

Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4-D y 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato

Orlando S. González Paneque*, Isabel Milanés Vega, Juan J. Silva Pupo, Angel Espinosa Reyes y Leonardo Acosta Pompa. *Autor para correspondencia.

Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Apdo. 21. Bayamo. C.P.: 85100. Granma. Cuba. e-mail: ogpaneque@udg.co.cu

RESUMEN

Raíces tuberosas de los clones Inivit B 90-1 y Yabú-8, fueron trasladadas al laboratorio y colocadas en frascos con agua; seleccionando de los brotes emitidos explantes de limbos foliares. Los mismos fueron desinfectados con Hipoclorito de Sodio (Na OCl) al 1% y sembrados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog que contenía diferentes concentraciones de 2,4-D independiente en el medio de cultivo y combinado con 6-BAP. Los cultivos fueron incubados en condiciones de luz solar y evaluados a las cuatro semanas. Los mejores resultados en la inducción de callos morfogénicos con características de color crema amarillentos, nodulares y friables; se obtuvieron con las concentraciones de 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) independiente y 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) combinado con 6-BAP (0.2 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo.

Palabras clave: clon, explantes, *Ipomoea*, tubérculos

ABSTRACT

Tubers from Inivit B 90-1 and Yabú-8, cultivars were put in the laboratories into water bottle and we chose explants of limbs from sprout. Explants were disinfected with Sodium Hypochlorite (Na OCl) with active chlorine (1%) and they were put into Murashige and Skoog culture medium under different concentrations of 2,4-D independent and combined with 6-BAP in the culture medium. Crops were put on the energy illumination. The best results in four weeks at the morphogenic callus induction were obtained with the concentrations of 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) and 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) combined with BAP (0.2 mg.l⁻¹) in the culture medium.

Key words: clon, explants, *Ipomoea*, tubers

INTRODUCCIÓN

El éxito del empleo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, está muy influenciado por la composición química del medio de cultivo y los factores ambientales (Gamborg, 1984; López, 1990). Si falta algún componente básico en el medio de cultivo, lo normal es que no se produzca crecimiento y desarrollo y el tejido u órgano muera. En el uso de las técnicas *in vitro* en las plantas superiores, los reguladores del crecimiento, especialmente las auxinas y citocininas, juegan un papel muy importante (Pierik, 1990).

Para establecer un sistema artificial de cultivo de tejidos vegetales, se debe elaborar un medio de cultivo que se ajuste a los principios requeridos nutricionalmente por la especie vegetal y tipo de explante empleado (Szabados *et al.*, 1993; Molina *et al.*, 2003).

Las auxinas, generalmente, producen elongación y a bajas concentraciones predomina la formación de raíces adventicias; mientras que, con altas concentraciones no se producen raíces y tiene lugar, en cambio, la formación de callos (Margara, 1988). Por otro lado, las giberelinas inducen la elongación de los entrenudos y el crecimiento de los meristemos aislados

o yemas *in vitro*, pueden romper la dormancia de los embriones y generalmente inhiben la formación de raíces y vástagos adventicios. Según Parrot (2002), cuando el nivel de auxinas en el medio de cultivo baja más de cierto umbral, las células embriogénicas comienzan un proceso de histodiferenciación.

En los diferentes cultivos agrícolas se manifiesta particular exigencia por la composición del medio de cultivo y en el boniato se han probado distintos reguladores del crecimiento y las respuestas encontradas han sido diferentes en cuanto al comportamiento en la inducción de callos, multiplicación y enraizamiento (Carswell, 1981). Siendo necesario realizar estudios de la composición del medio de cultivo en el comportamiento morfogénico *in vitro* de los clones existentes en Cuba, para de esta manera llevar a cabo trabajos de mejoramiento y propagación de esta especie.

Debido a la dificultad de obtener semillas botánicas, donde los problemas que afrontan los trabajos de mejoramiento convencional, son básicamente la lentitud y altos costos, ya que se requiere entre diez y quince años para la creación de una nueva variedad, una alternativa a estas dificultades es las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (Salinas *et al.*, 1991a). El

medio de cultivo comúnmente empleado para llevar a cabo estos trabajos es el de Murashige y Skoog (1962), donde se han obtenido resultados satisfactorios en otros cultivos (Roca y Mroginsky, 1993; Kende y Zeevart, 1997).

Es de vital importancia el desarrollo de la callogénesis en el cultivo del boniato, ya que la morfogénesis como proceso se manifiesta a través de la embriogénesis somática o la organogénesis; donde una u otra tienen grandes aplicaciones en el cultivo de tejidos vegetales y las técnicas biotecnológicas se aplican en una gran cantidad de cultivos, que incluye entre ellos las raíces y tubérculos (FAO, 1995).

La proyección futura de los laboratorios de biotecnología puede concretarse a través del desarrollo y la aplicación de técnicas biotecnológicas en mejoramiento genético y/o producción vegetal. Disponer de un método de selección y propagación *in vitro* en el cultivo del boniato, permitirá llevar a cabo trabajos de mejoramiento y multiplicación en esta especie; además, de lograr una mayor eficiencia en la obtención de nuevos somaclones y la propagación de los existentes.

Por todo lo anteriormente planteado, se propone como objetivo estudiar las concentraciones de ácido 2,4 diclorofenociacético (2,4-D) independiente y combinado con N⁶-bencilaminopurina (6-BAP) en el medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos en el cultivo *in vitro* del boniato.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de raíces tuberosas y pertenecientes a los clones Inivit B 90-1 y Yabú-8, colocadas en el laboratorio en frascos con agua, se obtuvieron brotes y a los veinticinco días se tomaron de ellos los explantes de limbos foliares. Estas fueron seccionadas a 1 cm² y sembrados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962), sacarosa (3%), agar-agar (0.6%) y ajustado el pH a 5.8. Se añadieron 20 ml en frascos con capacidad de 250 ml, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos y fueron adicionados los reguladores del crecimiento como a continuación se describe:

A partir de estudios preliminares con diferentes reguladores del crecimiento: ácido á-naftalenacético (ANA), ácido indolil-3-acético (AIA), ácido indolil-3-butírico (AIB) y ácido 2,4 diclorofenociacético (2,4-D) independientes o combinados con N⁶-bencilaminopurina (6-BAP) o Kinetina, se seleccionó el 2,4-D y se procedió a

determinar la concentración más adecuada de 2,4-D independiente y combinado con 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos.

Primera fase: Efecto del 2,4-D en el medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos

Se colocaron explantes de limbos foliares de los clones antes mencionados, en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y se añadieron diferentes concentraciones de 2,4-D: 0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 y 3.0 mg.l⁻¹, evaluándose a las cuatro semanas las concentraciones más adecuadas para la inducción de callos, teniendo en cuenta: porcentaje de callos formados, desarrollo de los callos (según escala de Santana, 1982), color y consistencia (compacta o friable).

Segunda fase: Efecto del 2,4-D combinado con 6-BAP en el medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos

Transcurridas cuatro semanas se seleccionaron las mejores concentraciones de 2,4-D y posteriormente se procedió a evaluar el efecto de la combinación de 2,4-D (a las concentraciones seleccionadas) con 6-BAP en diferentes concentraciones, sobre la inducción de callos morfogénicos (0.02; 0.2 y 1.0 mg.l⁻¹). Los recipientes de cultivo con las siembras asépticas fueron colocados en condiciones de luz solar de 4000-5000 lux.

A las cuatro semanas de cultivo se evaluaron las mismas variables del experimento anterior. Se analizaron veinticinco muestras por tratamiento y se realizaron tres repeticiones en cada caso. Se empleó un diseño completamente aleatorizado y el procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo en los callos pertenecientes al grado 3 de la escala de Santana (1982), para lo cual se realizó un análisis de comparación de proporciones y al existir diferencias entre las medias se les aplicó la prueba de rango múltiple de Duncan al 1%. Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA.

Descripción de la escala empleada por Santana (1982):
0 – no formación del callo.

1 – ligera formación del callo (se observó una débil proliferación en zonas del borde del explante).

2 – formación del callo (hay proliferación de células por todos los bordes del explante, sin llegar a formar una masa).

3 – abundante formación del callo (formación de una masa voluminosa de callos).

Para calcular el porcentaje de callos formados, se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Callos formados (\%)} = \frac{\text{número de explantes con callos por tratamiento}}{\text{número total de explantes por tratamiento}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre las características morfológicas de los callos de grado 3 de la escala en el cultivo del boniato, se apreciaron: color crema amarillo, consistencia friable y apariencia nodular, indistintamente del tipo de clon empleado; mientras que, los callos de grado 2, fueron de color amarillo y consistencia compacta, y los de grado 1 no presentaron características morfogénicas favorables para la embriogénesis ni organogénesis, siendo definidas estas variables por el crecimiento y las características morfológicas del callo según la escala de Santana (1982).

Primera fase: Efecto del 2,4-D en el medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos

Como se puede observar en las tablas 1 y 2, la inducción de callos a partir de los limbos foliares a las cuatro semanas fue posible con todas las concentraciones de 2,4-D utilizadas; no obstante los mejores resultados (callos con grado 3 de color crema amarillo, nodulares y friables) se obtuvieron con las concentraciones de 0.1; 0.5 y 1.0 mg.l⁻¹ que se muestran para los clones Inivit B 90-1 y Yabú-8. Al aumentar la concentración de 2,4-D no se formaron callos de grado 3, obteniéndose callos de grado 2 y a la concentración de 3.0 mg.l⁻¹ solamente se obtuvieron callos de grado 1 de la escala y un determinado porcentaje de explantes que no formaron callos. Por lo tanto, la mayor capacidad para inducir el porcentaje de callos pertenecientes al grado 3 de la escala, se puso de manifiesto cuando se empleó 0.1 mg.l⁻¹ de 2,4-D en el medio de cultivo para los clones evaluados.

Tabla 1. Influencia del 2,4-D independiente y combinado con 6-BAP en la inducción de callos morfogénicos de boniato en el clon Inivit B 90-1.

2,4-D						2,4-D combinado con 6-BAP						
2,4-D	Callos	Número de callos por grado de la escala (%)				(mg.l ⁻¹)	Callos	Número de callos por grado de la escala (%)				
(mg.l ⁻¹)	(%)	0	1	2	3	2,4-D	6-BAP	(%)	0	1	2	3
0.01	92.0 a	8.0	0	60.0	32.0 c	0.1	0.02	100 a	0	0	64.0	36.0 c
0.05	88.0 b	0	24.0	16.0	60.0 b	0.1	0.2	100 a	0	0	0	100 a
0.1	100 a	0	0	4.0	96.0 a	0.1	1.0	52.0 b	48.0	0	20.0	32.0 c
0.5	100 a	0	0	8.0	92.0 a	0.5	0.02	100 a	0	0	48.0	52.0 b
1.0	100 a	0	0	12.0	88.0 a	0.5	0.2	64.0 b	36.0	64.0	0	0 d
1.5	100 a	0	0	8.0	16.0 cd	0.5	1.0	48.0 bc	52.0	48.0	0	0 d
2.0	100 a	0	100	0	0 d	1.0	0.02	8.0 d	92.0	8.0	0	0 d
2.5	100 a	0	80.0	20.0	0 d	1.0	0.2	36.0 c	64.0	36.0	0	0 d
3.0	100 a	0	100	0	0 d	1.0	1.0	12.0 d	88.0	12.0	0	0 d

Tabla 2. Influencia del 2,4-D independiente y combinado con 6-BAP en la inducción de callos morfogénicos de boniato en el clon Yabú-8.

2,4-D						2,4-D combinado con 6-BAP						
2,4-D	Callos	Número de callos por grado de la escala (%)				(mg.l ⁻¹)	Callos	Número de callos por grado de la escala (%)				
(mg.l ⁻¹)	(%)	0	1	2	3	2,4-D	6-BAP	(%)	0	1	2	3
0.01	60.0 c	40.0	0	32.0	28.0 d	0.1	0.02	100 a	0	0	72.0	28.0 b
0.05	100 a	0	0	52.0	48.0 c	0.1	0.2	100 a	0	0	12.0	88.0 a
0.1	100 a	0	0	16.0	84.0 a	0.1	1.0	56.0 c	44.0	56.0	0	0 c
0.5	100 a	0	0	32.0	68.0 ab	0.5	0.02	80.0 b	20.0	0	60.0	20.0 b
1.0	100 a	0	20.0	20.0	60.0 bc	0.5	0.2	100 a	0	20.0	80.0	0 c
1.5	100 a	0	16.0	60.0	24.0 d	0.5	1.0	100 a	0	100	0	0 c
2.0	84.0 b	16.0	72.0	12.0	0 e	1.0	0.02	100 a	0	40.0	60.0	0 c
2.5	80.0 b	20.0	80.0	0	0 e	1.0	0.2	24.0 d	76.0	24.0	0	0 c
3.0	80.0 b	20.0	80.0	0	0 e	1.0	1.0	20.0 d	80.0	20.0	0	0 d

En la tabla 1, se muestra el comportamiento del clon Inivit B 90-1 que arrojó buenos resultados en cuanto a la inducción de callos morfogénicos a las cuatro semanas, alcanzando un 96.0% pertenecientes al grado 3 con el empleo de 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo y el resto de los callos pertenecientes al grado 2, con un total de 100%, seguido de 0.5 mg.l⁻¹ de 2,4-D con un 92.0% de callos de grado 3. Por otro lado, el clon Yabú-8 presentó un menor comportamiento en la inducción de callos morfogénicos (Tabla 2) y los más altos valores pertenecientes al grado 3 correspondieron al 84.0% para la concentración de 0.1 mg.l⁻¹ y un 68.0% para el mismo valor de grado de la escala en la concentración de 0.5 mg.l⁻¹. Como se observó, el comportamiento de los clones marcó tendencias diferentes, destacándose el clon Inivit B 90-1 por su facilidad en la inducción de callos pertenecientes al grado 3, alcanzando un 96.0% y menores resultados en el Yabú-8. Todo parece indicar que, los clones del tipo Inivit fueron propensos a la inducción de callos morfogénicos de mejor calidad y con mayor velocidad en su formación y crecimiento, según análisis visual comparativo realizado.

Cantliffe (1993), en clones de boniato obtuvo resultados satisfactorios en la inducción de callos morfogénicos y otros procesos organogénicos desarrollados *in vitro*; mientras que, en 1977, García y Menéndez (citados por Santana, 1982) en el cafeto, refirieron que con la ausencia de 2,4-D la producción de callos fue nula y con el aumento de éste y en combinación con 6-BAP fue posible la inducción de callos morfogénicos.

Salinas *et al.* (1991), en la inducción de callos en diferentes clones peruanos de *Ipomoea batatas* con el empleo de limbos foliares y el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con diferentes concentraciones de 2,4-D, comprobaron que este regulador del crecimiento tuvo un efecto marcado en el proceso de inducción de callos, donde las concentraciones de 0.05 y 0.1 mg.l⁻¹ resultaron ser las más eficientes para inducir y facilitar el desarrollo de los callos. Resultados similares fueron obtenidos en este estudio con el empleo de clones diferentes a los utilizados por ellos y adaptados a distintas condiciones edáficas y climáticas.

Segunda fase: Efecto del 2,4-D combinado con 6-BAP en el medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos

En la tabla 1 se muestra el comportamiento del clon Inivit B 90-1 con el empleo de diferentes concentraciones de 2,4-D combinado con 6-BAP, el cual manifestó los mejores resultados en comparación con el clon Yabú-8, observándose el mayor número de callos pertenecientes al grado 3 de la escala en el medio que contenía 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) y 6-BAP (0.2 mg.l⁻¹). A la concentración de

2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) combinado con 6-BAP (0.02, 0.2 y 1.0 mg.l⁻¹) no se obtuvieron formaciones callogenas pertenecientes al grado 3 de la escala. Por otro lado, el clon Yabú-8 (Tabla 2), manifestó los mejores valores en la inducción de callos, alcanzando un 88.0% de grado 3 cuando se empleó 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) y 6-BAP (0.2 mg.l⁻¹) y al usar combinaciones de 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) con 6-BAP (0.02; 0.2 y 1.0 mg.l⁻¹) se lograron resultados similares al clon Inivit B 90-1. Con la combinación del 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) y 6-BAP (0.2 mg.l⁻¹), independientemente de los valores cuantitativos obtenidos, se lograron callos de los grados 3, 2 y 1; con las características morfológicas descritas anteriormente para estos grados de la escala, destacándose la combinación de 0.1 mg.l⁻¹ de la auxina con 0.2 mg.l⁻¹ de la citocinina, en comparación con el empleo del 2,4-D solamente en el medio de cultivo y esto demuestra que, en el cultivo de tejidos, donde el crecimiento del callo es normal, se requiere de reguladores del crecimiento para lograr la continuidad del material y existe siempre una correlación entre la respuesta del material vegetal y la concentración del regulador del crecimiento empleado.

Como se observó, con el empleo de la auxina y la citocinina, la relación se inclinó a favor de la citocinina; coincidiendo con los resultados obtenidos en 1968 por Murashige y Miller (citados por Bidwell, 1979) en lo referente a las posibles tendencias en la inducción de callos y órganos con el empleo de combinaciones de auxinas y citocininas; dado en que al utilizar mayores valores de la concentración de la citocinina, en relación con la auxina, se favorece la callogénesis.

Debe destacarse que, a pesar de haberse obtenido material callógeno con bajas concentraciones de reguladores del crecimiento, los callos inducidos en ocasiones fueron amarillentos y de apariencia acuosa, no presentando características favorables a la morfogénesis. Por lo tanto, esto sugiere que son precisamente las características del callo las que determinan su capacidad morfogénicas (Cantliffe, 1993).

En las fases del cultivo de callo, el genotipo juega un importante papel para llegar a obtener éxito, por lo cual se debe siempre trabajar durante la investigación con dos o tres genotipos a la vez. Los callos pueden tener diferentes apariencias y color, en dependencia de la especie o genotipo que se trabaje, así como las condiciones de cultivo *in vitro* (Gómez, 1998) y es por ello que, en este estudio se trabajó con dos genotipos de boniato y no se obtuvo igual comportamiento en los mismos en la inducción de callos morfogénicos.

Narvaez (1983), señaló la influencia diferencial que ejercen algunos niveles de auxinas y combinaciones de auxinas y citocininas en las frecuencias de inducción de callos y regeneración de plantas,

argumentando que constituyen el principal elemento del medio inductor del proceso.

Según Murashige (1992), el proceso de regeneración de plantas puede iniciarse en el propio medio de cultivo de inducción de callos, cuando se utilizan combinaciones de auxinas y citocininas en el mismo. Se han empleado en la inducción de callos diversas combinaciones de 2,4-D y 6-BAP, obteniendo respuestas diferentes con el empleo de los distintos reguladores del crecimiento y cuando no se incluía el 2,4-D en el medio de cultivo no ocurrió inducción de callos. Lo que sugiere la importancia de esta auxina en la callogénesis en diversas especies, entre las que se encuentra el cultivo del boniato.

Según Piferrer *et al.* (2001), el proceso de callogénesis es una parte esencial para la morfogénesis *in vitro* y el estudio morfológico es importante para la determinación del tipo de evento morfológico ocurrido y las características del mismo.

CONCLUSIONES

La composición del medio de cultivo para la inducción de callos morfológicos en el cultivo *in vitro* del boniato debe de contener; además, de las sales de Murashige y Skoog (1962), los reguladores del crecimiento 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) independiente en el medio de cultivo o 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) combinado con 6-BAP (0.2 mg.l⁻¹), preferentemente el empleo del 2,4-D (0.1 mg.l⁻¹) donde se han obtenido buenos resultados.

En los medios de cultivo empleados para la inducción de callos morfológicos en boniato, se observó la presencia de tres tipos de callos: uno de color amarillo claro, apariencia nodular mucilaginosa y de consistencia esponjosa, (grado 1 de la escala); otros de color amarillo con visos verdes o pardos, de consistencia compacta y dura, de apariencia nodular (grado 2) y otros de color crema amarillo, friables y nodulares, correspondientes al grado 3.

REFERENCIAS

Bidwel, RG (1979) Fisiología Vegetal. Primera Edición en Español, P. 784

Cantliffe, DJ (1993) Advanced Propagation Systems for Biomass Species: A model system based on Sweet Potato. Biomass and Bioenergy 5 (1): 63-69

Carswell, G (1981) Regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). MS Tesis Universidad de Illinois, Urbana-Champaign, p. 188

FAO (1995) Biotecnología Apropiable: Racionalidad de su desarrollo y aplicaciones en América Latina y el Caribe. Red de Cooperación técnica en biotecnología Vegetal, p. 81, Santiago de Chile

Gamborg, OL (1984) Plant cells cultures; nutrition and media. Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants, I. Laboratory procedures and their applications, pp. 19-26

Gómez, KR (1998) Cultivo de células y tejidos. En: Pérez Ponce JN (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Cap. 2, Vol. 1, pp. 25-44, IBP, Santa Clara

Kende, H, Zeevar JA (1997) The five "classical" plant hormonal. Plant Cell, 9: 1197-1210

López, PCr (1990) Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. En: Villalobos VM (Ed) Fundamentos Teórico-Prácticos del cultivo de tejidos vegetales, pp. 15-19, FAO (105)

Margara, J (1988) Preparación y composición de los medios nutritivos. Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Los Meristemas y la Organogénesis, pp. 49-115, INRA, Madrid

Molina, L, Escalona M, Rodríguez R y Jihad A (2003) Efecto de la luz en el cultivo fotomixotrófico de la Piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en Biorreactores de Inmersión Temporal. Memorias del Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). Centro de Biotecnología de las Plantas (Bioplantas). Ciego de Ávila, Cuba

Murashige, T (1992) Uso del cultivo de anteras en el mejoramiento genético del arroz. Paper present in the International Workshop of Anther Culture for Rice Breeders, pp. 205-303

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantar 15: 473-497

Narvaez, J (1983) Cultivo de tejidos de arroz. Inducción de plantas, pp. 26-34, CIAT, Bogotá

Parrot, W (2002) La Embriogénesis somática en las angiospermas. Conferencia VI simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Libro Resúmenes. Instituto de Biotecnología de las Plantas, pp. 7-17. Santa Clara, Cuba

Pierik, RL (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa, pp. 49-113, Madrid

Piferrer, AE, Rosales Y y Reyes Z (2001) Descripción morfohistológica de la callogénesis en Piña cabeza (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Resúmenes del Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003). p. 119. Ciego de Ávila

Roca, WM y Mroginsky LA (1993) Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales. En: Roca W y Mroginsky LA (Eds) Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Parte A, Cap. 1, CIAT, pp. 1-18, Cali

Salinas, R, Gutiérrez A, Álvarez R y Dodds JH (1991) Análisis del desarrollo de embriones somáticos en Camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Boletín Científico No. 2, pp. 4-12, Colombia

Salinas, R, Gutiérrez A, Álvarez R y Dodds JH (1991a) I regeneración de plantas a partir de embriones somáticos de Camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Boletín Científico, ACEVIV, Vol. 3, No. 3, p. 8, Colombia.

Santana, NB (1982) Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp*) *in vitro*. Cultivos Tropicales. 4 (3): 48-52

Szabados, L, Núñez V, Tello L, Mafla G, Roa J y Roca W (1993) Agentes gelificantes en el cultivo de tejidos. En: Roca W y Mroginski L (Eds) Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cap. 4, pp. 80-93. CIAT, Cali.