

Evaluación de la dinámica del crecimiento *in vitro* en callos de *Ipomoea batatas*

Evaluation of the dynamics of the growth *in vitro* callus of *Ipomoea batatas*

Orlando S. González Paneque*, Margarita Hernández Espinosa**, Juan J. Silva Pupo***, Ángel Espinosa Reyes****

Resumen

El cultivo del boniato presenta una gran importancia, ya que se puede emplear en la alimentación humana y animal, así como en la industria; el mismo produce raíces reservantes de gran valor calórico y nutritivo con alto contenido de carbohidratos. Entre las raíces y tubérculos cultivados es el segundo en importancia y representa más del 80% de la producción mundial. El empleo de las técnicas *in vitro* constituye una poderosa herramienta en la explotación comercial, propiciando el empleo de la micropropagación en diferentes especies. Para desarrollar el presente trabajo se recolectaron raíces tuberosas pertenecientes al clon Inivit B 93-1. Se procedió a la formación de callos potencialmente embriogénicos, para lo cual se emplearon explantes de limbos foliares, desinfectados con hipoclorito de sodio (1%) y sembrados en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), vitaminas MS (10,0 mg/l⁻¹), mioinositol (100 mg/l⁻¹), sacarosa (3%), gelrite (0,2%), 2,4-D (0,25-2,5 mg/l⁻¹) y 6-BAP (0,25-1,0 mg/l⁻¹), el pH fue ajustado a 5,8 ± 0,01 mantenidos en la oscuridad durante treinta días, lográndose los mejores resultados con el uso del 2,4-D (0,50 mg/l⁻¹) y 6-BAP (0,25 mg/l⁻¹), y en los mismos se evaluó la dinámica del crecimiento y se lograron los mejores resultados entre los 28 y 32 días después de la siembra, para lo cual los resultados obtenidos servirán de base a otros estudios y permitirán evaluar, controlar y desarrollar estrategias para la conservación y el uso de los recursos naturales, dando cumplimiento al objetivo referente a estudiar la dinámica del crecimiento en la formación de callos potencialmente embriogénicos en el cultivo del boniato.

Palabras clave: boniato, cultivo *in vitro*, reguladores del crecimiento.

Abstract

The cultivation of the sweet potato presents a great importance, since you can use in the human feeding, animal as well as in the industry, the same one produces roots reservantes of great caloric and nutritious value with high content of carbohydrates. Between the roots and cultivated tubers it is the second in importance and it represents more than 80% of the world production. The employment of the techniques *in vitro* constitutes a powerful tool in the commercial, propitiated exploitation the employment of the micropropagación in different species. It is for it that you/they were gathered to develop the present work tuberous roots of the clon INIVIT B 93-1. Was realized the formation of callus with embryogenic structures, explantes of leaves were used, disinfected with hipoclorito de sodio (1%) and inoculated in the tissue culture medium proposed by Murashige and Skoog (1962), vitamins MS (10.0 mg/l⁻¹), myoinositol (100 mg/l⁻¹), sucrose (3%), gelyrite (0.2%), 2,4-D (0.25-2.5 mg/l⁻¹) and 6-BAP (0.25-1.0 mg/l⁻¹), the pH was adjusted 5.8 ± 0.01 maintained in the darkness during thirty days, being achieved the best results with the use of the 2,4-D (0.50 mg/l⁻¹) and 6-BAP (0,25 mg/l⁻¹) and was evaluated the

* Doctor en Ciencias Agrícolas. Profesor Titular, Universidad de Granma, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Granma, Cuba. ogonzalezp@udg.co.cu

** Doctora en Ciencias Agrícolas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.

*** Doctor en Ciencias Agrícolas. Profesor Titular, Universidad de Granma, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Granma, Cuba.

**** Magíster en Ciencias Agrícolas. Profesor Auxiliar, Universidad de Granma, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Granma, Cuba.

grow dynamic and obtained the better resulted between 28 and 32 days after culture, for that which the obtained results will serve from base to other studies and they will allow to evaluate, to control and to develop strategies for the conservation and use of the natural resources, giving execution to the objective with respect to studying the dynamics of the growth potentially in the formation of tripes embriogénicos in the cultivation of the sweet potato.

Key words: Sweet potato, cultivate *in vitro*, regulating of the growth.

Recibido: enero 4 de 2010

Aprobado: mayo 31 de 2011

Introducción

El boniato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) es de alto consumo, siendo uno de los cinco cultivos alimenticios más importantes del mundo y se adapta a diferentes condiciones edafoclimáticas, de ciclo corto, y permite varias cosechas al año (Estuardo, 2008). Según Arencibia y Cornide (1999), la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* abren una amplia perspectiva para su empleo en la micropropagación de especies vegetales y en especial para el cultivo del boniato. En trabajos realizados por López *et al.* (2002), plantearon que la importancia del mismo está dada por su hábito de consumo y ciclo vegetativo corto, lo cual permite la multiplicación rápida en un período breve de tiempo.

Los avances biotecnológicos marcan nuevas pautas en las investigaciones y en la búsqueda de nuevas vías de propagación acelerada de diversos cultivos; además, constituyen una herramienta más de la cual es posible obtener mayor provecho, partiendo de la obtención de callos potencialmente embriogénicos. Por otro lado, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales sirven para identificar las especies, posibilitando la conservación y multiplicación de la biodiversidad vegetal (Alvarado, 1998).

Los callos (caracterizados por el crecimiento celular), de acuerdo con sus características morfológicas y citológicas, pueden ser empleados para buscar diferencias en los patrones de expresión en la formación de embriones somáticos, como una vía de multiplicación acelerada de las especies vegetales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en la evaluación de los callos y su comportamiento, servirán de base a otros estudios, permitiendo evaluar, controlar y desarrollar estrategias para la conservación y el uso de los recursos naturales, posibilitando lograr avances en la preservación integral de los mismos.

Es por ello que el objetivo planteado en el presente trabajo fue estudiar la dinámica del crecimiento de callos potencialmente embriogénicos de *Ipomoea batatas*.

Materiales y métodos

El trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, y el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (Cebveg), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma.

Para la obtención de los callos se recolectaron raíces tuberosas correspondientes al clon Inivit B 93-1, trasladadas al laboratorio y colocadas en frascos con agua. A los 25 días de emitidos los brotes se procedió al corte de los explantes de limbos foliares, sembrados en el medio compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962), mioinositol (100 mg/L^{-1}), vitaminas MS ($10,0 \text{ ml/L}^{-1}$), sacarosa (3,0%) y gelrite (0,2%). Al medio de cultivo se le añadió ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) a $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$ y 6-bencilaminopurina (6-BAP) a $0,50 \text{ mg/L}^{-1}$, según Cantliffe (1993). El pH del medio de cultivo fue ajustado a $5,8 \pm 0,01$ e incubados en la oscuridad permanente.

Estudio del limbo foliar en la formación de callos potencialmente embriogénicos

Se colocaron explantes pertenecientes a la zona basal del limbo foliar en frascos con 20 ml de medio de cultivo con diferentes combinaciones de 2,4-D (0,25; 0,50; 1,0; 2,0 y $2,5 \text{ mg/L}^{-1}$) y 6-BAP (0,25; 0,50 y $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$), descritas por Jarret (1989) y Cantliffe (1993).

A los 30 días se evaluó el porcentaje de formación de callos de grado 3 según la escala propuesta por Santana (1982), y el porcentaje de callos potencialmente embriogénicos. Además, se realizó una evaluación cualitativa del callo en cuanto a color (amarillo, crema y blanco) y consistencia (compacto, friable y esponjoso).

Dinámica del crecimiento de los callos potencialmente embriogénicos

Se realizaron muestreos de los callos a partir de los 20 hasta los 40 días, y se evaluó el porcentaje de ca-

llos potencialmente embriogénicos determinando el momento óptimo de efectuar el subcultivo de los mismos, para lo cual se determinó inicialmente el peso del explante de limbo foliar (1 cm²) y se llevó a cabo la pesada (g) cada dos días, tomando en cada muestreo tres callos al azar.

Los datos obtenidos en la formación de callos, pertenecientes al grado 3 de la escala propuesta por Santana (1982), fueron procesados mediante un análisis de comparación de proporciones. Por otro lado, los resultados obtenidos en la dinámica del crecimiento de los callos se ajustaron a la función matemática a través del programa SigmaPlot 2000.

Resultados y discusión

Estudio del limbo foliar en la formación de callos potencialmente embriogénicos

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con el empleo de diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento, donde el medio con 2,4-D (0,50 mg/L¹) y 6-BAP (0,25 mg/L¹) resultó superior en la formación de callos desde el punto de vista cuantitativo (total de callos formados) con valores de 100% y cualitativo (callos potencialmente embriogénicos), con valores entre 90,0 y 96,0%, formándose callos pertenecientes al grado 3, de color crema y amarillo, nodulares y friables (figura 1), existiendo diferencias significativas con los demás tratamientos evaluados; el resultado alcanzado indicó el efecto positivo del 2,4-D y el 6-BAP en el indicador evaluado.

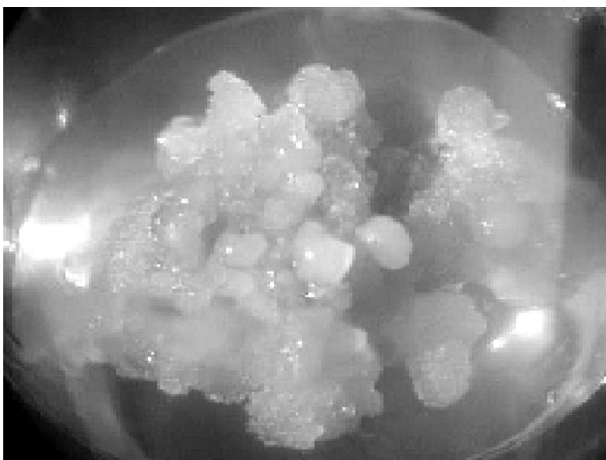


Figura 1. Callos potencialmente embriogénicos de color crema y amarillo, nodulares y friables. Genotipo evaluado: clon Inivit B 93-1.

Según Benavides (2008), existen varios trabajos investigativos del cultivo del camote o las batatas a partir del empleo de diferentes explantes en la formación de callos potencialmente embriogénicos, entre los que se encuentran los limbos foliares y existe una gran dependencia del genotipo utilizado en la respuesta encontrada.

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y 6-BAP en la formación de callos potencialmente embriogénicos

Composición del medio de cultivo	Formación de callos de grado 3 (%) Genotipo evaluado: clon Inivit B 93-1	
	TCF	CPE
2,4-D 6-BAP (mg/L ¹)		
0,25 0,25	100,0 a	70,0 c
0,50 0,25	100,0 a	100 a
1,0 0,25	100,0 a	90,0 bc
2,0 0,25	100,0 a	90,0 b
2,5 0,25	100,0 a	64,0 f
0,25 0,50	100 a	90,0 b
0,50 0,50	94,0 b	90,0 b
1,0 0,50	100,0 a	78,0 d
2,0 0,50	100,0 a	90,0 b
2,5 0,50	96,0 b	84,0 c
0,25 1,0	100,0 a	90,0 b
0,50 1,0	100,0 a	84,0 c
1,0 1,0	88,0 c	80,0 d
2,0 1,0	100,0 a	70,0 e
2,5 1,0	100,0 a	54,0 g
F	4,12 ***	5,42 ***

Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí según la prueba de Duncan, $p < 0,05$. TCF: total de callos formados. CPE: callos potencialmente embriogénicos.

Aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre la concentración antes mencionada y algunas de las restantes concentraciones empleadas, sí se apreciaron diferencias en las características morfológicas en los callos formados.

El hecho de que haya existido un comportamiento diferente en las características morfológicas de los callos puede estar dado por el balance de los reguladores del crecimiento empleados, que a pesar de favorecer la formación de callos de grado 3 de manera similar en el material vegetal en algunos medios evaluados, difieren en sus características morfológicas que se encuentran íntimamente relacionadas con la composición celular de los mismos y esto a su vez influye en su capacidad morfogénica.

Al respecto, García (1998) señaló la importancia del balance hormonal en los medios de cultivo para la formación de callos, planteando que la obtención de un medio de cultivo óptimo requiere de mayor profundidad en las investigaciones para que los análisis cuantitativos y cualitativos contribuyan de forma esclarecedora en la mejor interpretación de los resultados, enfatizando que diversos autores han realizado estudios en la formación de callos en diferentes cultivos de interés.

Trabajos relacionados con la composición del medio de cultivo han sido abordados por Santana (1982) en el cultivo del café (*Coffea* sp), señalando que la acción del 2,4-D en la formación de callos fue nula al ser empleado de manera independiente en el medio de cultivo, pero al ser combinado con 6-BAP, esta fue posible. Mientras, que Collado *et al.* (2005), indicaron que no sólo el 2,4-D combinado con una citoquinina juega un papel importante en la formación de callos; sino que influye en las características de los mismos. Por otra parte, Capote *et al.* (2000) plantearon que cuando se analiza la respuesta en el crecimiento, se observa que la adición de 2,4-D, combinado con una citoquinina, estimula la formación de callos.

Según González (2003), el balance de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, en especial el tipo y la concentración, pueden llegar a determinar las características de los callos en el proceso embriogénico, siendo el resultado de un adecuado balance de los reguladores del crecimiento, donde pueden formarse gran cantidad de callos con el empleo de diversas combinaciones y éstos diferir en sus características morfológicas, lo cual determina posteriormente la formación de los embriones somáticos; mientras que su presencia y concentración se encuentran en dependencia del tipo de tejido y del genotipo donante, de

ahí la importancia del material vegetal estudiado (Santana *et al.*, 1998).

Un comportamiento similar con relación al balance de los reguladores del crecimiento en respuesta a la calogénesis fue observado por García y Menéndez (1987), para conocer los requerimientos de la embriogénesis somática a partir de callos en *Coffea arabica*, diseñando experimentos con combinaciones de 2,4-D y AIB con cinetina y 6-BAP, encontrando que se formaron gran cantidad de callos en diversas de estas combinaciones y solo con el empleo del 2,4-D (1,0 mg/L⁻¹) y 6-BAP (0,8 mg/L⁻¹) se favoreció la formación de callos potencialmente embriogénicos.

García *et al.* (2002), plantearon que resulta indiscutible que el manejo de los reguladores del crecimiento constituye un factor fundamental en los sistemas *in vitro*. Sin embargo, también es necesario conocer la acción que dichos reguladores ejercen a diferentes niveles, así como su interrelación con el complejo hormonal endógeno del explante que sin dudas es muy diferente a la planta en condiciones naturales, pues no existe una regulación centralizada y organizada (Piferrer *et al.*, 2001).

Dinámica del crecimiento de los callos potencialmente embriogénicos

Al analizar el efecto de la edad del callo en las características morfológicas de los mismos se encontró que el momento óptimo para realizar el subcultivo de estos se encuentra entre los 28 y 32 días (tabla 2), mostrando un color crema y amarillo, nodulares y friables, características coincidentes con las señaladas por Jarret (1989) y Cantliffe (1993) en la formación de callos en la especie objeto de estudio en el presente trabajo. Antes de este momento los callos presentaban un color amarillo y eran compactos, lo cual demuestra que requieren de un tiempo más prolongado en el medio de cultivo para expresar las características morfológicas relacionadas con los procesos morfogénicos.

El análisis del crecimiento de los callos ha sido utilizado para evaluar el comportamiento de los mismos, a través de los cuales se explica la acción del empleo de los reguladores del crecimiento, lo que abre nuevas vías para el establecimiento *in vitro* de estos procesos. Al respecto, la edad del callo constituye un aspecto de gran importancia en el proceso de calogénesis en las diferentes especies vegetales, ya que el tiempo de permanencia en el medio de cultivo define el posterior comportamiento de estos (García, 1998).

Tabla 2. Características del callo potencialmente embriogénico en diferentes edades. Genotipo evaluado: clon Inivit B 93-1

Edad del callo	Características de los callos formados				
	Días	Callos formados	Color	Nodular	Friable
20	+	Amarillo	-	-	*
22	+	Amarillo	-	-	*
24	++	Amarillo	*	-	*
26	++	Amarillo	*	-	*
28	+++	Crema y Amarillo	**	**	-
30	+++	Crema y Amarillo	**	**	-
32	+++	Crema y Amarillo	**	**	-
34	+++	Crema y Amarillo	*	*	-
36	+++	Crema y Amarillo	*	*	-
38	+++	Crema y Oscuro	*	-	*
40	+++	Crema y Oscuro	*	-	*

Cantidad de callos formados: nodular, friable, compacto.
 (-): No formación. (-): No nodular. (-): No friable. (-): No compacto
 (+): Ligera formación. (*): Poco nodular. (*): Poco friable. (*): Compacto.
 (++) : Media formación. (**): Nodular. (**): Friable.
 (+++): Abundante formación.

Los resultados obtenidos señalan que en las condiciones experimentales descritas, el momento adecuado para el subcultivo de los callos al medio de formación de embriones somáticos estuvo comprendido entre los 28 y 32 días. Hasta los 36 días los callos mantuvieron el color crema y amarillo, pero menos friables y nodulares, y posteriormente alcanzaron un color crema y oscuro, lo cual indica la pérdida de potencialidades embriogénicas en los mismos.

De los resultados mostrados anteriormente se infiere que el estudio de la edad del callo resulta de gran importancia ya que determina el momento en el que este requiere ser subcultivado en el medio inductor de embriones somáticos, porque conjuntamente con el tiempo de sembrado y los estudios morfológicos analizados pueden constituir un marcador visual de gran utilidad práctica para determinar el momento del subcultivo de los mismos con la mayor eficiencia posible.

Los resultados obtenidos permiten señalar que es evidente la marcada influencia que ejerce la composición hormonal endógena del explante empleado y los reguladores en el medio de cultivo en el crecimiento de la masa fresca de los callos, reflejado en la edad de los

mismos y se manifiesta en las diferentes características morfológicas, sirviendo de base para estudios en la dinámica del crecimiento de los callos al evaluar su comportamiento en el medio de cultivo durante la formación, y constituye a su vez un importante indicador del potencial embriogénico ya que a partir de estos se originan los embriones somáticos los cuales, según Lee (2010), en determinadas especies vegetales, como la batata o boniato, resultan de gran importancia para su propagación.

En la figura 2 se muestra la dinámica del crecimiento de los callos, desde el momento de efectuada la siembra de los explantes, hasta los 87 días, y se observa que al determinar el crecimiento, mediante el comportamiento biológico descrito por los mismos, se obtuvo una curva semejante a la de otras especies, en la que se distinguen tres fases: período inicial o de latencia, el cual tuvo una duración de siete días, caracterizándose por un crecimiento lento dado que el explante se encuentra en un proceso de adaptación a las condiciones de cultivo *in vitro*, y se determinó el comportamiento biológico en el crecimiento de los callos en función de la masa fresca; la decisión de realizar posteriormente el subcultivo para la formación de

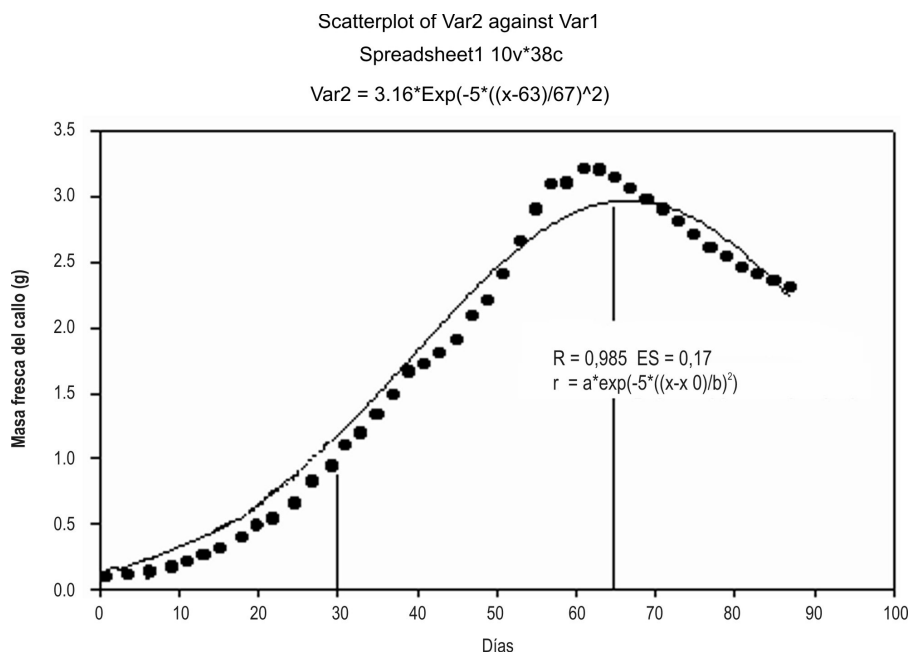


Figura 2. Dinámica del crecimiento de los callos potencialmente embriogénicos. Genotipo evaluado: clon Inivit B 93-1.

los embriones somáticos se tomó sobre la base del tiempo y las características morfológicas de los callos en el proceso de crecimiento.

A partir de los ocho días se inició la fase de crecimiento exponencial hasta aproximadamente los 30 días, donde se produjo un aumento acelerado en la masa fresca y el volumen de los callos. A partir de los 30 hasta los 65 días se presentó una fase de crecimiento lineal. Después de los 66 días, el crecimiento de la masa callógena cesó y comenzó el necrosado y la senescencia del callo, y se produjo un decrecimiento brusco en la masa fresca a partir de este momento, lo cual pudo ser causado por el agotamiento de los nutrientes y el agua como constituyentes del medio de cultivo; se muestra la curva de crecimiento ajustada para tener una referencia del comportamiento de la masa fresca de los callos según la aplicación de un modelo matemático que permite valorar y correlacionar el crecimiento de los mismos en correspondencia con su comportamiento biológico. Los resultados citados demuestran que es posible relacionar el desarrollo de los callos (momento de la curva) con el ajuste matemático realizado, a partir de lo cual se infiere que a los 30 días de formados los callos, en este momento coincidió con la máxima intensidad de crecimiento de los mismos, reflejada en el inicio de la fase de crecimiento lineal según el ajuste matemático.

En este sentido, es bueno destacar que la curva obtenida se ajusta en gran medida a la curva sigmoide característica del crecimiento, mediante la cual puede ser evaluado el mismo. Por otra parte, los estudios de los callos como material vegetal de partida permiten conocer, a partir de las especies estudiadas, la información que las mismas ofrecen de su composición celular específica, crecimiento, morfología, características y actividad, lo cual puede ser empleado en futuros estudios ofreciendo posibles vías y soluciones que permitan la protección, conservación y estudio de la biodiversidad.

Los resultados logrados en el presente trabajo demuestran que a los 30 días los callos con potencialidades embriogénicas alcanzaron un desarrollo que les permitió expresar características morfológicas favorables para la formación futura de los embriones somáticos, según lo descrito por Cantliffe (1993), las cuales persisten hasta los 32 días del cultivo; además, la curva de la ecuación matemática ajustada coincidió con el momento de máxima intensidad del crecimiento de los callos, lo cual sugiere que existe la posibilidad de que teóricamente este constituye el momento óptimo para realizar el subcultivo de los mismos y el punto preciso para cambiar de medio de cultivo, con la finalidad de llevar a cabo la formación de los embriones somáticos, alcanzando la máxima masa de crecimiento de los callos a los 66 días, y no presentaron características morfológicas favorables para formar posteriormen-

te los embriones somáticos, momento en que el callo ha completado su desarrollo. Al respecto, es necesario señalar que, según García (1998), se requiere ganar claridad entre los aspectos cuantitativos (ganancia en masa fresca) y cualitativos (características morfológicas), pues el resultado en la formación de callos potencialmente embriogénicos depende de ellos.

Es por esto que esta investigación sirve de base a los estudios que se realizan para evaluar el comportamiento del material vegetal en condiciones naturales, y los mismos no pueden ser observados en esas condiciones y se requiere de estudios de laboratorios. En este sentido, la callogénesis puede desarrollar un papel importante porque permite conocer la composición celular y el comportamiento morfológico de los materiales estudiados.

En el cultivo del boniato, con el empleo de la callogénesis, se abren nuevas áreas para la investigación científica y el estudio de la biodiversidad vegetal, representando una herramienta de gran utilidad para el estudio y la multiplicación de especies de interés, siendo un aspecto de gran importancia en la agricultura moderna. Con el presente trabajo como referencia, se puede estudiar el comportamiento de las especies en la fase de callogénesis, garantizando así la eficiencia en esta etapa del proceso, que a la vez se revierte en fundamento científico basado en optimización del tiempo. Los resultados anteriores demuestran que el proceso de formación de callos es de gran importancia, y su aplicación resulta de interés en los programas de investigación en la rama biotecnológica, constituyendo una herramienta para monitorear el comportamiento del material vegetal.

El comportamiento del programa de desarrollo de la biotecnología vegetal en Cuba muestra resultados positivos, teniendo presentes los logros alcanzados en cultivos de interés agrícola, ornamental, de plantas medicinales y de alimentación animal, satisfaciendo sus intereses, necesidades y posibilidades en la mayoría de los casos; según Mustelier (2007), en el desarrollo de las investigaciones científicas se deben conseguir resultados en el plano instructivo y formativo, lo que se logra fundamentalmente con la aplicación del pensamiento, y el conocimiento científico y tecnológico para enfrentar determinadas situaciones.

Conclusiones

Los mejores resultados en la formación de callos potencialmente embriogénicos, a partir del limbo foliar,

se obtuvieron con el empleo de 2,4-D (0,50 mg/L⁻¹) y 6-BAP (0,25 mg/L⁻¹).

Los callos formados a los 28 y 32 días presentaron la mejor respuesta, expresada en el color, la textura y la nodulación de los mismos, destacándose los callos con esta edad como los más favorables para realizar el subcultivo y lograr posteriormente la formación de los embriones somáticos.

Agradecimientos

A los trabajadores del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana (INCA), en especial a los miembros del Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas, por las sugerencias realizadas en el tema y la ayuda brindada en la ejecución de este trabajo; a los miembros del Instituto Nacional de Viandas Tropicales (Inivit), Santo Domingo, Villa Clara, por el material suministrado y las sugerencias realizadas.

Referencias bibliográficas

- Arencibia, D. A., Cornide, M. T. 1999. Biodiversidad y biotecnología de la caña de azúcar. *Elfos*. La Habana, 168 p.
- Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: J. Pérez (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Cap. 5, Vol. I. IBP. Santa Clara. pp. 82-104.
- Benavides, J.R. 2008. Aplicación de técnicas biotecnológicas en camote: regeneración y transformación genética. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 3.
- Cantliffe, D. J. 1993. Somatic Embryos in Sweet Potato. En: W. A. Hill, C. K. Bonci y P. A. Loretan (eds.). *Sweetpotato Technology for the 21st Century*. Tuskegee. pp. 38-46.
- Capote A., Rodríguez Z. y Pérez O. 2000. Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa*, L.) cv Caribe-71 regeneradas *in vitro*. *Biotechnología Aplicada*, 17(4): 241-246.
- Collado, R., Barbon R., Agramonte, D., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., Rámirez, D. 2005. Diferenciación de embriones somáticos de *Switenia macrophylla* King en medio de cultivo semisólido. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible (BioVeg 2005). Centro de Bioplantas. Ciego de Ávila. CD-ROM. p. 24.
- Estuardo, A. S. 2008. Inducción de embriogénesis somática a partir de vitrosegmentos nodales y vitrolaminas foliares durante el establecimiento *in vitro* de camote (*Ipomoea batatas*). Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero agrónomo en el grado académico de Licenciatura. Zamorano. Honduras.
- García, E., Menéndez, A. 1987. Embriogénesis somática de explantes foliares de caféto "Catimor". *Café, Cacao, Thé* 31 (2): 15-21.

- García, L., Padrón, Y., Pérez, J., Bermúdez, C., Orellana, P., Veitia, R., Romero, C. 2002. Regeneración de plantas a partir de yemas adventicias en banano cv. gran enano (AAA). Jornada XXXV Aniversario del Inivit, Santo Domingo, Villa Clara.
- García, O. D. 1998. Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en caféto (*Coffea canephora* Pierre). Tesis de Maestría (Master en Biología Vegetal). INCA, La Habana.
- González, M. E. 2003. Micropropagación de caféto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agrícolas). INCA, La Habana.
- Jarret, R. L. 1989. Somatic Embryogenesis in Sweet Potato. *Hort-Science* 19: 397-398.
- Lee, L. H., Murguía, J. G., Laguna, A. C., García, B. R., Gámez, M. R., Galindo et al. 2010. Desarrollo de semillas artificiales. *Chapingo Serie Horticultura*.
- López, J., Tórrez, M., Borroto, C., Trujillo, T., Daquinta, M., Gómez, R. et al. 2002. Metodología para la propagación *in vitro* del boniato. Jornada XXXV Aniversario del INIVIT, Santo Domingo, Villa Clara.
- Mustelier, F. C. 2007. Propuesta de sistema de conocimientos de la asignatura "Medicina Interna de la carrera de Medicina". Tesis para optar por el título de Máster en Educación Médica. Hospital Clínico-Quirúrgico "Celia Sánchez Manduley", Ciudad de Manzanillo, Provincia de Granma, Cuba.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantar* 15: 473-497.
- Santana, N. 1982. Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 4 (3): 35-40.
- Santana, N., Martínez, O., González, M. 1998. Embriogénesis somática en el cultivo del caféto (*Coffea arabica*). *Cultivos Tropicales* 10 (2): 36-43.
- Piferrer, A., Rosalez, Y., Reyes, Z. 2001. Descripción morfohistológica de la callogénesis en piña cabezona (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Taller Internacional de Biotecnología Vegetal (BioVeg 2001). Centro de Bioplantias. Ciego de Ávila.