

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL
PROGRAMA RECURSOS GENETICOS NICARAGUENSES

TRABAJO DE DIPLOMA

CONSERVACION *in vitro* A TASAS MINIMAS DE CRECIMIENTO DEL
CLON DE CAMOTE N-1437 (*Ipomoea batatas* (L.) LAM) DURANTE
DIECISEIS SEMANAS

AUTOR:
MARIO LOPEZ VELASQUEZ

ASESOR:
ING. MARBELL AGUILAR MARADIAGA

MANAGUA, NICARAGUA, 1994

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL
PROGRAMA RECURSOS GENETICOS NICARAGUENSES

TRABAJO DE DIPLOMA

CONSERVACION *in vitro* A TASAS MINIMAS DE CRECIMIENTO DEL
CLON DE CAMOTE N-1437 (*Ipomoea batatas* (L.) LAM) DURANTE
DIECISEIS SEMANAS

AUTOR:
MARIO LOPEZ VELASQUEZ

ASESOR:
ING. MARBELL AGUILAR MARADIAGA

MANAGUA, NICARAGUA, 1994

DEDICATORIA

Dedico con el más profundo cariño el presente trabajo a mi hermano:

Isidro Antonio López Velásquez

Baluarte fundamental en mi educación y formación profesional

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su mas sincero agradecimiento:

Mis tios:

Ines Toruño Velásquez
Rafaela Velásquez

Quienen se brindaron su apoyo moral y material

A mi novias:

Aida Nidia Cerrato Calero

Ing. Marbell Aguilar Maradiaga

Por su valioso asesoramiento para elaborar esta obra.

Ing. Guillermo Reyes Castro

Amigo y consejero.

Ing. Rodolfo Nunguía

Por su ayuda en los análisis estadísticos

Ing. José Dolores Cisne Contreras
Sra. Esmeida Bobadilla Bravo
Sra. Catalina Sánchez

A mis primos:

Hector, Domingo y Silvio.

Que de una y otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

INDICE

Sección	Página
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	3
2.1 Localización del experimento	3
2.2 Extracción del Material Vegetativo	3
2.3 Establecimiento de los explantes	3
2.4 Multiplicación de los explantes	4
2.5 Medios de cultivos	4
2.6 Control de Factores Abióticos.	5
2.7 Evaluaciones cuantitativas en la fase de conservación	5
2.7.1 Variables evaluadas	5
2.8 Evaluaciones cualitativas de las hojas	6
2.9 Evaluación de la sobrevivencia de los tejidos	6
2.10 Diseño y Análisis Experimental.	6
2.11 Materiales y equipos utilizados	9
III RESULTADOS Y DISCUSION	10
3.1 Efecto del manitol en la conservación in vitro a tasas mínimas de crecimiento en plántulas de camote clon N-1437.	10
3.1.1 Evaluación a las 4 semanas de conservación	10
3.1.2 Evaluación a las 8 semanas de conservación	13
3.1.3 Evaluación a las 12 semanas de conservación	16
3.1.4 Evaluación a las 16 semanas de conservación	19
3.2 Efecto de la dilución de las sales de Murashige y Skoog en el crecimiento in vitro del camote N-1437.	23
3.2.1 Evaluación a las 4 semanas de conservación	23
3.2.2 Evaluación a las 8 semanas de conservación	25
3.2.3 Evaluación a las 12 semanas de conservación	27
3.2.4 Evaluación a las 16 semanas de conservación	29

IV	CONCLUSIONES	33
V	RECOMENDACIONES	34
VI	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	35
VII	ANEXOS	40

INDICE DE FIGURAS

Figura N°.	Página
1 Efecto del manitol sobre la altura, número de hojas y número de raíces a las 4 semanas de conservación	11
2 Efecto del manitol en el incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 8 semanas de conservación.	14
3 Efecto del manitol en el incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 12 semanas de conservación.	17
4 Efecto del manitol en el incremento mensual de altura de plántula, número de hojas y número de raíces a las 16 semanas de conservación.	20
5 Efecto de diluciones de las sales MS en el promedio de altura de plántula, número de hojas y número de raíces a las 4 semanas de conservación.	24
6 Efecto de diferentes diluciones de las sales MS, en incremento mensual de altura de plántula, número de hojas y número de raíces a las 8 semanas de conservación.	26

7	Efecto de diferentes diluciones de las sales MS, en incremento mensual de altura de plántula, número de hojas y número de raíces a las 12 semanas de conservación.	28
8	Efecto de diferentes diluciones de las sales MS, en incremento mensual de altura de plántula, número de hojas y número de raíces a las 16 semanas de conservación.	30

INDICE DE TABLAS

Tabla N°.		Página
1	Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).	8
2	Concentración de manitol.	8
3	Dilución de sales MS.	9
4	Coloración de las hojas.	9
5	Efecto del manitol, en la formación de callo, plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las 4 semanas de consevación.	13
6	Efecto del manitol, en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 8 semanas de conservación.	15
7	Efecto del manitol, en la formación de callo, plantulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 12 semanas de conservación.	19
8	Efecto del manitol, en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 16 semanas de conservación.	21

9	Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 4 semanas de conservación.	25
10	Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 8 semanas de conservación.	27
11	Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 12 semanas de conservación.	29
12	Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 16 semanas de conservación.	32

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) adscrito a la Universidad Nacional Agraria, con el objetivo de estudiar el método de conservación *in vitro* a tasa mínimas de crecimiento en el cultivo de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) clon N-1437, se procedió a inocular bajo condiciones de asepsia total, microesquejes entre 3 y 4 mm de longitud aproximadamente, conteniendo una yema axilar. En la evaluación final a las 16 semanas, se observó que en los tratamientos con 10 y 15 g/l de manitol las variables altura, número de hojas y número de raíces presentaron menores valores de incremento mensual comparados con los alcanzados en los tratamientos testigo y a 5 g/l de manitol, además se determinó que en el tratamiento testigo hubo mejores resultados en cuanto a la sobrevivencia de los tejidos en el 100%, menor formación de callo en un 5%, vitrificación 10% y en la coloración verde oscuro de las hojas en un 65 % de las plántulas. En los tratamientos testigo y dilución de las sales MS, resultó que al 50% de dilución el incremento mensual presentó valores intermedios en las variables altura de la plántula y número de hojas, pero el número de raíces fue menor presentando valores de 0.16 cm, 0.95 y 0.56 respectivamente. La sobrevivencia de los tejidos fue del 100%, no se presentó formación de callo ni vitrificación y la coloración verde oscuro de las hojas fue del 90%.

Aun cuando el manitol fue efectivo en la reducción de la tasa de crecimiento de las plántulas, éstas presentaron efectos menos deseables en el aspecto morfológico y fisiológico, comparado con el efecto producido por las diluciones de las sales MS.

I. INTRODUCCION

Diversas teorías afirman que el camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) es un cultivo originario de América Tropical y que se ha adaptado y extendido a regiones templadas (Folquer, 1978).

El camote se cultivaba ampliamente en América Tropical a la llegada de los españoles; restos arqueológicos de más de 10,000 años han sido encontrados en las costas del Perú. Otros autores señalan que el camote también lo encontraron los europeos en el triángulo Polinésico, que abarca Nueva Zelanda, Pascua y Hawai (León, 1987).

El camote está recibiendo en los últimos años la atención que merece, es considerado tercero en términos de valor de la producción agrícola mundial y quinto en contribución de energía al ser humano (GeneFlow, 1990).

En Nicaragua no existe tradición en el consumo de camote, reportándose únicamente plantaciones de pequeñas parcelas principalmente en los departamentos del norte y costa atlántica (De La Puente, 1991).

Son muchos los factores que producen la erosión genética en las especies vegetales distribuidas en diferentes regiones del planeta. La necesidad de preservar los recursos genéticos, ha permitido la implementación de diferentes métodos de conservación de estos recursos vitales para la existencia de la humanidad.

La conservación de germoplasma *in situ* expone los materiales a pérdidas debido a problemas bióticos y abióticos además del costo elevado de su mantenimiento en caso de grandes colecciones en el campo (Roca et al., 1992).

En los últimos años la conservación de los recursos naturales no ha recibido atención especial, por que la diversidad genética en especies vegetales están siendo destruidas por la presión demográfica, la deforestación por la ampliación de la frontera agrícola; para salvar éstos recursos hay que conservarlos ya sea en semillas, en cámaras frías para evitar se pierda su viabilidad o en colecciones de plantas en el lugar que ocupan naturalmente *in situ*. Estos problemas pueden ser reducidos o eliminados por medio de algunas técnicas biotecnológicas.

Los métodos de cultivo de tejidos ofrecen vías para la conservación de germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente, permitiendo mantener las colecciones en pequeños espacios libres de plagas y enfermedades; además de facilitar el intercambio de germoplasma (Espinoza et al.,1992).

Considerando que la conservación de los recursos fitogenéticos representan un patrimonio de la humanidad, en el presente estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

- Reducir el crecimiento de plántulas del clon N-1437 de camote *in vitro* mediante la adición de diferentes concentraciones de manitol y diferentes diluciones de las sales de Murashige y Skoog (1962).
- Seleccionar las variantes de medios de cultivos más adecuados que permitan reducir al mínimo los riesgos de variación somaclonal.

II MATERIALES Y METODOS

2.1 Localización del experimento

El experimento se realizó en el periodo comprendido de abril a septiembre de 1992 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), Km. 12 1/2 carretera norte, Managua, Nicaragua.

2.2 Extracción del Material Vegetativo

Para el presente estudio se seleccionó el clon de camote N-1437 establecido in situ del que se tomaron esquejes de 15cm de longitud aproximadamente, este material se desinfectó con Benomil al 5% diluido en un galón de agua durante dos minutos; posteriormente se procedió a sembrarlos en macetas y se trasladaron a condiciones de sombra utilizando tela de sarán de 50% de regulación de la intensidad de luz, por un periodo de 30 días en el que surgieron nuevas yemas apicales.

2.3 Establecimiento de los explantes

Se utilizaron yemas apicales seleccionadas por su buen estado fisiológico y morfológico con longitud aproximada entre 3-5 cm, posteriormente se introdujeron en un beaker de 600 ml que contenía 350 ml de agua destilada a la que se le adicionó 5 gotas de jabón líquido, luego se expusieron durante dos horas consecutivas bajo el grifo de agua, para eliminar residuos de polvo e impurezas, una vez transcurridos este periodo se procedió a la desinfectación de los tejidos para prevenir ataques de bacterias y hongos, se realizó esta operación en la campana de flujo laminar en una

solución de hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos, para eliminar los residuos del hipoclorito de sodio se procedió a dar tres pases sucesivos con agua destilada estéril. Las yemas se secaron con papel filtro previamente esterilizado. Posterior a la desinfección se inició la inoculación de los explantes realizando la manipulación sobre cajas petri con ayuda de pinzas y escalpelos. 60 yemas apicales se sembraron de forma individual en tubos de ensayo que contenían 5 ml de medio de cultivo. Los tejidos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento por 50 días a temperatura de 24 ± 1 °C, humedad relativa (HR) del 72% e intensidad lumínica de 2000 lux con un fotoperíodo de 16 horas luz. Los explantes permanecieron en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) hasta que las plántulas se formaron debidamente con una altura aproximada entre 3 y 4 cm.

2.4 Multiplicación de los explantes

Para aumentar la cantidad de explantes necesarios para iniciar el estudio de conservación, se procedió a micropropagar cada plántula desarrollada en la fase de establecimiento, para lo cual se seccionó eliminando las hojas y raíces, dejando únicamente los microesquejes con una yema axilar o apical en estado dormante y se colocaron en un medio de cultivo igual al empleado en la fase de establecimiento hasta obtener plántulas de 3 a 4 cm de altura aproximadamente.

2.5 Medios de cultivos

Como medio de cultivo básico se seleccionó el medio de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Tabla 1). Las variantes realizadas al medio MS fueron las siguientes:

A- adiciones de 5 g/l, 10 g/l y 15 g/l de manitol.

B- dilución de las sales MS al 33% y 50%.

Para los dos factores en estudio se utilizó como testigo las sales completas de MS.

Las variantes de medios de cultivos se prepararon en frascos aforados diluyendo todos los constituyentes en agua destilada y desionizada, posteriormente las soluciones se homogenizaron en el agitador magnético; el pH se ajustó a 5.7 con adición de gotas de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de potasio (KOH), como producto gelificante se empleó agar a razón de 7g/l; después de aforar y disolver el agar mediante calentamiento se distribuyeron 5ml de variante de medio en cada tubo de ensayo.

Los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 121 °C a una atmósfera de presión durante 21 minutos, después se inocularon las yemas axilares con tamaño de 3 a 4 mm aproximadamente.

2.6 Control de Factores Abióticos

Después de la inoculación de los explantes, los tubos de ensayos se colocaron en gradillas y se trasladaron al cuarto de crecimiento a temperaturas de 24 ± 1 °C, intensidad luminica de 2000 lux, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y 72% de humedad relativa. Los explantes permanecieron en cuarto de crecimiento durante 120 días.

2.7 Evaluaciones cuantitativas en la fase de conservación

2.7.1 Variables evaluadas

- Altura de plántula (cm): con una regla milimétrica se midió la altura de cada plántula, desde la base a los dos

últimos primordios apicales.

- Número de hojas: se contaron todas aquellas hojas que se observaron morfológicamente normales.

-Número de raíces: se contabilizaron únicamente aquellas que medían más de 1 cm de longitud.

2.8 Evaluaciones cualitativas de las hojas

- Color verde oscuro:(A) hojas que presentaron una coloración verde limón sin clorosis.

- Color verde claro:(B) hojas que presentaron coloración verde más clara con respecto a la categoría anterior.

- Color verde clorótico: (C) hojas que presentaron coloración verde acompañadas de puntos blanquecinos y de bandas café rojizas.

2.9 Evaluación de la sobrevivencia de los tejidos

En cada tratamiento se observó el número de plántulas vivas; se consideraron tejidos vivos todos aquellos que se desarrollaron en buen estado fisiológico y morfológico que reunían las características de una plántula completa, también se evaluaron las plantas atípicas.

2.10 Diseño y Análisis Experimental

Los datos originales de la variable altura de las plántulas, número de hojas y número de raíces fueron transformadas con la fórmula estadística para variables continuas utilizada por Mora (1987):

$$Y = (x + 0.5)^{1/2}$$

Las coloraciones de las hojas, formación de callos, y sobrevivencia de los tejidos se presentaron en porcentajes.

El experimento se montó en un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se utilizaron 20 repeticiones por cada tratamiento, las medias obtenidas sirvieron para calcular los incrementos mensuales para las variables altura, número de hojas y número de raíces mediante la fórmula reportada por Mora (1987).

a: Fórmula Para la variable altura de plántula.

$$I_m = \frac{P_i - P_o}{P}$$

donde:

I_m = Incremento mensual.

P_i = Altura inicial.

P_o = Altura final.

P = Mes de evaluación (2, 3 y 4).

b: Fórmula para las variables número de hojas y raíces.

$$I_m = \frac{P_o}{P}$$

P_o = Número de hojas o raíces.

P = Mes de evaluación (2,3,4).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Solución	Constituyente	Concentración final mg/l
1	NH ₄ NO ₃	1650.00
2	KNO ₃	1900.00
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
4	KH ₂ PO ₄	170.00
5	H ₃ BO ₃	6.20
6	MnSO ₄ .H ₂ O	22.30
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
8	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
9	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
10	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
11	KI	0.83
12	CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
13	Na ₂ EDTA	37.30
14	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
15	TiaminaHCl	0.40
16	Mioinositol	100.00

Fuente: Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Tabla 2. Concentración de manitol

Variante medio de cultivo	manitol g/l	Concentración (%) de sales MS (1962)
MS-0	0	100
MS-1	5	100
MS-2	10	100
MS-3	15	100

III RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del presente estudio sugieren que es posible conservar material vegetativo de camote durante más de 16 semanas mediante la conservación *in vitro*.

3.1 Efecto del manitol en la conservación *in vitro* a tasas mínimas de crecimiento en plántulas de camote clon N-1437

3.1.1 Evaluación a las 4 semanas de conservación

A las cuatro semanas de inoculadas la yemas axilares, el tratamiento testigo presentó mayor promedio en la variable altura de la plántula (1.13 cm), superando a los tratamientos que se les adicionó manitol, registrándose valores de 0.59 cm, 0.52 cm y 0.69 cm para 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente.

El número de hojas producidas en los tratamientos con 10 y 15 g/l de manitol y el testigo superaron a las producidas en 5 g/l de manitol, presentándose valores de 3.25, 2.77, 3.85 y 3.40, para el testigo, 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente.

La formación de raíces fue mínima en la concentración de 10 g/l de manitol y no se observó formación de éstas en 15 g/l de manitol, mientras que en los tratamientos testigo y a 5g/l fue de 1.45 y 1.22 respectivamente (figura 1).

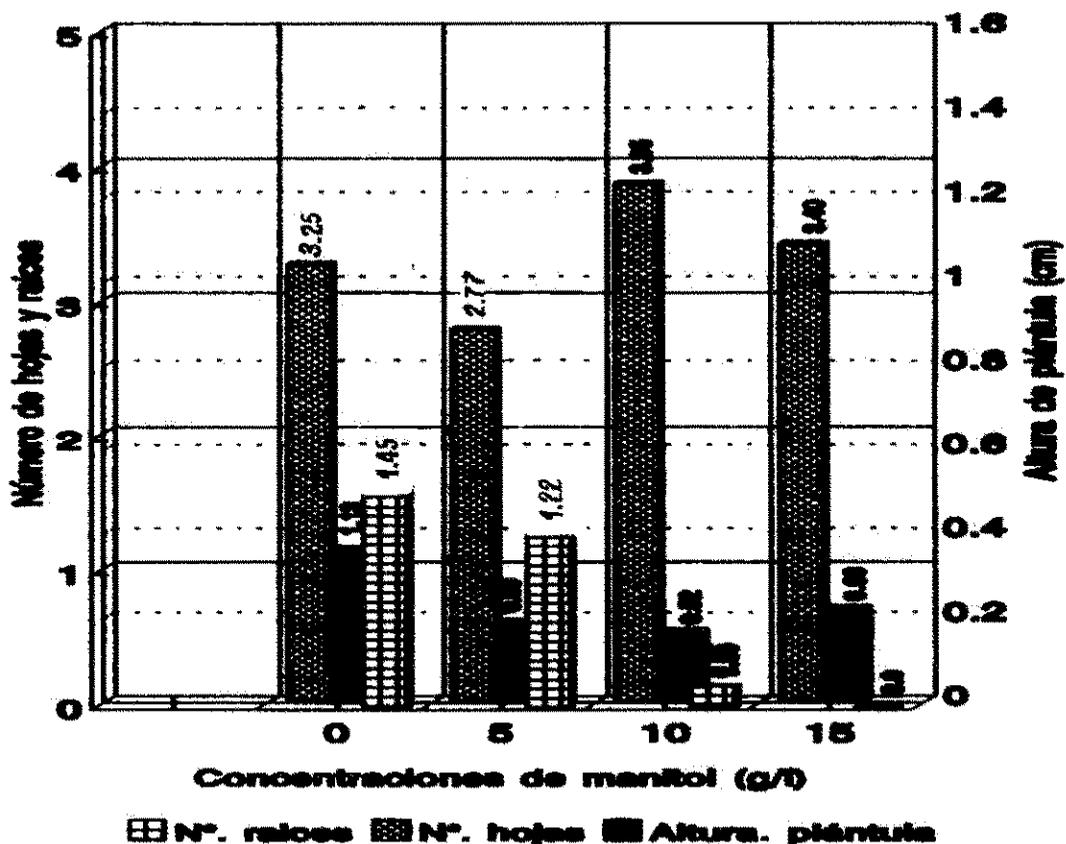


Figura 1. Efecto del manitol sobre la altura, número de hojas y número de raíces a las 4 semanas de conservación.

La formación de callo en los tratamientos testigo y a 5 g/l de manitol se produjo en el 5% de las plántulas y en 10 y 15 g/l fue de 20% y 30% respectivamente; las formaciones de callos parece que influyen en la velocidad de emergencia de las raíces. Se observó el crecimiento de plantas atípicas en un 10% a 5 y 10 g/l de manitol y de un 15% con 15 g/l de manitol. Las plántulas atípicas se caracterizaron por manifestar una coloración verde clara en las hojas y la brotación de yemas adventicias en números que por su disposición y tamaño que presentaron no fue posible su evaluación.

Allan (1979), observó la formación de yemas adventicias cuando subcultivó plántulas de camote; Granada y Villalobos (1980), atribuyen la formación de brotes adventicios en *Dioscorea* spp. a su origen en tejidos meristemáticos y la posterior diferenciación en ápices ya sea directamente a partir de callos originados también del explante; Pérez (1991), reporta que las yemas adventicias se forman en muchos cultivos a partir de una célula que puede ser del cambium basal o de cicatrización de callos que se forman cuando se cortan los tejidos *in vitro* para la respectiva multiplicación; también se forman yemas adventicias a partir de multiyemas.

Otro efecto fisiológico del manitol se manifestó en la coloración de las hojas, presentándose menor porcentaje de color verde oscuro a medida que se incrementó la adición de manitol, registrándose valores de 65%, 40%, 30% y 25 % para los tratamiento testigo, 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente. El color verde claro, los porcentajes fueron de 20%, 45%, 45% y 20%, mientras que el color verde clorótico presentó un alto porcentaje en 15 g/l de manitol con el 55%, en 10 g/l el 25% y en el testigo y a 5 g/l fue del 15 %. Aún cuando se evidenciaron diferencias en el aspecto morfológico y fisiológico por efecto del manitol, la sobrevivencia de los tejidos fue del 100 % en todos los tratamientos (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del manitol en la formación de callo plántulas atípicas, sobrevivencia y color de las hojas a las 4 semanas de conservación

Manitol (g/l)	Callo (%)	Plántulas atípicas (%)	Sobrevivencia (%)	Color de la hojas en (%)		
				A	B	C
0	5	0	100	65	20	15
5	5	10	100	40	45	15
10	20	10	100	30	45	25
15	30	15	100	25	20	55

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

3.1.2 Evaluación a las 8 semanas de conservación

A las 8 semanas de establecidos los explantes, el incremento mensual en la altura de las plántulas fue superior en los tratamientos a 5 y 10 g/l de manitol con valores respectivos de 2.11 cm y 2.08 cm y en el testigo y a 15 g/l se presentaron valores respectivos de 1.83 cm y 1.87 cm.

En los tratamientos con manitol, que a las 4 semanas iniciaron formaciones morfológicas atípicas, desarrollaron a las 8 semanas agrupaciones de yemas adventicias que presentaron pequeños esbosos foliares de coloración verde clorótico, pero no aumentaron los porcentajes de plántulas atípicas respecto a la evaluación anterior. Jarret y Gawel (1991), empleando cantidades de 18.2 g/l de manitol y sorbitol observaron la formación de hojas pequeñas, peciolo largo, desarrollo de callos en la base y pigmentación variada en comparación con niveles más bajos de manitol y sorbitol después de 90 días de inoculadas yemas axilares de camote; similares efectos reporta Feldermam citado por Pérez et. al., (1984), en caña de azúcar atribuyendo

dichas variaciones morfológicas al rejuvenecimiento y a la sanidad de las plántulas regeneradas *in vitro*.

El incremento mensual en la variable número de hojas fue similar en los tratamientos con manitol con valores de 3.11, 3.12 y 3.13 para 5, 10 y 15 g/l respectivamente, que superan ligeramente al testigo que registró 2.96.

El incremento mensual en el número de raíces en 5 g/l de manitol y en el testigo fue de 1.41 y 1.26 respectivamente, mientras que en 10 g/l fue de 0.13 y a 15 g/l aún no se producía la formación de raíces. La baja respuesta en la inducción de raíces se debió posiblemente al aumento de tamaño de los callos por efecto de las concentraciones de manitol (figura 2).

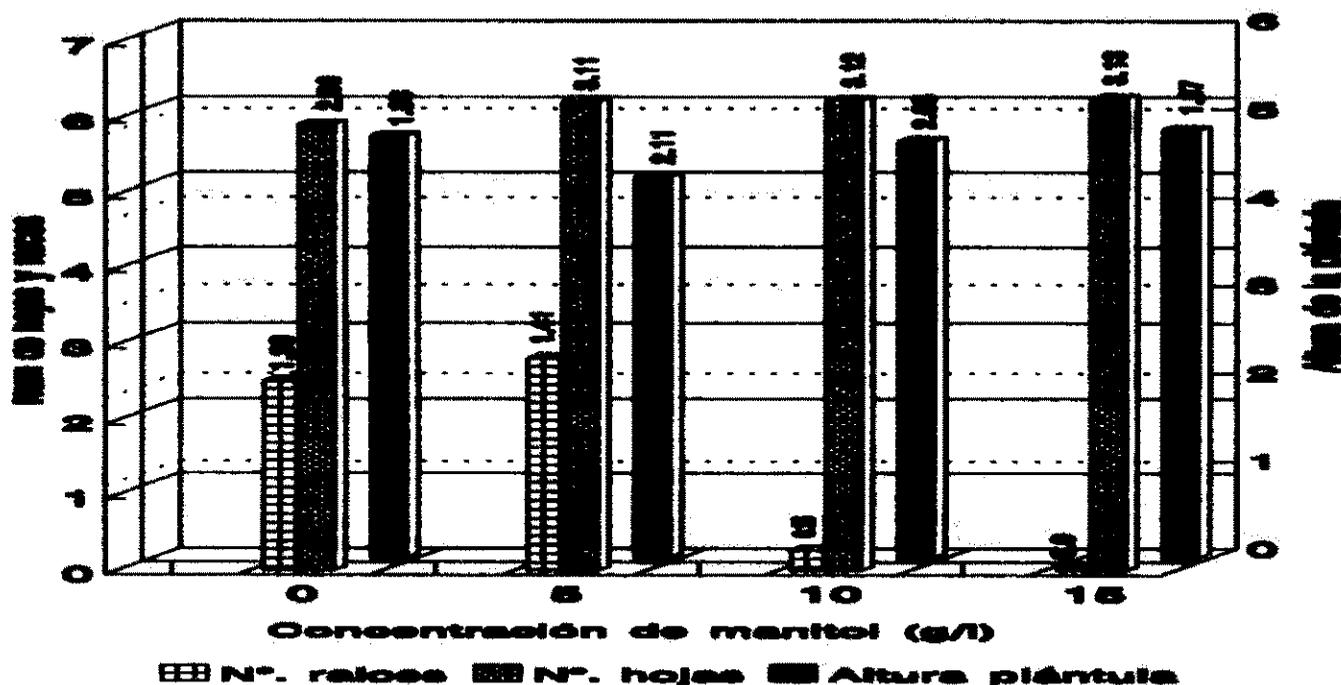


Figura 2. Efecto del manitol en el incremento mensual de altura de plántula, número de hojas y número de raíces a las 8 semanas de conservación.

Unicamente en los tratamientos con 5 y 10 g/l de manitol se incrementó el porcentaje de coloración verde oscuro de las hojas en un 10%, y a 5% en 15 g/l de manitol. La coloración verde claro aumentó hasta el 25 % en el tratamiento testigo y en los tratamientos con manitol a 5, 10 y 15 g/l se redujo en un 5%. La coloración verde clorótica disminuyó en 5% en los tratamientos testigo, 5 y 10 g/l de manitol, mientras que 15 g/l se obtuvo porcentaje del 40%. Aunque el porcentaje de sobrevivencia fue del 100 % en todas la variantes de medio de cultivo, se observó la formación de puntos blanquecinos con aspecto algodonoso en el envés, peciolo y el tallo de las plántulas en porcentajes de 5%, 10%, 20% y 30% en los tratamientos testigo, 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente, tabla 6.

Tabla 6. Efecto del manitol, en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 8 semanas de conservación

Manitol (g/l)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color hoja			Vitrificación (%)	Sobrevivencia (%)
			A	B	C		
0	5	0	65	25	10	5	100
5	5	10	50	40	10	10	100
10	20	10	40	40	20	20	100
15	30	15	30	30	40	30	100

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

Estudios microscópicos en 15 especies han demostrado que plántulas con tales manifestaciones viven un proceso de desarrollo anormal principalmente en la síntesis de lignina razón por la cual se le ha dado el nombre de vitrificación. Waymonth, (1973). Vieth Y Phan (1982) reportan en la mayoría de los casos de vitrificación se presentan en el medio MS por su alta concentración de

nitrato de amonio.

En las variables estudiadas fue evidente el efecto diferente que producen los tratamientos testigo y los que contienen manitol, las yemas inician el proceso de diferenciación una vez que se inoculan en el medio de cultivo y mantienen un ritmo de crecimiento rápido, disminuyendo paulatinamente después de 4 semanas, mientras que en los tratamientos que se les adicionó manitol, el proceso de diferenciación es lento debido a efecto osmótico que produce el manitol causando alteraciones fisiológicas en los tejidos como es la formación de callo, lo que impide en gran medida la iniciación de raíces, limitándose de esta manera la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo necesarios para mantener un crecimiento continuo. Jarret y Gawel (1991), reportan que el manitol y el sorbitol reducen la altura de las plántulas, se produce una apertura de las hojas y desarrollo del peciolo, acortamiento de los entrenudos y pérdida de la dominancia apical de lo cual resultan numerosos tallos y producen un sobre efecto de plántulas más compactas.

3.1.3 Evaluación a las 12 semanas de conservación

A las 12 semanas del establecimiento se observó que en la variable altura de la plántula se presentaron valores aproximados entre sí, el mayor incremento de la altura fue en los tratamientos a 5 g/l de manitol con 0.69 cm y en el tratamiento testigo con 0.65 cm; valores aproximados a estos se presentaron en 10 y 15 g/l de manitol con incrementos respectivos de 0.56 cm y 0.57 cm. Comparando estos incrementos con los que se obtuvieron a las 8 semanas resultaron inferiores, lo que indica que aun sin la adición de sustancias reductoras de

crecimiento las plántulas disminuyeron el ritmo de crecimiento aunque sus principales órganos (hojas, raíces) estén debidamente desarrollados.

En el número de hojas el incremento mensual fue mayor en 5 g/l de manitol con 1.99, en el tratamiento testigo fue de 1.45 y en 10 y 15 g/l de manitol de 1.25 y 1.06 respectivamente. El número de raíces presentó igual orden de respuesta que la variable número de hojas en los 4 tratamientos, siendo estos de 1.03 , 1.13, 0.45 y 0.35 en el testigo a 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente; Figura 3.

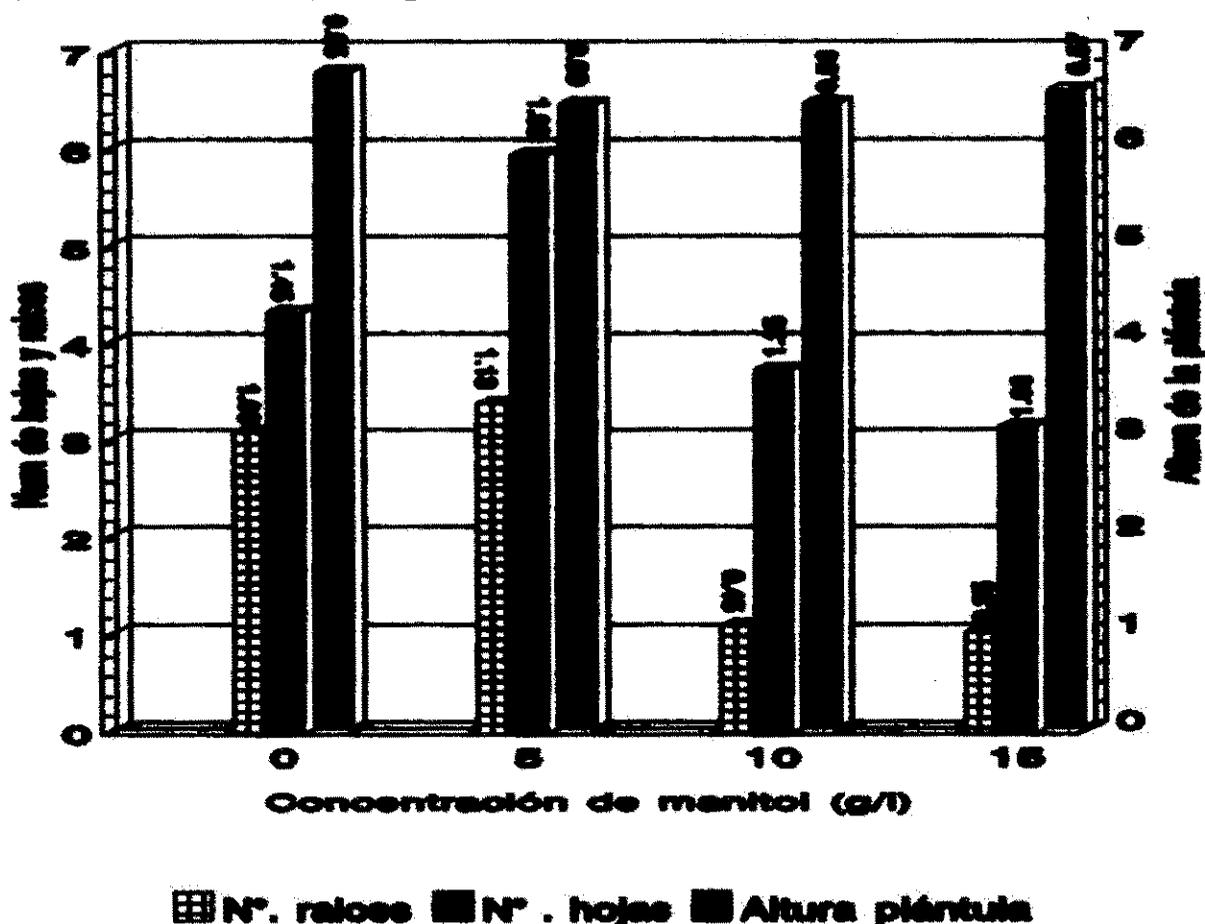


Figura 3. Efecto del manitol en el incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 12 semanas de conservación

Estos resultados parecen estar influenciados por el efecto osmorregulador del medio de cultivo por la retención de las moléculas de sacarosa y manitol y la deshidratación del medio de cultivo producto de la extracción de los tejidos mismos, como lo reportan Brown et al., (1979). Otros factores que inhiben la iniciación y el número de raíces producidas puede ser la formación de callo, la disposición de las yemas (axilares y apicales) . Nemeth (1981), experimentando con diferentes tipos y concentraciones de auxinas encontró que dentro de las especies estudiadas en concentraciones de 2 a 3 mg/l se estimula el desarrollo de callo y se limita la formación de raíces. Mroginski y Roca (1992), afirman que la respuesta de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. Los callos que se mantienen en condiciones indiferenciadas por largos periodos limitan su capacidad morfogénica (Roca et al., 1992). La posición relativas de las yemas es otro factor importante, se ha observado que las yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquellas obtenidas de la base o la porción apical (Roca et al., 1992). El tipo de coloración que presenta la plántula es un indicador de los cambios fisiológicos que se producen por efecto principalmente del manitol.

En las hojas se incrementó únicamente el color verde oscuro en el tratamiento testigo en 5%, mientras que con 5 y 10 g/l de manitol se redujo a un 10% y con 15 g/l el 5%. El color verde claro disminuyó en 5%, 20% y 12% en los tratamientos testigo, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente, no registrándose cambios en el porcentaje a 5 g/l de manitol; el color verde clorótico

se manifestó con mayor porcentaje en los tratamientos con manitol a 5, 10 y 15 g/l en 20%, 50%, y 57 % respectivamente, en el tratamiento testigo se conservó el 10% registrado a las 8 semanas. El porcentaje de callo aumentó únicamente en el tratamiento 5 g/l de manitol en un 5%, en el tratamiento testigo no hubo variación.

Aunque los porcentajes de sobrevivencia de las plantas alcanzó el 100%, fue notorio el incremento de puntos blanquecinos tanto en el haz como en el envés de las hojas en porcentajes de 5%, 10%, 20% y 30%, en los tratamientos testigos 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente, los resultados se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Efecto del manitol, en la formación de callo , plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 12 semanas de conservación

Manitol (g/l)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color de hoja (%)			Vitrificación %	sobrevivencia %
			A	B	C		
0	5	0	70	20	10	5	100
5	10	10	40	40	20	10	100
10	20	10	30	20	50	20	100
15	30	15	25	18	57	30	100

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

3.1.4 Evaluación a las 16 semanas de conservación

Las diferencias en el incremento mensual de la altura de la plántula fue mínima entre los tratamientos testigo, 5 y 10 g/l de manitol con valores de 0.25 cm, 0.28 cm y 0.22 cm respectivamente; en 15 g/l de manitol el efecto reductor del crecimiento fue mayor registrándose el incremento de 0.14 cm.

El número de hojas presentó incrementos de 1.02,

0.85, 0.56 y 0.31 en los tratamientos testigo, 5, 10, y 15 g/l de manitol respectivamente y en el número de raíces le correspondieron incrementos de 0.85, 0.96, 0.41 y 0.31. Los resultados se observan en la Figura 4.

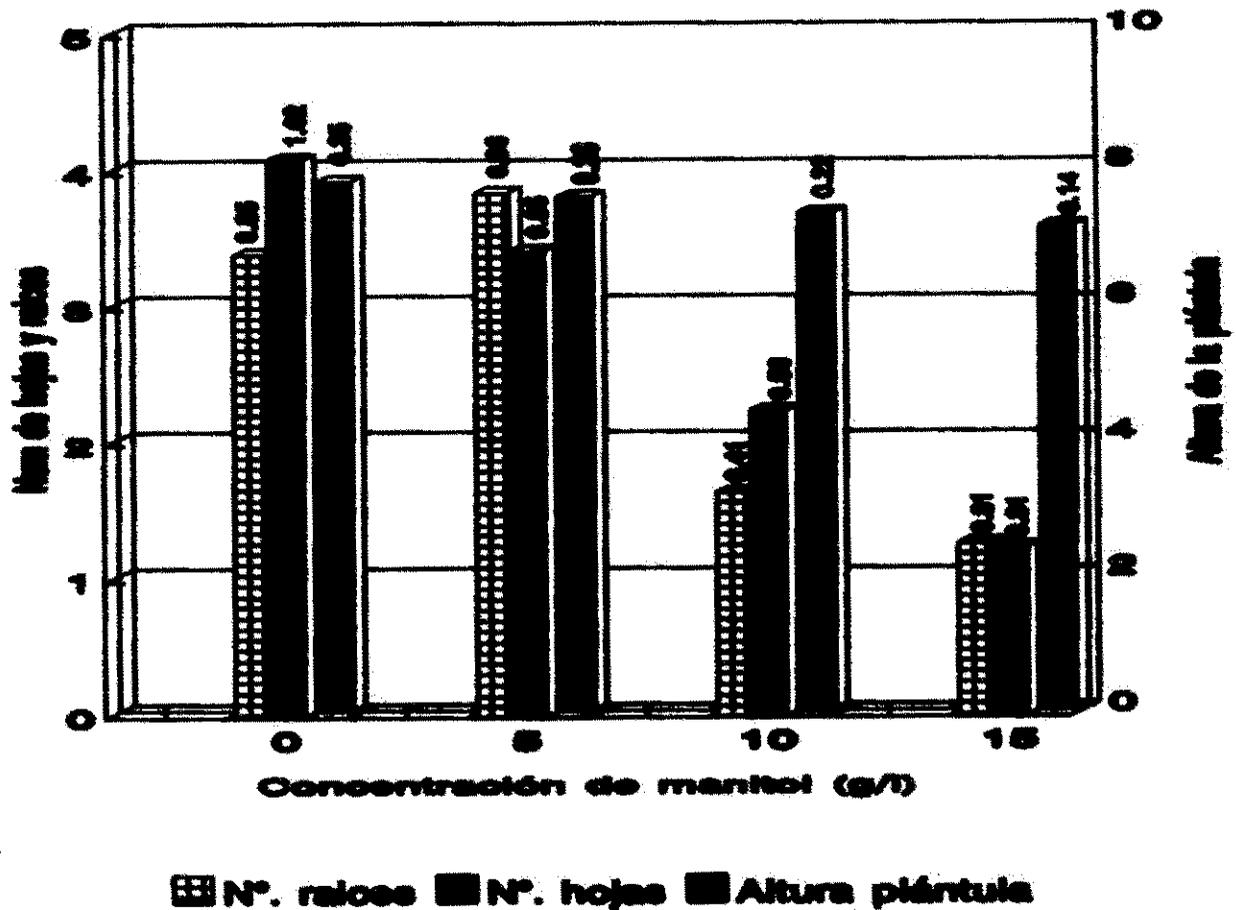


Figura 4. Efecto del manitol en el incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 16 semanas de conservación

El color verde oscuro de las hojas en relación a la evaluación a las 12 semanas, disminuyó el número de plántulas que lo manifestaron en todos los tratamientos, registrándose porcentajes de 65%, 30%, 28% y 22% en los tratamientos testigos, 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente. El color verde claro también sufrió

reducciones en los diferentes tratamientos en porcentajes de 15%, 25%, 10% y 8% en el testigo 5, 10 y 15 g/l de manitol respectivamente. El color verde clorótico expresión típica del deterioro fisiológico que sufren los tejidos fue más evidente en los tratamientos con mayor concentración de manitol, presentando porcentajes 70%, 62%, 45% y 20%, en 15, 10 y 5 g/l de manitol y el testigo respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del manitol, en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 16 semanas de conservación

Manitol (g/l)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color de hoja (%)			Vitrificación %	sobrevivencia %
			A	B	C		
0	5	0	65	15	20	10	100
5	10	10	30	25	45	15	100
10	20	10	28	10	62	25	95
15	30	15	22	8	70	30	90

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

A las 16 semanas de haber permanecido la yemas axilares en las diferentes variantes de medios de cultivos sujetos a estudio; fue evidente el mayor deterioro morfológico y fisiológico de las plántulas en los tratamientos a 10 y 15 g/l de manitol en las variables altura, número de hojas y raíces que experimentaron los menores incrementos mensuales; también se observó que a mayor concentración de manitol aumentó el amarillamiento en tallos y hojas y la sobrevivencia de las plántulas disminuyó hasta el 95% y 90 % en los tratamientos con 10 y 15 g/l de manitol. La presencia de

vitrificación se incrementó en 5% en relación a las 12 semanas en los tratamientos testigo, 5 y 10 g/l de manitol; no hubo incremento en la formación de callo y plántulas atípicas. Agentes osmóticos no metabolizables como el manitol y sorbitol posiblemente sean más efectivos que la sucrosa en las limitaciones de crecimiento de los cultivos (Roca et al., 1992). Mora (1987), señala que altas tasas metabólicas no se pueden mantener indefinidamente y eventualmente los procesos disminuyen, lo cual conduce a una detención del crecimiento. Heshaw (1982), reportó que concentración de 0.2 M de manitol causaron limitaciones en el crecimiento de *Solanum* spp. sin formación de plántulas anormales. Starinsky et al., (1985), afirman que la adición de manitol redujo el crecimiento de *Xanthosoma brasiliensis*.

Espinoza et al., (1985), observaron que la combinación de 4% de manitol con 0.5% y 3% de sacarosa y temperaturas de 25 °C se provocó estrés osmótico en *Solanum* spp. y se redujo el crecimiento de las plántulas. Para Roca et al., (1979), la disminución del crecimiento de las plántulas es debido a que al aumentar el potencial osmótico se reduce la absorción de agua y nutrientes por parte del explante; afectos similares son reportados por Jarret y Gawel (1991), con el empleo de sorbitol y manitol a concentraciones de 18.2 g/l después de 90 días en camote. Roca (1984), con el adiciones de manitol entre 5 y 25 mM encontró que es efectivo para limitar el crecimiento en yuca, pero disminuye la viabilidad de los tejidos a bajas temperaturas entre 10 y 18 °C . Westcott (1981), determinó que niveles mayores de 40 g/l de manitol causaron efectos tóxicos en los explantes de papa suprimiendo el crecimiento de los tejidos.

3.2 Efecto de la dilución de las sales de Murashige y Skoog en el crecimiento in vitro del camote N-1437

3.2.1 Evaluación a las 4 semanas de conservación

La nutrición del cultivo in vitro plantea problemas particulares, su débil actividad clorofilica necesita aporte de carbono bajo forma orgánica (sacarosa, glucosa etc.). Privados en gran parte de los mecanismos reguladores que se presentan en la planta entera, los tejidos aislados cultivados in vitro son especialmente sensibles a la acción de los iones minerales (Márgara, 1988). La relación entre las concentraciones de carbohidratos y los componentes del medio nutritivo pueden tener efecto sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos in vitro (Starinsky, 1980).

El balance de nitrógeno y carbono en el medio de cultivo tiende a favorecer el crecimiento de tallos o raíces, lo cual depende de que sea alto o bajo respectivamente. Con poca cantidad o la eliminación de ciertos nutrimentos orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo se puede reducir el crecimiento de los cultivos (Roca et al., 1992).

A las cuatro semanas de conservados los tejidos se observó que en la dilución al 50% de las sales MS, se produjo mayor efecto en la reducción de la tasa de crecimiento, reportándose el promedio de 0.65 cm, mientras que al 33 % de las sales y en el tratamiento testigo la altura fue notablemente superior con promedios respectivos de 1.17 cm y 1.13 cm.

El número de hojas fue mayor en el tratamiento testigo con promedio de 3.25, al 33 % de las sales 2.37 ligeramente superior al 2.22 que se obtuvo en el 50% de las sales.

La producción de raíces fue mayor en el tratamiento al 33% de las sales con 1.55, al 50% fue de 1.35 y con un comportamiento intermedio en el tratamiento testigo con 1.45 (figura 5).

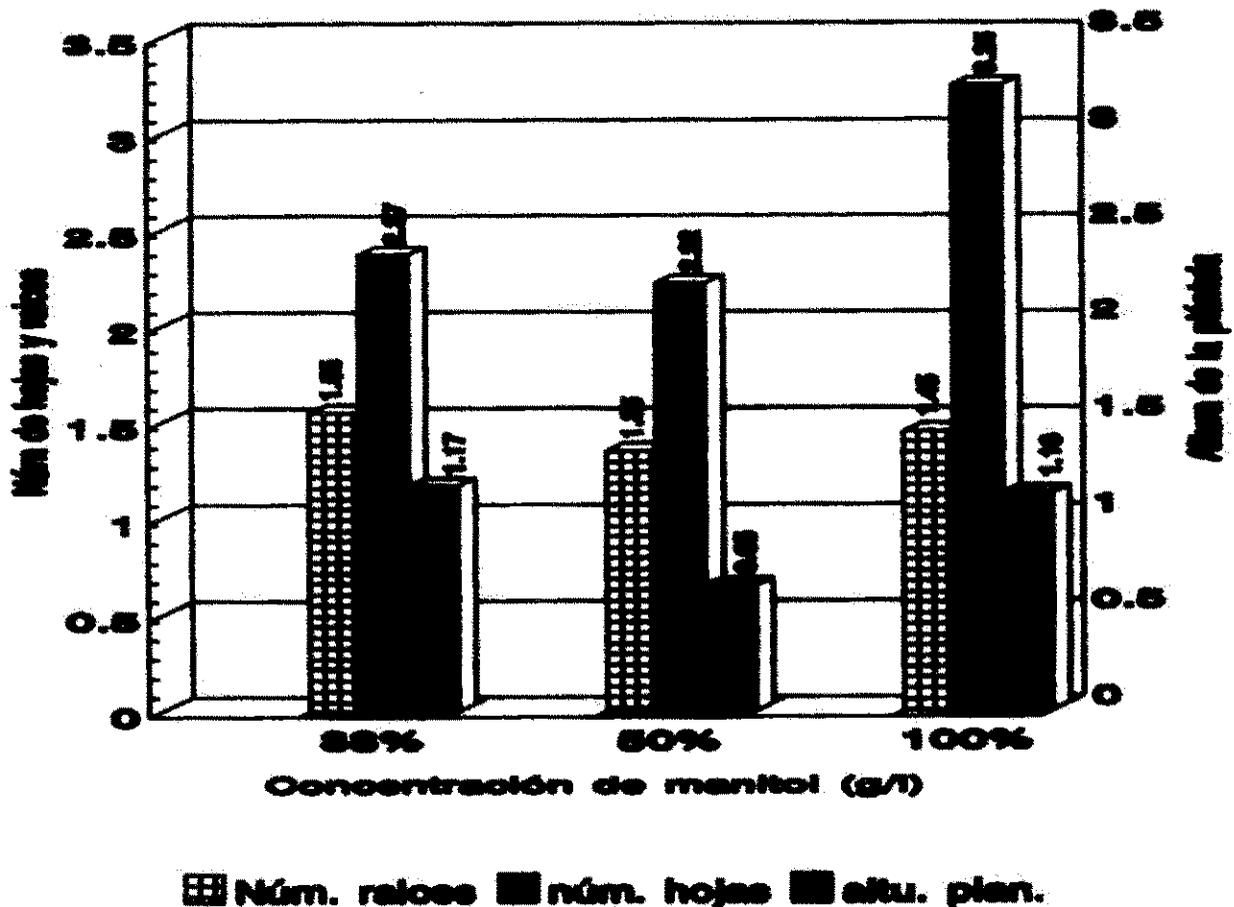


Figura 5. Efecto de diluciones de las sales MS en el promedio de altura, número de hojas y número de raíces a las 4 semanas de conservación

En la coloración de las hojas se observó que el color verde oscuro se manifestó en el 75% de las plántulas en los tratamientos en los cuales se diluyeron las sales, mientras que en el tratamiento testigo fue del 65%. El color verde claro se presentó en porcentaje de

15%, 25% y 20% en los tratamientos al 33 %, 50 % y testigo respectivamente. El color verde clorótico no se observó al 50% de las sales y en los tratamientos al 33% de las sales y el testigo, se presentó en el 10% y 15% de las plántulas respectivamente.

En todos los tratamientos la sobrevivencia de los tejidos fue del 100%, únicamente se presentó la formación de callo en un 5% de las plántulas establecidas en tratamiento testigo, los resultados se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 4 semanas de conservación

Sales M.S. (%)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color de hoja (%)			Vitrificación %	sobrevivencia %
			A	B	C		
0	5	-	65	20	15	-	100
33	0	-	75	15	10	-	100
50	0	-	75	25	0	-	100

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

3.2.2 Evaluación a las 8 semanas de conservación

A las 8 semanas en la variable altura de la plántula se registraron promedios de incremento mensual de 1.25 cm, 1.52 cm y 1.83 cm en los tratamientos al 33%, 50% y el testigo respectivamente. Estos resultados reflejan una reducción en el ritmo de crecimiento respecto a los resultados registrados a las cuatro semanas de conservadas las plántulas.

El incremento mensual en el número de hojas presentó igual orden de comportamiento que la variable altura de la plántula con valores de 2.16 , 1.85 y 2.96 en los tratamientos al 33%, 50% de la dilución de las sales y

el testigo respectivamente.

El número de raíces tuvo mayor incremento en el tratamiento testigo con 1.26 ligeramente superior al 1.18 que se obtuvo al 33% de la dilución de las sales; al 50% de las sales el incremento fue de 0.86, Figura 6.

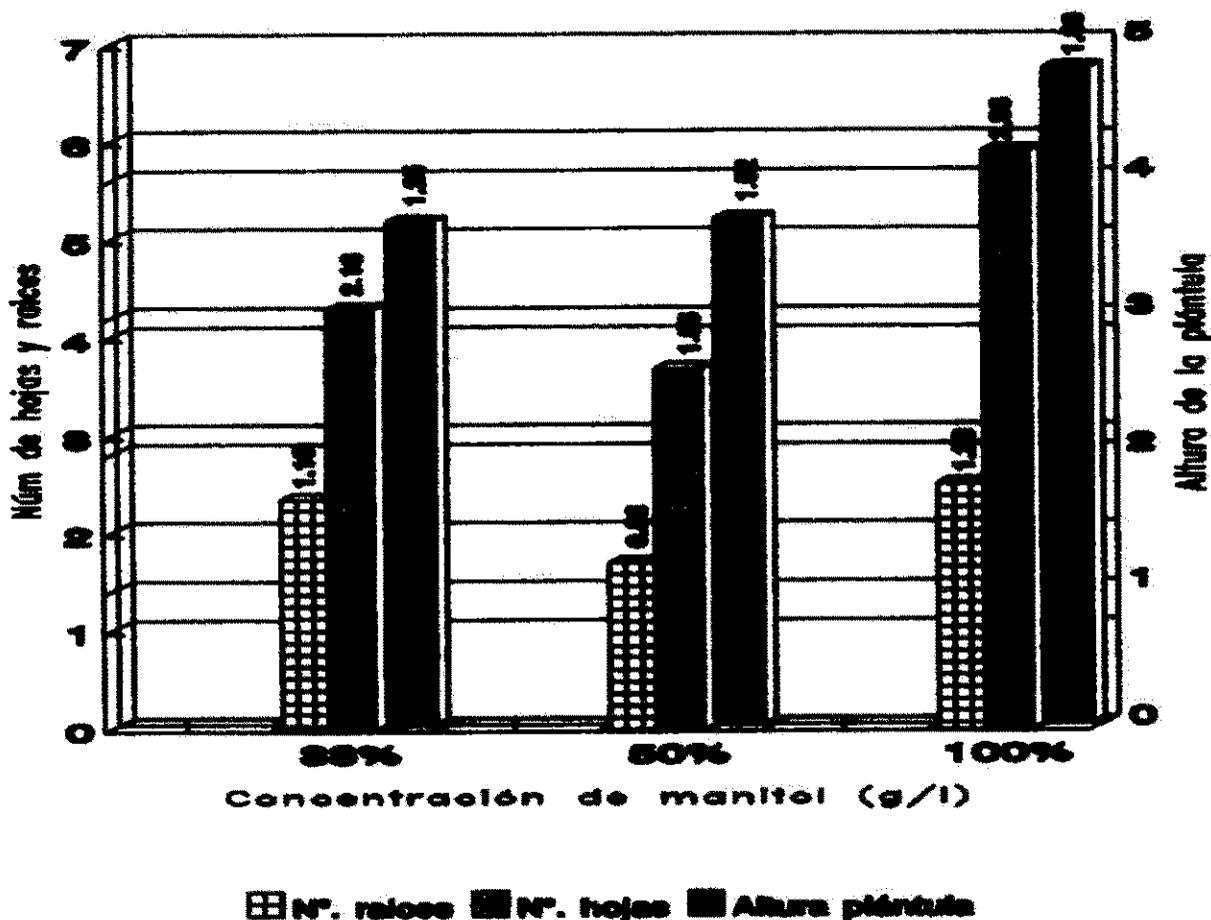


Figura 6. Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 8 semanas de conservación

El porcentaje de plántulas que presentaron color verde oscuro en los tratamientos testigo y al 50% de la dilución de las sales no variaron respecto a los

presentados a las 4 semanas de conservadas; al 33% se redujo al 70% de las plántulas. El color verde claro en los tratamientos al 50% de las sales también conservó el 25% reportado en la evaluación a las 4 semanas, al 33% de las sales y el tratamiento testigo aumentó el 5%. En el color verde clorótico no hubo cambio en los porcentajes de los tratamientos al 33% y 50%, pero en el tratamiento testigo se redujo el porcentaje al 10% de las plántulas.

La sobrevivencia fue del 100 % en todas las plántulas evaluadas y la formación de callo únicamente se observó en el tratamiento testigo en un 5% (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 8 semanas de conservación

Sales M.S. (%)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color de hoja (%)			Vitrificación %	sobrevivencia %
			A	B	C		
0	5	-	65	25	10	-	100
33	0	-	70	20	10	-	100
50	0	-	75	25	0	-	100

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

3.2.3 Evaluación a las 12 semanas de conservación

La altura de las plántulas a las 12 semanas en el tratamiento testigo presentó un incremento mensual de 0.65 cm superior al 0.12 cm y 0.32 cm que se obtuvo al 33% y 50% de la dilución de las sales respectivamente.

En el número de hojas en el incremento mensual fue superior en el tratamiento testigo con 1.45, a 50% de las sales 1.22 y al 33% fue de 0.87.

En el número de raíces el incremento fue de 1.03 en el tratamiento testigo ligeramente superior al 0.92 que se produjo al 33% de las sales, mientras que al 50% de

las sales se registró el menor número de raíces con incremento mensual de 0.70 (Figura 7).

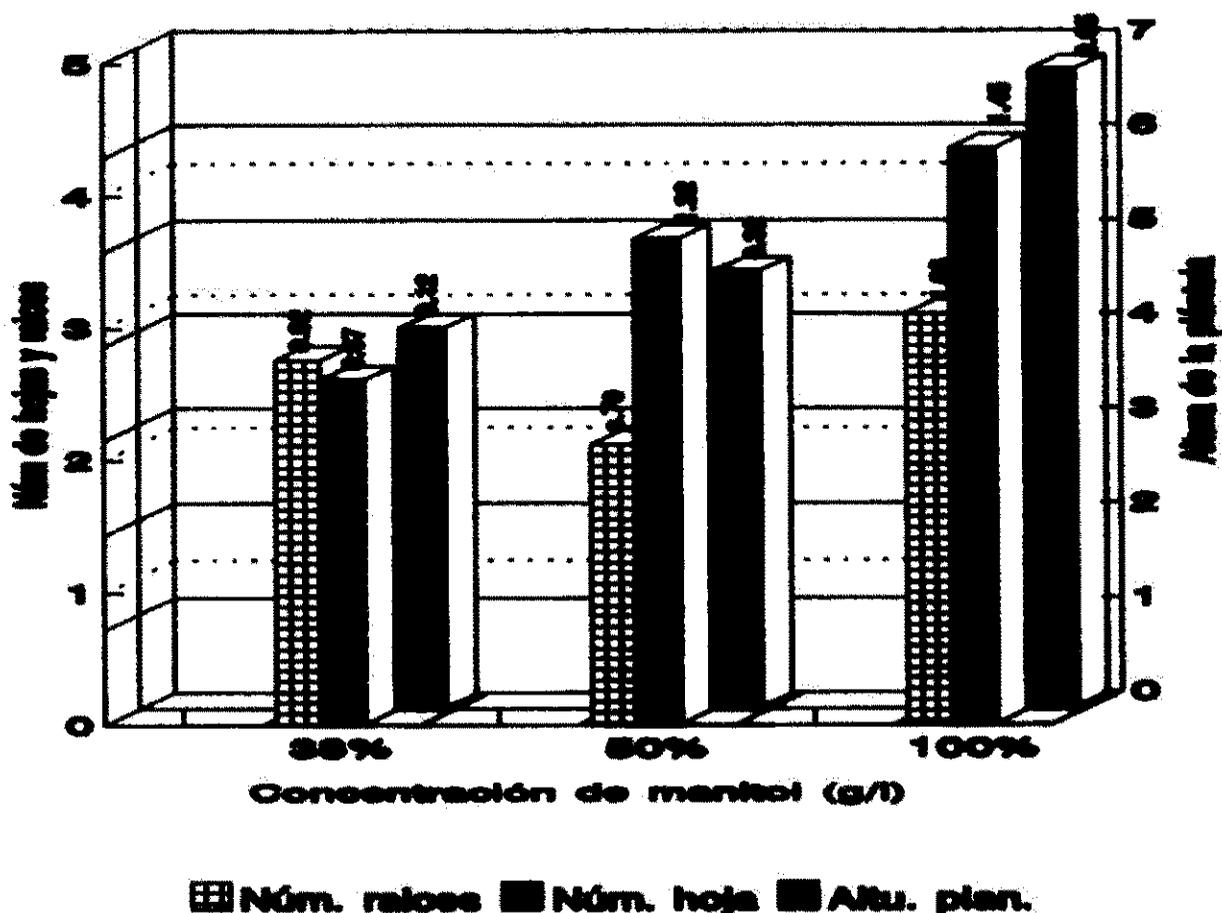


Figura 7. Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 12 semanas de conservación

El color verde oscuro presentó igual promedio que la evaluación a las 8 semanas en el tratamiento al 33% de la dilución de las sales; en los tratamientos al 50% de las sales y el testigo aumentaron los porcentajes a 90% y 70% respectivamente. El color verde claro en los tres tratamientos disminuyeron los porcentajes en relación a la evaluación a las 8 semanas presentando valores de 15%,

10% y 20% correspondiente a los tratamientos al 33%, 50% y el testigo. Unicamente, en el tratamiento al 33% de la dilución de las sales aumentó el porcentaje de plántulas que presentaron un color verde clorótico en un 15%, en los otros tratamientos no se observaron variaciones en los resultados. El comportamiento de las plántulas en los diferentes tratamientos no sufrieron alteraciones en cuanto a la sobrevivencia y la formación de callo respecto a la evaluación de las 8 semanas. El fenómeno de vitrificación se presentó en un 5% de las plántulas establecidas en el tratamiento testigo, tabla 11.

Tabla 11. Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S. en la formación de callo, plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 12 semanas de conservación

Sales M.S. (%)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color de hoja (%)			Vitrificación %	sobrevivencia %
			A	B	C		
0	5	-	70	20	10	5	100
33	0	-	70	15	15	-	100
50	0	-	90	10	0	-	100

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

3.2.4 Evaluación a las 16 semanas de conservación

A las 16 semanas de conservadas las plántulas experimentaron niveles más bajos de incremento mensual en la variable altura de la plántula en los tratamientos al 50% de la dilución de las sales y el testigo con valores de 0.16 cm y 0.25 cm respectivamente; al 33% de la dilución de las sales el incremento mensual registrado fue igual al de las 12 semanas con 0.12 cm.

El incremento mensual en el número de hojas en los tratamientos fue inferior al registrado a las 12 semanas, pero se mantuvo la tendencia de presentar mayores incrementos a mayor concentración de las sales en el

medio de cultivo; en los tratamientos testigo, 50% y 33% de las sales les correspondieron incrementos de 1.02, 0.95 y 0.62 respectivamente.

El número de raíces en el tratamiento al 50% de la concentración de las sales fue menor en todo el periodo de conservación, mientras que al 33% de la dilución de las sales se mantuvo cercano al producido en el tratamiento testigo. Los incrementos para los tratamientos al 33%, 50% de las sales y el testigo fueron de 0.74, 0.56 y 0.85 respectivamente, figura 8.

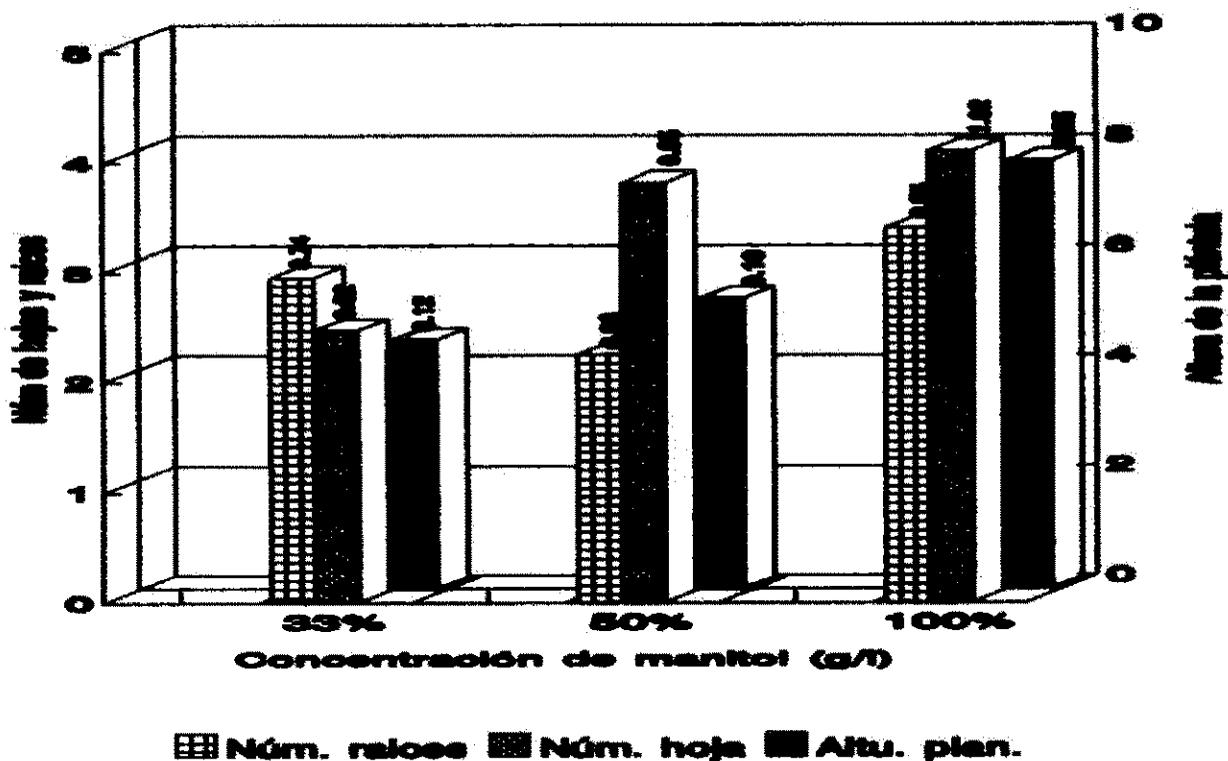


Figura 8. Efecto de diferentes diluciones de las sales MS en incremento mensual de altura, número de hojas y número de raíces a las 16 semanas de conservación

Resultados similares que estimulan mayor enraizamiento a menor dilución de las sales MS (25%, 33% y 50%) reportan Kartha et. al. (1981). Allan (1979), experimentando con diferentes clones de camote observó que al 10% de la dilución de las sales MS, el crecimiento de las plántulas fue perjudicado debido al bajo contenido de iones en el medio y que a 25% y 50% el crecimiento no fue significativamente diferente al que tuvieron en las sales completas de MS a 20 semanas de conservación.

El medio MS, contiene en su concentración nitrógeno y amonio, como sean altas las concentración se reducirá el crecimiento de las células en algunas especies (Gamborg y Shyluk, 1970). Ho y Wang (1983), reportan que a baja concentración de las sales MS puede ser beneficioso para la inducción de raíces y algunas veces resultó en un crecimiento pobre de las plántulas. El proceso de enraizamiento en brotes propagados *in vitro* es mejor en medios de cultivos a menor concentración de las sales, el propósito de reducir la disponibilidad de los nutrientes es el de disminuir el crecimiento sin que éste cause daños fisiológicos serios en el explante (Thorpe, 1980).

El color verde oscuro de las hojas disminuyó hasta el 63% y 65% en los tratamientos al 33% de la dilución de las sales y el testigo; al 50% de las sales mostró el 90% observado en la evaluación a las 12 semanas. El porcentaje de plántulas que manifestaron el color verde claro, aumentó hasta el 18% en el tratamiento al 33% de las sales, se mantuvo el 10% en el tratamiento al 50% de las sales y disminuyó hasta el 15% en el testigo. El color verde clorótico sufrió aumento en los tratamientos al 33% de la dilución de las sales y el testigo con porcentajes respectivos de 19% y 20%; en el tratamiento

al 50% de las sales no se observó esta coloración .

Al 33% de las sales la sobrevivencia de las plántulas fue del 95% y al 50% de las sales y el tratamiento testigo fue del 100%. La formación de callo y el fenómeno de vitrificación únicamente se presentaron en el tratamiento testigo en 5% y 10% de las plántulas respectivamente, tabla 12.

Tabla 12. Efecto de diferentes diluciones de las sales M.S.en la formación de callo , plántulas atípicas, color de las hojas, vitrificación y sobrevivencia a las 16 semanas de conservación

Sales M.S. (%)	Callo (%)	Plántulas atípicas	Color de hoja (%)			Vitrificación %	sobrevivencia %
			A	B	C		
0	5	-	65	15	20	10	100
33	0	-	63	18	19	-	95
50	0	-	90	10	0	-	100

A:Color verde oscuro B:Color verde claro C:Color verde clorótico

Allan (1979) en medios de cultivos a bajas concentraciones de los iones como son el de Heller y el MS, observó que las plántulas de diferentes clones de camotes sobrevivieron durante 56 semanas. Kikuta y Okazawa (1982), reportan que utilizando 25% y 50% de la concentración de las sales MS suplementado con las vitaminas de Nitsch y Nitsch en explantes de discos de hojas de papa *Solanum tuberosum* no se formaron callos en los tejidos, pero sí la formación de brotes y yemas en porcentajes de 16.6 y 3.5 respectivamente.

IV CONCLUSIONES

1.- Las sales del medio básico Murashige y Skoog resultó más efectivo para la reducción del crecimiento del clon N-1437 que los tratamientos a los que se les adicionó 5, 10 y 15 g/l de manitol a las 16 semanas de conservación.

2.- En la dilución al 50% de las sales de Murashige y Skoog (1962), las plántulas del clon de camote N-1437 presentaron mejores aspectos morfológicos y fisiológicos, comparado con el efecto que produjeron las otras variantes de medios de cultivos a las 16 semanas de conservación.

V RECOMENDACIONES

- 1.- Estudiar el efecto de la interacción de los factores, inhibidores de crecimiento, dilución de sales MS y temperatura para la conservación *in vitro* de diferentes clones de camote.
- 2.- Estudiar la estabilidad genética de las plántulas conservadas *in vitro* en condiciones de campo.

VI BIBLIGRAFIA CONSULTADA

- ALLAN, J.J. 1979. Tissue culture storage of sweet potato germoplas. P.h. D. Thesis, Birmingham, G.B. University of Birmingham. P. 4 , 15, 231, 233.
- BROWN, D.W.D.; THORPE, T.A.; LEUNG, D.W. 1979. Osmotic requeriment for shoot formation: In Tobacco callus. *Physiologia Plantarum*. DINAMARCA. 46:36-41
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. 1990. Un banco genético de batata. *Geneflow (IT)* p.11.
- DE LA PUENTE, F. 1991. Informe de exploración de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) En Nicaragua, Lima, (PERU), Centro Internacional de la Papa. p.2
- ESPINOZA, N.; LIZARRAGA, R.; SIGUEÑA, C.; BUITRON, F.; BRYAN, J.; DODDS, J.H. 1992. Cultivo de tejidos: Micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. *Guía de investigación, C.I.P.* p. 30.
- ESPINOZA, N.; ESTRADA, R.J; TOVAR, P.; BRAYAN, J.; BADDIS, J. 1985. Cultivo de tejidos; Micropropagación, conservación, exportación de germoplasma de papa. *Documentación de tecnología especializada*. Lima, Peru, CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. p.17.
- FOLQUER, F. 1978. La batata (camote) estudio de la planta y su producción comercial. I.I.C.A. San José, Costa Rica p.17-18.

GAMBORG, O.L. AND SHYLOK, J.P. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiol.* 45:598-600.

GRANADA, C.L.; VILLALOBUS, V.M. 1980. Propagación in vitro de *Dioscorea* sp. Nueva época (Chapingo) México. 21:1-7.

HENSHAW, G.G. 1982. Tissue culture methods and germoplasm storage. In International congress of plant tissue and cell culture. Plant tissue culture. Proceedings. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture p.789-792.

HU.C.Y.; WANG P.J. 1983. Meristem, shoot tip and bud cultures. In Handbook of plant cell cultures. v.1 Techniques for propagation and breeding. Ed. by D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and V. Yamada. p. 177-227 Mcmillan, New York.

JARRET, R.L.; GAWEL, N. 1991. Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Lin) *In vitro*. *Plant Cell. Tissue Organ Culture.* 25: 153-159.

KARTHA, K.K.; PAHL, K., LEUNG, N.L., AND MROGINSKI, L.A. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: Soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. (Can). *J. Bot.* 59: 1651-1679.

- KIKUTA, Y.; OKASAWA, Y. 1982. Shoot-bud formation and plantlet regeneration in potato tuber tissue cultured *in vitro*. J. Fac Agr. Hokkaido. 61:166-172.
- LEON, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. P. 186.
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*; los meristemas y la organogénesis. Ed. por Mateo Box, J. M.Y Urbano Terron. P. Madrid, Mundiprensa, p. 178.
- MORA, M.I. 1987. Uso de osmorreguladores e inhibidores químicos para la conservación del germoplasma *in vitro* de musa sp. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C. R. Universidad de Costa Rica. CATIE.p. 64,94.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*: In Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Ed. por W.M. Roca; L.A. Mroginski Cali, (COL), CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. P. 25.
- NEMETH, G. 1981. Adventitious root induction by substituted 2-chloro; 3-phenyl-propionitriles in apple rootstock cultured *in vitro*. Scientia horticulture. 14:253-259

PEREZ, P.J. CASTILLO, M.A.; GONZALEZ, M.A. Y VELAZCO, O. 1984. Comportamiento de poblaciones obtenidas por cultivo de tejidos en caña de azúcar (*Saccharum spp*). Primer congreso nacional de genética. La Habana, Cuba. (Resúmenes).

PEREZ, P.J. 1991. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. In Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones Ed. por W.M.Roca; L.D. Mroginiski. Cali, (Col), CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. p.547-548.

ROCA, W M. 1979. Métodos de cultivo de tejidos para el intercambio internacional y la conservación del germoplasma de la yuca. Boletín informativo. (Col) CIAT. 6: 3-5

ROCA, W.M; BELTRAN, J.; NARVAEZ, J.; REYES, R. 1984. Concentración de nitrógeno sobre el crecimiento y viabilidad del tejido. In Perca D.M.Bogotá, Colombia Universidad Nacional de Colombia. CIAT. p.128.

ROCA, M.W.; ESCOBAR, R.; MAFLA, G. 1992. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro* : Principios y técnicas. CIAT, CALI (COL.) .CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Guía de estudio.p.5-20.

STARITSKY, G. 1980. Growth inhibition and dormancy. In Crop genetic resources: The conservation of difficult material proceedings of an international workshop univerity of reading, Reino Unido.

- STARITSKY, G, A. J. DEKKERS ,N.P. LOUWAARS ; E. A. ZANDVOORT. 1985. *In vitro* conservation of aroid germoplasm at reduced temperatures and under osmotic stresses. In Plant tissue Culture and its Agricultural Applications, Butterworths. L.A. Withers and P.G. Alderson (Eds). p. 277 - 284.
- THORPE, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *Internacional Review of Cytology*. Supplement 11 A. Academic Press, New York. p. 71 - 111.
- VIETH, J.PHAN, C.T., HEGEDUS, P. 1982. Etude histologique exploratoire de regenerants vitreux de *Pyrus malus*, CV M - 26. *Annales de L'ACFAS* (Canada) 49:91.
- WAYMOUTH, C.H. 1973. Quality control measures; determination and survey of osmolality in culture medium. In Tissue culture methods and applications. Ed. by P. Kruse; M. Paterson. New York Academic prees. P. 703-709.
- WESCOTT, R.J. 1981. Tissue culture storage of potato germplams. Minimal growth storage. *Potato research* (Holanda) 24:331 - 342.

ANEXO I

Tabla 13. Efecto de diferentes concentraciones de manitol en altura (alt), número de hojas(nuh), número de raíces (nur) del clon camote N-1437 a las 4,8,12,16 semanas de conservación

Niveles manitol (g/l)	4 semanas			8 semanas			12 semanas			16 semanas		
	Alt	Nuh	Nur	Alt	Nuh	Nur	Alt	Nuh	Nur	Alt	Nuh	Nu
0	1.13a	3.25b	1.45a	4.79a	5.92a	2.52ab	6.75a	4.35b	3.10a	7.77a	4.10a	3.40b
5	0.59b	2.77c	1.22a	4.33a	6.22a	2.82a	6.42a	5.97a	3.4a	7.55a	3.42ab	3.85a
10	0.52b	3.85a	0.05b	4.74a	6.24a	0.27b	6.43a	3.75c	1.12b	7.3ab	2.25b	1.65c
15	0.69b	3.40b	0.00c	4.86a	6.27a	0.00c	6.56a	3.17c	1.05b	7.1ab	1.24c	1.25c

Diferencias entre promedios seguidas por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Rango múltiple de Duncan al 5% de probabilidad.

ANEXO II

Tabla 14. Efecto de diferentes diluciones de las sales MS (1962) en altura (Alt), número de hojas (Nuh) y número de raíces (Nur) a las 4, 8, 12 y 16 semanas de conservación

Dilución de sales (%)	4 semanas			8 semanas			12 Semanas			16 semanas		
	Alt	Nuh	Nur	Alt	Nuh	Nur	Alt	Nuh	Nur	Alt	Nuh	Nur
100	1.13a	3.25a	1.45a	4.79a	5.92a	2.52ab	6.75a	4.35a	3.10a	7.77a	4.10a	3.40a
50	0.65b	2.22b	1.35a	3.69b	3.70c	1.72b	4.62ab	3.67b	2.11b	5.27ab	3.81b	2.25b
33	1.17a	2.37a	1.55a	3.67b	4.32b	2.37a	4.02b	2.60c	2.75ab	4.52b	2.47c	2.95ab

Diferencias entre promedios seguidas por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Rango múltiple de Duncan al 5% de probabilidad.

Tabla 3. Dilución de sales MS

Variante medio de cultivo	Concentración (%) de sales MS (1962)
MS-0	100
MS-A	50
MS-B	33

Tabla 4. Coloración de las hojas

Color	clave
Verde oscuro	A
Verde claro	B
Verde clorótico	C

2.11 Materiales y equipos utilizados

Autoclave	pinzas
agitadores magnéticos	escalpelos
destilador de agua	hojas de escalpelos#11
desionizador de agua	pisetas
cámara de flujo laminar	alcohol al 70%
balanza analítica	algodón
potenciómetro	probetas
pipetas	beaker
placas pertri	papel filtro
parafilm	tubos de ensayo
gradillas	