

Embriones somáticos en el cultivo del boniato (*ipomoea batatas* (L.) Lam.) Vía de micropropagación acelerada (Original)

Somatic embryos in the cultivation of boniato (*ipomoea batatas* (L.) lam.) via of accelerated micropropagation (Original)

Orlando Salustiano González Paneque. Ingeniero Agrónomo. Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. ogonzalezp@udg.co.cu 

Juan José Silva Pupo. Ingeniero Agrónomo. Doctor en Ciencias. Profesor Titular. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. jsilvap@udg.co.cu 

Recibido: 24-04-2021/ Aceptado: 23-07-2022

Resumen

El cultivo del boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) constituye un alimento importante a nivel mundial, siendo necesario el uso de las técnicas biotecnológicas para facilitar mayor disponibilidad de material de plantación y el empleo de las técnicas de micropropagación *in vitro*, específicamente, la embriogénesis somática facilita el establecimiento de bancos de semilla de calidad. En la presente investigación fueron utilizados explantes de limbos foliares procedentes de brotes de raíces tuberosas pertenecientes a los clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1, Yabú-8 y Jewel, desinfectados con hipoclorito de sodio (1%), durante 15 minutos; posteriormente, se procedió a la formación de los callos potencialmente embriogénicos, la obtención de los embriones somáticos, la maduración, germinación y conversión en plántulas. Se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), y para la formación de los callos potencialmente embriogénicos, se añadió 2,4-D (0,50 mg.L⁻¹) y 6-BAP (0,25 mg.L⁻¹);

la inducción de los embriones somáticos se logró con 2,4-D ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$), no existiendo diferencias significativas entre los clones en ambos experimentos. La maduración de los embriones somáticos se alcanzó con el ácido abscísico (ABA) a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ y con el tidiazurón (TDZ) a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$. Se lograron los mayores resultados en la germinación; mientras, que la conversión en plántulas se obtuvo con el empleo del ácido giberélico (GA_3) a $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Palabras clave: embriogénesis somática; boniato; micropropagación; cultivo

Abstract

The culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) constitutes a important food worldwide, being necessary the use of biotechnological techniques to facilitate a greater availability of planting material with the increase the use of *in vitro* micropropagation techniques, specifically, the somatic embryogenesis, would help to establish quality seed banks. In the present investigation, explants of leaf blades of tuberous root shoots belonging to clones CEMSA 78-354, INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1, Yabú-8 and Jewel were used, disinfected with sodium hypochlorite (1%,) for 15 minutes, subsequently, the potentially embryogenic callus were formed, the somatic embryos were obtained, they matured, germinated and converted into seedlings. Being used the culture medium proposed by Murashige and Skoog (1962) and for the formation of potentially embryogenic callus, 2,4-D ($0,50 \text{ mg.L}^{-1}$) and 6-BAP ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) and the formation of somatic embryos was achieved with the addition of 2,4-D ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$), with no significant differences between the clones in both experiments. Maturation of somatic embryos was achieved with the addition of abscisic acid (ABA) a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ and with thidiazuron (TDZ) a $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ the highest results in germination; meanwhile, the conversion into seedlings was obtained with the use of gibberellic acid (GA_3) a $10,0 \text{ mg. L}^{-1}$.

Keywords: somatic embryogenesis; sweet potato; micropropagation; farming

Introducción

El boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) es una raíz tuberosa cultivada en muchos países, se emplea en la alimentación humana y animal, en la industria, y puede ser utilizado como forraje y abono verde (López et al., 2002).

En Cuba es un alimento altamente consumido y son destinadas espaciosas áreas agrícolas a este cultivo, lo cual requiere grandes volúmenes de material para la plantación y la aplicación de las nuevas tecnologías que facilitan la disponibilidad del mismo, constituyendo una alternativa el empleo de las técnicas biotecnológicas como vía de propagación masiva de plantas y entre ellas, la embriogénesis somática que ofrece una oportunidad para la multiplicación clonal rápida y la plantación de clones de interés (Espinosa *et al.*, 2003).

Según Alcántara et al. (2017), las investigaciones *in vitro* en cultivos vegetales aportan gran cantidad de herramientas y técnicas que permiten fortalecer múltiples estudios referentes al campo agrícola, la salud, la biología, la genética, entre otras.

Su y Zhang (2009, citados por Olivera et al., 2017), plantearon que la embriogénesis somática permite regenerar plantas completas, siendo ampliamente usada en la biotecnología y su principal ventaja es la producción de numerosas plantas a partir de una célula.

Con la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* se logra la propagación acelerada de diferentes cultivos, la resistencia a plagas y enfermedades, el mejoramiento genético de especies vegetales, entre otras, y debido a la creciente demanda alimentaria, se hace necesario en el cultivo del boniato, emplear las técnicas biotecnológicas para dar solución a los problemas existentes como la disponibilidad de material de plantación de alta calidad y el establecimiento de bancos de semilla para satisfacer las plantaciones en las áreas productivas, donde la micropropagación

basada en la embriogénesis somática, permita la producción rápida y a gran escala de altos volúmenes de plantas en diferentes clones de boniato.

El presente trabajo se propone como objetivo inducir la formación de los embriones somáticos a partir de callos potencialmente embriogénicos, evaluando la desinfección del material vegetal, la maduración y la germinación hasta la conversión en plántulas.

Población y muestra

La investigación fue realizada en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Bayamo, y el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Se recolectaron raíces tuberosas de 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, Santo Domingo, Villa Clara y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Camagüey. Su selección se debió a ser clones comerciales y precomerciales de elevada producción, y adaptación a las condiciones edáficas y climáticas.

Las raíces tuberosas fueron seleccionadas de plantas con 100 días de establecidas en el campo, con una masa promedio de 250 g (Figura 1), trasladadas al laboratorio y lavadas con agua y detergente para eliminar los restos de suelo y otras suciedades, sumergiendo un tercio de la raíz tuberosa en frascos con agua (Figura 2) y a los 25 días de emitidos los brotes, con una longitud entre 11 y 14 cm y seis hojas como promedio, se procedió al corte de los explantes de limbos foliares.

Materiales y métodos

Se empleó como medio de cultivo, las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962), como medio basal, suplementado con mioinositol (100 mg.L^{-1}), tiamina ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), sacarosa (3,0%) y solidificado con gelrite (0,2%). Los reguladores del crecimiento fueron incorporados al medio de cultivo, en dependencia del objetivo planteado en cada experimento y fue empleada una balanza analítica (Sartorius) de 0,1 mg de precisión.

Figuras 1 y 2. Raíces tuberosas y brotes del cultivo del boniato en condiciones semicontroladas de laboratorio



Figura 1



Figura 2

El pH del medio de cultivo fue ajustado a $5,8 \pm 0,01$ con un pH-metro (MV-88) y esterilizado en la autoclave a 121°C ($1,2 \text{ Kg/cm}^2$ de presión), durante 20 minutos. En la condición de incubación a la oscuridad, la temperatura promedio fue de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y en la condición de iluminación (fotoperíodo de 16 horas luz), la temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y en ambas condiciones, la humedad relativa fue de 80-85%.

Para la desinfección de los limbos foliares, se empleó el hipoclorito de sodio (1,0%, v/v), durante 15 minutos y explantes de limbos foliares (1 cm^2) del tercero y cuarto brotes, procedentes de las raíces tuberosas y las cinco hojas más jóvenes enumeradas del ápice hacia la base, siendo lavados con agua y detergente. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, se realizaron tres lavados con agua estéril, efectuando cortaduras en la superficie de los limbos foliares, siguiendo la metodología de Alguacil *et al.* (1996), sembrados con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo e incubados en la oscuridad en el medio de cultivo propuesto por Murashige y

Skoog (1962), sin reguladores del crecimiento. A los 30 días fue evaluado el porcentaje de explantes desinfectados.

Para la formación de los callos potencialmente embriogénicos, fueron seleccionados explantes del limbo foliar y sembrados siguiendo el procedimiento del experimento anterior, con el empleo de frascos de 250 ml, con 20 ml del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), y con 2,4-D ($0,50 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$); se añadieron, además, las vitaminas MS ($10,0 \text{ ml.L}^{-1}$) y colocados en la oscuridad, a partir de los resultados obtenidos en estudios realizados con anterioridad para la formación de callos potencialmente embriogénicos, evaluados según la escala propuesta por Santana (1982), la cual define: 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 en los bordes del explante, sin formar una masa) y grado 3: abundante formación del callo (masa voluminosa en todo el explante). A los 30 días se evaluó el porcentaje de callos potencialmente embriogénicos (grado 3), el color (amarillo, crema o blanco) y la consistencia (compacta, friable o esponjosa).

Para la inducción de los embriones somáticos, se emplearon callos del grado 3, pertenecientes a los cinco clones evaluados, colocados en el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2,4-D ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) y colocados en la condición de iluminación (fotoperíodo de 16 horas luz). A los 30 días se evaluó el número de embriones somáticos por callo, estadios de desarrollo (globular, corazón y torpedo) y el color (amarillo, crema o verde), siendo seleccionados para la evaluación, los callos potencialmente embriogénicos pertenecientes al clon INIVIT B 93-1.

Para la maduración de los embriones somáticos, los mismos fueron seleccionados en el estadio de torpedo y colocados en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962),

suplementado con $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido abscísico (ABA), siendo considerados embriones somáticos maduros los que aumentaron de tamaño con la aparición de los cotiledones y presentaron cambios en su coloración, de crema-amarillo a verde, según Litz y Jarret (1993), colocados en condiciones de iluminación (fotoperíodo de 16 horas luz). A los 30 días se evaluó el número de embriones somáticos maduros.

La germinación de los embriones somáticos se constató con el empleo de diez embriones somáticos en estadio cotiledonal, procedentes de los cinco clones evaluados y colocados en tubos de ensayos de 10,0 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro, conteniendo 10,0 ml del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) y fueron añadidas las vitaminas MS ($10,0 \text{ ml.L}^{-1}$) y $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiazurón (TDZ), colocados en condiciones de iluminación (fotoperíodo de 16 horas luz). A los 45 días se evaluó el porcentaje de embriones somáticos germinados al presentar la emisión de la radícula y la elongación del hipocótilo.

Con el propósito de convertir los embriones somáticos en plántulas, se emplearon embriones somáticos germinados, pertenecientes a los clones INIVIT B 90-1, INIVIT B 93-1 y Jewel, sembrados cinco embriones somáticos por tubo de ensayo, conteniendo 10,0 ml del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) y $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido giberélico (GA_3), colocados en condiciones de iluminación (fotoperíodo de 16 horas luz). A los 10 días se evaluó el porcentaje de embriones somáticos convertidos en plántulas, considerándose cuando el ápice del brote se desarrolló y aparecieron las hojas verdaderas.

Fue utilizado un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones para cada clon y un tamaño de muestra de 50 explantes por tratamiento, válido para todos los experimentos y 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, siendo empleado el paquete estadístico STATISTICA (1998), versión 6.0 en Windows y al existir significación entre las medias, fue aplicada la prueba de comparación de Rangos Múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$.

En la formación de los callos potencialmente embriogénicos, expresados en porcentajes de callos de grado 3, se empleó un análisis de comparación de proporciones, según el paquete estadístico diseñado en el Departamento de Matemática Aplicada del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) y en la formación, maduración, germinación y conversión de los embriones somáticos en plántulas, se aplicó un análisis de varianza de clasificación simple.

Análisis y discusión de los resultados

Se logró la desinfección de los limbos foliares a partir de la concentración del hipoclorito de sodio al 1%, v/v, alcanzando entre 90,0 y 93,0% de desinfección y no existieron diferencias significativas entre los clones (Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta a la desinfección de los limbos foliares con hipoclorito de sodio (1%, v/v) en la formación de callos potencialmente embriogénicos de boniato

| Explante Clones evaluados | | Formación de callos (grado 3), escala de Santana (1982) | | | | |
|------------------------------|--------|---|------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | Desinfección de explantes de limbos foliares (%) | | | | |
| | | 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 |
| 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) $p \leq 0.05$.
Leyenda: P K-W: prueba de Kruskal-Wallis, CF (%): callos formados (valores originales).

Los resultados favorables obtenidos en la desinfección de los limbos foliares, pueden deberse a la baja concentración empleada del hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión utilizado en el experimento, siendo uno de los desinfectantes más usados en el cultivo *in vitro*.

Numerosos autores han empleado el hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes de diferentes especies vegetales y en trabajos realizados por Alvarado *et al.* (2003), se plantea

que la desinfección del material vegetal requiere de un análisis minucioso para obtener éxitos en el cultivo *in vitro*. Según Sánchez et al. (2019), el procedimiento de desinfección superficial más eficiente, respecto al uso de insumos y tiempo de inmersión, se logra con el empleo del hipoclorito de sodio.

Respecto a la formación de los callos potencialmente embriogénicos, los explantes de limbos foliares no presentaron diferencias significativas entre los clones, para la formación de callos de grado 3 (Tabla 2). En relación con el número total de callos formados, la respuesta de los clones no siguió un patrón definido en el balance hormonal con el empleo del 2,4-D y 6-BAP, lo cual puede deberse a la respuesta de crecimiento acelerado de las células, provocado por estímulos hormonales exógenos.

Tabla 2. Efecto del 2,4-D y 6-BAP en la formación de callos potencialmente embriogénicos a partir de limbos foliares en clones de boniato

| Composición del medio de cultivo 2,4-D y 6-BAP (mg.L ⁻¹) | Formación de callos potencialmente embriogénicos 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 |
| 0,50 y 0,25 | 100 a | 96,0 a | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a | 100 a | 90,0 a | 100 a | 100 a |
| 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 $p \leq 0.05$.
 Leyenda: TCF: total de callos formados. CPE: callos potencialmente embriogénicos.**

El crecimiento del callo comenzó en los bordes de los explantes, alcanzando el color crema-amarillo, superficie nodular y la consistencia friable, características morfológicas que favorecen el desarrollo de las estructuras embriogénicas y la formación de callos potencialmente embriogénicos, ya que la formación de embriones somáticos depende del órgano usado como explante, la fuente de procedencia, la edad y el contenido endógeno de hormonas.

Según Sánchez et al. (2019), la embriogénesis somática a partir de explantes de limbos foliares es la mejor opción para la propagación de plantas *in vitro*; en la presente investigación, la calidad del callo, en los clones evaluados, se correspondió con la formación de callos potencialmente, a partir del limbo foliar como explante (Figura 3).

Figura 3. Formación de callos potencialmente embriogénicos a partir de los limbos foliares en el cultivo del boniato



Resulta importante estudiar los aspectos cualitativos en el crecimiento del callo (color, forma y textura), porque son determinantes en la posterior inducción y crecimiento de los embriones somáticos; donde los reguladores del crecimiento empleados en el medio de cultivo, favorecen la división celular y estimulan el potencial embriogénico en los callos.

Estudios relacionados con la composición del medio de cultivo han sido abordados por Santana (1982) en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.), planteando que la acción combinada del 2,4-D con 6-BAP es efectiva en la formación de callos potencialmente embriogénicos.

Con el empleo de la concentración de 2,4-D (0,2 mg.L⁻¹), no se observaron diferencias significativas entre los clones, destacándose la alta formación de embriones somáticos por callo y a pesar de ello, los clones INIVIT B 93-1 y Jewel presentaron los valores más altos en la inducción de los embriones somáticos por callo (Tabla 3).

Señalada para diferentes especies, la influencia favorable de las aplicaciones exógenas de auxinas en el medio de cultivo, preferentemente, el empleo del 2,4-D para la inducción de los embriones somáticos.

Según Sánchez et al. (2019), las diferentes respuestas a la interacción con los reguladores del crecimiento permiten afirmar que para cada variedad, se debe emplear un medio de cultivo específico; estos autores plantearon, además, que la embriogénesis somática es un proceso biológico donde las células somáticas desarrollan embriones semejantes a los embriones cigóticos que posteriormente se regeneran en plantas adultas genéticamente iguales a la planta madre.

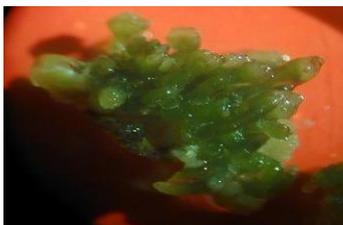
Tabla 3. Efecto del 2,4-D en la formación de embriones somáticos a partir de los limbos foliares en el cultivo del boniato

| 2,4-D (mg.L ⁻¹) | Inducción de embriones somáticos | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------|------------------|-------------|----------|
| | Clones evaluados | | | | |
| 0,2 | CEMSA 78-354 | INIVIT B 90-1 | INIVIT B 93-1 | Yabú-8 | Jewel |
| IES | 64,5 a | 68,0 a | 70,4 a | 51,0 a | 70,0 a |
| 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 $p \leq 0.05$.
 Legenda: IES: inducción de embriones somáticos.

En la figura 4 se muestra la inducción de los embriones somáticos a los 30 días, después del subcultivo de los callos potencialmente embriogénicos, donde los embriones somáticos en los estadios globulares y corazón, presentaron el color crema-amarillo y posteriormente, aparecieron en el estadio de torpedo de color verde-amarillo y de forma alargada.

Figura 4. Inducción de embriones somáticos de callos potencialmente embriogénicos obtenidos a partir de los limbos foliares en el cultivo del boniato



Se observó la inducción de los embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón y torpedo), debido a que no todas las células se encuentran simultáneamente listas, desde el punto de vista fisiológico, para expresar su toti potencia, y para obtener el estadio

de desarrollo cotiledonal, se hace necesario el empleo de un medio de cultivo que favorezca la maduración de los embriones somáticos, garantizando la germinación y la posterior obtención de plántulas.

El éxito de la embriogénesis somática, entre otros factores, depende de la variedad utilizada y el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento empleados en el medio de cultivo (Sánchez et al., 2019).

Respecto a la maduración de los embriones somáticos, se significa que 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 y aumento de tamaño en los mismos, alcanzando un mayor vigor que le permite la posterior germinación y la conversión en plántulas.

Según Jiménez (2005), la presencia del ácido abscísico (ABA) en el medio de cultivo induce a la desecación parcial de los embriones, lográndose el crecimiento y desarrollo de los mismos, lo cual es considerado importante para la germinación de los embriones somáticos y su conversión futura en plántulas completas.

En la presente investigación se observó el 100% de maduración de los embriones somáticos y un incremento significativo en el tamaño de los mismos, expresado por la diferenciación y el crecimiento de los cotiledones y un cambio de coloración, observándose la presencia de un color verde intenso (Figura 5).

Figura 5. Maduración de los embriones somáticos obtenidos a partir de callos potencialmente embriogénicos de los limbos foliares en el cultivo del boniato



Corredoira et al. (2003), plantearon que los embriones somáticos requieren del empleo de los reguladores del crecimiento antes de germinar y convertirse en plántulas, siendo necesario el proceso de maduración, al acumularse sustancias de reservas de forma análoga a la madurez fisiológica de los embriones cigóticos que conforman las semillas.

Según Danso y Ford (2004), el empleo del ABA resulta importante para la conversión en plántulas de los embriones somáticos y este constituye el regulador del crecimiento mayormente usado durante el proceso de maduración de los mismos.

Como se puede observar en la tabla 4, se lograron buenos resultados en la germinación de los embriones somáticos, sin existir diferencias significativas entre los clones evaluados.

Tabla 4. Germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de callos potencialmente embriogénicos de los limbos foliares en el cultivo del boniato

| Composición del medio de cultivo | Germinación de los embriones somáticos (%) | | |
|----------------------------------|--|---------------|---------|
| | Clones evaluados | | |
| TDZ (0,25 mg.L ⁻¹) | INIVIT B 90-1 | INIVIT B 93-1 | Jewel |
| GES | 50,0 a | 60,0 a | 60,0 a |
| ES (±) | 0,16 ** | 0,21 ** | 0,18 ** |

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí, según la prueba de Duncan $p \leq 0.05$.
 Leyenda: GES: germinación de los embriones somáticos.

Según Jiménez y Bangerth (2001), pueden existir fallas en la germinación de los embriones somáticos seleccionados a partir de sus características morfológicas y esto puede estar dado porque fisiológicamente como maduros 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 las especies vegetales.

Se alcanzó el 100% en la conversión de los embriones somáticos en plántulas, luego de ser transferidos al medio de cultivo con ácido giberélico (GA₃) y no existieron diferencias significativas entre los clones (Tabla 5).

Tabla 5. Conversión de los embriones somáticos en plántulas obtenidos a partir de callos potencialmente embriogénicos de los limbos foliares en el cultivo del boniato

| Composición del medio de cultivo | Conversión de los embriones somáticos en plántulas (%) | | |
|--|--|---------------|---------|
| | Clones evaluados | | |
| GA ₃ (10,0 mg.L ⁻¹) | INIVIT B 90-1 | INIVIT B 93-1 | Jewel |
| CESP | 100 a | 100 a | 100 a |
| ES (±) | 0,24 ** | 0,26 ** | 0,21 ** |

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

Legenda: CESP: conversión de los embriones somáticos en plántulas.

Sánchez et al. (2003) emplearon el ácido giberélico (GA₃) para la conversión en plántulas a partir de embriones somáticos de *Spathiphyllum* y en plantas leñosas, obteniendo buenos resultados. Los porcentajes de conversión en plántulas, a partir de embriones somáticos, en algunos cultivos son aún bajos y en el cultivo del boniato, en investigaciones realizadas por López et al. (2002) obtuvieron 18,2% de plantas regeneradas.

Según Jiménez (2005), en el cultivo *in vitro* es reconocido el papel del ácido giberélico (GA₃) en la elongación de los brotes y su adición en el medio puede suplir el déficit endógeno natural de este regulador del crecimiento en los explantes, el cual actúa como estimulante en el proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo conocido su efecto en esta etapa *in vitro* y la importancia de la adición del GA₃ al medio para la obtención de plantas aptas para la aclimatización y posteriormente, la adaptación a las condiciones naturales.

Conclusiones

1. En los explantes procedentes de los limbos foliares, obtenidos a partir de brotes de raíces tuberosas, se lograron entre el 90,0 al 93,0% de desinfección con el empleo del hipoclorito de sodio al 1,0%, v/v y hasta 96,0% en la formación de callos potencialmente embriogénicos, al ser empleado el medio de cultivo suplementado con 0,50 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,25 mg.L⁻¹ de 6-BAP.

2. La formación de los embriones somáticos se favoreció cuando se empleó el 2,4-D a la concentración de 0,2 mg.L⁻¹, alcanzando hasta 70,4 embriones somáticos por callo y en la maduración de los embriones somáticos se alcanzó el 100% con el aumento de tamaño y color verde intenso, al emplear el ácido abscísico (ABA) a la concentración de 1,0 mg.L⁻¹.
3. En la germinación de los embriones somáticos y la conversión en plántulas, se obtuvieron buenos resultados con el empleo del tidiazurón (TDZ) a la concentración de 0,25 mg.L⁻¹ y de ácido giberélico (GA₃) a 10,0 mg.L⁻¹, respectivamente.

Referencias bibliográficas

- Alcántara, J. S., Castilla, M. G., & Sánchez, R. M. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1(1). <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Alguacil, M. I., Espinosa, A. R., González, O. P., & Silva, J. J. (1996). *Encapsulado de yemas de boniato: Una alternativa para la obtención de semillas de calidad*. Resumen X Seminario Científico, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cultivos Tropicales.
- Alvarado, Y., Cruz, M., Portal, N., García, L., Freire, M., Quiala, E., & Gómez, R. (2003). *Estrategia de trabajo para el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar* [CD-ROM]. Resumen Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2003), Centro de Bioplantas Ciego de Ávila.
- Corredoira, E., Ballester, A., & Vieitez, A. (2003). Proliferation, Maturation and Germination of *Castanea sativa* Mill. somatic Embryos Originated from Leaf Explants. *Annals of Botany*, 92(1), 129-136. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg107>

- Danso, K., & Ford, B. (2004). *Effect of sucrose without abscisic acid on post-thaw viability, embryogenic competence and plant recovery from embryogenic Calli of Cassava*. Sixth International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology, CIAT.
- Espinosa, A. R., González, O. P., & Silva, J. J. (2003). Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo. *Bioteconología Vegetal*, 3(1), 37-41.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/206>
- Jiménez, V., & Bangerth, F. (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*. *Plant Science*, 160(2), 247-257. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00382-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00382-4)
- Jiménez, V. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant growth regulation*, 47(2), 91-110.
- Litz, E. & Jarret, R. (1993). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En W. Roca & L. A. Mroginski (eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (pp. 143-172). CIAT.
- López, J., Torrez, M., Borroto, C., Trujillo, T., Daquinta, M., Gómez, R., García, M., Medero, V., Ventura, J., Montano, N., Morales, A., Cabrera, M., Robaina, A., Rayas, A., & Pons, C. (2002). *Metodología para la propagación in vitro del boniato*. Jornada XXXV Aniversario del Instituto Nacional de Viandas Tropicales.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Olivera, P. G., Espinoza, R. R., & Tamariz, C. A. (2017). Multiplicación in vitro y embriogénesis somática de *Perezia pinnatifida* (Asteraceae) planta medicinal andina. *Revista peruana de Biología*, 24(3), 323-328.
<https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13911>
- Sánchez, M., Martínez, M., Valladares, S., Ferro, E., & Vieitez, A. (2003). Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *Journal of plant physiology*, 160(6), 699-707.
<https://doi.org/10.1078/0176-1617-00754>
- Sánchez, J., Cabrera, R. P., & Jiménez, J. D. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259-264. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.11>
- 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.
<https://ediciones.inca.edu.cu/files/anteriores/1982/3/CT04319.pdf>