foliares cambios anatómicos y fisiológicos (González, 2003), manifestados por la presencia de cutículas poco desarrolladas, escasa funcionalidad estomatal, estructura dorsiventral del limbo más delgada, entre otras. Estos cambios estructurales y funcionales repercuten en la formación de los callos, lo cual hace que presenten un menor crecimiento, color crema, nodulares y consistencia entre compacta y friable, características morfológicas menos favorables a la formación de callos potencialmente embriogénicos, al ser comparado con los explantes de brotes de raíces tuberosas.

Según Dodds *y col.* (1992), la naturaleza de la planta donadora es un aspecto determinante en la embriogénesis somática, ya que se encuentra influenciado por las características anatómicas del órgano a partir del cual se seleccionan los explantes para la formación de callos.

Por todo lo antes expuesto, el conocimiento de la morfología de las especies usadas en el cultivo *in vitro*, es de gran importancia para identificar los explantes potencialmente embriogénicos (Litz y Jarret, 1993).

De acuerdo con los resultados obtenidos, en lo adelante, se empleará el limbo foliar procedente de brotes de raíces tuberosas, teniendo en cuenta lo que ello representa en eficiencia en relación con el empleo de explantes procedentes de vitroplantas.

4.3.2. Edad fisiológica de la hoja.

Según la edad de la hoja empleada, se observó la presencia de tres tipos de callos, con las características morfológicas siguientes: cuando se utilizaron segmentos de limbos foliares como explantes, procedentes de la 1^{ra} y 2^{da} hojas, se obtuvieron callos de color

amarillo claro, apariencia mucilaginoso y consistencia esponjosa y en los explantes procedentes de hojas de mayor madurez (5^{ta}), se obtuvieron callos de color amarillo, en ocasiones pardos, de consistencia compacta y poco friables, de apariencia nodular. En cambio, en los explantes procedentes de las hojas 3^{ra} y 4^{ta}, los callos fueron de color crema-amarillo, nodulares y consistencia friable, características favorables a la formación de embriones somáticos.

No se detectaron diferencias significativas entre el porcentaje de callos formados en los explantes obtenidos de los limbos foliares 3^{ro} y 4^{to} en los diferentes clones evaluados. El clon Yabú-8 mostró los menores valores de porcentaje de callos formados, con un valor máximo de 78,0%; mientras que, en el resto de los clones los valores estuvieron entre 88,0 y 96,0% de formación de callos de grado 3

(Figura 3).

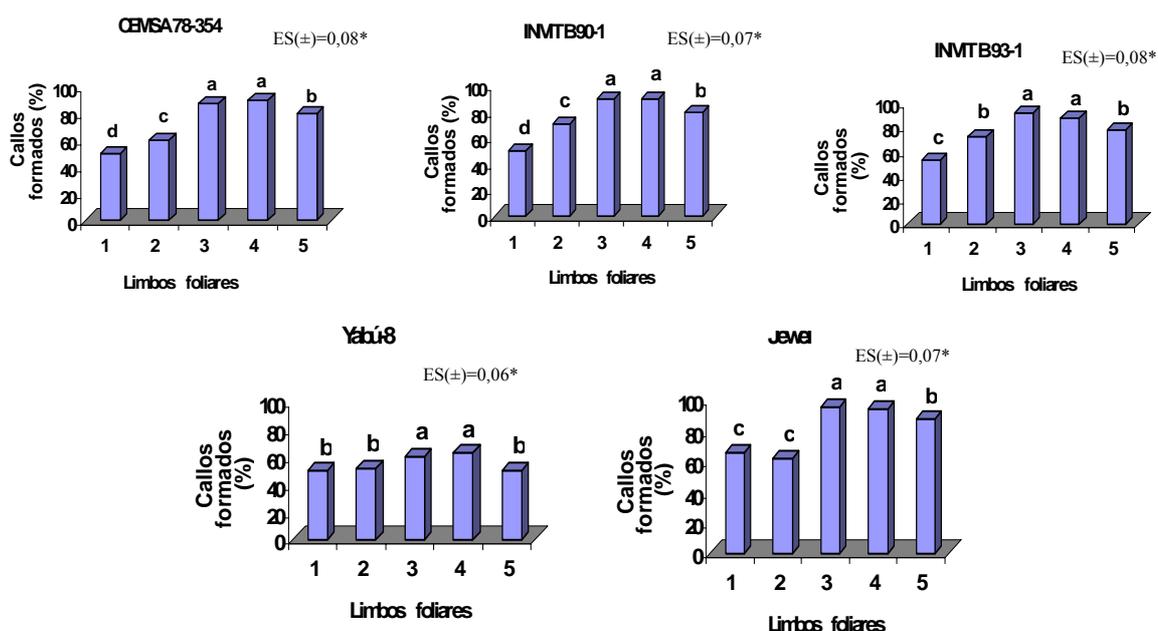


Figura 3. Efecto de la edad fisiológica de los limbos foliares sobre el porcentaje de callos formados de grado 3.

(Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan, $p \leq 0,905$)

Los resultados alcanzados pudieran estar asociados a que los limbos foliares 3^{ro} y 4^{to}, presentan una condición fisiológica y morfológica más favorable que el resto para la formación de callos, lo que se encuentra relacionado con el contenido de hormonas endógenas y el balance de las mismas, el cual varía con la edad del explante y a su vez

tiene influencia en la formación de los callos y sus características. Los callos de grado 3 obtenidos a partir de explantes se caracterizaron por presentar un color crema-amarillo, nodulares y de consistencia friable.

En el presente experimento se pudo observar que los callos de grado 3, se formaron en el mismo período de tiempo que los callos de grados 1 y 2; estos últimos no llegaron a alcanzar el grado 3 de la escala, aunque permanecieran en el medio de cultivo por un mayor período de tiempo y se apreciaron cambios en sus características morfológicas (color oscuro y consistencia compacto).

Estudios relacionados con la edad del explante han sido abordados en diferentes cultivos como el cafeto (*Coffea* sp.) por Santana (1993), quien planteó que el empleo de los limbos foliares del 3^{ro} y 4^{to} nudos de ramas centrales ortotrópicas de plantas cultivadas en campo, presentaron una mayor formación de callos en comparación con los limbos más jóvenes.

Roca y Mroginski (1993); Villalobos y Thorpe (1993), plantearon que las respuestas en la formación de callos de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar con la edad de los mismos. Jiménez y Bangerth (2001); Bidot *y col.* (2003), demostraron que la edad del explante es uno de los factores más importantes en el proceso de formación de callos e influye en el éxito del proceso de la embriogénesis somática.

Según Díaz-Sala *y col.* (1995); Tirajoh *y col.* (1998), se han encontrado diferencias en la formación de callos cuando los tejidos cultivados provienen de material vegetal de diferentes edades fisiológicas, indicando que la estación del año durante la cual es tomado, también pueden influir notablemente en el potencial embriogénico.

Diversos han sido los estudios realizados en los cuales se ha planteado que la formación de callos está influida por el estado de desarrollo de los explantes incrementado por la edad de los mismos (Malgorzata, 2001).

Los resultados obtenidos corroboran lo planteado por los autores citados, que en la callogénesis el material original es determinante y fisiológicamente el explante ejerce un efecto acentuado, no sólo en la respuesta; sino además, en la uniformidad del proceso, lo cual ha sido enfatizado, además, por Margara (1988); Dessai *y col.* (1995).

De manera general, los resultados alcanzados a partir de la utilización de los limbos foliares 3^{ro} y 4^{to} como explantes en la formación de callos de grado 3 de la escala,

superaron al resto de los limbos foliares evaluados con diferentes edades fisiológicas y por ello serán empleados en los próximos experimentos.

4.3.3. Posición en el medio de cultivo.

El mayor número de callos de grado 3 se obtuvo, en todos los clones, cuando los explantes de limbos foliares se colocaron con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo (94,0 a 100%) y cuando se les produjeron cortaduras sembrados en esta misma posición (92,0 a 100%), entre los cuales no existieron diferencias significativas en ninguno de los clones estudiados (Tabla 9). Desde el punto de vista práctico, al no diferir significativamente ambos tratamientos, para disminuir la manipulación del material vegetal y posibles contaminaciones, se seleccionó el primero como el mejor tratamiento para continuar los experimentos.

Tabla 9. Efecto de la posición de siembra del limbo foliar con y sin cortaduras en la formación de callos de grado 3 en los clones estudiados.

Posición del limbo foliar	Formación de callos de grado 3 de la escala de Santana (1982) (%)				
	Clones evaluados				
	CEMSA 78-354	INIVIT B 90-1	INIVIT B 93-1	Yabú-8	Jewel
Superficie adaxial	98,0 a	97,0 a	98,0 a	94,0 a	100 a
Superficie abaxial	84,0 c	92,0 b	88,0 c	84,0 b	92,0 c
Superficie adaxial con cortaduras	96,0 a	96,0 a	96,0 a	92,0 a	100 a
Superficie abaxial con cortaduras	92,0 b	92,0 b	92,0 b	84,0 b	96,0 b
ES (±)	0,09 **	0,08 ***	0,10 **	0,09 ***	0,08 ***

Valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan, ($p \leq 0,05$).

Los resultados referidos anteriormente pueden deberse a la estructura interna del limbo foliar, la cual presenta anatomía bifacial o dorsiventral y un parénquima en empalizada próximo a la superficie adaxial que se caracteriza por poseer células muy unidas que posibilita el transporte de los reguladores del crecimiento y los nutrientes hasta la región abaxial, donde se encuentra el tejido esponjoso que está constituido por células con abundantes espacios entre ellas (Esau, 1969), facilitando el crecimiento del callo endógeno hasta cubrir la superficie del limbo foliar.

En estudios realizados en el cultivo del boniato por Liu y Cantliffe (1984), al evaluar la posición del limbo foliar, obtuvieron los mejores resultados en la formación de callos cuando éstos fueron colocados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo, lo cual se corroboró en este estudio.

Margara (1988), planteó que la orientación del material vegetal que se siembra juega un papel importante en la formación de callos; coincidiendo con Salinas *y col.* (1990) en el cultivo del boniato; Santarem *y col.* (1997) en especies de leguminosas; Lee *y col.* (2000) en plantas ornamentales; lo que significa que indistintamente de la especie que se trabaje, juega un papel fundamental en la formación de callos la posición del explante en el medio de cultivo, resultando la superficie adaxial en el mismo en la que mejor comportamiento se obtuvo.

En los siguientes experimentos, para la formación de callos, se empleará el explante con la superficie adaxial sin cortaduras en contacto con el medio de cultivo, lo cual desde el punto de vista práctico disminuye la manipulación de los explantes y posibles contaminaciones en los mismos.

4.3.4. Zona del limbo foliar.

La zona del limbo foliar donde se tomó el área del explante, tuvo una influencia marcada en la formación de callos de grado 3 en todos los clones estudiados.

La formación de callos de grado 3, fue significativamente superior cuando el explante se tomó de la zona basal del limbo foliar para todos los clones, alcanzando más del 88,0% en los clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1 y Jewel, y se lograron menores resultados con las zonas apical y media, con valores entre 12,0 y 52,0%, respectivamente (Figura 4).

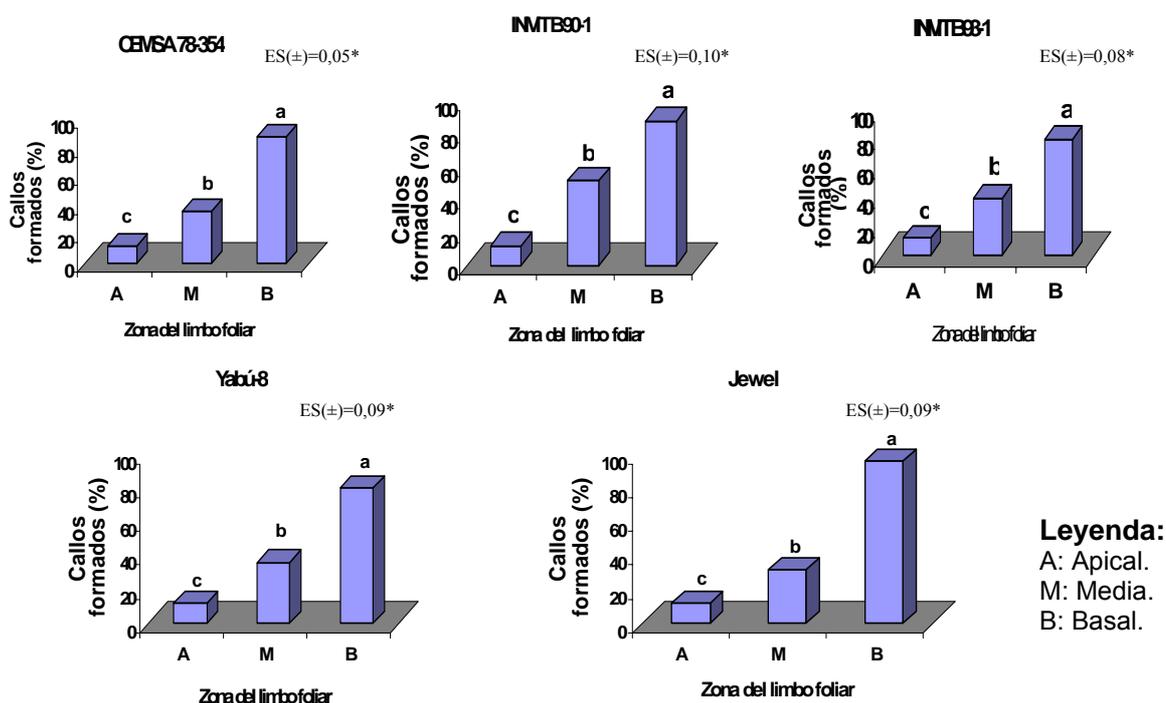


Figura 4. Efecto de la zona del limbo foliar de donde se tomó el explante sobre la formación callos de grado 3.

(Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan, p < 0,05)

Los resultados obtenidos pudieran deberse a la mayor cantidad de nervaduras presentes en la zona basal, donde se encontró que la unión del limbo foliar con el peciolo favoreció la cicatrización de las heridas y la formación del callo de color crema-amarillo, nodular y consistencia friable; además, según Esau (1969), en esta región del limbo foliar existen células meristemáticas remanentes del proceso de iniciación del mismo, las cuales tienen gran influencia y favorecen la formación de los callos.

Estudios realizados por Haydu y Vasil (1981); Wernieken y Brettell (1981), en el cultivo del millo (*Pennisetum purpureum* Shum) y sorgo (*Sorghum bicolor*), respectivamente, revelaron que los mejores resultados en la formación de callos se obtuvieron con el empleo de la zona basal del limbo foliar.

Así mismo, Margara (1988) señaló que existen diferentes respuestas según las zonas de donde se toma el explante, debido a la conformación anatómica de cada región de los diferentes órganos de la planta y por la posición que ocupa cada zona en el órgano vegetal.

De manera general, en la zona basal del limbo foliar para cada uno de los clones evaluados, se alcanzaron los mejores resultados en la formación de callos de grado 3 en comparación con las zonas medias y apical, en las cuales prevaleció en la mayoría de los clones callos de grado 2 y grado 1 de la escala propuesta por Santana (1982).

4.4. Experimento IV: Selección del medio de cultivo para la formación de callos potencialmente embriogénicos.

4.4.1. Efecto del 2,4-D combinado con 6-BAP.

En estudios realizados por Jarret (1989) y Cantliffe (1993), en boniato para la formación de callos potencialmente embriogénicos, plantearon que estos se caracterizaron por presentar un gran crecimiento, cubriendo completamente el explante, de color crema-amarillo, apariencia nodular y consistencia friable. En el presente trabajo, en relación al número total de callos formados, la respuesta de los clones no siguió un patrón definido en cuanto al balance con el empleo de 2,4-D y 6-BAP (Tabla 10).

Balances a favor de una o otra hormona favorecieron la formación de callos en los mismos; lo cual pudiera deberse a una respuesta de crecimiento acelerado de células provocado por cualquier estímulo exógeno; sin embargo, la calidad del callo sí respondió de forma específica, obteniéndose la mayor cantidad de callos potencialmente embriogénicos en todos los clones con el medio M₂, que contenía 0,50 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,25 mg.L⁻¹ de 6-BAP, los cuales fueron de color crema-amarillo, nodulares y consistencia friable (Figura 5A), tratamiento que difirió significativamente del resto en todos los genotipos estudiados. Estos resultados corroboraron lo planteado por numerosos autores en cuanto a la influencia del balance hormonal alcanzado en el medio de cultivo sobre las características de los callos formados en ellos.

Tabla 10. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y 6-BAP en la formación de callos potencialmente embriogénicos.

Medio induct. de callos	Composic. del medio 2,4-D y 6-BAP (mg.L ⁻¹)		Formación de callos de grado 3 (%)									
			Clones evaluados									
			CEMSA 78-354		INIVIT B 90-1		INIVIT B 93-1		Yabú-8		Jewel	
--		TCF	CPE	TCF	CPE	TCF	CPE	TCF	CPE	TCF	CPE	
M ₁	0,25	0,25	90,0 bc	50,0 h	100 a	76,0 f	100 a	70,0 c	80,0 c	34,0 k	100 a	66,0 g
M ₂	0,50	0,25	100 a	96,0 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	90,0 a	100 a	100 a
M ₃	1,0	0,25	96,0 ab	88,0 bc	100 a	90,0 bc	100 a	90,0 bc	74,0 d	72,0 d	100 a	94,0 b
M ₄	2,0	0,25	100 a	90,0 b	100 a	88,0 cd	100 a	90,0 b	88,0 b	86,0 b	100 a	90,0 c
M ₅	2,5	0,25	80,0 cd	50,0 h	96,0 b	60,0 h	100 a	64,0 f	80,0 c	48,0 i	90,0 b	72,0 f
M ₆	0,25	0,50	100 a	86,0 c	100 a	84,0 e	100 a	90,0 b	100 a	60,0 g	100 a	85,0 d
M ₇	0,50	0,50	76,0 d	80,0 d	90,0 c	88,0 cd	94,0 b	90,0 b	84,0 bc	58,0 g	100 a	80,0 e
M ₈	1,0	0,50	68,0 e	74,0 f	100 a	86,0 de	100 a	78,0 d	100 a	60,0 g	100 a	88,0 cd
M ₉	2,0	0,50	100 a	80,0 d	100 a	92,0 b	100 a	90,0 b	100 a	82,0 c	100 a	84,0 d
M ₁₀	2,5	0,50	84,0 c	86,0 c	90,0 c	88,0 cd	96,0 b	84,0 c	80,0 c	64,0 f	84,0 c	80,0 e
M ₁₁	0,25	1,0	100 a	80,0 d	100 a	88,0 cd	100 a	90,0 b	100 a	64,0 f	100 a	86,0 d
M ₁₂	0,50	1,0	100 a	76,0 ef	100 a	88,0 cd	100 a	84,0 c	100 a	60,0 g	100 a	90,0 c
M ₁₃	1,0	1,0	86,0 c	78,0 de	100 a	84,0 e	88,0 c	80,0 d	80,0 c	68,0 e	100 a	60,0 h
M ₁₄	2,0	1,0	90,0 bc	66,0 g	100 a	72,0 g	100 a	70,0 e	100 a	54,0 h	100 a	60,0 h
M ₁₅	2,5	1,0	40,0 f	48,0 i	100 a	40,0 i	100 a	54,0 g	88,0 b	40,0 i	100 a	50,0 i
--	ES (±)		1,20 ***	0,83 ***	0,41 ***	0,62 ***	0,41 ***	0,54 ***	0,58 ***	0,63 ***	0,40 ***	0,49 ***

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$). **TCF:** Total de Callos Formados. **CPE:** Callos Potencialmente Embriogénicos.

Según García (1998), es necesario profundizar en los aspectos cuantitativos (ganancia en masa fresca) y cualitativos (características morfológicas) del crecimiento del callo, pues el resultado es determinante en la formación de callos potencialmente embriogénicos. Este mismo autor señaló la importancia del balance hormonal en los medios de cultivo, planteando que la obtención de un medio de cultivo óptimo que permita la formación de callos potencialmente embriogénicos, requiere de mayor



Figura 5. Formación de callos a partir de limbo foliar. (A): Callos potencialmente embriogénicos. (B): Callos no embriogénicos.

profundidad en las investigaciones, donde los análisis cuantitativos y cualitativos en el crecimiento contribuyan de forma esclarecedora para una mejor interpretación de los resultados.

Es importante señalar que el medio M₂, compuesto por 2,4-D (0,50 mg.L⁻¹) y 6-BAP (0,25 mg.L⁻¹), resultó superior al propuesto por Cantliffe (1993) con iguales propósitos en clones de boniato, el cual contenía 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,50 mg.L⁻¹ de 6-BAP (M₈), con un consiguiente ahorro de reactivos y fundamentalmente del riesgo de producir variabilidad al reducirse a la mitad la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo.

Al ser empleadas las concentraciones más altas de 2,4-D (1,0; 2,0 y 2,5 mg.L⁻¹) y 6-BAP (1,0 mg.L⁻¹), en los clones INIVIT B 90-1, Jewel e INIVIT B 93-1 se obtuvieron callos de color verde pálido, con zonas de color crema y la presencia de raíces (rizogénesis); mientras que, con la más baja concentración evaluada de ambos reguladores (0,25 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,25 mg.L⁻¹ de 6-BAP) se obtuvieron callos de consistencia esponjosa (Figura 5B).

Estudios relacionados con la composición del medio de cultivo han sido abordados por Santana (1982) en el cultivo del cafeto, señalando que la acción independiente del 2,4-D en la formación de callos fue nula, pero al combinarse con 6-BAP, ésta fue posible. Mientras que, al respecto Schoofs y *col.* (1999); Collado y *col.* (2005), indicaron que no sólo el 2,4-D combinado con una citoquinina juega un papel importante en la formación de callos; sino que influye en las características de los mismos. Por otra parte, Capote y *col.* (2000), plantearon que cuando se analiza la respuesta en la formación de los callos, se observó que la adición de 2,4-D combinado con una citoquinina estimuló la formación de estos.

Diversos autores señalaron la importancia del empleo de los reguladores del crecimiento en la formación de callos, entre ellos el 2,4-D que es considerado una potente auxina grandemente empleada con esta finalidad y es la más efectiva en la formación de callos (De Klerk, 1998) y la presencia de los reguladores del crecimiento en el medio promueve la división celular y estimula el potencial embriogénico en los callos, la relativa concentración de los mismos determina el tipo de diferenciación morfológica que se exprese (Bhojwani y Razdan, 1996) y se encuentra relacionado con la sensibilidad de acción de los reguladores del crecimiento sobre la respuesta en determinados tipos de explantes empleados en el cultivo de tejidos vegetales (Jiménez, 2005).

Georget y col. (2000) y Desmond (2003), señalaron los efectos positivos que produce la interacción del 2,4-D con 6-BAP para la callogénesis en banano (*Musa* sp.), resaltando que estimulan un incremento en la flexibilidad de la pared celular provocada por la acidificación de las mismas y ésto facilita el incremento celular, que a su vez posibilita el crecimiento del callo.

Callos con características similares a las descritas en este estudio fueron obtenidos por García (1998) y Cevallos (2000), los cuales analizaron las características cualitativas en los callos procedentes de explantes de cafeto, al emplear distintas combinaciones de los reguladores del crecimiento, encontrando diferencias en la morfología de los mismos (color, nodulación y textura) a pesar de existir similitud en el número de callos formados, lo cual determina posteriormente, a partir de los mismos, la formación de los embriones somáticos (Taiz y Zeiger, 1991; Santana y col., 1998).

García y Menéndez (1987), en trabajos realizados en cafeto (*Coffea arabica*), llevaron a cabo experimentos con un amplio rango de combinaciones de 2,4-D y AIB con kinetina y 6-BAP, encontrando que se formaron gran cantidad de callos en diversas de estas combinaciones y sólo con el empleo del 2,4-D ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) se favoreció la formación de callos potencialmente embriogénicos.

Suksa-Ard y col. (1999); García y col. (2002), plantearon que por lo general, se tiende más a buscar el efecto de las diferentes concentraciones a través de diversas combinaciones hormonales, asumiéndose que existe un balance en el proceso y el mismo sea reproducible. Sin embargo, también es necesario conocer la acción que dichos reguladores ejercen a diferentes niveles, así como su interrelación con el complejo hormonal endógeno del explante que sin dudas es muy diferente al de la planta intacta, pues no existe una regulación centralizada y organizada (Piferrer y col., 2001).

De manera general, los callos formados potencialmente embriogénicos fueron de color crema-amarillo, nodulares y consistencia friable, siendo posible obtener poblaciones uniformes con predominio de callos pertenecientes al grado 3 de la escala propuesta por Santana (1982).

En lo adelante en el presente trabajo se empleará la combinación de 2,4-D ($0,50 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) por ser la que mejores resultados ofreció para la formación de callos potencialmente embriogénicos.

Conjuntamente con la composición del medio y el tipo de explante seleccionado para la formación de callos, el tiempo de permanencia de éstos en el medio de cultivo (edad del callo) resulta importante para el desarrollo de etapas posteriores y se encontró en las condiciones experimentales descritas que el momento óptimo para realizar la transferencia de los callos potencialmente embriogénicos al medio para la formación de embriones somáticos estuvo comprendido entre los 28 y 32 días (Tabla 11).

Antes de este momento, los callos presentaban un color amarillo y consistencia compactos; lo cual demuestra que requieren de un tiempo más prolongado en el medio de cultivo. Hasta los 36 días los callos mantuvieron el color crema-amarillo, nodulares y consistencia friable, y posteriormente tomaron un color crema-oscuro, lo que indicó la pérdida de potencialidades embriogénicas en los mismos, comenzando el necrosado y senescencia del callo, lo cual pudo ser causado por el envejecimiento de las células conjuntamente con el agotamiento de los nutrientes y el agua como constituyentes del medio de cultivo.

Tabla 11. Influencia de la edad del callo sobre las características del mismo.

Edad del callo (días)	Características de los callos				
	Callos formados	Color	Nodular	Friable	Compacto
20	++	Amarillo	--	--	*
22	++	Amarillo	--	--	*
24	+++	Amarillo	*	--	*
26	+++	Amarillo	*	--	*
28	+++	Crema – Amarillo	**	**	--
30	+++	Crema – Amarillo	**	**	--
32	+++	Crema – Amarillo	**	**	--
34	+++	Crema – Amarillo	*	*	--
36	+++	Crema – Amarillo	*	*	--
38	+++	Crema – Oscuro	*	--	*
40	+++	Crema – Oscuro	*	--	*

Cantidad de callos formados:

(-): no formación (Grado 0).

(+): ligera formación (Grado 1).

(++): formación del callo (Grado 2).

(+++): abundante formación (Grado 3).

Nodular:

(-): no nodular.

(*): poco nodular.

(**): nodular.

Friable:

(-): no friable.

(*): poco friable.

(**): friable.

Compacto:

(-): no compacto

(*): compacto.

La edad del callo constituye un aspecto de gran importancia en el proceso callogénico en las diferentes especies vegetales y las características morfológicas pudieran constituir un marcador cualitativo de gran utilidad práctica para determinar el momento del pase de

los mismos a otros medios, ya que el tiempo de permanencia en el medio de cultivo define el posterior comportamiento de éstos en la formación de embriones somáticos (García, 1998).

González (2001) y González (2003), al evaluar la edad del callo en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y cafeto, respectivamente, plantearon que es evidente la marcada influencia que ejerce la composición hormonal endógena del explante empleado y los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo sobre la edad de los callos y éste se manifiesta en sus características morfológicas.

De manera general, se puso de manifiesto que es necesario evaluar en los callos sus características cuantitativas y cualitativas, expresadas en la cantidad, color, nodulación y textura de los callos, a fin de garantizar un adecuado desarrollo de los posteriores eventos en el proceso de embriogénesis somática; por lo que se estableció los 30 días como momento óptimo para pasar los callos a la siguiente etapa.

4.5. Experimento V: Formación de embriones somáticos.

La concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D resultó significativamente superior al resto de las empleadas para la formación de embriones somáticos, como se observa en las figuras 6A y 6B, excepto en el clon CEMSA 78-354, en que no difirió significativamente de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. El número de embriones somáticos formados en esta concentración de 2,4-D estuvo entre 51,0 en el clon Yabú-8 y 70,4 en el clon INIVIT B 93-1 (Tabla 12).

En el clon CEMSA 78-354 se obtuvieron 64,5 y 62,2 embriones somáticos como promedio por callo con el empleo del 2,4-D ($0,2$ y $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), respectivamente, sin existir diferencias significativas entre ellos pero sí con el resto de las concentraciones evaluadas; mientras que, la más baja concentración ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) fue la que ofreció peor comportamiento en la formación de embriones somáticos, en todos los clones.

En el clon INIVIT B 90-1 se lograron con $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D hasta 68,0 embriones somáticos como promedio por callo, resultando la mejor concentración evaluada. Mientras que, las concentraciones de $0,05$ y $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ no difirieron significativamente entre ellas y la concentración de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ resultó la peor en este clon.

En el clon INIVIT B 93-1 se obtuvo una alta formación de embriones somáticos por callo (70,4), con el empleo del 2,4-D en el medio de cultivo a la concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, mostrando diferencias significativas con el resto de las concentraciones empleadas.

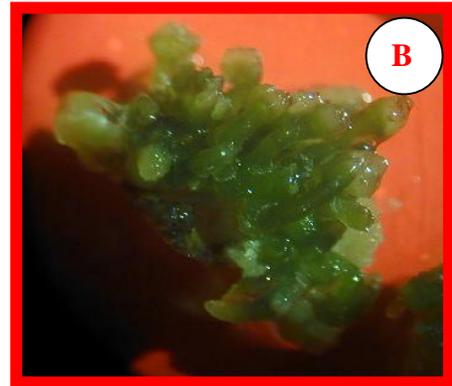


Figura 6. Formación de embriones somáticos a partir del limbo foliar. (A): Callos con embriones somáticos. (B): Abundante formación de embriones somáticos.

Es de destacar que, en el clon Yabú-8 se observó un número total menor de embriones somáticos formados; se obtuvo 51,0 embriones somáticos por callo en la concentración de 0,2 mg.L⁻¹ que fue significativamente superior al resto y solo 27,0 en la concentración de 0,25 mg.L⁻¹ que resultó ser menos favorable en este clon, lo que pudiera ser explicado por la sensibilidad a la concentración del regulador del crecimiento usada en la presente etapa.

Tabla 12. Efecto de la concentración de 2,4-D en la formación de embriones somáticos.

Tratamientos (2,4-D)		Número de embriones somáticos por callo				
		Clones evaluados				
(mg.L ⁻¹)		CEMSA 78-354	INIVIT B 90-1	INIVIT B 93-1	Yabú-8	Jewel
MI ₁	0,05	35,0 c	61,0 b	51,0 c	33,0 c	23,0 d
MI ₂	0,1	62,2 a	63,0 b	52,0 c	41,0 b	61,0 b
MI ₃	0,2	64,5 a	68,0 a	70,4 a	51,0 a	70,0 a
MI ₄	0,25	41,8 b	50,5 c	67,0 b	27,0 d	56,0 c
--	ES (±)	0,42 ***	0,19 ***	0,32 ***	0,57 ***	0,42 ***

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

El clon Jewel mostró altos valores en el número de embriones somáticos por callo, lográndose hasta 70,0 embriones somáticos en la concentración de 0,2 mg.L⁻¹ que fue significativamente superior al resto. Las dosis extremas resultaron menos favorables, siendo la dosis de 0,05 mg.L⁻¹ de peor comportamiento, difiriendo significativamente del resto, con solamente 23,0 embriones somáticos por callo.

Qing-chang *y col.* (1992) y Qi *y col.* (1996), obtuvieron los mejores resultados en la formación de embriones somáticos en el cultivo del boniato con el empleo del 2,4-D (0,2 mg.L⁻¹), alcanzando 32 y 24 embriones somáticos como promedio por callo, respectivamente, lo cual indica que el número de embriones somáticos por callo fue superado en la presente investigación.

El número de embriones somáticos formados por callo, en el presente trabajo, supera los resultados obtenidos por otros investigadores como Liu y Cantliffe (1984) y Torres *y col.* (2001), a partir de explantes de limbos foliares de boniato. Así mismo, Kokubu *y col.*

(1993) con $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, lograron la formación de hasta 20,0 embriones somáticos por callo en el cultivo del boniato, lo cual se encuentra muy por debajo de los resultados referidos en el presente trabajo.

Es ampliamente señalado en la literatura la influencia de aplicaciones exógenas de auxinas, preferentemente, el empleo del 2,4-D en el medio de cultivo para la formación de embriones somáticos a partir de callos transferidos a estos medios, ya que el mismo favorece la formación de embriones somáticos en diferentes especies vegetales (Jiménez, 2002; Fehér y col., 2003), reflejado por su efecto sobre las células embriogénicas, que es importante en el establecimiento de la simetría bilateral de los embriones somáticos y por consecuencia el futuro desarrollo de los mismos (Jiménez y col., 2001).

Cevallos (2000), en estudios realizados en el cultivo del cafeto, planteó que el papel que desempeñan las auxinas durante el proceso de embriogénesis somática ha sido grandemente estudiado y Jiménez (2005), señaló que en la mayoría de los sistemas embriogénicos se requiere de esta en el medio de cultivo para la formación de los embriones somáticos.

Según Bhojwani y Razdan (1996) el 2,4-D es, generalmente, necesario para llevar a cabo la embriogénesis somática y se ha obtenido con buenos resultados en plantas como zanahoria (*Daucus carota*), alfalfa (*Medicago sativa*), cereales, entre otras.

En la figura 7 se muestra el número de embriones somáticos en los estadios globular, corazón y torpedo, obtenidos a los 30 días de sembrados los callos en el medio de cultivo para la formación de embriones somáticos, en cada uno de los clones estudiados. Como se observó el estadio de desarrollo predominante fue el globular, lo cual indica que el proceso se encontraba en fase inicial en todos los genotipos. En la concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ la cantidad de embriones somáticos globulares superó significativamente al resto en todos los clones, excepto en el INIVIT B 90-1, que esta concentración no difirió significativamente de $0,05$ y $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Sin embargo, los estadios de desarrollo de corazón y torpedo resultaron superiores en la concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, aunque sin diferencias significativas para este último estadio de desarrollo al emplear $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$.

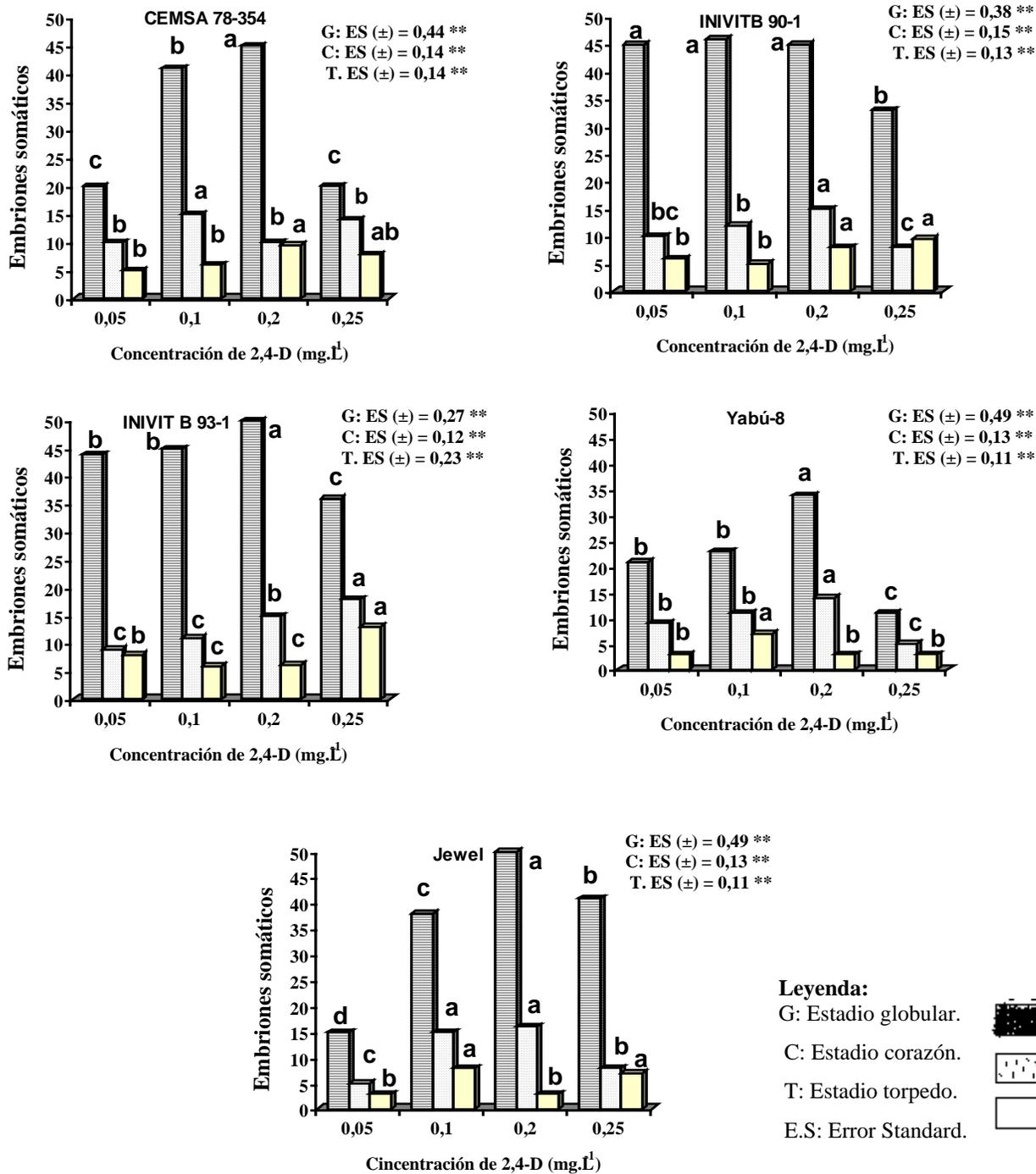


Figura 7. Número de embriones somáticos por estadio de desarrollo en las diferentes concentraciones de 2,4-D.

(Letras iguales no difieren significativamente entre sí para Duncan, $p \leq 0,05$)

Los clones INIVIT B 90-1, Yabú-8 y Jewel presentaron los mayores valores de embriones somáticos en el estadio de corazón con la concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ y este último sin diferir significativamente con la concentración de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Es válido señalar que, aunque el clon Yabú-8 mostró un comportamiento similar a los restantes y los mejores resultados en la formación de embriones somáticos se alcanzaron en la concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ y prevaleció para este tiempo de evaluación el estadio de desarrollo globular, sus valores generalmente resultaron inferiores con relación a los logrados en los restantes clones evaluados.

Se observó la alta formación de embriones somáticos, dando apariencia de una roseta, este fenómeno fue señalado por Michaux-Ferriere y *col.* (1987), destacando que los embriones somáticos son capaces de aparecer en diferentes estadios de desarrollo; coincidentemente con ello, no se observó uniformidad en la formación, estadios de desarrollo, color y forma de los embriones somáticos en el presente experimento; lo cual se ha atribuido a que una vez formadas las células embriogénicas, no todas se encuentran simultáneamente listas desde el punto de vista fisiológico para expresar su totipotencia, aun en un medio favorable para su cultivo (González, 2003).

La asincronía como fenómeno ha atraído la atención de varios autores en el proceso de embriogénesis somática (Cevallos, 2000; González, 2001; Hita y *col.*, 2003; González, 2003), los cuales plantearon que constituye la causa que las poblaciones de embriones somáticos muestren un amplio rango de tamaños y estadios de desarrollo, es el principal problema que presenta este sistema para su aplicación industrial y es un fenómeno común a todos los cultivos y se inicia a nivel celular, ya que todas las células no muestran el mismo tamaño, ni el mismo grado de desarrollo (Michaux-Ferriere y *col.*, 1987). Diversos autores han señalado que el control de determinados factores pudiera contribuir a la disminución de la asincronía, tal es el caso de la formación de embriones somáticos secundarios, cuyo origen puede ser a partir del eje principal del embrión o en la zona del suspensor (González, 2003); lo que podría contrarrestarse con la disminución o suspensión de los niveles de auxinas en los medios de cultivo, ya que éstos estimulan la división de las células embriogénicas que permanecen en estado de latencia en las paredes del eje principal o de las células del suspensor.

Cevallos (2000), estudió el efecto del tamizaje celular sobre la producción de embriones somáticos, logrando una mayor sincronización del proceso. El control del pH es otro

factor a considerar, ya que según el valor, es posible dirigir el proceso hacia la formación de embriones somáticos en un estadio de desarrollo determinado. Sin embargo, esta problemática no ha sido resuelta en la mayoría de los cultivos que exhiben la embriogénesis somática como una vía de diferenciación (Santana, 1993).

De manera general, se evidenció un incremento en los primeros estadios embrionarios (globulares), los que se apreciaron a los 30 días después de la siembra de los callos, los cuales posteriormente pasaron por los diferentes estadios de desarrollo y el mejor comportamiento se obtuvo para la concentración de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, por lo que esta se empleará en lo adelante en la presente investigación.

Es necesario destacar que, los resultados alcanzados en el presente trabajo en lo referente al número de embriones somáticos formados por callo (hasta 70,0), resultó superior al señalado por otros autores en este cultivo e incluso al obtenido en otras especies, lo cual permite una mayor eficiencia en el proceso y para algunos de los clones evaluados (INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1 y Yabú-8) constituye el primer informe de formación de embriones somáticos.

Posterior a los 30 días, los embriones somáticos continuaron su crecimiento, pasando por los diferentes estadios de desarrollo típicos de los mismos (globular, corazón, torpedo y cotiledonal) y para obtener este último estadio de desarrollo se hace necesario el empleo de un medio que favorezca la maduración conjuntamente con la aparición de los cotiledones y garantice la obtención de una respuesta adecuada en las siguientes fases del proceso, logrando mayor calidad del embrión, tanto en sincronía como en morfología.

El embrión somático requiere de un determinado tiempo para alcanzar su completa formación. En la figura 8 se muestran los estadios de desarrollo de los embriones somáticos en el clon INIVIT B 93-1, tomado como modelo por su alta capacidad de respuesta en la formación de los mismos.

Una vez que aparecieron los embriones somáticos en el estadio globular, pudo observarse que permanecieron en el mismo por un período de tiempo promedio de cinco días, en ese momento, pasaron al estadio de corazón en el cual se mantuvieron por un período de tres días; este estadio de desarrollo es apenas observable en otros cultivos en los cuales permanece por un período de tiempo corto y en otros no se observa (Cevallos, 2000).

Una vez transcurrido dicho tiempo, aparecieron los embriones somáticos en el estadio de torpedo, en el cual permanecieron durante 10 días, a partir de los cuales comenzó la aparición de los cotiledones.

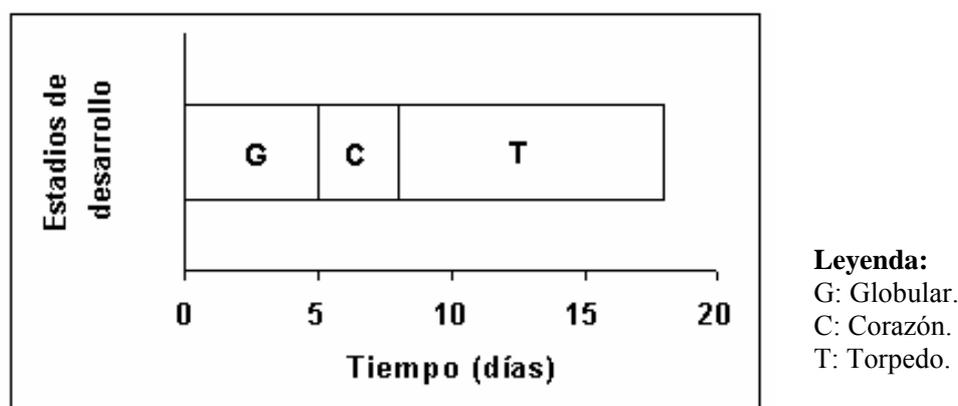


Figura 8. Duración de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos en el clon INIVIT B 93-1.

El color de los embriones somáticos en el estadio globular y corazón fue crema-amarillo y posteriormente, aparecieron en el estadio de torpedo de color verde-amarillo y forma alargada.

Las observaciones realizadas resultan importantes para lograr la formación de vitroplantas, teniendo en cuenta el tiempo de permanencia de los embriones somáticos en cada estadio de desarrollo, más aún si se piensa en la producción industrial de embriones somáticos en biorreactores para lograr automatizar el proceso.

Los resultados alcanzados en la presente investigación sirven de partida para futuras investigaciones; ya que no existen antecedentes en Cuba de trabajos realizados en relación con el estudio de la duración de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos en el cultivo del boniato.

4.6. Experimento VI: Caracterización histológica del proceso de embriogénesis somática.

Formación del callo potencialmente embriogénico.

En las secciones transversales del limbo foliar, se observó la estructura característica de este tipo de tejido, donde se distingue claramente la epidermis adaxial y abaxial, el

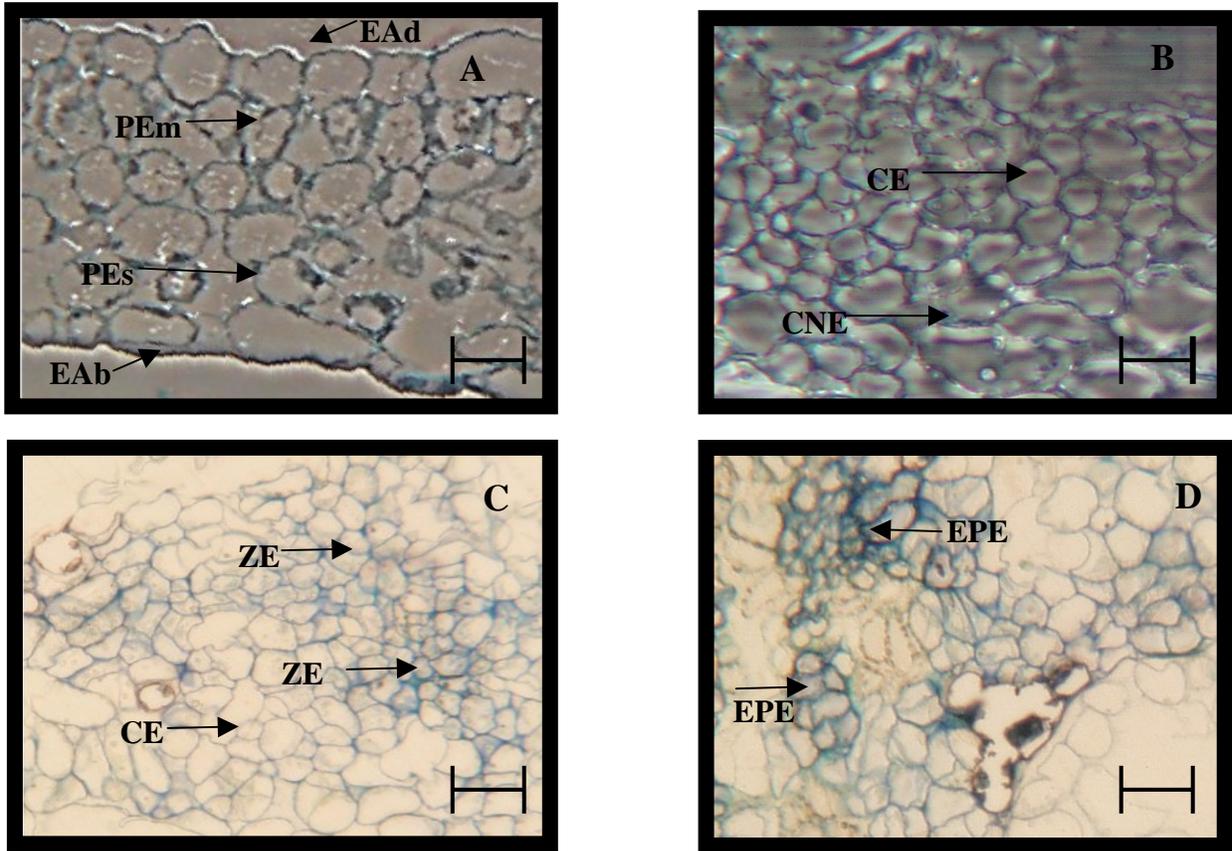


Figura 9. Cortes histológicas del limbo foliar y de callos de boniato del clon INIVIT B 93-1. (A): Secciones transversales del limbo foliar tomadas al momento de realizar la siembra. (B): Callo con 30 días de formado y con predominio de células pequeñas y abundantes. (C): Sección transversal de un callo con zonas embriónicas después de los cinco días del subcultivo. (D): Sección transversal de un callo con estructuras proembriónicas. Barras en las fotos: (A) =100 μ m, (B) =150 μ m, (C) y (D) =200 μ m.

Leyenda: EAd: Epidermis Adaxial. EAb: Epidermis Abaxial. PEm: Parenquima en Empalizada. PEs: Parenquima Esponjoso. CE: Células Embriónicas. CNE: Células No Embriónicas. ZE: Zona Embriónica. EPE: Estructura Proembriónica.

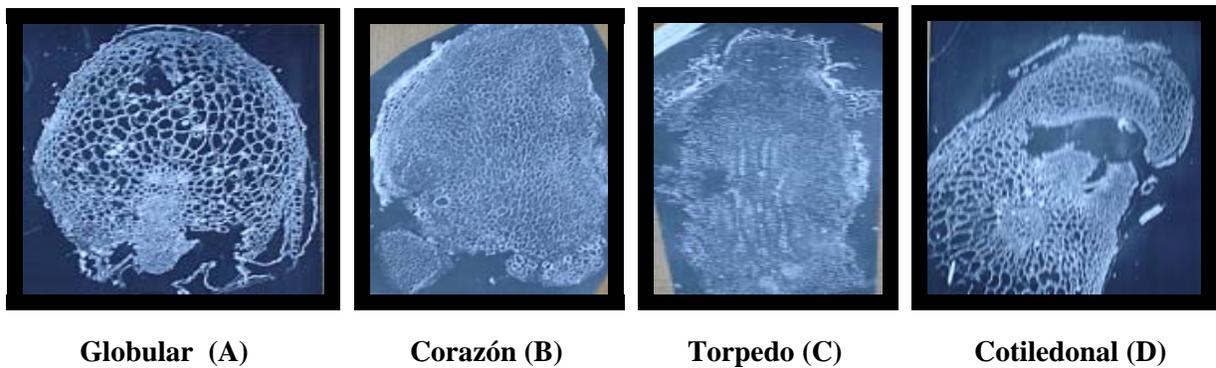


Figura 10. Secciones histológicas de los embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo (Globular, Corazón, Torpedo y Cotiledonal).

parénquima clorofílico bien diferenciado en empalizada y el lagunar o esponjoso (Figura 9A).

Posteriormente, se observó la formación del callo que se había iniciado en las células perivasculares del haz, descritos anteriormente por Michuax-Ferriere y *col.* (1987); Lee y *col.* (1997), a partir de explantes de limbos foliares de café y *Musa* sp., respectivamente.

El incremento de crecimiento del callo en todas direcciones dio lugar a que el callo se hiciera notable y se proyectara al exterior a través de la epidermis, el cual ocupó toda la superficie del explante, y en ese momento, se manifestó la etapa de dediferenciación del mismo y se incrementó el crecimiento con la multiplicación de células meristemáticas, que según Rodríguez y Mosqueda (1996), se componen de células isodiamétricas, citoplasma denso, vacuolas pequeñas, núcleo prominente y abundante contenido de almidón; siendo a partir de estas células que se originan los embriones somáticos, lo cual ha sido informado por Zapata (1994); González y Ferrer (1996), en el cultivo del café.

A los 30 días de la siembra, el callo presentó una apariencia homogénea y la masa callogénica creció hacia la zona abaxial con la predominancia de células potencialmente embriogénicas y también existieron células de tipo no embriogénicas muy vacuoladas (Figura 9B), demostrándose que el mismo callo puede presentar células con capacidad embriogénica y células no embriogénicas, lo cual ha sido discutido por Mukherjee y *col.* (2001) y la predominancia de un tipo determinado de células, conlleva a la formación de un tipo de callo u otro expresado en su composición celular y características morfológicas, lo cual depende, entre otras cosas, del explante empleado (Rival, 2000; Goh y *col.*, 2001).

En trabajos realizados por Laparra y *col.* (1997), demostraron que las células embriogénicas proceden de las células meristemáticas, y según Rodríguez y Mosqueda (1996), el aumento en el número de éstas se debe, casi enteramente, a la división repetida en tejidos meristemáticos específicos que se encuentran en regiones limitadas.

Estudios histológicos del callo han sido llevados a cabo por Maximova y *col.* (2002), los que destacaron que las células meristemáticas que lo determinan se encuentran por los bordes del explante. En trabajos realizados por Santana (1993), al efectuar un análisis microscópico de las secciones de los limbos foliares de café sometidos a la acción de

los reguladores del crecimiento, observó que el callo se originó a partir del parénquima y su proliferación ocasionó posteriormente la ruptura de la epidermis, lo cual indica que el origen de los callos se encuentra relacionado con el explante empleado y comienza la formación del mismo por un callo endógeno que posteriormente se hace visible con la ruptura de la epidermis (callo exógeno).

Formación de los embriones somáticos.

Después de los cinco días de sembrados los callos potencialmente embriogénicos en el medio de cultivo para la formación de los embriones somáticos, se observó el desarrollo de zonas embriogénicas en los callos conformadas por un grupo pequeño de células redondeadas y muy unidas (Figura 9C), similares a las observaciones realizadas por Alemanno y col. (1997) en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.), al realizar cortes histológicos en callos potencialmente embriogénicos colocados en el medio de cultivo para la formación de embriones somáticos, planteando que comienzan a aparecer zonas formadas por pocas células redondeadas que tienen una gran actividad nuclear, gran cantidad de almidón y alta capacidad de división.

La aparición de las zonas embriogénicas constituye una primera fase en la formación de los embriones somáticos y el agrupamiento celular posteriormente dio inicio a la formación de estructuras proembriogénicas (Figura 9D), fácilmente visibles que alcanzaron un mayor tamaño y a partir de las cuales se produjo, posteriormente, la emergencia de los embriones somáticos.

Testillano y col. (2001), señalaron que las estructuras proembriogénicas se encontraban formadas por células embriogénicas que, posteriormente, mediante divisiones sucesivas dieron lugar a los embriones somáticos globulares, los que pasaron por los distintos estadios de desarrollo similares a los embriones cigóticos.

En estudios histológicos realizados por diferentes investigadores, éstos plantearon que en las zonas meristemáticas ubicadas en los callos ocurren, frecuentemente, divisiones anticlinales y periclinales de las células; existiendo poco conocimiento acerca del origen y el desarrollo de los embriones somáticos (Dangou y col., 2002; Concepción y col., 2003).

Caracterización de los embriones somáticos.

Las secciones longitudinales de los embriones somáticos mostraron la naturaleza bipolar propia de los mismos (Figura 10) y durante el transcurso de los estadios de desarrollo, se pudo observar la variación que tiene lugar en cuanto a forma, tamaño y apariencia de los mismos, que siguen una trayectoria de desarrollo semejante a los embriones cigóticos; asociado a cambios que se van presentando a nivel celular con la maduración de los mismos (Michaux-Ferriere y Carrón, 1989; Farías, 2000).

Al realizar el corte histológico a los embriones somáticos en el estadio globular, se observó la forma típica redondeada de este tipo de estructura embriogénica, conformada por células meristemáticas (Figura 10A).

Los embriones somáticos en el estadio de corazón (Figura 10B), permanecieron por un período de tiempo corto, como fue descrito anteriormente, caracterizados por presentar un mayor tamaño que el estadio globular y una forma acorazonada, la cual da el nombre a este estadio de desarrollo, permitiendo con el posterior crecimiento y desarrollo del mismo que el embrión somático transitara a una etapa superior.

En la figura 10C, se muestra la imagen de un embrión somático en estadio de torpedo obtenido en las mismas condiciones y medio de cultivo que los anteriores y constituye un estadio de desarrollo más avanzado del mismo, que presenta la forma de estructura alargada característica de los embriones somáticos en el estadio de torpedo, conformada por un eje apical y radical, siendo ésta una de las propiedades fundamentales que los diferencian de las estructuras que se forman durante el proceso de organogénesis.

En la figura 10D, se puede apreciar el último estadio en la formación de un embrión somático (cotiledonal) y se observa la aparición de los cotiledones completamente desarrollados, característica propia de este estadio.

Según Budimir (2003), al realizar estudios de los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos, le confiere gran importancia a las células presentes, ya que aunque todas las células de un organismo son consideradas del mismo genotipo, no todas las células de un tejido o explante responden a la formación de embriones somáticos de igual manera; debido a que, solamente ciertas células parecen estar aptas para responder a la embriogénesis somática bajo la influencia de los reguladores del

crecimiento, lo cual trae consigo la necesidad de llevar a cabo estudios histológicos detallados del proceso de embriogénesis somática.

En el cultivo del boniato, éstos constituyen los primeros informes de la caracterización histológica del proceso de embriogénesis somática, lo cual facilita el estudio de la formación de los callos y la obtención de los embriones somáticos.

4.7. Experimento VII: Efecto del ABA en la maduración de los embriones somáticos.

El aumento de tamaño de los embriones somáticos responde a la acumulación de sustancias de reserva obtenidas a partir del medio de cultivo, lo cual provoca un cambio de coloración en los embriones somáticos y un mayor vigor que le permite la posterior germinación del mismo.

Según Jiménez (2005), con la presencia del ABA en el medio de cultivo se induce la desecación parcial de los embriones somáticos y se logra el desarrollo de los mismos, lo cual es considerado importante para la posterior germinación de los embriones somáticos y conversión en plántulas.

Se observó durante el proceso de maduración, un incremento significativo en el tamaño de los embriones somáticos en comparación con el que presentaban en el momento de la siembra, expresado por un crecimiento de los cotiledones y además se manifestó un cambio de coloración observándose la presencia de un color verde intenso.

En todos los clones evaluados, los mayores porcentajes de embriones somáticos maduros se obtuvieron en la concentración de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ABA (Figura 11) y se destacaron los clones INIVIT B 93-1 e INIVIT B 90-1 con más del 85,0% y el Jewel cerca del 80,0%, existiendo diferencias significativas con las demás concentraciones en todos los clones.

Los clones CEMSA 78-354 y Yabú-8 presentaron los valores más bajos en la maduración de los embriones somáticos con 45,0 y 50,0%, respectivamente, difiriendo significativamente del resto de las concentraciones evaluadas para cada clon. Con el empleo de las demás concentraciones los resultados fueron menos favorables en la maduración de los embriones somáticos y en el medio libre de reguladores del crecimiento se alcanzó, en algunos clones como el Yabú-8 y el CEMSA 78-354, valores entre 0 y 10,0%, respectivamente.

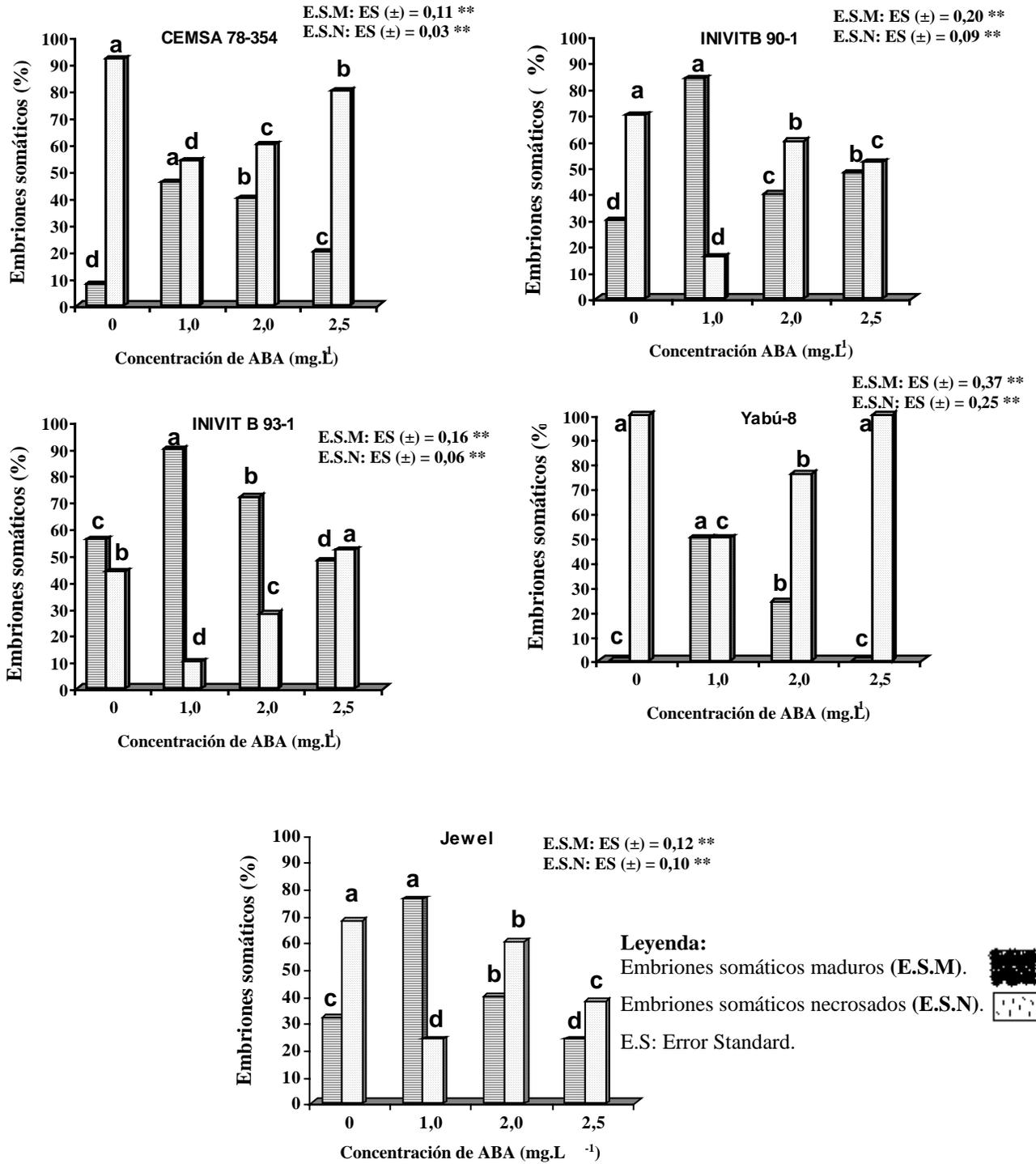


Figura 11. Influencia del ABA en la maduración de los embriones somáticos.

(Letras iguales no difieren significativamente entre sí para Duncan, $p \leq 0,05$)

Torres y col. (2001) y González (2003), en boniato y cafeto, respectivamente, encontraron que en ausencia de ABA en el medio de cultivo, los embriones somáticos no maduraron, muchos presentaron anomalías y un desarrollo unipolar. En la presente investigación en ausencia de ABA los embriones somáticos se necrosaron y no germinaron, trayendo consigo que se demore la germinación de los mismos y no desarrollan en plántulas, un comportamiento completamente diferente al observado en presencia de este regulador, lo cual según los autores antes mencionados, pudiera deberse a que en presencia de ABA se inhibe la división celular, favoreciendo el completo desarrollo de los embriones somáticos formados durante el proceso.

Algunos autores han destacado el papel del ABA en los medios de cultivo para la maduración de los embriones somáticos, como es el caso de González y col. (2000), al estudiar la regulación del desarrollo de embriones somáticos en cafeto, logrando mayor calidad de los embriones somáticos tanto en sincronía como en morfología al emplear $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ABA en el medio de cultivo, lo cual corrobora lo planteado en relación con el efecto que éste ejerce sobre la maduración de los embriones somáticos.

Parrot (2002); Jiménez (2002) y Corredoira y col. (2003), plantearon que los embriones somáticos requieren del uso de reguladores del crecimiento antes de germinar y convertirse en plántulas, siendo necesario el proceso de maduración, el cual se caracteriza por la acumulación de sustancias de reservas de forma análoga a la madurez fisiológica de los embriones cigóticos que conforman las semillas; lo que corrobora los estudios realizados por Aderkas y col. (2001), los cuales señalaron que la maduración comienza cuando el embrión somático completa el proceso de histodiferenciación y después el crecimiento por mitosis se detiene y las células se comienzan a expandir y acumular sustancias de reservas, especialmente, proteínas y carbohidratos que ayudan a incrementar la tolerancia a la desecación y al estrés provocado bajo las condiciones artificiales. Por otra parte, la maduración de los embriones somáticos posibilita la obtención de vitroplantas aptas para soportar la fase de aclimatización (Bhojwani y Razdan, 1996; Castillo, 2000; Hilde e Inzé, 2001).

El efecto del ABA en la maduración de los embriones somáticos ha sido estudiado por otro grupo de autores, tales como Barranco (2000); Ashok y col. (2003); González (2003) y Langhansová y col. (2004), al evaluar el empleo de este regulador del crecimiento en cultivos de banano, pepino (*Cucumis sativus*), cafeto y plantas medicinales como el

ginseng (*Panax ginseng*), respectivamente, los cuales plantearon que los embriones somáticos necesitan ser colocados en un medio de cultivo específico para favorecer la maduración de los mismos y la acumulación de sustancias de reserva, garantizando la obtención de una respuesta adecuada a las siguientes fases del proceso.

Los resultados alcanzados en el presente estudio, se encuentran en correspondencia con los autores antes mencionados y con lo planteado por Sánchez y col. (2003); Mauri y Manzanera (2003), en el árbol del caucho (*Quercus ilex* L.), quienes encontraron que el proceso de maduración de los embriones somáticos, posibilitó el aumento de la germinación de los mismos.

Según Danso y Ford (2004), el análisis de las concentraciones de ABA a emplear resulta importante para la conversión en plántulas de los embriones somáticos y éste constituye el regulador del crecimiento mayormente usado durante el proceso de maduración de los mismos. En la presente investigación se seleccionó la concentración de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para ser empleada con esta finalidad.

De manera general, se puede plantear que los mejores resultados en la maduración se alcanzaron al colocar los embriones somáticos en el medio de cultivo que contenía ABA a la concentración de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.8. Experimento VIII: Germinación de los embriones somáticos.

En los medios suplementados con 6-BAP (MG₆, MG₇ y MG₈) y Kinetina (MG₉, MG₁₀ y MG₁₁), no se produjo la germinación de los embriones somáticos en ninguno de los clones.

Los clones CEMSA 78-354 y Yabú-8 no respondieron a ninguno de los medios empleados, permaneciendo los embriones somáticos en el estadio cotiledonal y necrosándose posteriormente. Ambos clones pueden ser considerados como muy recalcitrantes según lo planteado por Jarret (1989), al expresar que la germinación constituye una etapa crítica en el proceso de embriogénesis somática, siendo muy frecuente la baja respuesta de los mismos y en ocasiones no se lleva a cabo.

Según Orellana (1998), un factor de gran importancia en el cultivo *in vitro* es el genotipo que se trabaje, ya que el índice de propagación es diferente para cada una de las especies y para los diferentes clones dentro de la especie. En muchos casos las

diferencias entre los genotipos puede ser determinante, existiendo algunos cuya multiplicación es extremadamente difícil, conocidos como genotipos “recalcitrantes”.

Es válido destacar que, los resultados alcanzados en el presente estudio difirieron de los informados por Jarret (1989); Salinas *y col.* (1990); Cantliffe (1993), al emplear con éxito el 6-BAP y la Kinetina en el medio de cultivo para la germinación de los embriones somáticos en clones de boniato diferentes a los evaluados en la presente investigación.

Como se puede observar en la tabla 13, la concentración de 0,25 mg.L⁻¹ de tidiazurón (TDZ) ofreció los mayores valores en la germinación de los embriones somáticos, los cuales se muestran en la figura 12A; presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos en los tres clones; al emplearse una concentración inferior o superior, se produjo un efecto depresor sobre ésta.

Onay *y col.* (2000) en frutales y Motoike *y col.* (2001) en el cultivo de la vid (*Vitis vinifera*), emplearon concentraciones de 0,2 y 0,25 mg.L⁻¹ de TDZ, respectivamente, para la germinación de los embriones somáticos, obteniendo buenos resultados. Por otro lado, estudios relacionados con los procesos de germinación en el cultivo *in vitro* han sido abordados por Freire (2002), en trabajos realizados en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y el mayor porcentaje de germinación de los embriones somáticos (53,8%), se obtuvo cuando fueron sometidos a una fase de maduración previa a la germinación.

Tabla 13. Efecto de la composición del medio de cultivo en la germinación de los embriones somáticos.

Tratamientos		Germinación de los embriones somáticos (%).		
		Clones evaluados		
Medio de germinación	Composición del medio de cultivo (mg.L ⁻¹)	INIVIT B 90-1	INIVIT B 93-1	Jewel
MG ₁	MS + NO ₃ ⁻ (mitad) sin reguladores del crecimiento	4,0 d	8,0 c	10,0 d
MG ₆	TDZ (0,1)	44,0 b	30,0 b	40,0 c
MG ₇	TDZ (0,25)	50,0 a	60,0 a	60,0 a
MG ₈	TDZ (0,4)	35,0 c	30,0 b	55,0 b
...	ES (±)	0,16 **	0,21 **	0,18 **



Figura 12. Obtención de vitroplantas. **(A)**: Germinación y conversión de los embriones somáticos en plántulas. **(B)**: Vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$). La reducción de los nitratos a la mitad en el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento (MG_1) y el empleo de los nitratos en el medio al ciento por ciento sin reguladores del crecimiento (MG_2), han sido recomendados para favorecer la germinación de los embriones somáticos en especie leñosas (Mauri y Manzanera, 2003; Corredoira y col., 2003). Sin embargo, no resultaron favorables en la presente investigación, ya que con el empleo de los nitratos en el medio de cultivo al ciento por ciento no se obtuvieron resultados y con el nitrato a la mitad se obtuvieron valores muy bajos para este tratamiento en los clones evaluados y como se observa en la tabla 13, resultó inferior al resto.

Según Jiménez (2001), pueden existir fallas en la germinación de los embriones somáticos seleccionados como maduros por sus características morfológicas y esto puede estar dado porque fisiológicamente no han alcanzado el grado de madurez que le permita la germinación en un medio apropiado; por lo que es poco frecuente lograr el 100% de germinación en especies vegetales aún cuando morfológicamente los embriones somáticos posean características de madurez.

De Fera (2001); Walker y Parrot (2001), plantearon que la germinación de los embriones somáticos constituye un paso importante para la validación *in vitro* de cualquier proceso embriogénico y es uno de los mayores obstáculos durante el proceso de la embriogénesis somática de numerosas especies.

Los resultados obtenidos en la presente investigación demostraron que el TDZ tuvo un efecto positivo en la germinación de los embriones somáticos en *Ipomoea batatas*, ya que posee una alta actividad como citoquinina, estimulando en general la germinación de los mismos y es por ello que se ha utilizado además, para la regeneración de plántulas a partir del cultivo *in vitro* en especies recalcitrantes y en la micropropagación de un gran número de cultivos (Murthy y col., 1998). Por otro lado, Fehér y col. (2003) en estudios realizados en alfalfa, señalaron la importancia del uso de las citoquininas en la germinación de los embriones somáticos y entre ellos se destaca el empleo del TDZ.

En trabajos realizados por Feitosa y col. (2004) en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), obtuvieron buenos resultados con el TDZ ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) logrando más del 80,0% en la germinación. Mientras que, Benega y col. (2000), lo emplearon en la germinación de embriones somáticos en piña (*Ananas comosus* (L.) Mer.), mostrando

los mismos en presencia de TDZ ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) un color verde y una rápida germinación, con resultados muy similares a los encontrados en esta investigación.

La germinación constituye una etapa importante a tener en cuenta en el proceso de embriogénesis somática, lo cual se demuestra por los resultados obtenidos en el presente trabajo, los que a su vez superaron los porcentajes de germinación de embriones somáticos alcanzados por otros autores en diferentes clones de esta especie, entre los que se encuentran Salinas y col. (1991); López y col. (2002), los que obtuvieron entre 20,0 y 30,0%, respectivamente, con el empleo del TDZ en el medio de cultivo, los cuales expresaron que la germinación está determinada por el genotipo y consideraron los clones que no respondieron como “recalcitrantes”.

Al respecto, Payro y Vidal (2002); Medero y col. (2002), plantearon que la embriogénesis somática tiene como limitante principal el bajo porcentaje de germinación, aspecto que dificulta su aplicación en la producción masiva de plantas, de ahí la importancia de los resultados obtenidos en esta investigación para el establecimiento de una metodología de uso práctico en *Ipomoea batatas*, con el empleo de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ en el medio de cultivo al alcanzar entre el 50,0 y 60,0% en la germinación de los embriones somáticos.

La germinación de los embriones somáticos en el cultivo del boniato, resultó favorecida con el uso del TDZ ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$), en comparación con los demás tratamientos empleados, al ser obtenido en los clones evaluados un mayor número de embriones somáticos germinados.

4.9. Experimento IX: Conversión en plántulas.

A partir de los embriones somáticos germinados, se logró la conversión en plántulas luego de ser transferidos al medio de cultivo con GA_3 , como se observa en las figuras 12A y 12B, y los mayores valores se obtuvieron con $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabla 14), donde se alcanzó un 100% de conversión en los tres clones que lograron germinar, existiendo diferencias significativas con el resto de los tratamientos; se obtuvieron valores significativamente inferiores y muy bajos cuando se empleó una menor concentración; mientras que, con la más alta concentración utilizada ($15,0 \text{ mg.L}^{-1}$) sólo se lograron plántulas en bajo porcentaje (10,0%) en el clon Jewel.

Tabla 14. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃ en la conversión en plántulas.

Tratamientos		Conversión en plántulas (%)		
		Clones evaluados		
Medio de conversión	GA ₃ (mg.L ⁻¹)	INIVIT B 90-1	INIVIT B 93-1	Jewel
MC ₁	5,0	10,0 b	15, b	10,0 b
MC ₂	10,0	100 a	100 a	100 a
MC ₃	15,0	0 c	0 c	10,0 c
...	ES (±)	0.24 **	0,26 **	0,21 **

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

Werbrouck y col. (2000); Sánchez y col. (2003) emplearon el GA₃ para la conversión en plántulas a partir de embriones somáticos de *Spathiphyllum* y en plantas leñosas, respectivamente, obteniendo buenos resultados. Los porcentajes de conversión en plántulas a partir de embriones somáticos en algunos cultivos son aún bajos, tal es el caso de *Musa acuminata* que mostró porcentajes de conversión entre 10,0 y 17,4% (Escobedo, 1996), al igual que en el boniato por López y col. (2002) que obtuvieron 18,2% de plantas regeneradas. En el presente trabajo se lograron resultados superiores a los alcanzados por los autores antes mencionados y los obtenidos en el cultivo del boniato por Salinas y col. (1991) y Cantliffe (1993), quienes alcanzaron 28,0 y 32,0%, respectivamente.

Según Escalona (1999) y Jiménez (2005), en el cultivo *in vitro* es reconocido el papel del GA₃ en la elongación de los brotes y su adición en el medio puede suplir el déficit endógeno de este regulador del crecimiento en los mismos y los estudios relacionados con los niveles endógenos de GA₃ en el proceso de embriogénesis somática son limitados, pero se conoce de su efecto en esta etapa *in vitro* y la importancia de la adición del GA₃ al medio, el cual actúa como estimulante en el proceso, estos resultados fueron citados en cítricos por Jiménez y col. (2001).

En la tabla 15 se observan los valores de altura de las plántulas a los 20 días, obteniéndose el mejor resultado en el clon INIVIT B 93-1 con 10,0 mg.L⁻¹ de GA₃, tratamiento que superó significativamente al resto; en los clones INIVIT B 90-1 y Jewel de igual manera que en el clon anterior, la mayor altura de las plántulas se obtuvo con la

concentración de 10,0 mg.L⁻¹ de GA₃, con medias de 6,9 y 5,6 cm, respectivamente, difiriendo significativamente de las demás concentraciones y entre ellos.

Al evaluar el número de hojas por plántula, el mejor comportamiento se obtuvo en el clon INIVIT B 90-1 a las concentraciones de 5,0 y 10,0 mg.L⁻¹ de GA₃, las cuales superaron significativamente al resto de los tratamientos evaluados.

En los clones INIVIT B 93-1 y Jewel las medias mayores se alcanzaron con 10,0 mg.L⁻¹ de GA₃, aunque sin diferencias significativas en el primero para la concentración de 15,0 mg.L⁻¹ y en Jewel con la concentración de 5 mg.L⁻¹; poniéndose de manifiesto la influencia del genotipo en la respuesta a concentraciones mayores o menores de este regulador.

En la concentración de 10,0 mg.L⁻¹ se alcanzaron los mayores resultados en la longitud de las raíces, donde se destacó el clon INIVIT B 90-1 con el mayor valor, el cual difirió significativamente del resto de los tratamientos evaluados.

Tabla 15. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃ en el crecimiento de las plántulas.

Clones	Medio de conversión	Concentración de GA ₃ (mg.L ⁻¹)	Altura de las plántulas (cm)	Número de hojas por plántula	Longitud de las raíces (cm)
INIVIT B 90-1	MC ₁	5,0	5,9 d	6,0 a	9,5 c
	MC ₂	10,0	6,9 c	5,9 a	13,4 a
	MC ₃	15,0	5,5 e	4,8 b	10,4 b
INIVIT B 93-1	MC ₁	5,0	7,8 b	3,2 e	8,1 d
	MC ₂	10,0	8,3 a	3,8 d	9,9 bc
	MC ₃	15,0	7,0 c	3,6 d	8,4 d
Jewel	MC ₁	5,0	4,7 f	4,9 b	5,8 g
	MC ₂	10,0	5,6 de	5,2 b	7,1 e
	MC ₃	15,0	4,1 g	4,0 c	6,3 f
--	--	ES (±)	0,15 ***	0,15 ***	0,21 ***
--	--	CV (%)	8,26	10,60	5,75

Medias con letras iguales no difieren entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

De manera general, fue observado un efecto favorable con la concentración de 10,0 mg.L⁻¹ de GA₃ en las variables evaluadas en las plántulas provenientes de todos los clones y al alcanzar un mayor tamaño, la morfología de las vitroplantas se correspondió con la de plantas normales, ya que contaban con dos o más hojas verdaderas de forma y color en correspondencia con las características morfológicas de los clones evaluados.

4.10. Experimento X: Análisis bioquímicos y moleculares.

4.10.1. Análisis bioquímicos.

Las peroxidasas es el sistema enzimático más estudiado, catalizan la oxidación de fenoles y están implicadas en los procesos de crecimiento, respiración y resistencia a enfermedades (Iglesias y González, 1995), por tal motivo su estudio es de gran importancia en la evaluación de la variabilidad de las diferentes especies.

El número y posición de las bandas correspondientes al sistema peroxidasas (Px) fueron idénticas para los cinco clones estudiados, así como para las vitroplantas pertenecientes al clon INIVIT B 93-1; lo cual indica que, al parecer, el proceso de embriogénesis somática no indujo variación en este sistema para este clon.

El sistema peroxidasas se caracterizó por la presencia de nueve bandas, de las cuales cuatro presentaron mayor grosor e intensidad de tinción (bandas 1, 4, 7 y 9), en comparación con las restantes bandas obtenidas (Figura 13).

No hubo diferencias en el perfil isoenzimático de los callos potencialmente embriogénicos y los no embriogénicos. Sin embargo, en los callos que hubo presencia de embriones somáticos no apareció la banda seis. La banda siete estuvo presente sólo en los tres tipos de callos, tanto potencialmente embriogénicos como no embriogénicos y con embriones somáticos, por lo que parece, su actividad está relacionada con el proceso propio de la callogénesis.

El sistema esterasas (Est) resultó el más polimórfico; en el zimograma del mismo se observan un total de quince bandas, de las cuales, ocho fueron comunes a todos los clones (Figura 14). Entre los clones se presentaron diferencias, ya que todos mostraron distintos zimotipos, al existir bandas propias o ausencia de algunas bandas entre éstos, por lo que el sistema podría emplearse para su identificación. Las vitroplantas obtenidas del clon INIVIT B 93-1 a partir de embriones somáticos poseen idéntico zimotipo que el

clon donante; lo cual indica que, el proceso de embriogénesis somática no indujo variación para este sistema.

Los callos potencialmente embriogénicos y con embriones somáticos pertenecientes al clon INIVIT B 93-1, mostraron idénticos patrones de bandas y se diferenciaron del callo no embriogénico porque este último no presentó la banda 2, caracterizada por una alta intensidad de tinción; lo cual puede ser un elemento de gran importancia para identificar callos potencialmente embriogénicos y esto permitirá desde etapas muy tempranas del proceso, poder seleccionar los callos con estas características, lo que denota la síntesis de determinadas formas proteicas para los estadios de desarrollo del callo, siendo esto estudiado por González (2001) en henequén y Hernández *y col.* (2004) en boniato, al expresar que el hecho de haberse encontrado el mismo patrón de bandas para las muestras de los callos, sugiere que esta técnica puede ser utilizada para detectar patrones comunes entre los materiales en el proceso de embriogénesis somática e identificar la posible utilización de los mismos en la caracterización de los callos con potencialidades embriogénicas.

Moré (2000) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*, L.), al realizar estudios con el empleo del sistema esterasas, destacó la presencia de bandas distintas en los callos, lo cual indica la factibilidad de su empleo en la caracterización de los mismos. De igual manera, Bapat *y col.* (1992), en trigo (*Triticum aestivum*, L.), señalaron la importancia de la caracterización de los perfiles isoenzimáticos de las esterasas durante el proceso de formación de callos potencialmente embriogénicos y no embriogénicos.

Según Cavalcante *y col.* (1994), el estudio de las isoenzimas se considera apropiado para distinguir entre los callos potencialmente embriogénicos y los no embriogénicos en el cultivo del boniato, siendo éste un factor asociado con la actividad isoenzimática, lo cual se corroboró en este estudio para el sistema esterasas.

En la especie *I. batatas* el sistema esterasas posee un valor taxonómico marcado, pudiendo servir para identificar los diferentes clones, y de igual forma, la banda 2 puede emplearse para seleccionar los callos potencialmente embriogénicos.

El sistema anhidrasa carbónica (AC) mostró trece bandas (Figura 15), caracterizadas en su mayoría por una gran intensidad de tinción; diez de ellas fueron comunes a todos los clones, solamente el CEMSA 78-354 e INIVIT B 93-1, tuvieron idénticos zimotipos diferenciándose del resto y éstos entre sí por la presencia o ausencia de alguna banda.

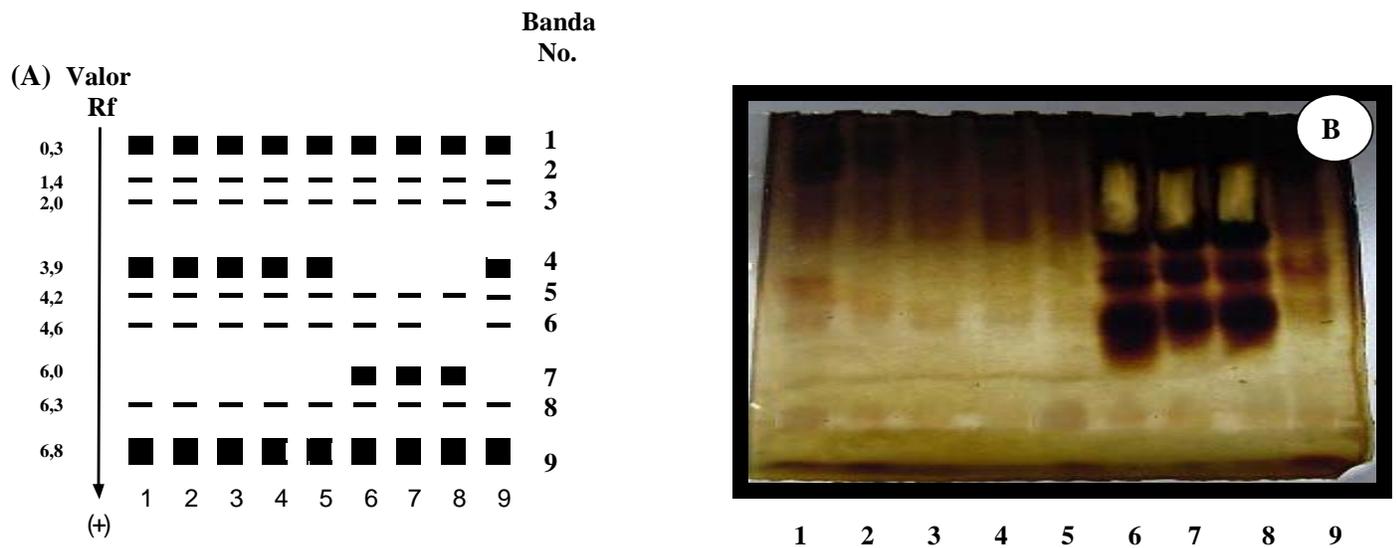


Figura 13. Zimograma del sistema isoenzimático peroxidadasas (A) y foto del gel (B).

Legenda: Representación en columnas de los clones CEMSA 78-354 (1), INIVIT B 90-1 (2), Jewel (3), Yabú-8 (4) e INIVIT B 93-1 (5), callos no embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (6), callos potencialmente embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (7), callos con embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (8) y vitroplantas regeneradas a partir de embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (9).

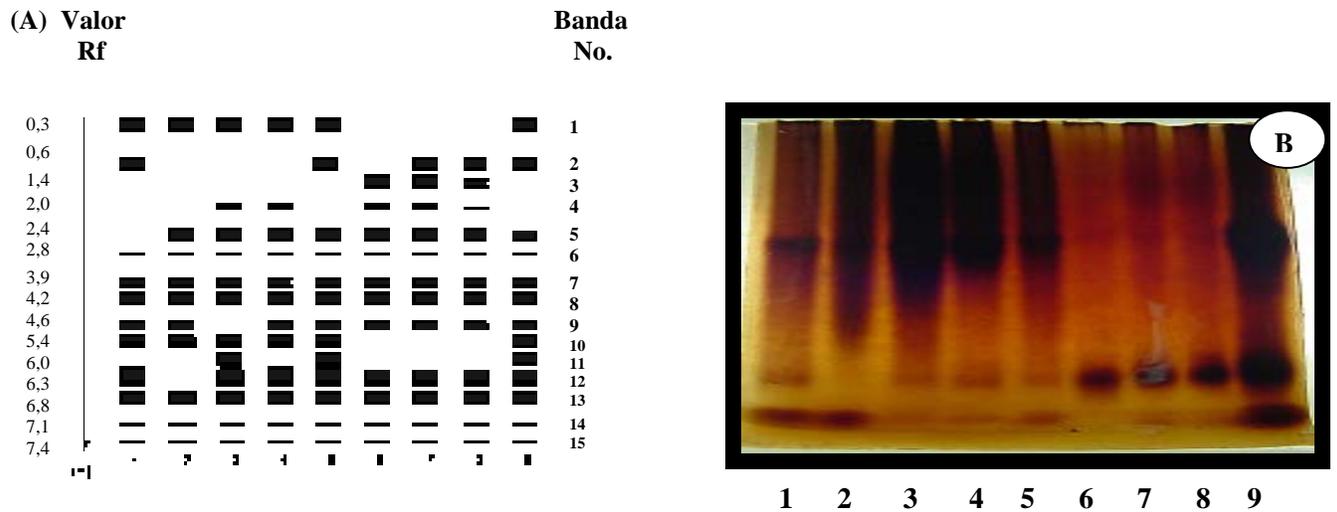


Figura 14. Zimograma del sistema isoenzimático esterasas (A) y foto del gel (B).

Leyenda: Representación en columnas de los clones CEMSA 78-354 (1), INIVIT B 90-1 (2), Jewel (3), Yabú-8 (4) e INIVIT B 93-1 (5), callos no embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (6), callos potencialmente embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (7), callos con embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (8) y vitroplantas regeneradas a partir de embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (9).

El análisis de los patrones de anhidrasa carbónica no mostró diferencias entre las plantas donantes y las vitroplantas del clon INIVIT B 93-1.

Beovides (2002), en estudios realizados con este sistema en el cultivo de la yuca, al evaluar el material propagado *in vitro*, encontró que existió uniformidad en el número de bandas obtenidas en comparación con el material donante.

Según Román (2004), se han realizado estudios de la anhidrasa carbónica en diferentes especies de plantas, pero aún se encuentra poco estudiada. Aunque no se cuenta con evidencias de su caracterización en el boniato, se sabe que esta es una de las proteínas solubles más abundantes y se encuentra, fundamentalmente, en los cloroplastos (Lara y col., 2003). Estos mismos autores plantearon que resulta de gran importancia el empleo de las isoenzimas para evaluar los procesos que tienen lugar cuando se utilizan las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y más aún, cuando se utilizan reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, entre los que se encuentra el 2,4-D, cuya utilización reviste una gran importancia para el proceso de embriogénesis somática, el cual es utilizado a bajas concentraciones en el presente trabajo.

El empleo del 2,4-D en la embriogénesis somática del henequén, no produjo variabilidad genética en el material obtenido (González, 2001), lo cual es corroborado con los resultados logrados en la presente investigación. El análisis de la estabilidad genética en las vitroplantas, es de gran importancia en la validación del empleo de la embriogénesis somática como método de propagación del material vegetal de manera estable, lo que fue planteado en los resultados obtenidos por González y col. (2002), en investigaciones relacionadas con la embriogénesis somática en henequén.

La posible presencia de variabilidad genética en plántulas obtenidas a partir de embriones somáticos, ha sido analizada por diversos autores (Arias y col., 1997; Iglesias y Casas, 2004), en diferentes cultivos como la piña y especies forestales, respectivamente. Resulta interesante destacar que Santana (1993); Montes y col. (1995), observaron una gran homogeneidad genética entre las poblaciones obtenidas a partir de embriones somáticos en cafeto, al encontrar los mismos perfiles e intensidad de las bandas en los sistemas estudiados, por lo que algunos autores le confieren una gran importancia a estos estudios, entre los cuales podemos citar a González y col. (2001); Oliveira y col. (2002), en trabajos realizados en los cultivos de tabaco (*Nicotiana* sp.) y boniato, respectivamente.

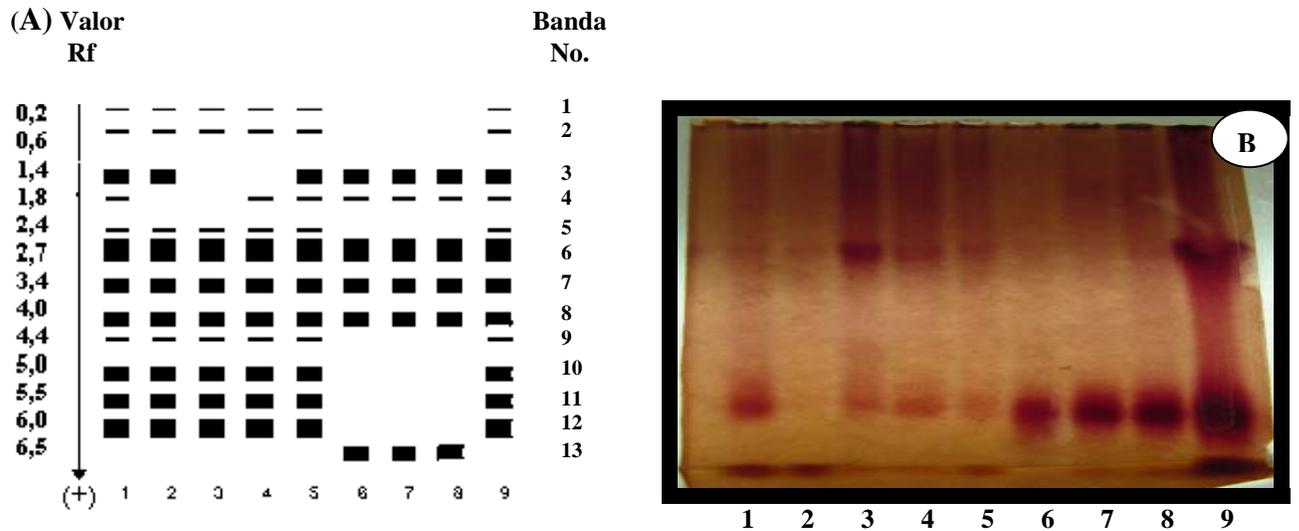


Figura 15. Zimograma del sistema isoenzimático anhidrasa carbónica (A) y foto del gel (B).

Leyenda: Representación en columnas de los clones CEMSA 78-354 (1), INIVIT B 90-1 (2), Jewel (3), Yabú-8 (4) e INIVIT B 93-1 (5), callos no embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (6), callos potencialmente embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (7), callos con embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (8) y vitroplantas regeneradas a partir de embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (9).

En la figura 16 se representa el dendrograma obtenido a partir de la información aportada por los zimogramas de los diferentes sistemas evaluados, en el que se observa para un índice de similitud del 0,86 la formación de dos grupos, en el primero se encuentran los cinco clones estudiados y las vitroplantas obtenidas a partir de los embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1, lo que denota la afinidad genética de este material y en el segundo grupo se encuentran los tres tipos de callos evaluados.

Los resultados anteriores constituyen una evidencia en la que el proceso de embriogénesis somática, para el clon analizado, no indujo variabilidad genética en las vitroplantas obtenidas con respecto al donante.

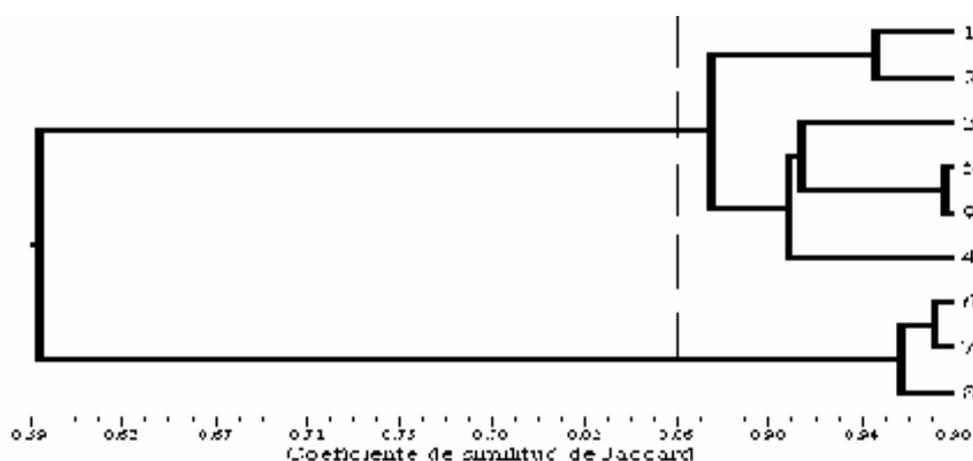


Figura 16. Dendrograma obtenido a partir de la matriz de similitud por el índice de Jaccard.

Leyenda: CEMSA 78-354 (1), INIVIT B 90-1 (2), Jewel (3), Yabú-8 (4) e INIVIT B 93-1 (5), callos no embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (6), callos potencialmente embriogénicos del clon INIVIT B 93-1 (7), callos con embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (8) y vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1 (9).

Según Cullis y Kumed (2000); Valencia y *col.* (2002), en trabajos realizados en banano, plantearon que llevar a cabo el estudio de los análisis bioquímicos con la finalidad de monitorear o identificar las variaciones somaclonales es de gran importancia, ya que este es un fenómeno muy difundido en las plantas provenientes de cultivo de tejidos y la aplicación de los mismos resulta de interés en los programas donde se apliquen los métodos biotecnológicos.

En el cultivo del boniato no se han desarrollado estudios para monitorear la estabilidad de las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos, por lo que los resultados obtenidos revisten gran importancia al demostrar la factibilidad del empleo de algunos sistemas con este fin.

4.10.2. Análisis moleculares del ADN.

Un total de diez cebadores ensayados en el experimento, siete produjeron una amplificación aceptable en cuanto a la intensidad de bandas (OPF-15, OPF-14, OPF-04, OPF-07, OPF-01, OPA-12 y OPF-05) y los cebadores más informativos fueron el OPF-01, OPA-12 y OPF-07, al generar el mayor número de bandas en el donante y las vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos (Tabla 16), coincidiendo el total de bandas obtenidas para el donante y las vitroplantas con todos los cebadores empleados (Figura 17), existiendo un alto monomorfismo entre ambos materiales (100%).

Tabla 16. Resultados del análisis de los RAPD en el material donante y el material regenerado a partir de embriones somáticos en el clon INIVIT B 93-1.

Cebador	Secuencia	Clon INIVIT B 93-1			
		Total de bandas (n)		Bandas monomórficas	Monomorfismo (%)
		Donante	Regenerado		
OPF-15	CCAGTACTCC	4	4	4	100
OPF-14	TGCTGCAGGT	2	2	2	100
OPA-13	CAGCACCCAC	5	5	5	100
OPF-13	GGCTGCAGAA	1	1	1	100
OPF-04	GGTGATCAGG	3	3	3	100
OPF-07	CCGATATCCC	5	5	5	100
OPF-01	ACGGATCCYG	6	6	6	100
OPF-03	CCTGATCACC	2	2	2	100
OPA-12	TCGGCCATAG	6	6	6	100
OPF-05	CCGAATTCCC	6	6	6	100
---	Total	40	40	40	100

Según Cornide *y col.* (2002) y Ramírez (2005), los marcadores moleculares son una herramienta eficaz para monitorear la estabilidad genética del material vegetal. Referente al empleo de los marcadores moleculares, Rodríguez y Arencibia (2002); Coto y Cornide (2002), plantearon que los mismos brindan más información que los marcadores morfológicos, pues el polimorfismo detectado es mayor y no están influenciados por el ambiente.

La funcionalidad de los cebadores empleados en este trabajo, para detectar variación genética, ha sido informada por Peteira *y col.* (1999) y Peteira *y col.* (2001), en estudios de diversidad genética en diferentes especies vegetales del género *Lycopersicon*, quienes demostraron que los mismos son efectivos para estos estudios y no han sido señalados con anterioridad para el cultivo del boniato, por lo que deberán probarse otros cebadores antes de hacer conclusivos los resultados de monomorfismo encontrados para el donante y las plantas regeneradas a partir de embriones somáticos del clon INIVIT B 93-1.

Las isoenzimas y los RAPD han sido usados extensamente para determinar diversidad genética y relaciones entre especies (Ipek e Ipek, 2003; Bamberg y del Río, 2003). En el cultivo del boniato, los estudios moleculares con el empleo de RAPD han sido usados en algunos cultivares para la estimación de la diversidad genética, para el mapeo genético y la localización de genes para resistencias a nemátodos en las raíces (Tseng *y col.*, 2001), no existiendo reportes en lo referente a estudios llevados a cabo en el material propagado vía embriogénesis somática.

Las semejanzas observadas en el ADN genómico del clon donante y sus vitroplantas evidenciaron la estabilidad genética de las mismas. Los resultados indicaron una total correspondencia entre las secuencias de ADN que fueron determinadas.

Al respecto, Sánchez *y col.* (2003), plantearon que los análisis de RAPD pueden ser usados para la identificación de cultivares; además, para distinguir diferencias entre genotipos. Mientras que por otro lado Medero *y col.* (2004), en el cultivo de la yuca, al comparar plantas donantes con vitroplantas procedentes de embriones somáticos, determinaron mediante el empleo de marcadores morfoagronómicos y moleculares (AFLP), que las plantas obtenidas de los embriones somáticos fueron genéticamente estables, y ésto a su vez, confirmó la posibilidad de emplear la embriogénesis somática como una vía de micropropagación acelerada en este cultivo.

Desde el punto de vista bioquímico y molecular, el cultivo del boniato ha sido poco investigado, aspecto éste que se hace necesario enfatizar, ya que según González (2003), la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales requieren como análisis complementarios los estudios de la estabilidad genética del material obtenido, a fin de conocer el comportamiento del mismo, luego de haber sido sometido a este proceso, representando estos resultados el primer reporte de aplicación de los RAPDs al análisis de la estabilidad de plantas obtenidas vía embriogénesis somática en el boniato. De manera general puede plantearse que, la amplificación del ADN de los materiales con los cebadores utilizados, produjo un alto grado de monomorfismo, presentando las plantas procedentes de embriones somáticos patrones de bandas idénticos al donante en la región del ADN explorada por los mismos.

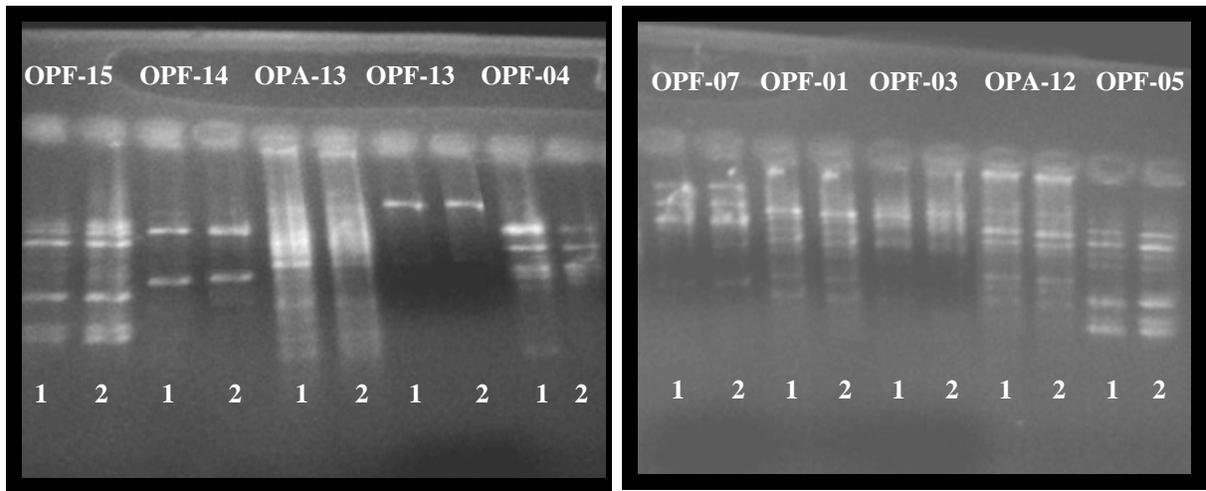
Los estudios de los marcadores moleculares en el cultivo del boniato han sido muy limitados y más aún en la determinación de la estabilidad genética en plantas obtenidas a partir de embriones somáticos; de ahí que podamos plantear que los resultados obtenidos en la presente investigación, constituye un aporte científico y por primera vez en Cuba se informa de los resultados alcanzados con la aplicación de los RAPD a plantas propagadas a través de embriones somáticos en la especie *Ipomoea batatas*.

4.11. Experimento XI: Aclimatización de las vitroplantas.

La aclimatización de las vitroplantas posibilita a las mismas continuar su ciclo vegetativo, ya que las condiciones de laboratorio, en ocasiones, provoca cambios anatómicos y fisiológicos que repercuten en la supervivencia de estas en las condiciones *ex vitro* y no se encuentran aptas para soportarlas, de ahí la necesidad de estudiar detenidamente esta etapa (González, 2003).

A los diez días posteriores a la plantación en las bolsas, las plantas procedentes de embriones somáticos pertenecientes a los clones INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1 y Jewel, presentaban un alto porcentaje de supervivencia (el 100% en los dos primeros y el 85,0% en el último), comenzando la emisión de nuevas hojas y con buen vigor.

Los valores de supervivencia de las plantas resultaron elevados en relación con los alcanzados en las investigaciones realizadas por Qing-chang y *col.* (1992) y Qi y *col.* (1996), quienes obtuvieron un 60,5 y 76,2%, respectivamente, al llevar a cabo la



Leyenda:

1 – Material donante.

2- Vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

Figura 17. Productos de la amplificación por PCR del ADN en *Ipomoea batatas* perteneciente al clon INIVIT B 93-1.

aclimatización de vitroplantas de boniato regeneradas a partir de embriones somáticos, empleando como sustrato vermiculita y suelo, respectivamente. Estos autores señalaron que la aclimatización de las vitroplantas constituye una etapa de mucho cuidado en la manipulación y selección de las mismas para lograr éxitos en estas condiciones.

Al respecto, González (2001), ratificó la importancia del estudio de la aclimatización de las vitroplantas y planteó que con una correcta manipulación del material, unido al rejuvenecimiento de los tejidos se pueden lograr altos índices en la aclimatización de las mismas.

En el presente trabajo esta etapa no presentó dificultades, dado el alto índice de supervivencia que se logró en la aclimatización de las vitroplantas, lo cual hace que la metodología propuesta sea válida para la multiplicación de clones en el cultivo del boniato.

Según Rodríguez (2005), el principal problema que afecta las vitroplantas durante la aclimatización es el control estricto de la transpiración durante los primeros días de su traslado a estas condiciones, lo cual es fundamental para alcanzar alta supervivencia.

En el caso que nos ocupa, se empleó una campana de cristal para cubrir las vitroplantas durante los primeros siete días después de la plantación en las bolsas, a fin de disminuir la transpiración en las mismas y de esta manera se garantizó el éxito en esta fase.

En las figuras 18, 19 y 20 se muestra el comportamiento de diferentes variables de las plantas en bolsas a los 20 días posteriores a la plantación a estas condiciones y comparado con las plantas control obtenidas de yemas axilares.

Al ser analizado el clon INIVIT B 90-1, se pudo observar que entre las variables longitud y ancho de las hojas, longitud de los peciolo y número de hojas, no existieron diferencias significativas entre el material control y las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos; mientras que, al evaluar la altura de las plantas y la longitud de las raíces, éstas mostraron diferencias significativas entre ambos materiales, siendo la primera variable superior en las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

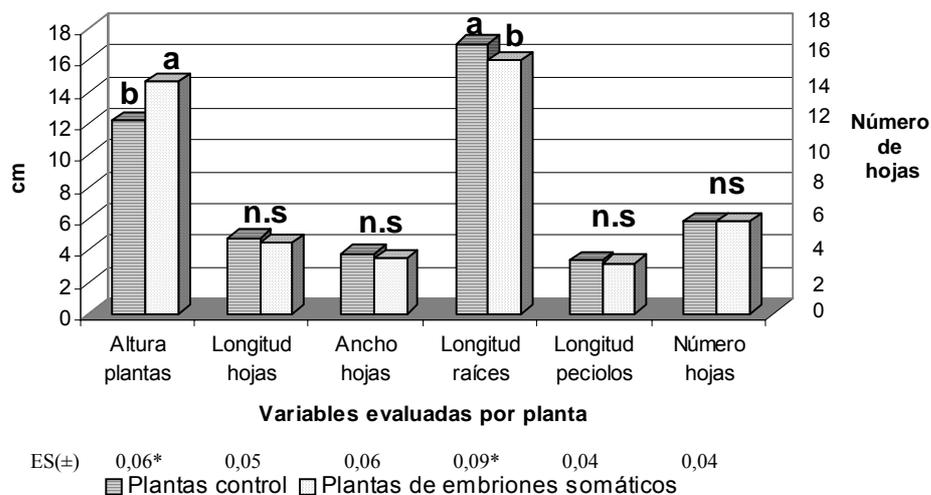


Figura 18. Evaluación de las plantas del clon INIVIT B 90-1.(Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan $p \leq 0,05$)

Al evaluar el comportamiento de las plantas en el clon INIVIT B 93-1 (Figura 19), se observó que no existieron diferencias significativas entre las variables longitud y ancho de las hojas y longitud de los peciolo entre las plantas control y las procedentes de embriones somáticos y en las restantes variables existieron diferencias significativas entre ambas.

Las plantas control resultaron superior en la longitud de las raíces y el número de hojas, aunque los valores de estas variables en las plantas procedentes de embriones somáticos no resultaron desfavorables.

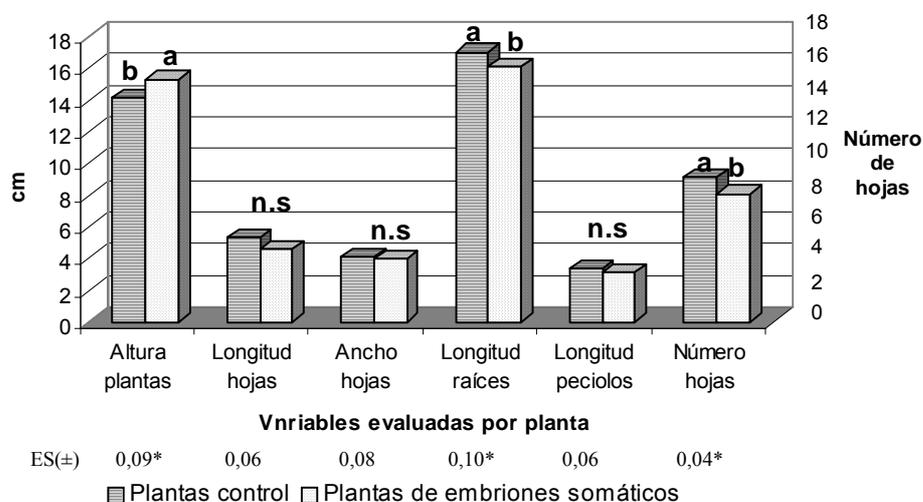


Figura 19. Evaluación de las plantas del clon INIVIT B 93-1. (Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan $p \leq 0,05$)

En la figura 20 se observan los resultados obtenidos en el clon Jewel, donde se aprecia que no existieron diferencias significativas entre las variables longitud de los peciolo y longitud y ancho de las hojas; mientras que, en la altura de las plantas, número de hojas y longitud de las raíces existieron diferencias significativas; en las dos primeras variables, las plantas control fueron superiores a las obtenidas a partir de embriones somáticos, no siendo así en la longitud de las raíces.

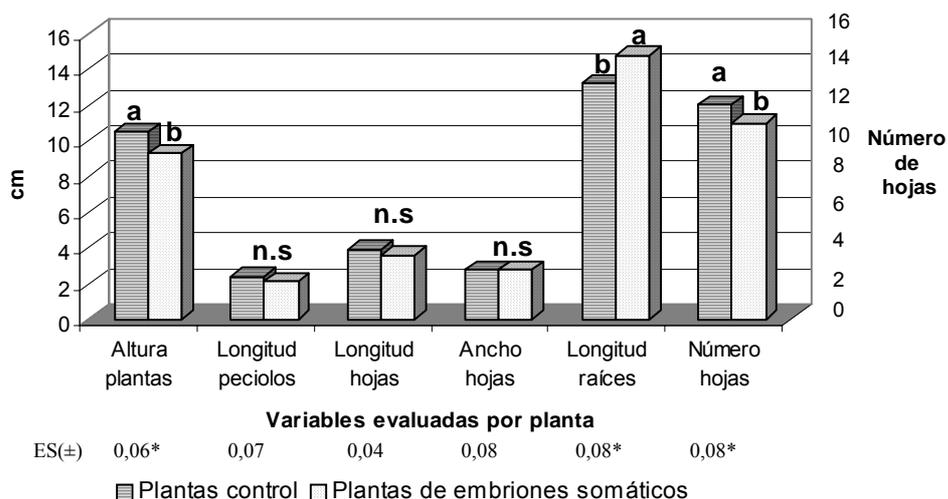


Figura 20. Evaluación de las plantas del clon Jewel. (Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan $p \leq 0,05$)



Figura 21. Vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos. (A): Aclimatización de las vitroplantas en bolsas durante los primeros días. (B): Aclimatización de las vitroplantas en bolsas hasta los 30 días.

De manera general, al efectuar una evaluación cualitativa de las plantas, se pudo observar que las mismas presentaron un buen vigor, alcanzando en todos los clones, valores de las variables evaluadas que se encontraban en el rango establecido para considerarlas como tal.

Trabajos de aclimatización han sido llevados a cabo en plantas obtenidas a partir de embriones somáticos en diferentes especies, tal es el caso de Ashok *et al.* (2003), que refieren la aclimatización de vitroplantas de *Cucurbitaceas* al ser plantadas en bolsas con una mezcla de suelo y materia orgánica colocadas en condiciones de invernadero, los cuales observaron más del 80,0% de supervivencia. En este sentido, Agramonte *et al.* (1998) y Garriga (2003), señalaron que la adaptación de las vitroplantas al medio en condiciones naturales debe ser cuidadosa, pues la respuesta fisiológica cambia, porque durante el cultivo *in vitro* crecen con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso, medios ricos en compuestos inorgánicos y estas condiciones provocan cambios en la morfología de las vitroplantas que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo.

En la tabla 17 se muestra una evaluación cualitativa de las plantas procedentes de embriones somáticos en los clones que fueron llevados a la fase de aclimatización.

Tabla 17. Comportamiento morfológico de las plantas durante la fase de aclimatización.

Clones	Color de las hojas	Forma de las hojas	Morfología de las plantas	Pubescencia
INIVIT B 90-1 (Control)	Verde intenso	Lobulada	Normal	No
INIVIT B 90-1 (Plantas de embriones somáticos)	Verde intenso	Lobulada	Normal	No
INIVIT B 93-1 (Control)	Verde intenso	Cordada	Normal	No
INIVIT B 93-1 (Plantas de embriones somáticos)	Verde intenso	Cordada	Normal	No
Jewel (Control)	Verde	Hastada	Normal	No
Jewel (Plantas de embriones somáticos)	Verde	Hastada	Normal	No

Se observa que no existieron diferencias en el color y la forma de las hojas, la morfología de la planta y la pubescencia entre las plantas empleadas como control y las obtenidas a partir de embriones somáticos; ambas se correspondieron con las de plantas normales y no se apreciaron anomalías ni plantas atípicas en su crecimiento durante esta etapa de aclimatización en bolsas (Figuras 21A y 21B).

4.12. Experimento XII: Evaluación en condiciones de campo.

Se logró un buen crecimiento al ser plantados en condiciones de campo los esquejes del clon INIVIT B 93-1 (Figura 22).

Se pudo observar que las plantas procedentes de embriones somáticos alcanzaron en la altura, longitud de los peciolo y número de hojas por planta, valores superiores al control, existiendo diferencias significativas entre éstos. En las demás variables evaluadas (longitud y ancho de las hojas), los valores alcanzados no difirieron significativamente del control y se observó que no se presentaron variaciones en la morfología de las plantas obtenidas a lo largo de todo el ciclo del cultivo.

Se comprobó el alto grado de supervivencia (100%), el vigor y la sanidad con que crecieron las plantas durante todo el ciclo, posibilitando la disponibilidad de material de siembra para su continuo establecimiento en el campo, lo cual estuvo muy relacionado con la calidad del material y las excelentes condiciones de preparación del suelo que prevalecieron en el momento y posterior a la plantación.

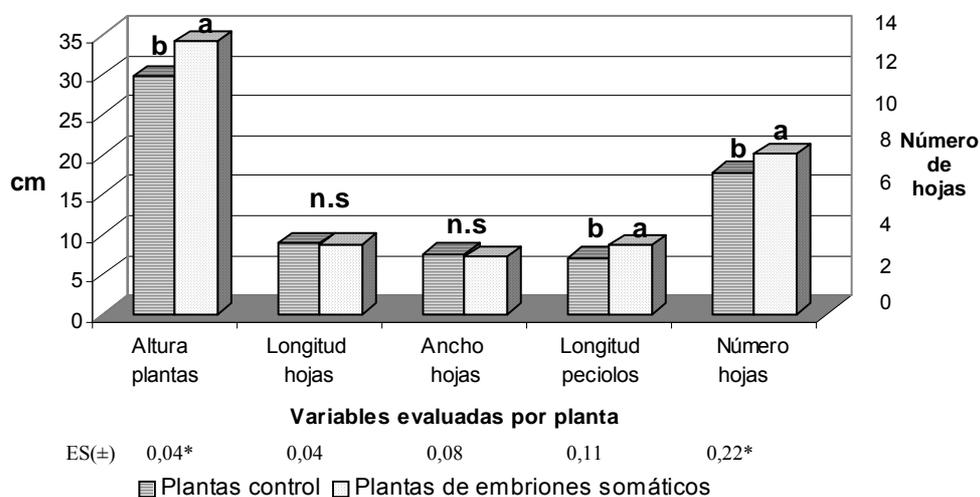


Figura 22. Evaluación de las plantas en campo del clon INIVIT B 93-1.

(Letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan $p \leq 0,05$)

El cierre del campo fue muy semejante entre las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos y las empleadas como control; o sea, las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos mostraron hábitos de crecimiento similares a las obtenidas por la

vía tradicional en cuanto al desarrollo alcanzado (Figura 22A), produciendo raíces tuberosas una vez establecidas en estas condiciones (Figura 22B).

González y col. (1998), indicaron que cualquier sistema de propagación utilizado debe permitir la aclimatización y el posterior desarrollo de las plantas en el campo; siendo importante ya que todo sistema de micropropagación, debe concluir con los estudios de campo del material vegetal obtenido. Según Ortíz (2000) y Malgorzata (2001), para la aplicación de la embriogénesis somática en la agricultura, cualquier sistema *in vitro* debe lograr finalmente la regeneración de plantas.

En la tabla 18 se muestra el comportamiento en la producción de raíces tuberosas y sus componentes en las plantas correspondientes al clon INIVIT B 93-1, el cual fue seleccionado para estudiar el proceso en la fase de campo, debido a que el mismo posee características morfoagronómicas favorables.

Tabla 18. Comportamiento en la producción de raíces tuberosas y sus componentes en las plantas correspondientes al clon INIVIT B 93-1.

Tratamientos	Numero de raíces tuberosas/planta	Raíces tuberosas no comerciales / planta	Masa promedio de la raíz tuberosa (kg)	Masa de raíces tuberosas/planta (kg)	Calibre de las raíces tuberosas	
					Longitud (cm)	Ancho (cm)
Plantas control	4,13	0,33	0,17	0,70	17,52	11,63 a
Plantas de embriones somáticos	4,27	0,53	0,13	0,55	16,27	9,84 b
ES (±)	0,12 n.s	0,18 n.s	0,10 n.s	0,12 n.s	0,20 n.s	0,34 *

Medias con letras iguales no difieren entre sí según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

En la tabla anterior se observa que no se apreciaron diferencias significativas en el número de raíces tuberosas por planta al ser comparado el material procedente de esquejes con el obtenido a partir de embriones somáticos; similar comportamiento se presentó en las raíces tuberosas no comerciales por planta, masa promedio de la raíz tuberosa, masa de raíces tuberosas por planta y longitud de las raíces tuberosas, no existiendo diferencias desde el punto de vista estadístico. El ancho de las raíces tuberosas se vio favorecido en las plantas procedentes de esquejes (control), difiriendo significativamente de las plantas procedentes de embriones somáticos; lo cual pudiera

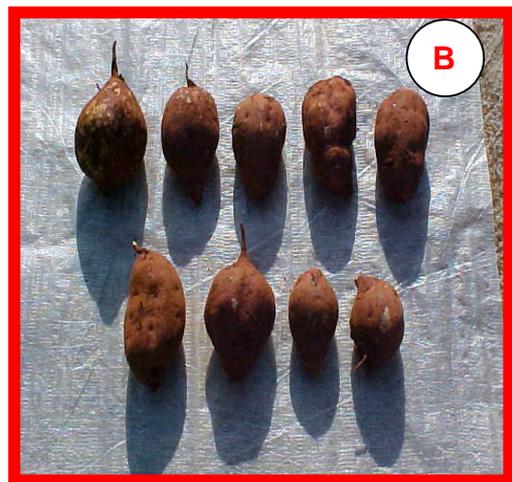


Figura 22A y 22B. Vitroplantas obtenidas a partir de embriones somáticos. **(A)**: Crecimiento y desarrollo de las plantas en el campo. **(B)**: Raíces tuberosas cosechadas de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos.

deberse a que estas últimas necesitan una primera campaña de siembra en el campo para favorecer el crecimiento de las mismas.

En lo referente a la forma de las raíces tuberosas, se observó que esta no varió entre las plantas procedentes de embriones somáticos y las plantas control, la cual fue redondo a ovoide, con predominio del redondo para ambos casos y preferentemente en las raíces tuberosas de mayor calibre. En el momento de la cosecha se presentó un buen desarrollo vegetativo en las plantas.

Los resultados logrados en el presente trabajo están en correspondencia con los alcanzados por Medero y *col.* (2004), en el cultivo de la yuca, los cuales encontraron que en el primer ciclo del cultivo de material procedente de embriones somáticos, la producción fue menor que los alcanzados al ser comparados con las plantas procedentes del método de siembra tradicional y ésto es debido al período de adaptación que se requiere en el material procedente de cultivo *in vitro* en el primer ciclo de plantación en el campo y los autores antes mencionados alcanzaron la mejor respuesta productiva y el mejor crecimiento y desarrollo de las plantas durante el segundo y el tercer ciclo de siembra en el campo.

En trabajos realizados por Jiménez (1995), con plantas obtenidas a partir de embriones somáticos en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.), encontró que las mismas presentaron una disminución en el diámetro de los tallos con respecto a las plantas obtenidas por vía tradicional, observándose una disminución de los tallos en las plantas micropropagadas; lo cual se presentó en el primer retoño siendo un reflejo del efecto del cultivo *in vitro* y en lo sucesivo se observó la estabilización de los distintos caracteres agrícolas en las plantas evaluadas, lo que le permitió expresar que las plantas propagadas *in vitro* en sus primeros ciclos de adaptación a las condiciones de campo muestran variaciones respecto a las plantas propagadas por la vía tradicional, tal es el caso que se puede presentar un incremento o disminución de algunos caracteres agrícolas, los cuales están relacionados con el efecto de rejuvenecimiento o cambios temporales.

Los resultados alcanzados constituyen el primer informe de evaluación en condiciones de campo de plantas de boniato obtenidas a partir de embriones somáticos, debido a que no se conocen trabajos de otros autores y el mismo reviste una gran importancia, ya

que permite validar el proceso de embriogénesis somática hasta la producción de raíces tuberosas en estas condiciones.

4.13. Metodología propuesta para la multiplicación acelerada del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) mediante la embriogénesis somática.

A partir de la integración de los resultados obtenidos en la presente investigación en las diferentes etapas evaluadas durante el proceso de embriogénesis somática, se logró la obtención de una metodología de micropropagación vía embriogénesis somática que incluye desde la formación de los callos hasta la aclimatización de las vitroplantas y su plantación en campo. Basado en los resultados obtenidos, se propone el esquema general de la metodología para la obtención de plantas a través de la embriogénesis somática en el cultivo del boniato (Figura 23).

Con la aplicación de estos resultados se dispone de una vía alternativa para fortalecer la producción de “semilla” y facilitar la multiplicación e introducción de nuevos clones o la sustitución rápida de otros ante problemas sanitarios o de desastres naturales y ser empleada en el mejoramiento genético, la conservación y el intercambio nacional e internacional de germoplasma.

La presente metodología puede recomendarse como el primer sistema completo de embriogénesis somática en el cultivo del boniato llevado a cabo en Cuba; donde se realizaron; además, estudios de la estabilidad genética del material vegetal regenerado y evaluaciones en condiciones de campo.

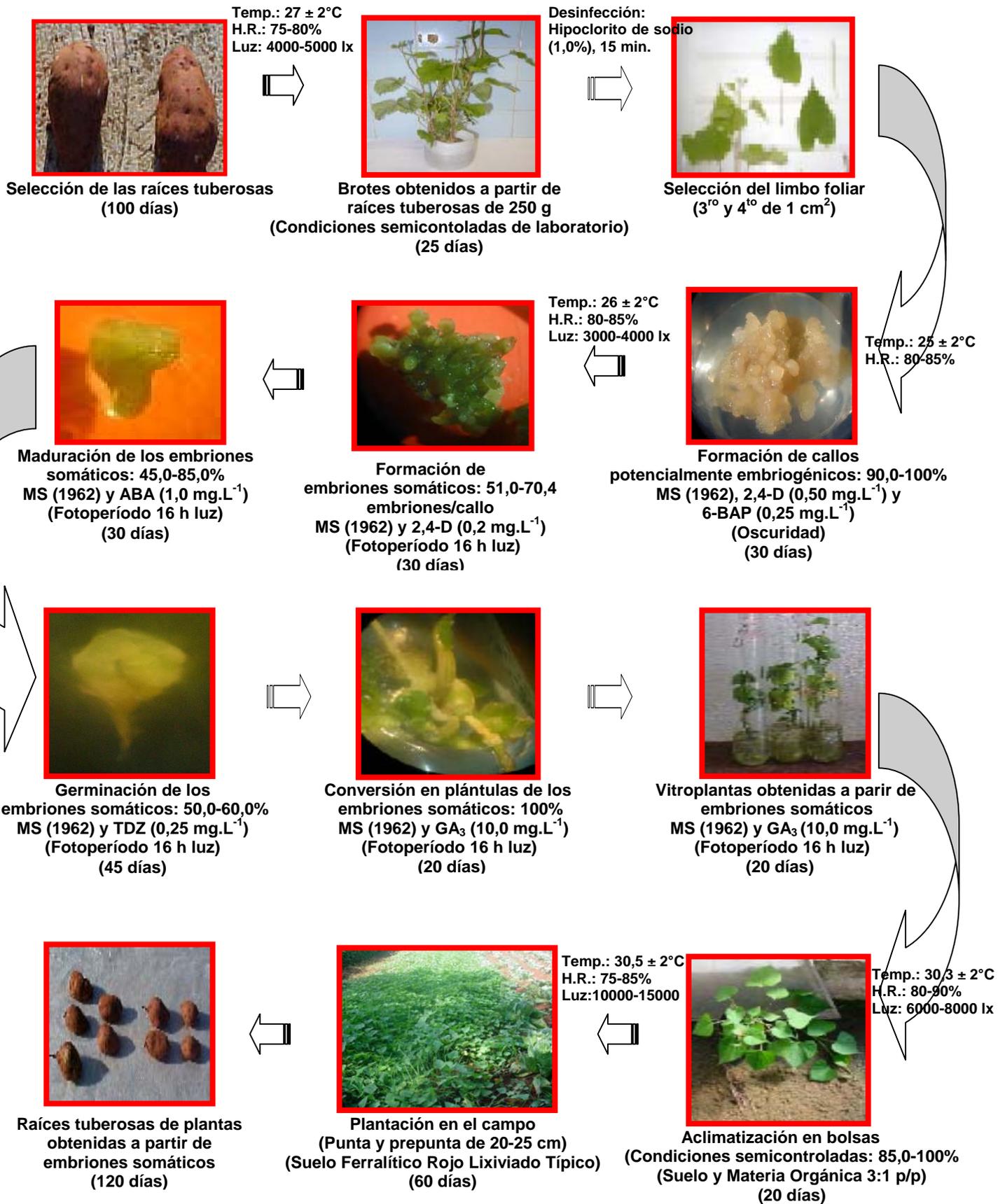


Figura 23. Esquema de la metodología propuesta para la micropropagación vía embriogénesis somática en boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.).

5. CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología completa para la micropropagación del boniato basada en la embriogénesis somática, con valores de germinación y conversión en plántulas que supera los alcanzados por otros autores y en la cual se logró la aclimatización y establecimiento en campo de las plantas obtenidas.
2. Los explantes procedentes de brotes de raíces tuberosas resultaron superiores, lográndose un 96,1% de desinfección con el hipoclorito de sodio al 1,0% y hasta 96,0% de formación de callos cuando se colocó la superficie adaxial de la zona basal de los limbos foliares 3^{ro} y 4^{to} en contacto con el medio de cultivo.
3. Se obtuvo hasta 96,0% de callos potencialmente embriogénicos cuando se empleó un medio de cultivo suplementado con 0,50 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,25 mg.L⁻¹ de 6-BAP, y la formación de embriones somáticos se favoreció cuando se eliminó la citoquinina y se redujo el 2,4-D a 0,2 mg.L⁻¹. La maduración de los embriones somáticos se logró con el empleo del ABA a una concentración de 1,0 mg.L⁻¹ y la germinación de los mismos y/o conversión en plántulas se incrementó con el empleo del TDZ (0,25 mg.L⁻¹) y GA₃ (10,0 mg.L⁻¹), respectivamente.
4. La descripción histológica de las diferentes etapas del proceso permitió establecer la zona de origen del callo, así como las características de los embriones somáticos en los diferentes estadios de desarrollo.
5. En las etapas de aclimatización y plantación en el campo, se lograron elevados valores de supervivencia de las plantas (85,0-100 y 100%, respectivamente), no habiéndose detectado variabilidad del material obtenido con respecto al donante mediante los estudios bioquímicos y moleculares realizados, así como de acuerdo a las características morfoagronómicas evaluadas.

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear la metodología propuesta en la micropropagación de clones de boniato para llevar a cabo el establecimiento de bancos de “semilla”, la conservación e intercambio de germoplasma y la transformación genética en el cultivo y a partir de los resultados obtenidos, evaluar la misma en otros clones de interés.
2. Continuar profundizando en los estudios relacionados con el proceso de embriogénesis somática en sistemas, a fin de poder realizar en un futuro la automatización del proceso.
3. Analizar otros sistemas isoenzimáticos y emplear otras técnicas moleculares y cebadores que exploren otras regiones del ADN, para llevar a cabo los estudios de estabilidad de los materiales obtenidos.
4. Incluir los resultados obtenidos en esta investigación en los programas de las asignaturas de pre y posgrado relacionados con la temática.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M.I.; I. CABALLERO; Y. ALVARADO y M. LEYVA.** (2002). Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.). Resúmenes. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP. Santa Clara. P.122.
- ADERKAS, P.; M. LELU y P. LABEL.** (2001). Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 495-502.
- AGRAMONTE, D.; D. RAMÍREZ; M. PÉREZ; O. GUTIÉRREZ; J. PÉREZ y M. NUÑEZ.** (1998). Manejo integrado de vitroplantas en la fase de aclimatización. Resúmenes. XI Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. 115 p.
- ALEMANNI, L.; M. BERTHOULY y N. MICHAUX-FERRIERE.** (1997). A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant*, 33: 163-172.
- ALGUACIL, M; A. ESPINOSA; O. GONZÁLEZ y J.J. SILVA.** (1996). Encapsulado de yemas de boniato: Una alternativa para la obtención de semillas de calidad. Resúmenes. X Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. P. 72.
- ALVARADO, Y.** (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: J. Pérez (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Cap. 5. Vol. I. IBP. Santa Clara. P. 82-104.
- ALVARADO, Y.; M. CRUZ; N. PORTAL; L. GARCÍA; M. FREIRE; E. QUIALA y R. GÓMEZ.** (2003). Estrategia de trabajo para el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. Resúmenes. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- AMMIRATO, P.V.** (1974). The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). *Bot. Az.*, 135: 228-337.

- ANDRADE, F.; V. SOUZA; K. SILVA y E. SILVA.** (2002). Efeito de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sodio e mercurio na desinfestação de explantes caulinares de bacurizeiro. Boletín Sociedad de Brasileños de Fruticultura. EMBRAPA. 25 p.
- ANDREY, H.; M. ENSMINGER; J. KONLANDE y J. ROBSON.** (1994). Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). En: Foods & Nutrition Encyclopedia. 2nd Edition. Vol. 2. I-Z. CRC. P. 2087-2090.
- ARENCIBIA, D.A. y M.T. CORNIDE.** (1999). Biodiversidad y Biotecnología de la Caña de Azúcar. Elfos. La Habana. 168 p.
- ARIAS, E.; N. NIEVES; M. ISIDRÓN y R. BENEGA.** (1997). Isoenzymatic variability in pineapple somaclones *Ananas comosus* (L.) Mer. Cultivos Tropicales, 18(2): 56-59.
- ASHOK, A.; H. MURTHY y K. PAEK.** (2003). Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. Scientia Horticulture, 98: 213-222.
- BAMBERG, J. y A. DEL RIO.** (2003). Vulnerability of alleles in the us potato genebank extrapolated from RAPDs. Amer. J. of Potato Res., 80: 79-85.
- BARRANCO, O.L.** (2000). Embriogénesis somática en banano (*Musa AAAB*, cv. FHIA-18) empleando medios de cultivo líquido. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). Santa Clara. P. 17.
- BAPAT, S.; S. RAWAL y A. MASCARENHANS.** (1992). Izozyme profiles during ontogeny of somatic embryos in Wheat (*Triticum aestivum*, L.). Plant Science, 82: 235-242.
- BENEGA, R.; J. MARTÍNEZ; M. DAQUINTA; E. ARIAS; M. HIDALGO; M. GONZÁLEZ y M. ISIDRÓN.** (2000). Efecto del tiazurón sobre la formación de embriones y regeneración de plántulas en callos recalcitrantes de anteras en piña (*Ananas comosus* (L.) Mer.) Cultivos Tropicales, 21(3): 47-50.
- BEOVIDES, J.** (2002). Detección de la variabilidad genética en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante estudios morfoagronómicos,

- citogenéticos y genético-bioquímico. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. Facultad de Biología. 76 p.
- BERTOLÍ, M.; J. ARZUAGA y R. MARTÍNEZ.** (1994). Evaluación de un grupo de clones precoces de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivados en suelo Ferralítico Rojo Típico del Municipio Güira de Melena, Provincia la Habana. *Cultivos Tropicales*, 15(1): 29-31.
- BERTHOULY, M. y N. MICHAUX-FERRIERE.** (1996). High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 169-176.
- BHOJWANI, S. y M. RAZDAN.** (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised . Edition ELSEIVER SCIENCE B.V. *Studies in Plant Science*, 5. 766 p.
- BIDOT, I.; M. DE FERIA; A. CAPOTE; M. CHAVEZ; E. QUIALA; R. BARBÓN y J.N. PÉREZ.** (2003). Efecto de diferentes factores en la formación de callos de *Cocos nucifera* L. cv. Indio Amarillo. Resúmenes. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplasmas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- BORGES, Y.** (2004). Contribución al estudio de la degradación de los suelos Ferralítico Rojo Lixiviado en la región de San José de las Lajas por el cambio del uso de la tierra. Trabajo de Diploma. UNAH. La Habana. 69 p.
- BORROTO, C.** (2002). Biotecnología Agropecuaria. En: F. Castro (ed). Cuba. Amanecer del Tercer Milenio. Ciencia, Sociedad y Tecnología. Editorial DEBATE. La Habana. 414 p.
- BRETTING, P. y M. WIDRELECHNER.** (1995). Genetic Markers and Horticultural Germplasm Management. *HortScience*, 30(7): 1340-1356.
- BREWER, G. y C. SINGH.** (1979). Introduction to isoenzymes techniques. Acad. Pres. N.Y. P. 186.
- BUDIMIR, G.** (2003). Developmental histology of organogenic and embryogenic tissue in *Picea omorika* culture. Brief Communication. *Biologia Plantarum*, 47(3): 467-470.

- CANTLIFFE, D.J.** (1993). Somatic Embryos in Sweet Potato. En: W.A. Hill, C.K. Bonci y P.A. Loretan (eds). Sweetpotato Technology for the 21st Century. Tuskegee. P. 38-46.
- CAPOTE, A.; Z. RODRÍGUEZ y O. PÉREZ.** (2000). Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa*, L.) cv Caribe-71 regeneradas *in vitro*. Biotecnología Aplicada, 17(4): 241-246.
- CARRAZANA, D.; L. HERRERA; N. MOLLINEDO; I. ARBOLAES; H. CASTELLANOS y T. MARTÍNEZ.** (2003). Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa* sp. Biotecnología Vegetal, 3(1): 49-52.
- CASTILLO, L.R.** (2000). La embriogénesis somática en la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido). Estudios básicos del proceso y su contribución a la semilla artificial. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). Ciego de Ávila. 109 p.
- CASTILLO, J.; A. ESTÉVEZ; D. VARGAS; M. HERNÁNDEZ; J. SALOMÓN; Y. QUIÑONEZ; Y. LÓPEZ y A. ARENCIBIA.** (2004). Detección de la estabilidad genética en especies de papa (*Solanum tuberosum* L.) conservadas *in vitro*, por largos períodos de tiempo, mediante el empleo de AFLPs. Resúmenes. XIV Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. P. 95.
- CASTRO, F.** (1992). Un grano de Maíz. Conversación con Tomás Borge. La Habana. P. 199.
- CAVALCANTE, M.; D. SIHACHAKR; M. ALLOT; S. TIZROUTINE; I. MUSSIO; A. SERVAES y G. DUCREUX.** (1994). Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Reports, 13: 437-441.
- CEVALLOS, M.** (2000). Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto (*Coffea* sp.), mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 136 p.

- COLLADO, R.; R. BARBÓN; D. AGRAMONTE; F. JIMÉNEZ; M. PÉREZ; O. GUTIÉRREZ y D. RAMÍREZ.** (2005). Diferenciación de embriones somáticos de *Switenia macrophylla* King. En medio de cultivo semisólido. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. (BioVeg 2005). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- CONCEPCIÓN, O.; L. NÁPOLES; R. TRUJILLO; A. PÉREZ y N. PERALTA.** (2003). Regeneración de brotes en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) propagadas *in vitro*. Resúmenes. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- CORNIDE, M.T.** (2001). La Genética Vegetal, el Mejoramiento y la Sociedad. *Cultivos Tropicales*, 22(3): 73-82.
- CORNIDE, M.T.** (2002). Genética Vegetal. En: F. Castro (ed). Cuba. Amanecer del Tercer Milenio. Ciencia, Sociedad y Tecnología. Editorial DEBATE. La Habana. 414 p.
- CORNIDE, M.T.; J. SÁNCHEZ y D. CALVO.** (2002). Identificación de genotipos y progenitores. En: M.T. Cornide (ed). Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Capítulo 7. La Habana. P. 212-220.
- CORREDOIRA, E.; A. BALLESTER y A. VIEITEZ.** (2003). Proliferation, Maturation and Germination of *Castanea sativa* Mill. Somatic Embryos Originated from Leaf Explants. *Annals of Botany*, 92: 129-136.
- COTO, O. y M.T. CORNIDE.** (2002). Principales aplicaciones de los marcadores moleculares. En: M.T. Cornide (ed). Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Capítulo 4. La Habana. P. 92-119.
- COTO, O.; M.T. CORNIDE; M. RODRÍGUEZ; I. HERNÁNDEZ; E. CANALES; F. DE PRADA y G. PÉREZ.** (2005). Diversidad genética basada en marcadores moleculares de una colección de clones del complejo *Saccharum* utilizados en el programa de introgresión de la caña de azúcar en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 26(1): 41-48.

- CUBA. MINAGRI.** (1998). Instructivo Técnico del Boniato. SEDAGRI/AGRINFOR. La Habana. 21 p.
- CULLIS, A. y K. KUMED.** (2000). Isolation of tissue cultures induced polymorphism in bananas by representation differences analysis. *Acta Horticulturae*, 5(30): 421-428.
- CRUZ, M.; Y. ALVARADO; T.M. ACOSTA; N. PORTAL; M. LEYVA y M. LEZCANO.** (2003). Evaluación de sustancias antimicrobianas para el control de microorganismos contaminantes de la micropropagación de plantas. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplantitas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- CHAPEL, T.; L. IGLESIAS; A. BORROTO; F. BAISRE y J. SIMÓN.** (1974). A simplified apparatus for vertical slab electrophoresis in polyacrilamide gel. *Laboratory Practice No. 23*: 311-312.
- CHÉE, P.; J. SCHULTHESIS y D.J. CANTLIFFE.** (1992). Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *High-Tech and Micropropagation III. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 19: 107-117.
- DANGOU, S.; V. HOCHER; N. FERRER; C. FUICHERI; P. MORAR y L. ALEMANN.** (2002). Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. Endosperm during seed development. *Seed Science Research*, 12(2): 91-100.
- DANSO, K. y B. FORD.** (2004). Effect of sucrose without abscisic acid on post-thaw viability, embryogenic competence and plant recovery from embryogenic callus of cassava. *Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology*. CIAT. Colombia. P. 128.
- DAZA, M. y H. RINCÓN.** (1993). Perfil tecnológico del camote (Batata) en la costa central del Perú. Estudio de zonas agroecológicas del valle de Cañete. CIP. Documento de Trabajo Número 1. 38 p.
- DAVIES, B.J.** (1964). Dis electroforesis. II Methods and application to human serum proteins. *Ann NY. Acad. Sci.* 12: 404-427.

- DE FERIA, M.** (2001). Empleo de biorreactores para la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 en medios líquidos. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). IBP. Santa Clara. 103 p.
- DE JONG, J.; J. CORDEWENER; F. LOSCHIAVO; M. TERSI; J. VANDEKERCHOVE; A. VANKAMMEN y F. DE URIES.** (1993). A carrot somatic embryos induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *C. arabica*. Symposium Ferrugens do Caffeiro. Center of Investigacao das Ferrugens do Cappeiro. Deiras, Portugal. P. 499.
- DE KLERK, G.L.** (1998). Plant Hormones in Tissue Culture. Duchefa Catalogue 98-99. P. 19.
- DELLAPORTA, S.; J. WOOD; B. HICKS.** (1983). A plant molecular DNA minipreparation. Versión II. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 19-21.
- DESMOND, D.D.** (2003). Desarrollo de la embriogénesis somática y su empleo en la transformación genética por biobalística en el cultivar híbrido de plátano FHIA-21 (*Musa* sp. AAAB). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). IBP. Santa Clara. 96p.
- DESSAI, A.; R. GOSUKONDA; E. BLAY; C. KORSI; F. MEDINA y C. PRAKASH.** (1995). Plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explants *in vitro* using a two-stage protocol. Scientia Horticulturae, 62: 217-224.
- DÍAZ-SALA, C.; R. BESFORT; M. REY y R. RODRÍGUEZ.** (1995). Variation in the DNA-methylation and polypeptide patterns of adult hazel associated with sequential *in vitro* subcultures. Plant Cell Report, 15: 218-221.
- DÍAZ, G.P.** (1997). Evaluación de la tolerancia a la salinidad en somaclones de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). CNIC. La Habana. 75 p.
- DODDS, H; J. BENAVIDES; F. MEDINA y C. SIGUEÑAS.** (1992). Biotechnology applied to sweet potato improvement. En: W.A. Hill, C.K. Bonsi y P.A. Loretan

- (eds). Sweet Potato Technology for the 21st Century. Tuskegee University . P. 7-19.
- DOYLE, J. y L. DOYLE.** (2001). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- ESAU, K.** (1969). Anatomía Vegetal. Edición Revolucionaria. La Habana. 46 p.
- ESCALONA, M.** (1999). Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). Resumen. Centro de Bioplasmas. Ciego de Ávila. 26 p.
- ESCOBEDO, R.M.** (1996). Condiciones nucleares y citológicas durante la embriogénesis *in vitro* de *Musa acumata*. Tesis de Maestría (Master en Ciencias Biotecnológicas). Instituto Tecnológico de Mérida. 116 p.
- ESPINOSA, A.; O. GONZÁLEZ y J.J. SILVA.** (2003). Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo. Biotecnología Vegetal, 3(1): 37-41.
- ETIENNE, H. y M. BERTHOULY.** (2002). Temporary immersion system in plant micropropagation. Plant Cell Tissue and Culture, 64: 215-231.
- FAO.** (2004). FAO Stat-Agriculture. Disponible en: http://www.fao/waicent/portal/statistic_es.asp. Visitada en fecha: 21 de Mayo del 2005.
- FAO.** (2004a). Agricultural date [en línea]. Disponible en: www.fao.org. [http://faostat.fao.org/faostat/collection version agriculture](http://faostat.fao.org/faostat/collection_version_agriculture). Visitada en fecha: 15 de Julio del 2005.
- FARIAS, F.R. (2000).** Cultivo *in vitro* de *Anthurium shlectendalii* Kunth (Araceae), especie silvestre del estado de Veracruz. México. Tesis de Maestría (Master en Ciencias Biológicas). Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Veracruz. 119 p.
- FEHÉR, A.; T. PASTERNAK y D. DUDITS.** (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 201-228.

- FEITOSA, J.; T. TICANCO y A. CAMPOS.** (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava genotypes from the northeast of Brazil. Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. CIAT. Colombia. P. 130.
- FINALÉ, J.; S. REMY; I. FRANCOIS; J. LÓPEZ; L. SAGIL y R. SWENNEN.** (2002). Agrobacterium-mediated transformation of Cuban plantain cultivars for fungal tolerance. Jornada XXXV Aniversario del INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara. P. 8.
- FORD-LLYOD, B.** (2001). Genotyping in plant genetic resources. Plant Genotyping: the DNA fingerprinting of plant. CAB International. 56 p.
- FREIRE, M.** (2002). Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido var. C 87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Jornada XXXV Aniversario del INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara. P. 2.
- FREIRE, M.; B. CHONG; R. GÓMEZ; M. REYES; I. BERMUDEZ; I. HERRERA y D. DANIELS.** (2003). Eliminación de la fase de callos para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en especies monocotiledóneas. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- GARCÍA, E. y A. MENÉNDEZ.** (1987). Embriogénesis somática de explantes foliares de cafeto "Catimor". *Café, Cacao, Thé*, 31(2): 15-21.
- GARCÍA, L.; Y. PADRÓN; .J. PÉREZ; C. BERMUDEZ; P. ORELLANA; R. VEITIA y C. ROMERO.** (2002). Regeneración de plantas a partir de yemas adventicias en Banana cv. Gran Enano (AAA). Jornada XXXV Aniversario del INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara. P. 5.
- GARCÍA, M.; S. RODRÍGUEZ; V. MEDERO; J. LÓPEZ; J. DE LA C. VENTURA y M. CABRERA.** (1998). Desarrollo de la embriogénesis somática en Malanga (*Xanthosoma* sp. y *Colocasia esculenta*). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana. P. 51.

- GARCÍA, O.D.** (1998). Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en caféto (*Coffea canephora* Pierre). Tesis de Maestría (Master en Biología Vegetal). INCA. La Habana. 74 p.
- GARCÍA, G.R.** (2005). Metodología para la regeneración y la transformación genética del boniato (*Ipomoea batatas* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). Camagüey. 100 p.
- GARRIGA, M.** (2003). Micropropagación de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Trabajo de Diploma. Universidad de la Habana. 55 p.
- GEORGET, F.; F. COTE; R. DOMERGUE y N. FERRIERE.** (2000). Morphohistological study of the different constituents of banana (*Musa* AAA, cv. Grande Naine) embryogenic cell suspension. *Plant Cell Reports*, 19: 748-754.
- GHISLAIN, M. y B. TROGNITZ.** (1996). La batata en cifras. Circular CIP. Vol. 22. No. 2. Septiembre. Lima. P. 16-19.
- GOH, D.; M. BON; F. ALIOTTI; J. ESCOUTE; N. FERREIRE y O. MONTEVIS.** (2001). In vitro somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrilli* and *Calamus subinermis*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37: 375-381.
- GÓMEZ, K.R.** (1998). Cultivo de Células y Tejidos. En: J N. Pérez Ponce (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Capítulo 2. Vol. 1. Santa Clara. P. 25-44.
- GÓMEZ, K.R.; T. GUILLARD y A. BARRANCO.** (2000). Somatic embryogenesis in liquid medium. Maturation and enhancement of germination of the hybrid cultivars FHIA-18 (AAAB). *InfoMusa*, 9(1): 12-14.
- GONZÁLEZ, C.M.** (1993). Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento genético para la tolerancia a la salinidad en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 95 p.
- GONZÁLEZ, C. y J. GONZÁLEZ.** (1981). Estudio de patrones para la Lima Persa III; caracterización isoenzimática. *Ciencia y Técnica Agrícola*, 4(2): 102-108.
- GONZÁLEZ, C.A.** (2002). Detección de polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: M.T. Cornide (ed). Marcadores

- Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Capítulo 2. La Habana. P. 36-66.
- GONZÁLEZ, CL.; M.I. ROMÁN; X. XIQUÉS; H. GARCÍA; M. VALDÉS; I. GALÁN y L. PÉREZ.** (2001). Análisis electroforético de isoenzimas en variedades híbridas de tabaco rubio (*Nicotiana* sp.). Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2001). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila. P. 40.
- GONZÁLEZ, G.** (2001). Embriogénesis somática en Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Establecimiento de una metodología de propagación *in vitro*. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). Universidad de Matanzas. 114 p.
- GONZÁLEZ, G.; S. ALEMAN; F. BARREDO y M. ROBERT.** (2002). Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem.. Biotecnología Vegetal, 2(1): 3-8.
- GONZÁLEZ, L.; R. RODRÍGUEZ; R. BÉCQUER; J. LORENZO y M. CID.** (1998). Reducción de la mortalidad de vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) durante la aclimatación. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana. P. 40.
- GONZÁLEZ, M.E.** (2003). Micropropagación de cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 97 p.
- GONZÁLEZ, M.E. y L.M. BARRIOS.** (2003). Estudio sobre contaminantes fungosos en la formación de callos a partir de explantes foliares de *Coffea* sp. Biotecnología Vegetal, 3(2): 97-100.
- GONZÁLEZ, M.E. y M. FERRER.** (1996). Caracterización histológica de la callogénesis en *Coffea arábica* var. "Caturra" durante la embriogénesis somática. I Taller de Biotecnología Vegetal de las Provincias Orientales. P. 6.
- GONZÁLEZ, M.E.; R. RAMOS y N. SANTANA.** (2000). Efecto del ácido abscísico (ABA) en la regulación del desarrollo de los embriones somáticos de *Coffea canephora* P. var. Robusta. Cultivos Tropicales, 21(3): 33-37.

- GRANADA, C.L.** (1990). Manejo de plantas en invernadero. En: V.M. Villalobos (ed). Fundamentos teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. FAO (105). P. 85-88.
- HAYDU, Z. e I. VASIL.** (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue and putters of *Pennisetum purpureum* Shum. Theoretical and Applied Genetic, 59: 268-274.
- HERNÁNDEZ, G.; H. VENTO y Y. DEL LLANO.** (1998). Desinfección exógena y endógena de malanga para su conservación *in vitro*. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana. P. 46.
- HERNÁNDEZ, A.; J. PÉREZ; D. BOSCH y L. RIVERO.** (1999). Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. AGRINFOR, 64 p.
- HERNÁNDEZ, P.; J. MIKEU; T. HERNÁNDEZ y J. FONTENOT.** (2004). Mutations a means of improving sweet potato varieties. Proc. Assoc. South. Agric. Work, 53: 175.
- HERRERA, L.; M. FOLQUERAS; D. CARRAZANA; N. SUÁREZ y D. PÉREZ.** (2001). Los hongos contaminantes en la micropropagación de raíces y tubérculos tropicales en Cuba. Centro Agrícola, 3: 46-51.
- HIDROBO, J.R.** (2000). Estudios morfológicos, histológicos y bioquímicos de callos embriogénicos en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*, L.). Tesis de Maestría (Master en Ciencias Agrícolas). UNAH. La Habana. 125 p.
- HILDE, S. y D. INZÉ.** (2001). When plant cells decide to divide. TRENDS in Plant Science, 6(8): 359-368.
- HITA, O.; P. GALLEGRO; N. VILLALOBOS; I. LANAS; A. BLAZQUEZ; J. MARTÍN; J. FERNÁNDEZ; L. MARTÍN y H. GUERRA.** (2003). Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72(1):13-18.
- HUAMAN, Z.** (1991). Descriptores de la Batata. CIP/ AVRDC/ IBPGR. Lima. 134 p.
- HUAMAN, Z.** (1992). Identificación morfológica de duplicados en colecciones de *Ipomoea batatas*. Guía de Investigación CIP 36. Lima. 31 p.

- IGLESIAS, L.; H. LIMA y J. SIMÓN.** (1974). Isozyme identification of nucellar seedling in *Citrus*. J. Heredity, 65: 81-84.
- IGLESIAS, L. y M.C. GONZÁLEZ.** (1995). Estudios isoenzimáticos asociados con la tolerancia a la salinidad en arroz (*Oryza sativa* L.). Cultivos Tropicales, 16(1): 64-69.
- IGLESIAS, L y J. CASAS.** (2004). Avances en la evaluación de la diversidad genética de especies forestales mediante el uso de marcadores isoenzimáticos. Cuaderno de Biodiversidad. CIBIO. Universidad de Alicante. España. No. 15. Año VI. P. 11-16.
- INFOAGRO.** (2003). El cultivo de la batata. Disponible en: www.infoagro.com/hortalizas.htm. Visitada en fecha: 15 de Mayo del 2005.
- IPEK, M. y A. IPEK.** (2003). Comparing of AFLPs, RAPD markers, and isoenzymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 128(2): 246-252.
- JAKSON, M.L.** (1970). Análisis Químico de Suelos. Edición Revolucionaria. 662 p.
- JARRET, R.L.** (1989). Somatic Embryogenesis in Sweet Potato. HortScience, 19: 397-398.
- JARRET, R.L y N. GRAWEL.** (1991). Chemical and environmental growth regulation of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 25: 153-159.
- JIMÉNEZ, G.E.** (1995). Propagación *in vitro* de la caña de azúcar. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 98 p.
- JIMÉNEZ, G.E.** (1998). Cultivo de Ápices y Meristemos. En: J. Pérez (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Cap. 3. Vol. 1. IBP, Santa Clara. P. 50.
- JIMÉNEZ, G.E.** (1998a). Generalidades del Cultivo *in vitro*. En: J. Pérez (ed). Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología. Cap.1.Vol.1. IBP. Santa Clara. P.13-24.

- JIMÉNEZ, M. y F. BANGERTH.** (2001). Endogenous hormone concentration and embryogenic callus development in Wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 37-46.
- JIMÉNEZ, V.** (2001). Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *ELSEIVIER. Plant Science*, 160: 247-257.
- JIMÉNEZ, V.; E. GUEVARA; J. HERRERA y F. BANGERTH** (2001). Endogenous hormone level in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stage of regeneration. *Plant Cell Reports*, 20: 92-100.
- JIMÉNEZ, V.** (2002). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Review. Universidad de Costa Rica. 18 p.
- JIMÉNEZ, V.** (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators *in vitro* somatic embryogenesis. Review. CIGRAS. Universidad de Costa Rica. 18 p.
- JIMÉNEZ, V.; E. GUEVARA; J. HERRERA y F. BANGERTH.** (2005). Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant and Biochemistry. Plant Cell Reports*, 23: 567-572.
- KIM, K.; H. PARK; M. PARK y V. YEO.** (2001). Effects of auxins and cytokinins on organogenesis of soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Biotechnology*, 3(2): 95-100.
- KOKUBU, T.; Q. LIU y M. SOTO.** (1993). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Shoot Tip Cultures of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Mem. Fac. Agr. Kogoshima Univ.*, 29: 53-59.
- KRUSKAL, N. y W. WALLIS.** (1952). Use of rank in one criterion analysis of variance. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 47: 583-621.
- LANGHANSOVÁ, L.; H. KONRÁDOVÁ y T. VANÉK.** (2004). Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 22: 725-730.

- LAPARRA, H.; R. BRONNER y G. HAHNE.** (1997). Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* H. Protoplasm, 196:1-11.
- LARA, R.M.; M. FLORIDO; D. PLANA; O. MORÉ; M.E. GONZÁLEZ; M. ÁLVAREZ y M. HERNÁNDEZ.** (2003). Isoenzymatic analysis for detecting *in vitro* variability and/or stability of economically important crops. Cultivos Tropicales, 24(3): 39-48.
- LARA, R.M.** (2005). Empleo de la selección asistida por marcadores (MAS) para la resistencia a nemátodos en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.). Tesis de Maestría (Master en Biología Vegetal). INCA. La Habana. 70 p.
- LEE, H.; E. LEÓN y B. GARCÍA.** (2000). Efecto de la exposición del explante sobre la brotación múltiple en *Dipladenia scandens*. Factores químicos y hormonales relacionados. Resúmenes. XII Seminario Científico del INCA. La Habana. P. 157.
- LEE, S.; F. ZAPATA-ARIAS; H. BRUNWER y R. AFZA.** (1997). Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* sp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 1-8.
- LEIFERT, C. y A. CASSELLS.** (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 37(2): 133-138.
- LEÓN, O.** (1998). Marcadores moleculares: Principales tipos, bases moleculares, ventajas y limitaciones. En: O. León (ed.). Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas. P. 1-17.
- LIU, R. y D.J. CANTLIFFE.** (1984). Somatic embriogénesis and plant regeneration in tissue culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*, Poir). Plant Cell Reports., 3: 112-115.
- LIU, C.; H. ZHAUI; D. LIU; Y. WANG y D. ZHANG.** (1998). An efficient system of embryogenesis suspension culture and plant regeneration in Sweetpotato. CIP. Program Report. P. 265-271.

- LITZ, E. y R. JARRET. (1993). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis Somática y Organogénesis. En: W. Roca y L.A. Mroginski (eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cap. 7. CIAT. Colombia. P. 143-172.
- LÓPEZ, J.; M. TORREZ; C. BORROTO; R. TRUJILLO; M. DAQUINTA; R. GOMEZ; M. GARCÍA; V. MEDERO; J. VENTURA; N. MONTANO; A. MORALES; M. CABRERA; A. ROBAINA; A. RAYAS y C. PONS. (2002). Metodología para la propagación *in vitro* del Boniato. Jornada XXXV Aniversario del INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara. P. 18.
- LÓPEZ, Z.M.; E. VÁZQUEZ y R. LÓPEZ. (1995). Raíces y Tubérculos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. P. 163-225.
- MALGORZATA, D. (2001). Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsi thaliana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64: 39-46.
- MARGARA, J. (1988). Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Los Meristemos y la Organogénesis. Editorial Mundi-Prensa. INRA. Madrid. P. 232.
- MARTÍN, C. y C. PÉREZ. (1994). The use of RAPD to determine the genetic variability of micropropagated plants from endangered species. Application to the spanish endemism, *Limonium estevei*. Revista Internacional de Botánica Experimental. P. 65-72.
- MARTÍN, R.; M. MOK y D. MOK. (1993). Cytolocalization of zeatin O-xylosyltransferase in *Phaseolus*. Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 953-957.
- MARULANDA, A.M. (2000). Selección, propagación y caracterización genética de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*, Benth). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). La Habana. 100 p.
- MAURI, P.V. y J.A. MANZANERA. (2003). Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 229-235.
- MAXIMOVA, N.; L. ALEMANNI; A. YOUNG; N. FERRIERE; A. TRAORE y M. GUILTIMAN. (2002). Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of

- primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L.. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38(3): 252-259.
- McGREE, J.J.** (1972). Test of current definitions of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data. *Agric. Meteorol.*, 10: 443-453.
- MEDERO, V.; C. BORROTO; R. GÓMEZ; S. RODRÍGUEZ; R. ESCOBAR; G. GALLEGRO; J. THOME; J. BEOVIDES; J. LÓPEZ; M. GARCÍA; J. DE LA C. VENTURA; M. CABRERA; C. PONS; M. FOLQUERAS y J. CRUZ.** (2002). Metodología para la embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Jornada XXXV Aniversario del INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara. P. 3.
- MEDERO, V.; S. RODRÍGUEZ; C. BORROTO; R. GÓMEZ; R. ESCOBAR; G. GALLEGRO; J. THOME; Y. BEOVIDES; J. LÓPEZ; M. GARCÍA; J. DE LA C. VENTURA; M. CABRERA; M. BASAIL; C. PONS; A. RAYAS; A. SANTOS; M. FOLGUERAS; J. CRUZ; M. MARTÍNEZ; H. TOLEDO; D. GUERRA; M. ÁLVAREZ y J. GARCIA.** (2004). Estudio agronómico y de estabilidad genética en vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Resúmenes. XIV Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. P. 94.
- MERKLE, S.; W. PARROT y B. FLINN.** (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: T.A. Thorpe (ed). *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Klumer Academic, 55-203.
- MICHAUX-FERRIERE, N. y M. CARRÓN.** (1989). Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. The importance of the timing of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19: 243-256.
- MICHAUX-FERRIERE, N.; P. DUBLÍN y J. SCHWENDIMAN.** (1987). Histological study of somatic embryogenesis from foliar explants of *Coffea canefora*. *Café, Cacao, Thé*, 31(2): 112-114.
- MORÉ, O.** (2000). Empleo de nuevos biorreguladores en la obtención de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum*, L.). Tesis de Maestría (Maestro en Biología Vegetal). Universidad de la Habana. Facultad de Biología. 96 p.

- MOLINA, L.; M. ESCALONA; R. RODRÍGUEZ y A. JIHAD.** (2003). Efectos de la luz en el cultivo fotomixotrófico de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en biorreactores de inmersión temporal. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila.
- MONTES, S.; M. MARTÍNEZ; R. ROJAS; N. SANTANA y M. CUBA.** (1995). Obtención de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Coffea canephora* var; Robusta. Cultivos Tropicales, 16(3): 77-81.
- MORALES, C.; S. LOMBARDI; P. SOARES y G. FORTES.** (1999). Efeito do BAP e TDZ na calogênese em internodios de maiceira cv. Gala RW1. Rev. Brisa. de Agrociencia, 5(3): 174-177.
- MORTLEY, C.** (1999). Manganese toxicity and tolerance in Sweet potato. Hort Sciences Soil Nutrition and Fertilizer, 28(8): 812-813.
- MOTOIKE, Y.; R. SKIRVIN; M. NORTON y A. OTTERBACHER.** (2001). Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from *Vitis vinifera*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66: 121-131.
- MUKHERJEE, A.; B. DEBATA; P. MUKHERJEE y S. MALIK.** (2001). Morphohistobiochemical characteristics of embryogenic and noembryogenic callus cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Cytobios, 106(412): 113-124.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantar.*, 15: 473-497.
- MURTHY, N.; J. MURCH y P. SAXENA.** (1998). Thidiazuron: A potent regulator on *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Plant*, 34: 267-275.
- NICHTERLEIN, K.** (2000). Workshop on mutation and *in vitro* culture techniques for the improvement of vegetatively propagated tropical food crops. Curso de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. P. 56.
- NIEVES, N.; R. CASTILLO; M. CID; I. CAPOTE y M. ESCALONA.** (1999). Efecto del ABA, el AIA y la sacarosa sobre el nivel de compuestos nitrogenados en callos embriogénicos de caña de azúcar. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 99). Centro de Bioplantas. Ciego de Ávila. 45 p.

- NODAL, M.** (2001). Caracterización de la variabilidad del género *Xanthosoma* en Cuba. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Biológicas). Universidad de la Habana. Facultad de Biología. 103 p.
- NOWACK, B. y K. MICZYNSKI.** (2002). The course and efficiency of organogenesis on leaf explants of plum "Wegierka Zwyla" (*Prunus domestica* L.) induced by cytokinins. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. P. 35-39.
- OLIVEIRA, C.; M. APARECIDA; T. SEDIYAMA; F. FINGER y C. DAMIAO.** (2002). Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. Horticultura Brasileira, 20(4): 576-582.
- OLORIZ, M.; L. ROJAS; V. GIL; M. MENDOZA; A. ARENCIBIA; E. CARMONA y E. JIMÉNEZ.** (2002). Empleo de AFLP en estudios de somaclones resistentes a la roya de la caña de azúcar. Biotecnología Vegetal, 2(4): 239-242.
- OMOKAWA, H. y S. ANONUMA.** (2002). Amelioration of the SALT stressed root growth of rice and normalization of the Na⁺ distribution between the shoot and root by (s)-alpha-methylbenzyl-2-fluoro-4-methylphenylurea. Bisci Biotechnol Biochem, 66(2): 336-343.
- ONAY, A.; C. JEFREE; C. THEOBALD y M. YEOMAN.** (2000). Analysis of the effects of maturation treatments on the probabilities of somatic embryos germination and plantlet regeneration in pistachio using a linear logistic method. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 121-129.
- ORELLANA, P.** (1998). Propagación vía organogénesis. En: J. Pérez (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Capítulo 9. Volumen I. IBP. Santa Clara. P. 152-178.
- ORELLANA, P. y P. PEÑA.** (2003). Caracterización *in vitro* de la respuesta al NaCl en callos en las fases de multiplicación y regeneración de varios genotipos de arroz. Biotecnología Vegetal, 3(1): 13-18.
- ORTIZ, R.** (2000). Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. Folleto. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana. 25 p.

- ORTIZ, R.; C. DE LA FÉ y D. LARA.** (1998). Aportes de la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. Sustrato más eficiente para la adaptación de vitroplantas. *Cultivos Tropicales*, 19(2): 45-49.
- PARROT, W.** (2002). La embriogénesis somática en las angiospermas. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. P. 7-17.
- PAYRO, C.E. y J.A. VIDAL.** (2002). A model for the regeneration of pitahaya (*Hylocereus undatus* Haw Britton & Rose) by indirect organogenesis: potential use for *in vitro* selection. *Biotecnología Habana 2002. Transgenesis in Plant.* Editorial ELFOS Scientia. P. 181.
- PÉREZ, J.P.; P. ORELLANA; M. SUÁREZ y C. VALDÉS.** (1998). Propagación masiva en biofábricas. En: J. Pérez (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.* Vol. 1. Capítulo 14. IBP. Villa Clara. P. 241-258.
- PÉREZ, A.; A. RODRÍGUEZ; B. DIBUT; Y. MUÑOZ y J. ESTRADA.** (2004). Biotecnologías hechas a la medida para el desarrollo endógeno. Su aplicación en la Agricultura Urbana de Cuba. *Convención Trópico 2004.* CD-ROM. INIFAT. La Habana. 12 p.
- PETEIRA, B.; E. FERNÁNDEZ; P. GARCÍA; E. MIRANDA; O. LEÓN e I. MIRANDA.** (1999). Repetibilidad de los marcadores RAPD en el género *Lycopersicon*. Breve estudio. *Protección Vegetal*, 14(2): 75-79.
- PETEIRA, B.; E. FERNÁNDEZ; M. GONZÁLEZ; T. SHAGARODSKY e I. MIRANDA.** (2001). Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en Cuba. *Protección Vegetal*, 16(2-3): 84-91.
- PIFERRER, A.; Y. ROSALES y Z. REYES.** (2001). Descripción morfohistológica de la callogénesis en piña cabezona (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2001). Centro de Bioplasmas. CD-ROM. Ciego de Ávila. P. 119.
- PILGRIM, D.M.** (2000). Propagación "*in vitro*" de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). La Habana. 120 p.

- PORTIELES, R.; R. RODRÍGUEZ; I. HERNÁNDEZ; E. CANALES y M.T. CORNIDE.** (2002). Determinación del número cromosómico de un grupo de clones silvestres de origen desconocido y clones de fundación del complejo *Saccharum*. *Cultivos Tropicales*, 23(2): 69-72.
- POSADA, L.; R. GÓMEZ; M. REYES y L. ÁLVAREZ.** (2003). Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Bioteología Vegetal*, 3(1): 3-8.
- PREECE, J.E.** (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and the field. En: J.E. Preece y E.G. Luher (eds). *Micropropagation*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. P. 71-93.
- QI, Z.; A. POROBO y Ch. PRAKASH.** (1996). Rapid and repetitive regeneration in Sweetpotato via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 15: 381-385.
- QUING-CHANG, L.; T. KOKUBU y M. SATO.** (1992). Somatic Embryogenesis and Shoot Organogenesis from Leaf Callus of *Ipomoea triloba*, L. *Mem. Fac. Agr. Kogoshuma Univ.*, 28: 55-60.
- RAMÍREZ, C.; P. TESTILLANO; B. PINTOS; M. MORENO; J. DOMENECH; A. GÓMEZ; J. MANZANERA; M. BUENO y M. RISUEÑO.** (2000). Cellular characterization of microspore embryogenesis in anther culture of *Quercus suber*. *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*. Cost 824, Bled, Slovenia. P. 1-5.
- RAMÍREZ, I.; J. FUENTES; N. RODRÍGUEZ; J. CUETO; B. BECKER y W. RHODE.** (2002). Análisis del polimorfismo de ADN en variedades cubanas de aguacate (*Persea americana* Mill.) mediante marcadores moleculares del tipo ISTR. *Cultivos Tropicales*, 23(3): 85-88.
- RAMÍREZ, R.** (2005). Uso de bajas dosis de rayos x en la estimulación del crecimiento, rendimiento y calidad del fruto en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 99 p.

- RAYMOND, S.** (1964). Acrylamide gel electrophoresis. *Ann. Acad. Sci.*, 121: 350-361.
- RISUEÑO, M.** (2000). Microspore-derived embryogenesis from *in vitro* cultures of heat-stressed anthers of *Capsicum annum* involves a dedifferentiation followed by proliferation and further dedifferentiation. *Plant Development and Nuclear Organization*, 4(2): 76-82.
- RIVAL, A.** (2000). Somatic embryogenesis in oil palm. En: S. Jain; P. Gupta y R. Newton (eds). *Somatic Embryos in Woody Plant*, 6: 249-290.
- ROCA, W. y L. MROGINSKI.** (1993). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales. En: W. Roca y L. Mroginski (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Parte A. Capítulo 1.* CIAT. Colombia. P. 1-18.
- RODRÍGUEZ, A.; R. LÓPEZ; Y. SÁNCHEZ; D. PÉREZ; N. MARRERO; G. BRITO; O. PÉREZ y O. LLORENTE.** (2004). Comportamiento de genotipos cubanos de girasol ante la callogénesis y la germinación de los embriones. Convención Trópico 2004. CD-ROM. INIFAT. La Habana. 14 p.
- RODRÍGUEZ, J. y M. MOSQUEDA.** (1996). Determinación de parámetros histopatológicos en la interacción fusarium-piña (*Ananas comosus*, Merr.). Boletín. P. 15-19.
- RODRÍGUEZ, M. y A. ARENCIBIA.** (2002). Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas Analíticas. En: M.T. Cornide (ed). *Marcadores Moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas.* Capítulo 1. P. 13-35.
- RODRÍGUEZ, R.S.** (2005). Aclimatización de plántulas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) propagadas en biorreactores de inmersión temporal. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). Centro de Bioplantas. Ciego de Avila. 94 p.
- RODRÍGUEZ, S.; M. GARCÍA; V. MEDERO; J. LÓPEZ y J. DE LA C. VENTURA.** (1998). Las técnicas biotecnológicas, una valiosa herramienta

- para rescatar el potencial productivo en las raíces y tubérculos tropicales. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO '98. La Habana. P. 52-53.
- RODRÍGUEZ, Y.; E. PÉREZ; E. SOLORZANO; A. MENESES y F. FERNÁNDEZ.** (2001). Actividad de la peroxidasas y la polifenoloxidasas en las raíces de tomate inoculadas con *Glomus clarum* o *Glomus fasciculatum*. Cultivos Tropicales, 22(1): 17-22.
- ROMÁN, M.I.** (2004). Estudio de la diversidad genética en accesiones de bananos y plátanos (*Musa* sp.) en Cuba. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Biológicas). Universidad de la Habana. Facultad de Biología. 106 p.
- ROMÁN, M.I.; CL. GONZÁLEZ; X. XIQUES; M. ALONSO; R. ACOSTA; I. SÁNCHEZ; L. PÉREZ y J. CASAÑAS.** (2001). Análisis genético-bioquímico de clones de plátano fruta y viandas (*Musa* sp.). Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2001). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila. P. 39.
- SALAS, E.; D. AGRAMONTE y R. GÓMEZ.** (2003). Aplicación del cultivo de tejidos en morera (*Morus alba* L.). Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Bioplantas. CD-ROM. Ciego de Ávila. P. 54.
- SALINAS, R.; A. GUTIÉRREZ; R. ÁLVAREZ y J.H. DODDS.** (1990). Obtención de embriones somáticos en camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). ACEVIV. Colombia. Boletín Científico, 3(3): 5-28.
- SALINAS, R.; A. GUTIÉRREZ; R. ÁLVAREZ y J.H. DODDS.** (1991). Regeneración de plantas a partir de embriones somáticos de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). ACEVIV. Colombia. Boletín Científico, 3(3): 58-76.
- SALINAS, R.; A. GUTIÉRREZ; R. ÁLVAREZ y J.H. DODDS.** (1991a). Análisis del desarrollo de embriones somáticos en camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). ACEVIV. Colombia. Boletín Científico, 2(3): 4-12.
- SÁNCHEZ, M.; M. MARTÍNEZ; S. VALLADARES; E. FERRO y A. VIÈITEZ.** (2003). Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf

- and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J. Plant Physiology*, 160: 699-707.
- SÁNCHEZ, Y.; M. MILIAN; A. MORALES y F. DE LA FUENTE.** (1995). Prospección de recursos genéticos de raíces y tubérculos tropicales en Cuba en 1991. *Cultivos Tropicales*, 16(1): 84-87.
- SANTANA, N.** (1982). Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, 4(3):35-40.
- SANTANA, N.** (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA. La Habana. 155 p.
- SANTANA, N.; O. MARTÍNEZ y M. GONZÁLEZ.** (1998). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea arabica*). *Cultivos Tropicales*, 10(2): 36-43.
- SANTAREM, E.; B. PELISSIER y J. FINER.** (1997). Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell, Dev. Biol. Plant*, 33: 13-19.
- SASSON, A.** (2001). Cultivos transgénicos: hechos y desafíos. Editorial ELFOS Scientia. La Habana. 377 p.
- SCOTT, G.J.** (1992). Transformación de los cultivos alimenticios tradicionales: desarrollo de productos a base de raíces y tubérculos. Volumen II. CIP- ICTA. Lima. P. 3-22.
- SCHOOFS, H; B. PANIS; H. STROSSE; A. MAYO; J. LÓPEZ; N. ROUX; J. DOLEZE y R. EWENNER.** (1999). Cuellos de botella en la generación y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *INFOMUSA*, 8(2): 3-7.
- SHU, Q.; G. LIU; D. QI; C. CHU; J. LIU y H. LI.** (2003). An effective methods for axillary bud culture and RAPD analysis of cloned plant in tetraploid black locust. *Plant Cell Reports*, 22(3): 175-180.
- SEGOVIA, R. y D. LAING.** (1993). Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas. En: W. Roca y L.A. Mroginski (eds). *Cultivo de Tejidos en la*

- Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Apéndice G. CIAT. Colombia. P. 925-936.
- SHARP, W.R.** (1980). The physiology "*in vitro*" asexual embryogenesis. Horticultural Rev., 2: 263-310.
- SIGARROA, A. y M.T. CORNIDE.** (1995). Marcadores moleculares para la selección de variedades vegetales. Avances en Biotecnología Moderna. Vol. 3. P. 17-47.
- SILVA, P.; J. MOREIRA; J. LIMA; L. SALOMAO; M. COECEIRO y M. ROCHA.** (2002). Protocolo para desinfestacao de sementes de Tangerina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan.). Revista Agrícola Brasileira. P. 28-32.
- SOTO, F. y D. MORALES.** (1996). Relación de la temperatura del aire, la humedad relativa y la radiación global con el crecimiento de plántulas de cafeto. Cultivos Tropicales, 17(3): 41-44.
- STATISTICA.** (1998). Versión 6.0 para Windows. Statsoft. Inc. Tulsa. USA.
- SONDAHL, M.R.; J.L. SALISBURY y W.R. SHARP.** (1979). Characterization of embryogenesis in *Coffea* callus cells. Z. Pflanzphysiol, 94: 185-188.
- SUKSA-ARD, P.; I. KATAOKA; Y. FUJIME y S. SUBHADRABANDHU.** (1999). Requirement of 2,4-D and sucrose for somatic embryogenesis of papaya. J. Trop. Agr., 43(1):1-4.
- SUMPUI, W. y K. KANCHANAPOON.** (2002). Plant regeneration from petiole and leaf of african violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*. J. Sci. Technol., 24(3): 357-364.
- TAIZ, L. y E. ZEIGER.** (1991). Micropropagation and tissue culture callus in plants. Benjamir/Cumming. Pub. Co. Inc., Redwood City. Plant Physiology, 45: 124-128.
- TAKAHASHI, T.; A. GASCH; N. NISHIZAWA y N. CHUA.** (1995). The diminuto gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. Genes and Development, 9: 97-107.
- TAPIA, C.** (2003). Análisis de la variabilidad genética de Jicama. Boletín Técnico. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. IPGRI. No. 8. P. 50-55.

- TESTILLANO, P.; M. CORONADO; I. BARANY; A. LATINO; J. SEGUI; C. RAMÍREZ; M. DÍAZ-MENDOZA y M. RISUEÑO.** (2001). Defined cellular markers including specific MAPK distribution in two pollen developmental programmer. *Microscopy*. P. 68-69.
- TERÁN, Z.; G. GRASS y R. PLANA.** (1996). Sustratos más eficientes con Zeolita para la adaptabilidad de vitroplantas de caña de azúcar. *Cultivos Tropicales*, 17(3): 75-78.
- TIRAJOH, A.; T. KYUNG y Z. PUNJA.** (1998). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in american ginseng (*Panax quinquefolium* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 34: 203-211.
- TORRES, A.; M. ZEN y D.J. CANTLIFFE.** (2001). Abscisic acid and osmotic induction of synchronous somatic embryo development of sweet potato. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37(2): 262-267.
- TSATSAKIS, A. y M. SHITILMAN.** (1993). Phytoactive polymers: new synthetic plant growth regulators. En: K. Roubelakis-Angelakis y T. Kiem (eds). *Morphogenesis in plants*. Plenum Press, 5: 115-128.
- TSAI, S. y M. TSENG.** (1979). Embryos formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. *Bot. Bul. Acad. Sinica*, 20: 117-122.
- TSENG, Y.; H. LO y S. HWANG.** (2001). Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphism. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43: 99-104.
- USATORRES, B.; D. SOMONTES y Y. CABRERA.** (2002). Obtención de brotes transformados y regenerados de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) resistentes a basta. *Biotecnología Habana 2002. Transgénesis de Plantas*. Editorial ELFOS Scientae. P. 192.
- VALENCIA, M.; J. MORALES y H. SÁNCHEZ.** (2002). Colección colombiana de *Musáceas*. Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe una contribución de MUSALAC a la investigación y desarrollo de las *Musáceas*. 29 p.

- VALLEJO, F. y E. ESTRADA.** (2002). Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Editorial Fervisa S.A. 402 p.
- VARGAS, D.; A. ROQUE y E. HECTOR.** (2002). Empleo de la técnica AFLP para determinar la estabilidad de plantas de frutabomba (*C. papaya* cv. Maradol Rojo) durante la micropropagación. VII Congreso Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. P. 24.
- VÁZQUEZ, E. y S. TORRES.** (1995). Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 451 p.
- VEGA, R.; L.E. RODRÍGUEZ; J.L. SAGUE y Y. SANTIAGO.** (2000). Utilización de sustratos alternativos en la aclimatización de vitroplantas de plátano cv. FHIA 01. XII Seminario Científico del INCA. Cultivos Tropicales. La Habana. P. 188.
- VERA, CI.; M. PAREDES y V. BECERRA.** (1999). Estudio comparativo de diversidad morfológica, isoenzimas y RAPDs dentro y entre clases comerciales de frijol chileno (*Phaseolus vulgaris* L.). Agricultura Técnica, 59(4): 247-259.
- VILLALOBOS, V.M. y T. THORPE.** (1993). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: W. Roca y L. Mroginski (eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia. P. 127-141.
- WALKER, D. y W. PARROT.** (2001). Effect of polyethylene glycol and sugar alcohol's on soybean somatic embryo germination and conversion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64: 55-62.
- WARREN, D. y C. CHRISTOPHER.** (1999). Isozyme variability among cryptic species of botrychium subgenus botrychium (*Ophio glussaceae*). Am. Journal of Botany, 86(15): 614-630.
- WERBROUCK, S.; T. ECKHAUT y P. DEBERGH.** (2000). Induction and conversion of somatic embryogenesis on the anther filament of *Spathiphyllum* Schott. Acta Horticulturae, 520: 263-269.
- WERNIEKEN, N. y R. BRETTELL.** (1981). Somatic embryogenesis from *sorghum bicolor* leaves. Nature, 287: 138-142.

- YOON, E. y Y. CHOI.** (2002). Micropropagation and mass production of adventitious explants. *Journal of Plant Biotechnology*, 4(1): 33-37.
- ZAPATA, F.B.** (1994). Estudio morfohistológico y bioquímico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora var. Robusta*. Trabajo de Diploma. UNAH. La Habana. 74 p.
- ZIV, M.** (1999). Plant propagation and mechanized separation of organogenic clusters from biorreactor culture. Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 99). Centro de Bioplasmas. CD-ROM. Ciego de Ávila.

8. Anexos

Anexo 1. Principales características de los clones seleccionados.

Clones	Categoría comercial	Rend. (t.ha ⁻¹)	Raíz tub. por planta	Ciclo vegetativo (días)	Color de la masa	Color de las raíces tuberosas (epidermis)	Forma de las raíces tuberosas
CEMSA 78-354	Comercial	43,0	3,1	120	Blanca	Crema	Alargada
INIVIT B 90-1	Pre-comercial	20,0	2,9	120	Anaranjado	Anaranjado	Redondo elíptica
INIVIT B 93-1	Pre-comercial	36,0	3,0	120	Anaranjado	Anaranjado	Redondo elíptica
Yabú-8	Comercial	35,0	2,5	130	Crema claro	Morado	Elíptica
Jewel	Pre-comercial	36,0	2,9	110	Anaranjado intenso	Anaranjado intenso	Elíptica

Fuentes: López y col. (1995); Dodds y col. (1992); Instructivo Técnico del Boniato (Cuba. MINAGRI, 1998).

Anexo 2. Potencialidades de las raíces tuberosas en la emisión de brotes a los 25 días.

Clones	Número de raíces tuberosas recolectadas	Total de brotes	Brotes por raíz tuberosa	Longitud de los brotes (cm)	Hojas por brote (x)	Total de hojas	Hojas por raíz tuberosa (x)
CEMSA 78-354	32	86	2,7	13,4	5,7	492	15,4
INIVIT B 90-1	40	92	2,3	14,2	5,5	503	12,6
INIVIT B 93-1	36	87	2,4	12,1	5,3	463	12,7
Yabú-8	35	87	2,5	10,2	5,4	467	13,5
Jewel	26	55	2,1	11,1	5,4	298	11,3

Anexos

Anexo 3. Composición del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) utilizado como medio básico en esta investigación.

	Elementos	Concentración (mg.l ⁻¹)
Macroelementos	CaCl ₂ x 2H ₂ O	440,0
	KNO ₃	1900,0
	KH ₂ PO ₄	170,0
	NH ₄ NO ₃	1650,0
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
	N _a EDTA	37,3
Microelementos	MgSO ₄ x 7H ₂ O	37,0
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6
Vitaminas MS	Acido nicotínico	50,0
	Piridoxina-HCl	60,0
	Tiamina	10,0
	Glicina	200,0
Suplementos	Mioinositol	100,0
	Sacarosa	30,0 g.L ⁻¹

Anexo 4. Composición de los medios de cultivo con mejores resultados en las diferentes etapas de la investigación.

Componentes	ETAPAS DE LA INVESTIGACIÓN				
	Formación de callos	Formación de embriones somáticos	Maduración de los embriones somáticos	Germinación de los embriones somáticos	Conversión en plántulas
Sales MS	10,0 ml.L ⁻¹	10,0 ml.L ⁻¹	10,0 ml.L ⁻¹	10,0 ml.L ⁻¹	10,0 ml.L ⁻¹
Sacarosa	30,0 g.L ⁻¹	30,0 g.L ⁻¹	30,0 g.L ⁻¹	30,0 g.L ⁻¹	30,0 g.L ⁻¹
Tiamina	--	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹	--	1,0 mg.L ⁻¹
Vitaminas MS	10,0 ml.L ⁻¹	--	--	10,0 ml.L ⁻¹	--
Mioinositol	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹
2,4-D	0,50 mg.L ⁻¹	0,2 mg.L ⁻¹	--	--	--
6-BAP	0,25 mg.L ⁻¹	--	--	--	--
ABA	--	--	1,0 mg.L ⁻¹	--	--
TDZ	--	--	--	0,25 mg.L ⁻¹	--
GA ₃	--	--	--	--	10,0 mg.L ⁻¹
Gelrite	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
pH	5,8 ± 0,01	5,8 ± 0,01	5,8 ± 0,01	5,8 ± 0,01	5,8 ± 0,01

Anexos

Anexo 5. Evaluación del efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de callos potencialmente embriogénico a partir de limbos foliares.

Reguladores del crecimiento (mg.L ⁻¹)							Callos potencialmente embriogénicos					
ANA	AIA	AIB	2,4-D	6-BAP	Kinetina	Picloram	Cant.	Color	Nod.	Cpto.	Fr.	Br.
0,1	--	--	--	--	--	--	--	0	0	0	0	0
1,0	--	--	--	--	--	--	--	0	0	0	0	0
2,0	--	--	--	--	--	--	+	B	0	0	0	*
3,0	--	--	--	--	--	--	+	B	0	*	0	*
4,0	--	--	--	--	--	--	++	A	0	*	0	0
5,0	--	--	--	--	--	--	+++	A	*	0	*	0
6,0	--	--	--	--	--	--	+++	A	*	0	*	0
7,0	--	--	--	--	--	--	+++	A	*	0	*	0
8,0	--	--	--	--	--	--	++	A	0	0	0	0
9,0	--	--	--	--	--	--	++	A	0	*	0	0
10,0	--	--	--	--	--	--	++	A	0	*	0	0
--	0,01	--	--	--	--	--	--	0	0	0	0	0
--	0,05	--	--	--	--	--	+	B	0	*	0	*
--	0,1	--	--	--	--	--	+	B	0	*	0	*
--	0,5	--	--	--	--	--	+	B	0	*	0	*
--	1,0	--	--	--	--	--	++	A	0	*	0	0
--	--	0,1	--	--	--	--	+	A	*	*	0	0
--	--	0,5	--	--	--	--	++	A-Cr	*	*	0	0
--	--	1,0	--	--	--	--	+++	Cr	*	0	*	0
--	--	--	0,25	--	--	--	++	A	*	0	*	*
--	--	--	0,50	--	--	--	+++	Cr-A	*	0	*	*
--	--	--	1,0	--	--	--	++	A	*	0	*	*
--	--	--	2,0	--	--	--	+	A	*	0	*	*
--	--	--	2,5	--	--	--	+	A	*	0	*	*
--	--	--	0,25	0,25	--	--	+++	A	0	*	0	*
--	--	--	0,50	0,25	--	--	+++	Cr-A	*	0	*	0
--	--	--	1,0	0,25	--	--	+++	Cr-A	*	*	0	0
--	--	--	2,0	0,25	--	--	+++	A	*	*	0	0
--	--	--	2,5	0,25	--	--	+++	A	0	*	0	0
--	--	--	0,25	0,50	--	--	+++	Cr-A	*	*	0	0
--	--	--	0,50	0,50	--	--	+++	Cr-A	*	*	0	0
--	--	--	1,0	0,50	--	--	++	Cr-A	*	*	0	0
--	--	--	2,0	0,50	--	--	+++	A	*	*	0	0
--	--	--	2,5	0,50	--	--	+++	A	0	*	0	0
--	--	--	0,25	1,0	--	--	++	A	0	*	0	0
--	--	--	0,50	1,0	--	--	+++	A	0	*	0	0
--	--	--	1,0	1,0	--	--	+++	A	0	*	0	*
--	--	--	2,0	1,0	--	--	+++	A	0	*	0	*
--	--	--	2,5	1,0	--	--	++	A	0	*	0	*

... Continua...

Anexos

Anexo 5. Evaluación del efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de callos potencialmente embriogénico a partir de limbos foliares.

...Continuación...

Reguladores del crecimiento (mg.L ⁻¹)							Callos potencialmente embriogénicos					
ANA	AIA	AIB	2,4-D	6-BAP	Kinetina	Picloram	Cant.	Color	Nod.	Cpto.	Fr.	Br.
--	--	--	0,25	--	0,05	--	+++	Cr-A	*	0	*	*
--	--	--	0,50	--	0,05	--	+++	Cr-A	*	0	*	*
--	--	--	1,0	--	0,05	--	+++	Cr-A	*	0	*	*
--	--	--	2,0	--	0,05	--	+++	A	*	0	*	*
--	--	--	2,5	--	0,05	--	++	A	*	0	*	*
--	--	--	0,25	--	0,1	--	+++	Cr-A	*	*	0	0
--	--	--	0,50	--	0,1	--	+++	Cr-A	*	*	0	0
--	--	--	1,0	--	0,1	--	++	A	*	0	*	0
--	--	--	2,0	--	0,1	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	2,5	--	0,1	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	0,25	--	1,5	--	+++	A	*	0	*	0
--	--	--	0,50	--	1,5	--	+++	A	*	0	*	0
--	--	--	1,0	--	1,5	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	2,0	--	1,5	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	2,5	--	1,5	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	0,25	--	2,0	--	++	A	*	0	*	0
--	--	--	0,50	--	2,0	--	++	A	*	0	*	0
--	--	--	1,0	--	2,0	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	2,0	--	2,0	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	2,5	--	2,0	--	+	A	0	*	0	0
--	--	--	--	0,25	--	0,5	+++	A	*	0	*	*
--	--	--	--	0,25	--	1,0	+++	A	*	0	*	*
--	--	--	--	0,25	--	1,5	+++	A	*	0	*	0

Cant.: Cantidad de callos formados:

(-): no formación de callos (0%).

(+): poca formación de callos (hasta 30%).

(++): mediana formación de callos (desde 31% hasta 60%).

(+++): abundante formación de callos (desde 61% hasta 100%).

Color: A: amarillo.

Cr: crema.

B: blanco.

Fr.: friable.

Nod.: nodular.

Cpto.: compacto.

Br.: brillante.

Anexos

Anexo 7. Actividades a desarrollar mediante la carta tecnológica en la siembra tradicional del banco de "semilla" del boniato.

No.	Labores realizadas	Número de labores	Días (antes y después)	Norma salarial hombre/día/labor (MN)
1	Roturar	1	- 60	6,80
2	Grada	4	- 41, 23, 20, 11	7,84
3	Cruce	1	- 30	6,80
4	Subsolador	1	-25	7,84
5	Alisar	2	- 21, 19	6,80
6	Surcar	1	- 4	3,92
7	Triturar fertilizante	1	- 4	5,36
8	Tiro de fertilizante	2	- 4	5,92
9	Fertilizar	2	- 3	4,96
10	Otras labores	1	- 3	4,96
11	Desinfección de "semilla"	2	0, 9	5,36
12	Tiro de "semilla"	2	0, 9	4,96
13	Acondicionamiento de riego	5	0, 6, 12, 22, 35	4,96
14	Riego	5	0, 6, 12, 22, 35	5,92
15	Sembrar	1	0	5,36
16	Aplicación de herbicidas	1	1	5,92
17	Preparación de "semilla"	1	9	5,36
18	Resiembra	1	10	5,36
19	Cultivar	3	18, 31, 47	8,17
20	Limpia manual	3	19, 32, 48	5,36
21	Tiro de agua de fumigación	3	23, 30, 37	8,17
22	Fumigar	3	23, 30, 37	5,92
23	Corte de "semilla"	3	60, 120, 180	5,92
	Total	51	47	---

Fuente: Carta Tecnológica de la Empresa de Cultivos Varios de Manzanillo, Provincia Granma. Según el Instructivo Técnico del Boniato (Cuba. MINAGRI, 1998).

Labores para realizar en una hectárea hasta los sesenta días: 51.

Total de labores hasta los sesenta días: 47.

Anexos

Anexo 6. Caracterización físico-química del suelo Ferralítico Rojo Lixiviado Típico (Borges, 2004).

Horizontes	Profundidad (cm)	pH	MO (%)	Ca (cmol.kg ⁻¹)	Mg (cmol.kg ⁻¹)	Na (cmol.kg ⁻¹)	K (cmol.kg ⁻¹)	Da (kg.dm ³)	Porosidad total (%)	Humedad (%)
A ₁	0-19	7,3	3,67	16,3	2,1	0,2	0,9	1,11	59,0	27,9
B ₁₁	20-44	6,8	---	13,4	2,8	0,2	0,5	1,17	56,8	30,6
B ₁₂	45-60	6,7	2,00	9,5	1,5	0,2	0,3	1,10	59,9	32,1
B _{2t}	61-100	5,7	1,12	8,3	1,0	0,2	0,2	1,10	60,3	33,8

Descripción del primer horizonte: Color en seco: rojo oscuro (0-3 cm) y rojo (4-19 cm), textura: arcillosa, estructura: granular pequeña (0-3 cm) y bloques (4-19 cm), friable (0-3 cm) y compacto (4-19 cm), seco, poroso y sin reacción al HCL.

Anexo 6.1. Caracterización físico-química del suelo utilizado en la investigación.

Sustrato empleado	pH	MO (%)	Ca (cmol.kg ⁻¹)	Mg (cmol.kg ⁻¹)	K (cmol.kg ⁻¹)	N (kg.ha ⁻¹)	P (ppm)	Da (kg.dm ³)
Suelo	7,5	3,24	16,9	3,2	0,19	0,16	203,0	1,00

Anexo 6.2. Caracterización físico-química de la materia orgánica (cachaza) utilizada en la investigación.

Sustrato empleado	Condición	pH	MO (%)	Ca (%)	Mg (%)	K (%)	N (%)	P (%)	Da (kg.dm ³)	Humedad (%)
Cachaza	Base seca	8,8	62,10	4,57	2,70	0,17	1,43	1,68	0,78	--
	Base húmeda	8,8	51,92	3,82	2,25	0,14	1,20	1,42	--	16,26

Anexo 6.3. Caracterización físico-química del sustrato utilizado en la investigación.

Sustrato empleado	Condición	pH	MO (%)	Ca (%)	Mg (%)	K (%)	P (ppm)	Da (kg.dm ³)	Humedad (%)
Mezcla Suelo +Cachaza	Base seca	7,9	16,02	6,9	1,87	0,87	159	1,01	61,6
	Base húmeda	7,9	16,31	5,2	1,38	0,33	118	1,01	61,6

Mezcla en proporción: 3:1 (p/p). Profundidad del suelo analizada: 20 cm.

Métodos de valoración empleados para la determinación de los elementos del suelo asimilable:

K (Potasio) y N_a (Nitrito): Método de Maslova (1939) de extracción con acetato de amonio y determinación por fotometría de llama *.

C_a (Calcio) y M_g (Magnesio): Método de Maslova (1939) de extracción con acetato de amonio y determinación por valoración con EDTA*.

P (Fósforo): Método de Aronld y Kurtz *.

MO (Materia orgánica): Método de Walkley-Black (1947).

N (Nitrógeno): Método de Kjeldahl (1945).*

pH: Método Potenciométrico (en agua).

Humedad: Método gravimétrico.

* Citados por Jakson (1970).

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{100 (\text{PH} - \text{PS})}{\text{PH}}$$