

## **A. Cultivo de meristemas**

- 1) Coseche las puntas de los brotes (1-2 cm de longitud) de las raíces de almacenamiento retoñadas o de los brotes establecidos. Es esencial contar con material limpio para la siembra. Las plantas patrón deberán mantenerse en el invernadero o en la cámara de crecimiento y se someterán periódicamente a medidas de control de plagas.
- 2) Coloque las puntas de brotes cortadas sobre papel filtro humedecido o sobre toallas de papel, para evitar su deshidratación.
- 3) Quite todas las hojas de las puntas a excepción de las más pequeñas (las menores de 1 cm).
- 4) Esterilice superficialmente las puntas de brotes mediante inmersión en una solución que contenga 10% (v/v) de blanqueador comercial (aproximadamente 0.525% de hipoclorito de sodio) y 2 gotas/ 100 ml de Tween-20, durante 10-15 minutos.
- 5) En ambiente aséptico, enjuague las puntas de los brotes tres veces en agua destilada estéril.
- 6) Traslade las puntas de los brotes a una caja Petri forrada con papel filtro humedecido.
- 7) En una campana de flujo laminar o en otro ambiente estéril y adecuado, y con ayuda de un microscopio de disección, recorte las hojas jóvenes restantes doblándolas hacia atrás y alejándolas del tallo. Durante este paso del procedimiento de aislamiento del explante, el ápice del brote se toma con un par de pinzas de punta fina mientras que las hojas se cortan con un bisturí (con cuchilla no. 11).
- 8) Remueva cuidadosamente el primordio foliar así: bordear la cúpula meristemática mientras lo raspa con el lado cortante del bisturí, hasta que sólo quede la cúpula meristemática (0.1 mm de longitud).
- 9) Con un segundo bisturí, reservado para la remoción del meristema, corte hasta la mitad transversalmente por debajo de la cúpula apical. Dé vuelta al tallo y haga un corte similar en el lado opuesto. También da buenos resultados, en la remoción del meristema, un microbisturí que se prepara afianzando un pedazo de cuchilla en un mango delgado de madera.
- 10) Utilizando el bisturí, levante el meristema separándolo de los tejidos subyacentes y colóquelo inmediatamente en el medio de cultivo.

**Medio de cultivo.** La fórmula de sales minerales de Murashige y Skoog (1962) da buenos resultados en cultivos de tejido de camote (Kuo et al., 1985; Love et al., 1986). Por ello los cultivos de meristemas se inician en un medio basal que contenga sales MS y las siguientes sustancias, en mg/litro: tiamina-HCl, 1.0; i-inositol, 100; sacarosa, 70,000; agar, 7000; y que esté suplementado además con ANA (0.03 mg/litro) y BA (0.3 mg/litro). Love et al. recomiendan agregar Na<sub>2</sub>EDTA (37.3 mg/litro) al medio. En vez de colocar los meristemas cortados en un medio semisólido, pueden hacerse flotar directamente en la superficie del medio líquido. Una vez se perciba visualmente el desarrollo del brote, éste se cultiva de nuevo en el medio basal, desprovisto esta vez de hormonas para acelerar el desarrollo de la plántula.

Los cultivos pueden incubarse en diversidad de condiciones ambientales. Las temperaturas de 22 a 34 °C pueden considerarse como los extremos aceptables, con un punto óptimo entre 26 y 28 °C. La iluminación fluorescente (1500 a 6000 lux) es satisfactoria; sin embargo, mayores intensidades de luz estimulan una regeneración más rápida. La iluminación incandescente complementaria puede estimular también el desarrollo de las plántulas, una vez que éste se ha iniciado; no ocurre así en cultivos mantenidos solamente con luz fluorescente. El tiempo que se requiere para la regeneración de una plántula depende del genotipo y puede oscilar de 1 a 4 meses.

Después de la regeneración de la plántula, los cultivos pueden o bien mantenerse, o propagarse mediante la excisión y cultivo individual de los nudos que contengan una yema axilar, en un medio basal semisólido. Normalmente, el desarrollo radical es posterior al desarrollo del brote, en presencia o ausencia de reguladores del crecimiento (Love et al., 1986).

El cultivo de meristemas requiere tiempo. Es esencial por tanto tomar todas las precauciones posibles para evitar la contaminación o la muerte del explante. Los siguientes puntos deberán recibir atención especial (Love et al., 1986):

- Esterilice adecuadamente todos los instrumentos al pasar de un meristema a otro.
- Mantenga el material progenitor tan limpio como sea posible mediante medidas programadas de control de plagas.
- Evite que el meristema sufra daño físico durante el procedimiento de excisión.
- Evite que el explante se deshidrate trasladándolo directamente al medio de cultivo, inmediatamente después de la excisión.

## **B. Organogénesis**

Varias publicaciones presentan protocolos detallados para estimular la formación de órganos adventicios partiendo de explantes cultivados de camote. El siguiente procedimiento se ha tomado de Carswell y Locy (1984) quienes fueron los primeros en estimular la formación de raíces adventicias partiendo de diferentes tipos de explantes, y en observar después la formación de brotes partiendo de esas raíces.

- 1) Coseche las primeras tres hojas totalmente expandidas y los segmentos internodales de tallo, desde el ápice del brote hasta el cuarto internudo. Utilice solamente material vegetal sano.
- 2) Esterilice superficialmente hojas enteras y segmentos de tallo mediante su inmersión en una solución de 1.23% de hipoclorito de sodio (aproximadamente 20% de blanqueador comercial) durante 15 minutos.
- 3) Enjuague todos los tejidos en agua destilada estéril tres veces.
- 4) Prepare los explantes tomando, con un taladro para corcho, discos de tejido foliar (incluyendo las venas) de 6 mm de diámetro, y secciones de segmentos de tallo internodal de 2 a 3 mm de espesor.
- 5) Coloque estos explantes primarios en el medio de cultivo, en tubos o en cajas Petri.
- 6) Cuando se observe la formación de las raíces adventicias, las raíces individuales pueden cortarse y cultivarse de nuevo en un medio de cultivo fresco o dejarse unidas al explante original. Sin embargo, Carswell y Locy (1984) observaron que la capacidad de estas raíces para formar brotes disminuye si se separan del explante primario.
- 7) Los brotes adventicios que se desarrollen de estas raíces pueden cortarse y establecerse en un medio basal carente de hormonas.

**Medio de cultivo.** Los explantes foliares y los de segmentos de tallo se cultivan en un medio basal que contenga sales MS y las siguientes sustancias (en mg/litro): i-inositol (100), ácido nicotínico (0.5), piridoxina-HCl (0.5), glicina (2.0), tiamina-HCl (0.4), sacarosa (30,000), y agar (7000); además, que esté suplementado con ANA (1.0) y BA (0.1). Los cultivos se incuban a 25-30 °C en la oscuridad o con luz débil (1000-3000 lux). Sin embargo, la formación de yemas no ocurre en ausencia de iluminación.

Se observa, generalmente, la formación de raíces adventicias partiendo de estos tejidos a los 30-40 días después de iniciado el cultivo. La formación

de brotes, que ocurren en las puntas de las ramificaciones de la raíces laterales, puede tomar más tiempo (hasta 65 días más). Debe recordarse que una respuesta vigorosa depende del genotipo y de la concentración de hormonas. Se aconseja experimentar con varios cultivares, dentro de un rango de tratamientos hormonales, con el fin de optimizar el medio de cultivo. Carswell y Locy (1984) utilizaron el cultivar Jewel en sus estudios.

### **C. Embriogénesis somática**

Los cultivos de callo embriogénico pueden iniciarse partiendo de diversos explantes de tejidos del camote, como las anteras (Tsai y Tseng, 1979), las puntas de brote (Jarret et al., 1984), y los explantes de raíz y de pecíolo (Liu y Cantliffe, 1984). La propagación del camote en grandes cantidades, mediante la embriogénesis somática, puede facilitar el desarrollo de técnicas mecánicas (Kitto y Janick, 1985) que permitirían la siembra directa de este cultivo a diferencia de la propagación vegetativa convencional. El protocolo que aparece a continuación se ha tomado de Jarret et al. (1984) y de Liu y Cantliffe (1984).

- 1) Empiece los cultivos de las puntas de brote, como se describió en la sección A (**Cultivo de meristemas**), con un explante más grande (2-5 primordios foliares). Incube estos cultivos a 26-28 °C, bajo una iluminación de 1000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas. Dos a cuatro semanas después de la inoculación, las hojas bien expandidas (10-15 mm de longitud) y las puntas de los brotes se cosechan como explantes primarios.

Alternativamente, explantes de puntas de brote y de segmentos de tallo se obtienen de plantas en buen estado fitosanitario que se hayan conservado en el invernadero o en la cámara de crecimiento. Se cosecha tanto la parte de los tallos basales de los ápices de los brotes (10-15 cm de longitud) como las yemas apicales y axilares. Se esterilizan superficialmente con hipoclorito de sodio (0.5%) o con blanqueador comercial al 10% durante 10-15 minutos, y se enjuagan tres veces en agua destilada estéril.

- 2) Corte las hojas perpendicularmente a la nervadura central, en listas de 2 mm de ancho. Deje el margen foliar intacto. Coloque cortes individuales en el medio de inducción del callo, con la superficie adaxial en contacto con el medio.
- 3) Utilice un microscopio de disección para recortar los explantes de las puntas de brote hasta una longitud de 2-3 mm, y trasládelos al medio de inducción del callo.

- 4) Recorte y descarte los extremos de los segmentos internodales de tallo para remover el tejido dañado por el procedimiento de esterilización. Corte el resto en segmentos de 5 mm. Trasládelos al medio de cultivo.
- 5) Cuando sea evidente la formación de embriones globulares y acorazonados, transfiera el callo con los embriones al medio basal desprovisto de hormonas para que continúe su desarrollo y germine.
- 6) Al llegar a su madurez, los embriones individuales pueden retirarse del callo y cultivarse de nuevo en un medio basal fresco para promover su crecimiento adicional.

**Medio de cultivo.** El callo embriogénico se inicia en un medio basal modificado MS que contiene los compuestos inorgánicos MS y los siguientes (en mg/litro): i-inositol (100), tiamina-HCl (0.4), sacarosa (60,000), y agar (7000); está complementado además con 2,4-D (0.5-3.0 mg/litro) y su pH es de 5.8. Los cultivos se incuban a 25-28 °C, en un fotoperíodo de 16 horas y con una iluminación de 1000 lux.

En el período de 2 a 4 semanas después de iniciado el cultivo, dos tipos de callo serán evidentes. El primero es de un color amarillo mate, friable, que no es embriogénico. El segundo tiene un color que va de pálido a amarillo brillante, es muy compacto y liso; este callo producirá embriones somáticos bajo un régimen hormonal apropiado. La iniciación del callo embriogénico es altamente dependiente de la concentración de 2,4-D, del genotipo, y de la fuente del tejido.

El desarrollo del embrión somático cesa en la etapa denominada corazón-torpedo, en presencia de 2,4-D. Por tanto, a medida que los embriones en desarrollo se vuelven evidentes, el callo y los embriones somáticos deberán transferirse al medio basal sin 2,4-D y mantenerse en las mismas condiciones de luz y temperatura establecidas en los cultivos de callo.

## Referencias

- Alconero, R.; Santiago, A. G.; Morales F. y Rodríguez, F. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. *Phytopathology* 65:769-773.
- Antoni, H. J. y Folquer, F. 1975. Cultivo *in vitro* de tejidos de batata *Ipomoea batatas* (L.) Lam. para la producción de nuevos cultivares. *Rev. Agrom. N.O. Argent.* 12:176-178.

- Austin, D. F. 1978. The *Ipomoea batatas* complex; I: Taxonomy. Bull. Torrey Bot. Club. 105:114-129.
- Bidney, D. L. y Shepard, J. F. 1980. Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. Plant Sci. Lett. 18:335-342.
- Blayde, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Plant. 19:748-753.
- Bouwkamp, J. C. (ed.). 1985. Sweet potato products: A natural resource for the tropics. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Brettell, R. I. S.; Dennis, E. S.; Scowcroft, W. R. y Peacock, W. J. 1986. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol. Gen. Genet. 202:235-239.
- Carswell, G. y Locy, R. D. 1984. Root and shoot initiation by leaf, stem and storage root explants of sweet potato. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3:229-236.
- Edmond, J. B. 1971. Sweet potatoes: Production, processing, marketing. En: Bassett, M. J. (ed.). Breeding vegetable crops. AVI Publ., Westport, CT, E.U.
- Eilers, R. J.; Sullivan, J. G.; Skirvin, R. M. y Smith, M. A. L. 1986. Growth regulator and media component interactions in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) protoplast culture. HortScience 21:850. (Resumen.)
- Elliot, R. F. 1969. Growth of excised meristem tips of kumura, *Ipomoea batatas* (L.) Poir., in axenic culture. N. Z. J. Bot. 7:158-166.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1984. FAO production yearbook for 1983. Roma, Italia.
- Gunckel, J. E.; Sharp, W. R.; Williams, B. W.; West, W. C. y Drinkwater, W. O. 1972. Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variation. Bot. Gaz. 133:254-262.
- Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. (Paris) 14:1-223.
- Henderson, J. H. M.; Phillips, B. R. y Wheatley, B. T. 1984. Sweet potato. En: Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 2, p. 303-326.
- Hernández, T. P.; Mikell, J. J.; Hernández, T. y Fontenot, J. F. 1956. Mutations, a means of improving sweet potato varieties. Proc. Assoc. South. Agric. Work. 53:175.
- Hildebrand, E. M. 1957. Freeing sweet potato varieties by propagation with tip cuttings. Phytopathology 47:452. (Resumen.)

- . 1964. Heat treatment for eliminating internal cork viruses from sweet potato plants. *Plant Dis. Rep.* 48:356-358.
- y Brierley, P. 1960. Heat treatment eliminates yellow dwarf virus from sweet potatoes. *Plant Dis. Rep.* 44:707-709.
- Holmes, F. O. 1956. Elimination of foliage spotting from sweet potatoes. *Phytopathology* 46:502-504.
- Hwang, L. S.; Skirvin, R. M.; Casyao, J. y Bouwkamp, J. 1983. Adventitious shoot formation from sections of sweet potato grown in vitro. *Scient. Hortic.* 20:119-129.
- Jarret, R. L.; Salazar, S. y Fernández Z., R. 1984. Somatic embryogenesis in sweet potato. *HortScience* 19:397-398.
- Jones, A. 1965. Cytological observations and fertility measurements of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 86:527-537.
- . 1968. Chromosome numbers in *Ipomoea* and related genera. *J. Hered.* 59:99-102.
- . 1980. Sweet potato. En: Fehr, W. R. y Hadley, H. (eds.). *Hybridization of crop plants*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, E.U. p. 645-653.
- ; Dukes, P. D. y Schalk, J. M. 1986. Sweet potato breeding. En: Bassett, M. J. (ed.). *Breeding vegetable crops*. AVI Publ., Westport, CT, E.U. p. 1-35.
- Kitto, S. L. y Janick, J. 1985. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110:277-282.
- Kobayashi, M. y Shikata, S. 1975. Anther culture and development of plantlets in sweet potato. *Bull. Chugoku Agric. Exp. Stn., Serie A* 24:109-124.
- Kuo, C. G.; Shen, B. J.; Shen, M. J.; Green, S. K. y Lee, D. R. 1985. Virus-free sweet potato storage roots derived from meristem-tip and leaf cuttings. *Sci. Hortic.* 26:231-240.
- Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Liao, C. -H. y Chung, M. -L. 1979. Shoot tip culture and virus indexing in sweet potato. *J. Agric. Res. China.* 28:139-144.
- Litz, R. E. y Conover, R. A. 1978. In vitro propagation of sweet potato. *HortScience* 13:659-660.
- Liu, J. R. y Cantliffe, R. D. 1984. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Reports* 3:112-115.

- Love, S. L.; Rhodes, B. B. y Moyer, J. W. 1986. Meristem culture and virus indexing of sweet potatoes: A manual of techniques. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma.
- Mori, K. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. Jap. Agric. Res. Quart. 6:1-7.
- Moyer, J. W. y Collins, W. W. 1983. 'Scarlet' sweet potato. HortScience 18:111-112.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nakamura, Y.; Ikeda, Y.; Ebihara, N. y Tabuchi, K. 1981. Inhibition of growth of callus cells by degradation products of dehydroascorbic acid. Agric. Biol. Chem. 45:759-760.
- Nielsen, L. W. 1960. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweetpotatoes. Phytopathology 50(11):840-841.
- Nishiyama, I.; Miyazaki, T. y Sakamoto, S. 1975. Evolutionary autopoloidy in the sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] and its progenitors. Euphytica 24:197-208.
- Oba, K. y Uritani, I. 1979. Biosynthesis of furano-terpenes by sweet potato cell cultures. Plant Cell Physiol. 20:819-826.
- Over de Linden, A. J. y Elliot, R. E. 1971. Virus infection in *Ipomoea batatas* and a method for its elimination. N. Z. J. Agr. Res. 14:720-724.
- Owens, R. A. y Diener, T. O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. Science 213:670-672.
- Sasaki, T.; Takodoro, K. y Suzuki, S. 1972. The distribution of glucose phosphate isomerase isoenzymes in sweet potato and its tissue culture. Biochem. J. 129:789-791.
- Seghal, C. B. 1975. Hormonal control of differentiation in leaf cultures of *Ipomoea batatas* Poir. Beitr. Biol. Pflanzen. 51:47-52.
- . 1978. Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir). Z. Pflanzenphysiol. 88:349-352.
- Templeton-Somers, K. M. y Collins, W. W. 1986. Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Theor. Appl. Genet. 71:835-841.
- Tsai, H. S. y Lin, C. I. 1973a. The growth of callus induced from in vitro cultures of sweet potato anther. J. Agr. Assoc. China. 81:12-19.



- y —— . 1973b. Effects of the composition of culture media and cultural conditions on growth of callus of sweet potato anther. J. Agr. Assoc. China. 82:30-41.
- y Tseng, M. -T. 1979. Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot. Bull. Acad. Sin. 20:117-122.
- Veliky, I. A.; Rose, D. y Zink, M. W. 1976. Uptake of magnesium by suspension cultures of plant cells (*Ipomoea* spp.). Can. J. Bot. 55:1143-1147.
- White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. 2nd. ed. Ronald Press, Nueva York. 228 p.
- Wu, Y. W. y Ma, T. P. 1979. Isolation, culture and callus formation from *Ipomoea batatas* protoplasts. Acta Bot. Sin. 21:334-338.
- Yamaguchi, T. y Nakajima, T. 1972. Effect of abscissic acid on adventitious bud formation from cultured tissues of sweet potato. Crop. Sci. Soc. Jpn. Proc. 41:531-532.
- y —— . 1974. Hormonal regulation of organ formation in cultured tissue derived from root tuber of sweet potato. En: Proceedings of the Eighth International Congress on Plant Growth Substances. p. 1121-1127.
- Yoshida, F.; Kawaka, K. y Takaka, K. 1970. Functions of calcium and magnesium on ion absorption by cultured free cells of tobacco and sweet potato. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ. 10:13-27.
- Zink, M. W. 1980. Acid phosphatases of *Ipomoea* sp. cultured in vitro; 2: Influence of gibberellic acid on the formation of phosphatases. Can. J. Bot. 58: 2171-2180.
- y Veliky, I. A. 1977. Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductase in cultured *Ipomoea* cells. Can. J. Bot. 55:1557-1568.
- y —— . 1979. Phosphatases of *Ipomoea* sp. cultured in vitro; 1: Influence of pH and inorganic phosphate on the formation of phosphatases. Can. J. Bot. 57:739-763.