

Capítulo 18

Cultivo de tejidos de camote

R. L. Jarret*

* Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U.

Introducción

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) pertenece a la familia de las Convolvuláceas que contiene aproximadamente 50 géneros y 1200 especies. Varios miembros de esta familia tienen importancia económica ya sea como malezas o como plantas ornamentales; sólo la *Ipomoea batatas* se cultiva comercialmente como alimento, y la batata es la única especie del género que tiene raíces comestibles. Actualmente, el camote ocupa el sexto lugar entre los alimentos más importantes del mundo. La producción mundial, en 1983, superó las 114,842 toneladas (FAO, 1984). El camote, además de ser consumido por sus carbohidratos, es una fuente importante de almidón para uso industrial en el Japón, donde actualmente se investiga también su potencial en la producción de alcohol carburante.

Las pruebas disponibles indican que el centro de diversificación del camote se encuentra entre el sur de México y el norte de América del Sur (Jones et al., 1986). Sin embargo, todavía no se ha encontrado su ubicación exacta. Según Edmond (1971), el camote fue domesticado en América Central y en las islas tropicales del Pacífico antes de la era cristiana. En las Américas, tanto los Mayas como las civilizaciones peruanas de los Andes cultivaron el camote y diseminaron su cultivo al norte de México, a las Antillas occidentales, y a otras regiones de América del Sur. En el Pacífico, el cultivo del camote se extendió a Nueva Zelanda. En el siglo XVI los exploradores españoles llevaron esta raíz carnosa a España de donde se extendió a otros países de Europa y Africa. El camote llegó a St. Thomas, lejos de la costa de Africa, hacia 1563. Los exploradores españoles llevaron también este cultivo a las Filipinas y a las Antillas Orientales, y de allí fue diseminado por los portugueses a la India y Malasia. En el siglo XVII, los marineros chinos de Fukien llevaron estas raíces de las Filipinas a varias regiones del sur de la China, a Taiwan y al Japón. El cultivo del camote ya se encontraba bien establecido en los Estados Unidos hacia finales del siglo XVIII (Edmond, 1971).

El camote es un hexaploide natural (Jones, 1965) a diferencia de la mayor parte de los miembros del género que son diploides ($2n = 30$) o, en raras ocasiones, tetraploides (Jones, 1968). Algunos investigadores japoneses (Nishiyama et al., 1975) obtuvieron híbridos hexaploides artificiales a partir de clones diploides y tetraploides relacionados; las hibridaciones interespecíficas, por consiguiente, son posibles. El comportamiento cromosómico durante la meiosis sugiere que los clones hexaploides se originaron en las polinizaciones cruzadas naturales entre progenitores silvestres

tetraploides y diploides, que fueron seguidas por duplicación cromosómica. La recopilación más reciente de información taxonómica sobre el género *Ipomoea* es la de Austin (1978).

El cultivo del camote está expuesto al ataque de una gran variedad de plagas (Bouwkamp, 1985), especialmente enfermedades micóticas, virus, e insectos dañinos. Hasta el momento, los fitomejoradores del camote han tenido mucho éxito en incorporar resistencia a estas plagas (Jones et al., 1986). Sin embargo, ciertas incompatibilidades han ocasionado dificultades en la hibridación de los progenitores seleccionados cuando se trata, por ejemplo, de introducir nuevos genes mediante una hibridación interespecífica o intergenérica. Para una revisión de las estrategias y objetivos actuales del fitomejoramiento del camote, el lector puede referirse a Jones (1980) y a Jones et al. (1986).

Técnicas del Cultivo in Vitro

La eliminación de los patógenos de las plantas, especialmente de los virus, constituye un prerequisite para la producción de material limpio para la siembra y para el intercambio internacional del germoplasma. La alta incidencia de la infección viral, dentro de los clones más cultivados, ha motivado a numerosos investigadores a ensayar técnicas para su eliminación como las siguientes: el injerto de ápices in vivo (Hildebrand, 1957; Holmes, 1956); el tratamiento con calor de los materiales de siembra (Hildebrand, 1964; Hildebrand y Brierley, 1960); el cultivo in vitro de ápices cortados o de meristemas (Elliot, 1969; Mori, 1971; Nielsen, 1960); o una combinación de las técnicas anteriores (Over de Linden y Elliot, 1971; Kuo et al., 1985; Love et al., 1986). Este capítulo discutirá solamente las técnicas in vitro.

Cultivos de ápices y de meristemas

Nielsen (1960) cultivó meristemas de camote en un medio definido carente de reguladores del crecimiento. El desarrollo de los brotes avanzó lentamente y sólo se recuperaron las plántulas 3 a 10 meses después. Elliot (1969) cultivó los meristemas y los ápices de brotes de cuatro clones de camote en diversos medios de cultivo; el medio MS, de Murashige y Skoog (1962), uno de los ensayados, estimuló más el explante como se observó en la supervivencia y ulterior crecimiento de los tejidos de éste. Sin embargo, se observó que el ácido nicotínico, la piridoxina, el HCl y la glicina no eran esenciales para la supervivencia del explante o para el desarrollo de la

plántula. Los meristemas cultivados en un medio semisólido produjeron una cantidad levemente mayor de callo a diferencia de aquéllos cultivados en puentes de papel filtro. Además, las raíces adventicias se formaron con mayor frecuencia en los meristemas cultivados en el medio semisólido. Tanto el ácido giberélico (GA_3) como el agua de coco reprimieron el crecimiento de los brotes y raíces. La formación de raíces y el desarrollo de la plántula fueron más rápidos en el medio que contenía ácido naftalenacético (ANA) como único regulador del crecimiento.

Over de Linden y Elliot (1971) cultivaron los meristemas apicales de varios cultivares de *Ipomoea* después de aplicar un tratamiento térmico al material vegetativo (38 °C durante 4 a 12 semanas). Los explantes se cultivaron en el medio MS complementado con 1 mg/litro de ANA, cuando se partía de meristemas, o con 1 mg/litro de ácido indol-3-butírico (AIB), cuando se partía de las puntas de los brotes. En el cultivar Owaiaka Red se logró eliminar el virus sólo cuando se cultivaron puntas de brotes de 2 mm de largo que provenían de una planta progenitora tratada con termoterapia durante 12 semanas. Otros cultivares, sin embargo, requerían un pretratamiento menos vigoroso. Mori (1971) también informó sobre la eliminación exitosa de virus en clones de camote que fueron sometidos a un protocolo similar.

Alconero et al. (1975) cultivaron meristemas de 0.4 a 0.8 mm de largo, aislados de yemas axilares, en el medio basal MS modificado. Se informó que el ácido 3-indolacético (AIA) era más efectivo que el ANA como fuente de auxina, solo o en combinación con N-6-furfurilaminopurina (cinetina). El desarrollo de las plántulas se estimuló más al añadir ácido fólico (1 mg/litro). Las plántulas fueron producidas bajo una amplia gama de combinaciones de AIA/cinetina y la existencia de una interacción significativa del tipo genotipo/hormona se hizo evidente. Algunos de los brotes regenerados fueron atípicos; sin embargo, la producción de brotes atípicos se redujo a un mínimo cuando los meristemas se cultivaron en un medio MS complementado con 2 mg/litro de cinetina y 1 mg/litro de AIA. El 47% de las plantas regeneradas dieron un índice libre de virus cuando se empleó *I. setosa* como planta indicadora.

Litz y Conover (1978) investigaron la capacidad de varios medios de cultivo para sostener el crecimiento de ápices meristemáticos de camote, con miras a utilizar la técnica para lograr una rápida propagación clonal. Los dos cultivares investigados fueron White Star y PI 31 5343. Las puntas de brote de las yemas axilares y apicales (3.0 mm de longitud) se cultivaron en medio MS basal que se complementó con 10 g/litro de carbón activado y 0.5-2.0 mg/litro de AIB ó 0.5-2.0 mg/litro de cinetina combinados con 0.05-2.0 mg/litro de AIA. Una semana después se observó la formación de

callo en la superficie cortada de los explantes, el cual, desde entonces, se removió periódicamente. Los explantes de White Star se regeneraron en un medio basal que contenía 1 mg/litro de AIB. La regeneración de los brotes, a partir de las puntas de explante, tomó unas cinco semanas; los cultivos que se iniciaron a partir de yemas axilares, en cambio, requirieron varias semanas más. Frecuentemente, las raíces adventicias se formaban a partir del callo, en la superficie cortada del explante y en la base de las plántulas en desarrollo. Las pequeñas plántulas se habían establecido en unas ocho semanas cuando se usaron puntas de brote como explantes, y en 2 a 3 semanas más cuando se utilizaron explantes de yemas laterales.

Liao y Chung (1979) informaron sobre la eliminación de virus en el cultivar Tainung 63 cuando extirparon meristemas de 0.3 a 0.6 mm de largo de plantas que habían sido expuestas previamente a 38-42 °C durante 28 días. Los meristemas se cultivaron en un medio MS complementado con 4-6 mg/litro de BAP y se incubaron durante 30-50 días en las siguientes condiciones: 25 °C, débil intensidad de luz y fotoperíodo de 16 horas. Los brotes desarrollados se trasladaron a un medio MS modificado con 2 mg/litro de cinetina que estimularía un desarrollo adicional; las plántulas completas se recuperaron en un lapso de 65 a 120 días. Dos terceras partes de las plantas regeneradas no manifestaron síntomas virales después de ser inoculadas mediante transmisión mecánica o de ser injertadas en *I. nil*.

Kuo et al. (1985) describieron recientemente un procedimiento para eliminar los virus A (SPV-A) y N (SPV-N) del camote mediante el cultivo de meristemas. Siguiendo este procedimiento, se cortaron meristemas (0.2-0.4 mm de longitud) en ápices obtenidos de raíces que habían sido almacenadas y que retoñaron a 30-35 °C. Los meristemas se cultivaron en un medio basal MS modificado que se complementó con 1.0 mg/litro de AIA y 1.0 mg/litro de cinetina, y se incubaron a 23 W m⁻² en un fotoperíodo de 15 horas a 22-32 °C. Aunque se observó alguna variación entre los genotipos, las plántulas se recuperaban generalmente de 40 a 60 días después de iniciado el cultivo. El porcentaje promedio de plántulas establecidas, para cada uno de los 14 cultivares examinados, fue de 40% (en un rango de 8-87%). Las plántulas individuales se propagaron también por cultivo de esquejes uninodales. El 83% de las plántulas regeneradas estaba libre de SPV-A y SPV-N, como lo indicó la prueba ELISA (ver Capítulo 30). Las partes regeneradas infectadas con el virus no mostraron síntomas de enfermedad.

Por lo menos en un caso se obtuvo un nuevo cultivar, ya sea directamente de una mutación somática o de una quimera, durante los procedimientos que se siguieron para eliminar el virus (Moyer y Collins, 1983).

Love et al. (1986) han descrito en detalle los procedimientos para el cultivo de meristemas y para la eliminación de virus en el camote, de los cuales se tratará al final de este capítulo.

Embriogénesis somática

Varios informes han presentado recientemente protocolos detallados para estimular la embriogénesis en cultivos de tejidos de camote. Estas técnicas serán muy útiles porque facilitarán la propagación rápida de material de siembra libre de enfermedades, el intercambio de germo-plasma, y el mejoramiento genético de ese cultivo.

Jarret et al. (1984) estimularon la embriogénesis somática partiendo de puntas de brotes cultivados, en numerosos cultivares introducidos de camote. Las yemas terminales y axilares se cultivaron en un medio basal MS modificado que se suplementó con 0.1 a 3.0 mg/litro de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En presencia del 2,4-D fue evidente la aparición de varios tipos de callo morfológicamente diferentes, varias semanas después de iniciado el cultivo. El color del callo embriogénico iba del blanco al amarillo pálido, y su superficie era compacta y lisa. Los embriones somáticos podían detectarse a simple vista a las 3 ó 4 semanas del comienzo del cultivo. Las auxinas inhibieron el desarrollo del embrión más allá de la etapa corazón-torpedo, y sólo se recuperaron plantas enteras después de trasferir los 'embrioides' individuales, o conglomerados de callo embriogénico, al medio basal carente de hormonas. La concentración de auxinas, el genotipo de la planta de origen, y la posición original del explante afectan, antes del inicio del cultivo, la ocurrencia de la embriogénesis. Los explantes tomados de las porciones apicales del brote responden mejor.

Liu y Cantliffe (1984) cultivaron explantes de hoja, de ápice meristemático, de tallo y de raíz de camote, en un medio MS modificado que contenía 6% de sacarosa y 0.5 a 4.0 mg/litro de 2,4-D. En presencia de 2,4-D todos los tejidos produjeron fácilmente callo; más tarde se logró producir callo embriogénico. Las superficies abaxiales —no las adaxiales ni las cortadas— de los explantes foliares y de los ápices formaron un callo embriogénico en MS suplementado con 0.5-2.0 mg/litro de 2,4-D; este mismo callo se inició a lo largo de las superficies cortadas de los explantes de tallo y de raíz, cuando éstos se cultivaron en MS más 1.0 mg/litro de 2,4-D. El subcultivo del callo en MS suplementado con 2.0 mg/litro de 2,4-D, 2.0 mg/litro de cinetina, y 20% (v/v) de agua de coco desproteínizada sirvió de soporte para una continua proliferación celular y para la producción de

embriones somáticos durante un período superior a nueve meses. Se observó que la gemación secundaria, en los embriones somáticos en desarrollo, ocurría en la superficie de los cotiledones y de los hipocótilos. Como se informó anteriormente (Jarret et al., 1984), el desarrollo del embrión en presencia del 2,4-D no pasó de la etapa acorazonada. La maduración del embrión y la germinación ocurrieron al hacer la transferencia al medio basal libre de auxinas. Las plántulas establecidas crecieron rápidamente después de su transferencia al suelo, y fueron fenotípicamente similares a la planta progenitora.

En un estudio más reciente, Templeton-Somers y Collins (1986) analizaron la heredabilidad de la regeneración de plantas en el cultivo de tejidos de camote. Una población de polinización libre, formada por 12 líneas parentales y 12 progenitores, se seleccionó según dos características: el crecimiento del callo *in vitro* y la regeneración. Los cultivos de callo se iniciaron a partir de explantes tomados tanto del pecíolo de hojas jóvenes como de pequeñas puntas de brote, y se siguieron los procedimientos descritos por Jarret et al. (1984) y por Seghal (1975). De este modo se obtuvieron los cultivos organogénicos y embriogénicos. Los efectos genotípicos estaban altamente correlacionados con las tasas de crecimiento del callo, con su textura y con su color después de dos subcultivos sucesivos. La tasa de crecimiento del callo, en los subcultivos segundo y tercero, siempre se halló correlacionada negativamente con una posterior regeneración de la raíz o del brote originados de ese callo. Las características del crecimiento temprano del callo no estaban correlacionadas con la aparición posterior de la embriogénesis o de la organogénesis.

Aislamiento y cultivo de protoplastos y de células del mesófilo

Actualmente la información disponible sobre los procedimientos para aislar y cultivar protoplastos partiendo de tejidos de camote es escasa. Sin embargo, a medida que surjan técnicas estándar para la transferencia de genes, será cada vez más importante desarrollar técnicas para la regeneración de plantas a partir de células y protoplastos aislados.

Wu y Ma (1979) aislaron protoplastos de células de callo provenientes del tallo del camote que habían sido incubadas en una formulación de sales basales complementada con 2% de celulasa, 20 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 0.8 M de manitol. Después de cinco horas ocurrió la liberación de los protoplastos. Luego se sembraron los protoplastos cuya concentración fluctuaba entre 1×10^5 y 2×10^5 protoplastos/ml, en un medio MS semisólido modificado y complementado con 0.3 mg/litro de ANA,

0.1 mg/litro de 2,4-D, 0.1 mg/litro de cinetina, y de 4 a 5% de agua de coco; el resultado fue una rápida regeneración de la pared celular. Se obtuvo también la división celular y la formación (de la colonia) de callo. No se observó la formación de órganos.

La división celular de los protoplastos de camote recién aislados se pudo alcanzar gracias a una modificación de la técnica de capa celular-‘reservorio’ (Bidney y Shepard, 1980). Los protoplastos se habían aislado de secciones del pecíolo partidas longitudinalmente y se sometieron a un tratamiento con una solución que contenía 0.2% de macerozima R-10, 0.4% de celulasa (Onozuka R-10), 1/4 de elementos mayores de MS (excepto NH_4NO_3), sacarosa 0.3 M, 10 mg/litro de hidrolisado de caseína (HC), y ácido sulfónico 2-N-morfolinoetano (MES) 5 mM, durante 4 horas a 28 °C, en un agitador rotatorio a 45 rpm. Los protoplastos liberados se recogieron en botellas de Babcock. Los cuadrantes opuestos (I y III) de la caja Petri recibieron el medio del reservorio; éste se componía de sales basales MS complementadas con vitaminas, HC, D-manitol, y sacarosa 15 mM, y solidificadas con agar al 0.5%. A los cuadrantes II y IV se trasladaron, mediante una pipeta, los protoplastos mezclados con un medio de capa celular que consistía en una formulación MS basal suplementada con hidrolisado de caseína, ANA y BAP, y solidificada con agar al 0.4%. Los cultivos se incubaron en un fotoperíodo de 24 horas, bajo una iluminación de 1000 lux a 28 °C. Después de dos semanas, la eficiencia de siembra para los dos cultivares ensayados fue de 60 a 70%; una eficiencia similar se logró sembrando protoplastos en densidades de 2×10^3 , 5×10^3 , y 10×10^3 protoplastos/ml.

Aunque en el sistema de capa celular-reservorio la eficiencia de siembra fue mayor, los protoplastos sembrados en un medio de capa celular lograron también la división celular y la formación de colonias, aunque más lentamente y con menor eficiencia de siembra. Dos factores importantes aumentaron la división celular y la formación de colonias: los bajos niveles de auxinas en el medio de la capa celular, y la afluencia de manitol desde el medio del reservorio. Los altos niveles de sacarosa favorecieron el comienzo de la división celular; sin embargo, la reducción gradual de la sacarosa fue útil para el desarrollo de la colonia. Las colonias derivadas de protoplastos se trasladaron exitosamente al medio libre de auxinas para obtener mayor proliferación del callo. Aunque se observó la formación ocasional de raíces, no se formó el brote ni el embriode.

Según este mismo informe, se aislaron enzimáticamente células de mesófilo foliar de los cultivares Jewel y Centennial. Se colocaron bandas de tejido foliar en una solución de 2% de sucrosa, 2% de macerozima

(Yakult Biochem), 0.5% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP-10), y se incubaron a 28 °C en un agitador rotatorio (100 rpm). Las células liberadas se recolectaron después de 5 horas, se centrifugaron a 150g, se resuspendieron de nuevo en una solución que contenía 2% de sacarosa y 50% de sales MS (excepto NH_4NO_3), se centrifugaron nuevamente, y se resuspendieron en una concentración de 10^6 células/ml. Los protoplastos de estas células no se aislaron con éxito.

Las mayores eficiencias de siembra se obtuvieron siguiendo la técnica celular de capa-reservorio, como se hizo con los protoplastos. El medio de la capa celular contenía las sales MS estándar, menos el NH_4NO_3 , y además los siguientes compuestos (en mg/litro): ribósido de cinetina (0.5), 2,4-D (1.0), HC (50), D-biotina (0.5), ácido fólico (5.0), glicina (2.0), tiamina-HCl (0.5), e i-inositol (100). Los cultivos se incubaron a 28 °C, con un fotoperíodo de 16 horas y bajo una iluminación de 2000 lux.

La división de las células de mesófilo ocurrió, generalmente, 14 días después de sembradas, y las divisiones posteriores dieron como resultado la formación de una colonia (día 20). Las eficiencias de siembra fluctuaron entre 30 y 35% a una densidad celular de 1 a 5×10^4 células/ml. La división celular dependió sobremanera de la intensidad inicial de la luz después de la siembra y de la temperatura de incubación del cultivo.

Eilers et al. (1986) aislaron protoplastos de tallo de plantas de camote cultivadas en el invernadero. Los protoplastos aislados se cultivaron en un medio basal complementado con diversas concentraciones de BAP, ANA, espermidina, espermina y putrecina. Seis días después se hizo un análisis estadístico para detectar, de una parte, interacciones entre esos componentes del medio y, de otra, la función de estas interacciones en la eficiencia de siembra del protoplasto. Se hallaron interacciones significativas entre ANA y BAP, ANA y putrecina, y putrecina y espermina. La espermidina no tuvo ningún efecto significativo en la eficiencia de siembra, en el rango de concentraciones ensayadas.

Organogénesis

Gunckel et al. (1972), en un esfuerzo por estimular la formación de órganos a partir de tejidos cultivados de camote, cultivaron pequeños cilindros de tejido radical de almacenamiento en la solución salina de White (1963) complementada con varios compuestos orgánicos, y los incubaron a 25 °C, en un fotoperíodo de 12 horas con luz de baja intensidad. En ausencia de aditivos, los explantes presentaron una leve formación de callo y sufrieron senescencia. Entre las auxinas ensayadas (ANA, AIA y

2,4-D), el AIA fue el más eficaz como promotor de la formación de raíces adventicias y de callo. La producción de callo, partiendo de los explantes de raíces de almacenamiento, dependía del suplemento orgánico, del cultivar, de la orientación del explante, y de los efectos de la polaridad tisular. El callo proveniente de los explantes del cultivar Centennial fue óptimo cuando se utilizó un medio basal complementado con AIA y 2,4-D. El ANA fue menos efectivo que el AIA en la estimulación de las raíces; otros suplementos orgánicos, como el sulfato de adenina y el GA₃, utilizados ya sea en forma individual o combinados, estimularon la formación de raíces. En términos generales, la formación de raíces adventicias estaba correlacionada positivamente con el crecimiento del callo.

Fue evidente el efecto de polaridad. Los cilindros del cultivar Centennial produjeron raíces abundantes sólo cuando se cultivaron en posición horizontal sobre el medio de cultivo. Se ha indicado que los efectos de polaridad pueden ser ocasionados por los gradientes de auxina/citocinina que se desarrollan dentro de la raíz de almacenamiento; tales efectos eran reversibles manipulando las concentraciones de la auxina y de la citocinina en el medio de cultivo. Los brotes se formaron de explantes de dos de los tres cultivares que se examinaron. Yellow Jersey produjo brotes en el medio basal complementado con agua de coco, sulfato de adenina, cinetina, GA₃, y AIA. Los explantes de Centennial produjeron brotes adventicios en el medio básico suplementado con cinetina, GA₃, AIA, 2,4-D y agua de coco o sulfato de adenina.

Yamaguchi y Nakajima (1974) investigaron la regulación hormonal en la formación de órganos, partiendo de discos de tejido radical de almacenamiento. Los explantes se cultivaron en un medio basal que contenía sales de White (White, 1963), 0.5% (p/v) de extracto de levadura y 5% de sacarosa. El medio básico complementado con ANA estimuló la formación de raíces abundantes; sin embargo, la eficiencia de esta auxina dependía del tiempo de poscosecha de la raíz de almacenamiento de la que provenía el explante: si el tejido era de mayor edad, los explantes producían mayor cantidad de raíces adventicias en comparación con explantes de raíces de almacenamiento recién cosechadas. Esta respuesta podía invertirse al añadir cinetina al medio de cultivo. Los investigadores sugirieron que los niveles endógenos de auxina y citocinina en la raíz de almacenamiento eran un factor importante en la respuesta obtenida *in vitro*. En varios cultivares, la formación de brotes adventicios era estimulada en un medio basal que contenía 2,4-D pero carecía de zeatina. El ácido abscísico (ABA), cuya actividad en la formación de brotes en los cultivos de tejido de camote ha sido demostrada por Yamaguchi y Nakajima (1972), se añadió luego al medio que, junto con el 2,4-D, estimuló aún más la formación de

brotos en explantes de raíces de almacenamiento de mayor edad. Se ha sugerido que este efecto es causado por los altos niveles de citocinina endógena de las raíces mayores, los cuales inhiben la formación de yemas o brotes a menos que se contrarresten con ABA.

En 1975, Seghal informó sobre la inducción de yemas adventicias en los explantes foliares cultivados. Se cultivaron hojas inmaduras de 1 cm de longitud en medio basal MS modificado y suplementado con varios compuestos orgánicos. Ocurrió un rápido crecimiento del callo en el medio basal suplementado con 0.5 mg/litro de 2,4-D y 0.1 mg/litro de cinetina. En este medio no se formaron órganos. Sin embargo, al trasladar este callo al medio MS suplementado con 1.0 mg/litro de AIA, la formación de raíces fue rápida y abundante. En cambio, el callo que se transfirió al medio MS suplementado con 10 a 20 mg/litro de sulfato de adenina, produjo tanto raíces como brotes después de cuatro semanas. Posteriormente, de estas yemas adventicias se regeneraron plantas enteras.

Antoni y Folquer (1975) cultivaron secciones de raíz de almacenamiento del camote que contenían partes del tejido cambial, en un medio MS suplementado con 3 mg/litro de 2,4-D y 10% de agua de coco; ocho días después fue evidente la formación de callo en estos explantes. Una proliferación adicional de callo ocurrió en este medio, pero tres meses más tarde los explantes se trasladaron al medio MS con agua de coco pero sin 2,4-D, o a las sales minerales de White (White, 1963) que contenían 0.5 mg/litro de ABA. No se logró la formación de órganos.

Hwang et al. (1983) cultivaron diferentes tejidos de camote, incluyendo puntas de brotes, yemas axilares, trozos de hoja, secciones de pecíolo, y discos del tejido radical de almacenamiento, en el medio MS modificado que contenía 0.1 mg/litro de AIA y 2.0 mg/litro de BA. En este medio, los ápices y las yemas axilares se desarrollaron luego como plántulas. El desarrollo del callo se observó solamente en los explantes foliares; se formaron raíces y brotes en los explantes de pecíolo. En los explantes de raíces de almacenamiento se formó el callo y se desarrollaron yemas de brotes adventicios, algunas de las cuales continuaron desarrollándose hasta convertirse en plántulas establecidas. La respuesta de los explantes de raíz de almacenamiento dependía del genotipo y de la posición original del explante en la raíz. Los explantes provenientes de las regiones proximales de la raíz de almacenamiento producían abundantes yemas mientras que aquéllos de las regiones distales de la misma raíz emitían raíces abundantes. Además, los explantes de las raíces recién cosechadas respondieron más que aquéllos de las raíces que habían estado almacenadas

durante algunos meses. Aunque se observaron numerosas yemas adventicias, sólo un pequeño porcentaje de ellas (4%) se desarrolló para producir brotes.

Carswell y Locy (1984) cultivaron explantes de tallo, de hoja y de raíz de almacenamiento del cultivar de camote Jewel, en un medio modificado MS que se suplementó con ANA (0.1-10.0 mg/litro) y BA (0.1-10.0 mg/litro) agregados independientemente o en combinaciones factoriales. La formación de callo a partir de explantes de hoja o de tallo fue más marcada en un medio que contenía 1 mg/litro de ANA y 10 mg/litro de AIA. La elevada proporción auxina/citocinina favoreció la formación de raíces a partir de este callo. La regeneración del brote resultó afectada tanto por el régimen hormonal del medio de cultivo como por la edad del cultivo. Treinta días después, sólo los explantes que se cultivaron en el medio basal suplementado con 1 mg/litro de ANA y con 0.1 mg/litro de BA emitieron raíces adventicias. Sin embargo, 70 días más tarde se formaron brotes en diversos medios caracterizados por múltiples relaciones auxina/citocinina en diferentes concentraciones. Los brotes formados a partir de las raíces adventicias procedían generalmente de los puntos de origen de las raíces laterales. Se formaron raíces en todos los explantes en presencia y en ausencia de luz; las yemas de brotes, en cambio, no se formaron en la oscuridad. La capacidad de formación de brotes procedentes de las raíces adventicias disminuyó al separarlos del explante primario.

Cultivo de anteras

Tsai y Lin (1973a) fueron los primeros en informar sobre las tentativas de regeneración de plantas de camote mediante la androgénesis. Anteras que contenían granos de polen en una etapa indeterminada de desarrollo se inocularon en el medio de Blayde (1966) complementado con 2 mg/litro de 2,4-D y de cinetina. En este medio las anteras produjeron un callo abundante de un color similar al de la raíz de almacenamiento del cultivar de donde se habían obtenido las anteras. El porcentaje de anteras que formaban callo dependía en gran parte del genotipo. La proliferación continua del callo se logró transfiriendo las anteras al medio de Blayde (1966) que contenía 2 mg/litro de 2,4-D y de AIA. El agua de coco y el 2,4-D actuaron sinérgicamente para estimular el crecimiento del callo. No se informó sobre formación de órganos.

Tsai y Lin (1973b), en un artículo análogo al anterior, definieron mejor los componentes del medio que estimula la rápida proliferación del callo derivado de las anteras del camote. El estudio demostró que la sacarosa, en

una concentración óptima de 4 a 5%, tenía un efecto altamente significativo en el crecimiento del callo. Los períodos de cultivo mayores de 30 días causaron un cambio en el pH del medio; éste, sin embargo, mantenido en un rango de 5 a 7, no tuvo efectos significativos en el crecimiento del callo. Otras condiciones ambientales, como la temperatura de 30 °C y la oscuridad, estimularon también el crecimiento del callo.

Kobayashi y Shikata (1975) cultivaron granos de polen uninucleados en varias formulaciones de sales suplementadas con diversos reguladores de crecimiento y vitaminas. En todos los medios basales que contenían de 1 a 2 mg/litro de 2,4-D y 2 mg/litro de cinetina se estimuló la formación de callo. En algunos casos se observó la formación inicial de raíces en el callo. El callo continuó proliferando cuando se subcultivó en el medio MS que contenía 2 mg/litro de AIA y 2 mg/litro de cinetina. La diferenciación de las raíces en el callo subcultivado fue inducida por la transferencia del callo al medio de White x 1/2 (White, 1963) que contenía 1 mg/litro de cinetina y 4 mg/litro de extracto de levadura. Los cultivos se conservaron a 1500 lux, a 25 °C, en un fotoperíodo de 12 horas. En este medio, las raíces adventicias se alargaron con facilidad. La diferenciación de la yema del brote, partiendo de estas raíces, se estimuló cuando éstas se cultivaron en un medio basal que contenía niveles elevados de sacarosa (4-12%), y de ABA (0.1-1.0 mg/litro) o cinetina (0.1-1.0 mg/litro). El conteo cromosómico de las células madre del polen de las plantas regeneradas fue $n = 45$.

Seghal (1978) informó sobre la regeneración de plántulas a partir del cultivo de anteras del camote, pero no especificó el cultivar. Las anteras en diferentes etapas de desarrollo (desde la célula uninucleada hasta el polen de dos células) se sembraron en un medio MS suplementado con varias auxinas y citocininas, individualmente o en combinación. No todos los tratamientos tuvieron efecto en la estimulación directa de la androgénesis. Sin embargo, se formó abundante callo de la pared de la antera y de los tejidos conectivos cuando éstos se sembraron en un medio MS suplementado con 1 mg/litro de 2,4-D, 1 mg/litro de zeatina o de cinetina, y 1 mg/litro de AIA. El callo que se obtuvo de las anteras cultivadas en el medio MS con 10 a 20 mg/litro de sulfato de adenina y 1 mg/litro de 2,4-D fue de apariencia nodular, y presentó diferenciación en estructuras 'similares al brote' cuando se trasladó al medio basal MS carente de hormonas. No se recuperaron plantas enteras.

Tsai y Tseng (1979) cultivaron anteras que contenían polen en la etapa uninucleada de desarrollo, en los medios MS y de Blayde (Blayde, 1966) suplementados con varios reguladores del crecimiento. El medio MS fue superior al de Blayde en cuanto a su capacidad para promover la formación de callo. El medio MS suplementado con 2 mg/litro de 2,4-D, con

AIA y con cinetina fue la combinación más efectiva para lograr la formación del callo, según la respuesta obtenida de anteras de cinco cultivares de camote. El subcultivo de este callo en el medio MS suplementado con diversas combinaciones de ABA (0.1-1.0 mg/litro), fomentó la formación de embrioides. La eficacia del ABA en promover la formación de embrioides dependía del genotipo de la antera. La formación de raíces, en cambio, ocurrió en una amplia gama de formulaciones de medios y de cultivares. Los embrioides germinaron cuando se transfirieron al medio MS suplementado con AIA y cinetina, y de ellos se recuperaron más tarde plantas enteras. No se indicó el conteo cromosómico de las plantas regeneradas.

Estudios con suspensiones celulares

Además de los estudios anteriores, que han hecho hincapié en la morfogénesis, varios investigadores han utilizado suspensiones celulares de camote, o de especies relacionadas, para examinar diversos fenómenos como la síntesis enzimática, la producción de metabolitos secundarios, y la nutrición mineral de la célula individual. Aunque estos estudios no están directamente relacionados con el mejoramiento de cultivos, han ayudado a definir las condiciones para el cultivo continuo de las células de camote.

Yoshida et al. (1970) investigaron la captación de K, Ca y Mg en las suspensiones celulares de camote. El callo se inició en un medio MS modificado que se suplementó con 2,4-D y extracto de levadura. El calcio estimuló la captación de K en las células de tabaco pero no en las de camote; en éstas la captación de potasio fue mayor que la de Ca o Mg. En síntesis, el orden de afinidad para la captación de cationes era $K > Mg > Ca$.

Sasaki et al. (1972) compararon los perfiles isoenzimáticos del tejido radical de almacenamiento del camote con los del callo cultivado en agar y con aquéllos de las suspensiones celulares líquidas. Los cultivos de callo se iniciaron en el medio de White (1963) que contenía 2,4-D; las suspensiones líquidas y los cultivos posteriores de callo se iniciaron a partir de ese primer callo y se mantuvieron en el medio PRL-4 de Gamborg modificado mediante la adición de 0.2% de casaminoácidos en lugar de aminas. Las isoenzimas de la fosfoglucoisomerasa (PGI) se separaron en una columna de celulosa DEAE. En el tejido radical de almacenamiento se identificaron tres formas de PGI: I, II, y III. En las células cultivadas en líquido faltaban las isoenzimas II y III, mientras las cultivadas en agar poseían las isoenzimas II y III pero no la I. Cantidades equivalentes de actividad (por mg de proteína) se recuperaron de todas las muestras.

Veliky et al. (1976) informaron que se requería menos de 0.3 mM de Mg para sostener el crecimiento óptimo de una suspensión celular de *Ipomoea*

sp. (batatilla), en presencia de 2% de sacarosa. La captación de Mg por las células aumentó al incrementar el Mg y el pH en el medio de cultivo. El exceso de Mg se podía extraer fácilmente triturando las células en agua destilada; esto indica que dichas células captan una cantidad de Mg mayor de la requerida para su crecimiento.

Zink y Veliky (1977) examinaron la asimilación de nitrógeno y la regulación de la actividad de las enzimas nitritoreductasa y nitrato-reductasa en las células cultivadas de la batatilla. Las células de *Ipomoea* sp. prefirieron el amonio como fuente de N durante las primeras etapas del ciclo de crecimiento; y posteriormente asimilaron el ion nitrato independientemente de la presencia o ausencia del amonio. Las enzimas necesarias para asimilar el nitrato fueron inducidas por el mismo nitrato. La adición de amonio a las células preinducidas para la actividad de la reductasa no causó una supresión de la síntesis enzimática; en cambio, cuando se añadió nitrato a las células que asimilaban amonio, el resultado fue un bajo nivel de inducción enzimática de ambas reductasas. Cuando el nitrato y el amonio se hallaban presentes inicialmente en el medio, el amonio se utilizó rápidamente. Sin embargo, no ocurrió una inducción de las reductasas durante las 24 horas en que fue baja la asimilación del nitrato. Después de la inducción, la actividad de la reductasa aumentó rápidamente hasta alcanzar niveles más altos que los de las células cultivadas continuamente en presencia del nitrato. En estos cultivos celulares el amonio produce efectos similares a la represión en la actividad de la reductasa.

Zink (1980) examinó los efectos del GA_3 en la formación de fosfatasa, en dos líneas celulares de *Ipomoea* sp. en las cuales, efectivamente, el GA_3 alteraba diferencialmente la actividad de esas enzimas. El pH del medio de cultivo y la adición de fosfato inorgánico reprimían la actividad de la fosfatasa, según se había demostrado anteriormente (Zink y Veliky, 1979). El GA_3 reprimió la actividad de la fosfatasa después de un período inicial de crecimiento celular de tres días. Los efectos de represión del GA_3 y del fosfato inorgánico fueron aditivos. En la segunda línea celular, los niveles de la actividad enzimática en las fracciones solubles y particuladas aumentaron en presencia del GA_3 durante las primeras etapas de crecimiento celular, y luego declinaron. Parece que el GA_3 disminuye la secreción o lixiviación de las fosfatasa en el medio de cultivo.

Oba y Uritani (1979) cultivaron tejido radical de camote en un medio semisólido que contenía sales minerales de Heller (Heller, 1953), vitaminas, 2,4-D, extracto de levadura, y sacarosa; luego hicieron una monitoría de la secreción de furano-terpenos en ese medio de cultivo. No detectaron en él producción de estos compuestos. Sin embargo, al colocar este callo en

un cultivo de suspensión líquida, ocurrió una rápida producción de furano-terpenos; la presencia del extracto de levadura y de la sacarosa fue esencial para la producción de estos compuestos. Los patrones de TLC (cromatografía en capa fina) de los furano-terpenos producidos por las suspensiones celulares fueron en esencia los mismos, cualitativamente, que los producidos por los extractos del tejido radical de almacenamiento del camote.

Nakamura et al. (1981) examinaron los efectos que los productos de degradación del ácido deshidroascórbico (DHA) ejercían en la inhibición del crecimiento de las suspensiones celulares del camote. Los cultivos de callo se iniciaron y se mantuvieron en un medio semisólido MS complementado con 2,4-D y cinetina; en este medio, los valores del peso seco celular aumentaron cinco veces en 21 días. Cuando los cultivos se inocularon con una solución de DHA, incubada a 30 °C durante 10 días, se inhibió su crecimiento; cuando se inocularon con una solución fresca de DHA, no se registró efecto alguno en su crecimiento. El ácido 2,3-dicetogulónico (DKG) también inhibió el crecimiento celular; no obstante, una solución de DKG, almacenada durante tres días a 30 °C, no produjo tal inhibición. Los autores concluyen que los productos de degradación del DHA inhiben el crecimiento celular y que el grado de inhibición es diferente según la especie tratada.

Investigaciones Futuras

Las técnicas para eliminar virus en el camote se aplican actualmente en varios centros de investigación internacionales y nacionales. La principal limitación de estas técnicas es la dificultad para evaluar con precisión la presencia de los virus más conocidos del camote y la falta de conocimiento sobre esos mismos virus. El desarrollo de un programa internacional para caracterizar los virus del camote facilitaría su identificación y, en consecuencia, la distribución y el intercambio de germoplasma del camote. El perfeccionamiento de las técnicas con ácidos nucleicos (Owens y Diener, 1981) junto con los ensayos inmunológicos con anticuerpos monoclonales deberían ayudar en la identificación de los virus y fomentar la investigación adicional sobre nuevos métodos para eliminarlos. Al respecto, parece que vale la pena investigar la utilización de compuestos antivirales *in vitro*.

La capacidad de estimular la embriogénesis somática en los tejidos del camote abre nuevas áreas a la investigación. Por ejemplo, los embriones somáticos pueden encapsularse y sembrarse como semilla (Kitto y Janick, 1985) asegurando así la obtención de colecciones uniformes y libres de

virus. También se pueden emplear los embriones somáticos, deshidratados o criopreservados, para la conservación de germoplasma. Las suspensiones celulares embriogénicas ofrecerían una herramienta muy útil para el estudio *in vitro* de las técnicas de selección que intentan lograr la resistencia al estrés ambiental y a las enfermedades en las plantas.

El desarrollo de protocolos para la regeneración de plantas enteras a partir de protoplastos aislados suministrará una valiosa herramienta para aquéllos que trabajan en el mejoramiento de cultivos. La microinyección y las transformaciones obtenidas por intermedio de *Agrobacterium* se utilizan hoy exitosamente en varios cultivos agronómicos y podrían emplearse en el mejoramiento del camote.

El mejoramiento genético *in vitro* del camote puede lograrse también como resultado de una variación genética, natural o inducida, que se haya desencadenado durante el proceso del cultivo de tejidos. Las mutaciones somáticas ocurridas en ese proceso también han desempeñado un papel significativo en el desarrollo de variedades de camote (Hernández et al., 1956). La regeneración de las plántulas por medio de la organogénesis puede producir una proporción importante de tipos anormales de los cuales pueden seleccionarse luego aquellos que presenten características deseables. Los variantes somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981) se buscan entre las diferentes especies cultivadas que se hayan regenerado a partir del cultivo de tejidos. Una característica deseable de estos variantes es que, generalmente, los cambios en el genoma son pequeños (Brettell et al., 1986).

Respecto al desarrollo de las técnicas *in vitro* para la regeneración de plantas a partir de células aisladas y de tejidos, el camote se encuentra muy atrasado en comparación con cultivos menos importantes. Se espera que esta situación cambie en un futuro cercano. Todavía queda mucho por hacer y las posibilidades expresadas anteriormente son sólo unas pocas de las muchas que existen.

Protocolos para el Cultivo de Tejidos de Camote

En esta sección se describen los procedimientos experimentales siguientes: a) el aislamiento de meristemas, la regeneración y la propagación de plántulas (Love et al., 1986; Carswell y Locy, 1984); b) la organogénesis partiendo de raíces formadas de novo (Jarret et al., 1984); y c) la embriogénesis somática partiendo de explantes vegetativos (Liu y Cantliffe, 1984).